

Serološke in funkcijske preiskave pri diagnosticiranju trombocitopenije, povzročene s heparinom (HIT)

Serological and functional tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia

Elvira Maličev, Tadeja Dovč-Drnovšek, Primož Rožman

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

Korespondenca/ Correspondence:

Elvira Maličev
elvira.malicev@ztm.si
01 5438 177

Ključne besede:

HIT, heparin, trombocitopenija, funkcijske preiskave, pretočna citometrija

Key words:

HIT, heparin, thrombocytopenia, functional assays, flow cytometer

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn 2012;
81: 149–58

Prispelo: 5. maj 2011,
Sprejeto: 3. okt. 2011

Izvleček

S heparinom povzročena trombocitopenija (*angl.* heparin induced thrombocytopenia, HIT) je imunska reakcija, ki se pojavi pri približno 3–5 % bolnikov, ki dobivajo heparin več kot 5 dni, in lahko vodi do arterijskih in venskih tromboz. Za pojav so ključna protitelesa razreda IgG, ki nastanejo kot odziv na komplekse trombocitni faktor 4/heparin. Posledica je povečana aktivacija trombocitov, njihovo pospešeno odstranjevanje in trombocitopenija. Nadaljevanje zdravljenja s heparinom ima lahko hude posledice, zato je za ustrezno nadomestno zdravljenje ključnega pomena hitro diagnosticiranje HIT. Diagnozo HIT postavimo na podlagi kliničnih podatkov ter seroloških in funkcijskih laboratorijskih preiskav. Serološka določitev protiteles proti kompleksom trombocitni faktor 4/heparin v serumu bolnika ni dovolj za potrditev diagnoze, saj tvorba protiteles ne povzroča vedno trombocitopenije ali tromboz. Ker z običajnimi encimsko-imunskimi testi odkrivamo le prisotnost protiteles, ne pa tudi njihove patogenosti, je priporočljivo, da diagnozo potrdimo še s funkcijsko preiskavo, pri kateri izmerimo dejansko sposobnost protiteles, da aktivirajo oziroma agregirajo testne trombocite. Ena od sodobnejših funkcijskih preiskav je analiza aktivacije testnih trombocitov, ki temelji na merjenju povečanega izražanja molekule P-selektin (CD62P) na trombocitih, ki jih izpostavimo bolnikovemu serumu s protitelesi HIT. Po naših izkušnjah je preiskava v kombinaciji s standardnimi serološkimi testi dovolj zanesljiva za diagnosticiranje klinične oblike HIT.

Abstract

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is an immune-mediated reaction occurring in 3–5 % of patients receiving heparin therapy for more than 5 days, which can lead to arterial and venous thrombosis. It is caused by IgG antibodies directed against platelet factor 4/heparin complexes, leading to platelet activation, platelet depletion and thrombocytopenia. Prolonged therapy with heparin can result in serious adverse consequences, so prompt diagnosis is of key importance for the introduction of supplemental therapy. The diagnosis of HIT is based on clinical criteria as well as on serological and functional laboratory assays. Serological assays that identify the presence of platelet factor 4/heparin antibodies in the serum are not sufficient for confirmation of diagnosis because all detected antibodies are not capable of causing thrombocytopenia and thrombosis. Since the usual enzyme-immune assays detect the presence of antibodies but not also their pathogenicity it is recommended to confirm HIT with a functional assay that confirms the capacity of HIT antibodies to activate or aggregate platelets. One of newer functional methods is the flow cytometric analysis of P-selectin (CD62P) expression on the standard platelets after exposure to the patient's serum. In our experience, this test, in parallel with standard serological tests, proved its reliability for the confirmation of clinical HIT diagnosis.

Uvod

Heparin so kot antikoagulantno zdravilo poznali že pred 90 leti, vendar so šele po 40 letih uporabe opazili, da ima lahko včasih tudi paradokсне, tj. protrombotične učinke. Tako so leta 1973 prvič opisali primer bolnikov, ki so imeli trombocitopenijo in hkrati trombozo kot posledico zdravljenja s heparinom.¹

S heparinom povzročena trombocitopenija (*angl.* heparin-induced thrombocytopenia, HIT) je najpogostejša trombocitopenija, ki jo povzročajo zdravila. Gre za imunsko reakcijo na zdravilo heparin ali njemu podobne molekule. HIT najpogostejše nastane po uporabi nefrakcioniranega heparina. Pojavi se pri približno 3–5 % bolnikov, ki prejemajo heparin več kot 5 dni. Redkeje, pri 0,5 % bolnikov, pa se HIT pojavi po uporabi nizkomolekularnih heparinov ali heparinu podobnih zdravil. Za HIT je značilno hitro znižanje števila trombocitov in njihov porast v nekaj dneh po ukinitvi heparina. Navadno število trombocitov pade na 50 % prvotne vrednosti med 5 in 10 dnem po izpostavitvi heparinu in se po ukinitvi heparina v 4–14 dneh dvigne. Redkeje se HIT pojavi po 10. dnevu zdravljenja s heparinom. Pri bolnikih, ki so v zadnjih 3 mesecih že prejeli heparin, lahko pride do takojšnjega upada števila trombocitov zaradi že prisotnih heparinskih protiteles.^{2–5}

Zaradi spremljajočega aktiviranja trombocitov se lahko pojavljajo različni trombotični zapleti, ki imajo tudi relativno visoko smrtnost (do 15 %). Najpogostejši klinični znak HIT je povečanje že prej ugotovljenih strdkov ali nastanek novih strdkov v ožilju. Ti lahko nastanejo v arterijah in venah; prvi povzročijo kap, infarkt miokarda in akutno ishemijo udov, drugi pa trombozo globokih ven ali pljučno embolijo. Venske tromboze pri HIT so približno 4-krat pogostejše od arterijskih.^{2,4,6,7}

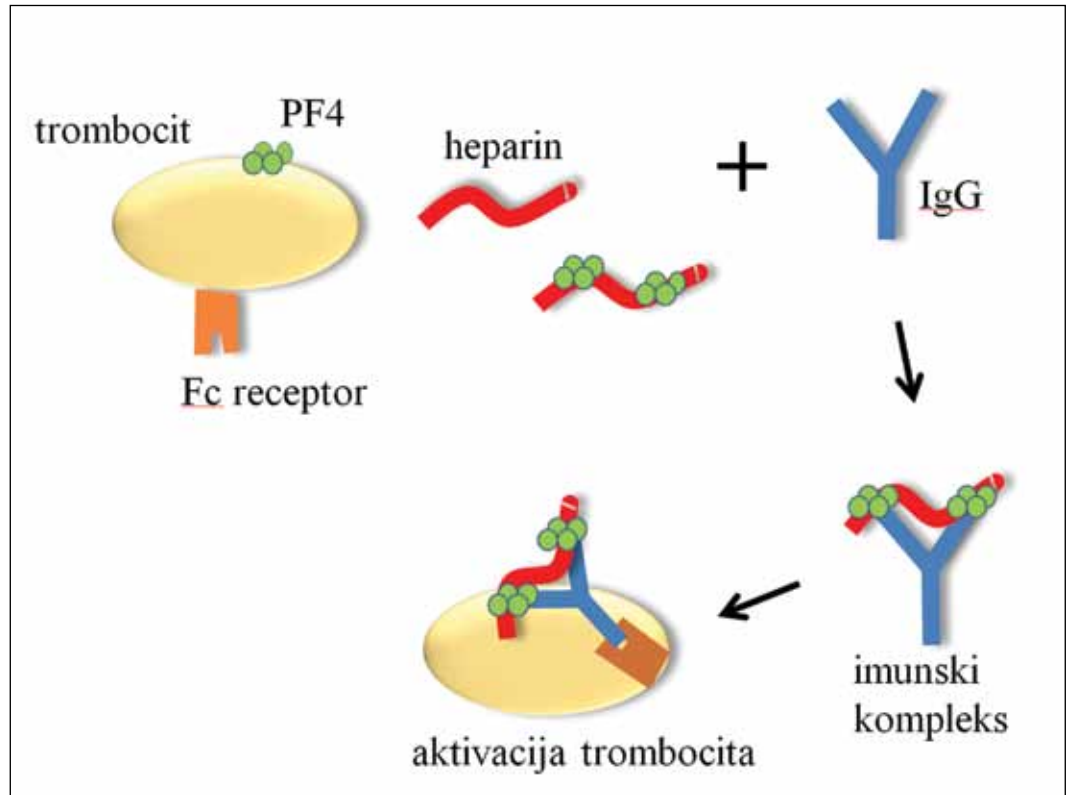
Verižno reakcijo, ki vodi do nastanka HIT, sproži kompleks heparina s trombocitnim faktorjem 4 (*angl.* platelet factor 4, PF4), ki ga ob aktiviranju sproščajo trombociti. Ta kompleks se nahaja v plazmi, pa tudi na membrani trombocitov. Ob vezavi s heparinom pride tudi do določene kon-

formacijske spremembe molekule PF4, kar povzroči nastanek t. i. nepoznanega neoantigena, ki je za nekatere bolnike imunogen. Imunski odziv takega bolnika na kompleks PF4/heparin se prične s tvorbo protiteles razreda IgM, kasneje pa jim sledi tvorba protiteles razreda IgG.^{7–10} Protitelesa proti kompleksu PF4/heparin se vežejo na ta kompleks na trombocitih in v plazmi s svojo regijo Fab, z regijo Fc pa se vežejo na receptorje Fc na površini istega ali sosednjih trombocitov (Slika 1). Receptorji Fc na trombocitih so vrste FcγIIa. To so nizkoafinitetni receptorji, na vsakem trombocitu pa jih je med 1000 in 2000. Vezava sproži dodatno aktiviranje in agregacijo trombocitov, ki ob aktiviranju pospešeno sproščajo nove količine PF4 in protrombotične dejavnike, kar sproži celoten kaskadni koagulacijski sistem in pospeši nastajanje trombina. Posledica vezave protiteles na receptorje Fc na trombocitih je tudi njihovo pospešeno odstranjevanje, ki poteka večinoma v vranici. Obseg tromboz po vezavi protiteles HIT na komplekse PF4/heparin je zelo težko oceniti. Zdi se, da jih pospešujejo tudi številni trombocitni mikrodelci velikosti 0,1–1,0 μm, ki nastanejo z aktiviranjem trombocitov in delujejo prokoagulantno.^{12,13} Protitelesa oz. kompleksi se vežejo tudi na endotelne celice in povzročijo njihovo aktiviranje, kar pospešuje sistemski odziv in multiple tromboze. Izjemno redko nastanejo avtoimunska protitelesa proti-PF4 tudi spontano; opazili so jih pri nekaterih bolnikih s trombozami in stanji, podobnimi HIT, pri čemer niso nikoli dobivali heparina.^{14,15}

Heparin in trombocitni faktor PF4

Heparin je po svoji strukturi ena najbolj nenavadnih molekul, ki jih uporabljamo za zdravljenje. Gre za naravni ogljikohidratni polimer iz skupine glikozaminoglikanov, sestavljen iz ponavljajočih se disaharidnih enot, ki so močno sulfatirane (Slika 2). Je najmočnejše negativno nabita molekula od vseh poznanih bioloških molekul. Izločajo ga bazofilci in mastociti iz svojih sekretornih granul, pri čemer je njegova fiziološka vloga predvsem obramba pred mikroorganizmi, manj pa opravlja funkcijo antikoagulantna. To vlogo v organizmu opravlja sorodna mo-

Slika 1: Shematski prikaz razvoja HIT.



lekula – heparan sulfat, ki je manj sulfatiran. Kot antikoagulant uporabljajo heparin v medicini in farmaciji od 30. let prejšnjega stoletja dalje, izdelujejo pa ga iz mukoznih tkiv prašičev in goveda. Heparin in njegovi številni nizkomolekularni derivati so učinkoviti pri preprečevanju globokih venskih tromboz in pljučnih embolij, ker inhibirajo delovanje faktorjev strjevanja krvi, serinskih proteaz XIa, Xa, IXa in IIa (trombin). To dosegajo neposredno ali posredno preko ojačitve delovanja inhibitorja strjevanja krvi antitrombina III, na katerega se heparin specifično veže in do 1000-krat poveča njegovo aktivnost. Na tak način bistveno zavre nastajanje strdkov. Hkrati z vezavo na trombin zavre tudi aktiviranje trombocitov.^{14,15} Heparin je še vedno nepogrešljiv zaradi enostavne uporabe, kratke razpolovne dobe in nizke cene.¹

V zadnjem času vse več uporabljamo analoge, še posebno nizkomolekularne oblike heparina, ki bolj kot na aktivnost antitrombina delujejo na aktivnost faktorja X. Tako bolj natančno urejujejo strjevanje krvi, hkrati pa povzročajo tudi 10-krat manj primerov HIT. Podobno deluje zdravilo fondaparinux, ki je umetni pentasaharid in je po-

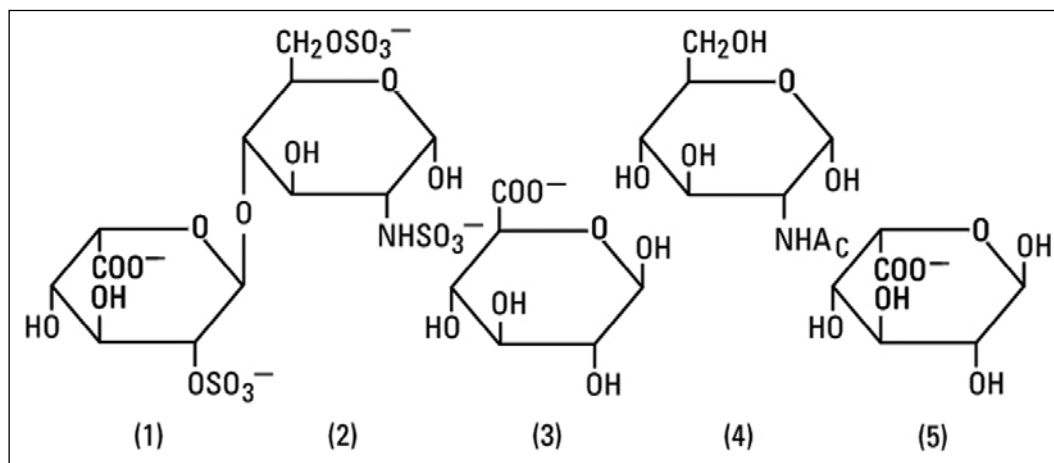
doben tistemu delu polimernega heparina, ki se veže na antitrombin in ojačuje njegovo antikoagulantno delovanje.¹

Trombocitni faktor 4 (PF4) je majhna tetramerna molekula, dolga 70 AK. Je citokin iz skupine kemokinov CXCL4 in je shranjen v α -granulah trombocitov ter se izloči ob njihovi aktivaciji. Nato se veže na heparin in njemu podobne molekule, s čimer ureja njihovo delovanje, predvsem zmanjšuje prevelik vpliv antitrombina, in vpliva na celjenje ran ter zmanjšuje vnetne reakcije na endotelu. Nastali kompleks PF4/heparin vsebuje tudi neoantigen, na katerega se vežejo protitelesa HIT, ki jih tvorijo določeni bolniki. Zakaj je ta neoantigen imunogen le za določene posameznike, še ni raziskano. PF4 se veže tudi na endotelne celice, ki tako lahko postanejo antigensko pozitivne.¹⁷

Laboratorijsko diagnosticiranje hit

Diagnozo HIT postavimo na podlagi kliničnih podatkov in izsledkov laboratorijskih preiskav. Ob sumu na HIT najprej ocenimo verjetnost za nastanek HIT s pomočjo točkovačnika *4T* (*angl.* thrombocytopenia,

Slika 2: Heparin – kemijska struktura.¹⁶



timing, thrombosis, absence of other explanations), ki so ga razvili prav za zgodnje odkrivanje HIT. Točkovni sistem 4T sešteva štiri glavne kazalce klinične oblike HIT, ki jih prikazujemo v Tabeli 1. Seštevek 6–8 točk pomeni veliko verjetnost za nastanek HIT, seštevek 3–5 točk srednjo verjetnost, seštevek 2 ali manj točk pa majhno verjetnost. Če pri bolniku s točkovnikom 4T ocenimo, da obstaja srednja ali velika verjetnost za HIT, nadaljujemo z ustreznimi laboratorijskimi preiskavami.^{5,21,22}

Avtorji priporočajo, da pri sumu na HIT takoj prenehamo uporabljati vse heparine ter heparinsko obdelane katetre in priprave. Odsvetujejo tudi transfuzijo trombocitnih pripravkov, ker lahko sprožijo trombozo. Podobno v akutni fazi HIT odsvetujejo uporabo kumarinskih pripravkov, npr. varfari-

na, ker lahko povzročijo nadaljevanje venske tromboze in gangreno udov. Uporabljamo jih lahko šele potem, ko število trombocitov poraste nad $150 \times 10^9/L$. Vsekakor moramo pri sumu na HIT obvezno zamenjati antikoagulacijsko zdravljenje in uporabiti zdravila, ki inhibirajo nastanek trombina (neposredni ali posredni zaviralci trombina). Neposredni zaviralci trombina so npr. zdravilo lepirudin (rekombinantni analog hirudina iz medicinskih pijavk), argatroban (mala sintetična molekula) in bivalirudin (polisintetični analog hirudina, ki neposredno zavira učinek trombina). Posredni zaviralci pa zavirajo faktor Xa; poznana sta danaparoid (mešanica antikoagulantnih glikozamoglikanov – heparan sulfata, dermatan sulfata in hondroitin sulfata) in fondaparinux.^{1,5,18} Zanimivo je tudi, da kljub prekinitvi zdra-

Tabela 1: Ocenjevanje verjetnosti za nastanek HIT – točkovnik 4T (prirejeno po Warkentin, 2004).²¹

	Predtestna verjetnost (točke): 6–8 velika, 4–5 srednja, 0–3 majhna		
Značilnosti	2	1	0
Trombocitopenija	> 50 % padec trombocitov ali št. trombocitov $< 20 \times 10^9/L$	30–50 % padec ali št. trombocitov $10–19 \times 10^9/L$	< 30 % padec ali št. trombocitov $< 10 \times 10^9/L$
Pojav trombocitopenije v dnevih (prvi dan prejema heparina je dan 0)	5–10, ali ≤ ob predhodni izpostavljenosti heparinu (30 dni)	> 10, ali < 1 ob nedavni izpostavljenosti heparinu (31–100 dni)	< 4 (brez predhodne izpostavljenosti heparinu)
Tromboza ali druge posledice	nove tromboze, kožne nekroze, akutna sistemska reakcija po intravenskem vbrizganju heparina	napredovanje ali ponovitve tromboze, eritematozne spremembe na koži, sum na trombozo	niso prisotni
Drugi vzroki za trombocitopenijo	niso prisotni	možni	prisotni

vljenja s heparinom pri približno 20–50 % bolnikov še vedno pride do določenih trombotičnih zapletov, in sicer ne glede na vrsto uporabljenega nadomestnega zdravljenja.¹⁹

Pri laboratorijskem diagnosticiranju ob sumu na HIT si pomagamo z dvema vrstama preiskav. To so serološke preiskave, s katerimi potrdimo prisotnost HIT-protiteles, in funkcijske preiskave, s katerimi ocenimo sposobnost protiteles, da aktivirajo trombocite. Protitelesa proti kompleksu PF₄/heparin sicer najdemo pri številnih bolnikih, ki prejemajo heparin, vendar pa se klinična slika HIT se razvije le pri redkih.²³ Serološke preiskave so torej občutljive, a premalo specifične. Zato so razvili dodatne funkcijske preiskave, ki imajo bistveno večjo specifičnost, a je njihova izvedba zahtevna, zanje pa potrebujemo sveže testne trombocite. Večina strokovnjakov poleg določitve prisotnosti od heparina izzvanih protiteles v serumu svetuje še, da opravimo enega od funkcijskih testov, s katerimi merimo sposobnost protiteles, da aktivirajo testne trombocite.^{24,25}

Obe preiskavi – serološka in funkcijska – postaneta po nekaj tednih ali mesecih negativni, ker protitelesa izginejo iz krvnega obtoka in jih z imunološkimi testi ni več mogoče dokazati. Zato na podlagi preiskav preboleli HIT težko diagnosticiramo.^{2,4} Za učinkovito diagnosticiranje moramo poznati značilnosti obeh preiskav in jih smiselno uporabljati. Značilnosti laboratorijskih preiskav pri sumu na HIT predstavljamo v Tabeli 2.

Eden izmed predlaganih modelov diagnosticiranja HIT prikazujemo na Sliki 3.

Serološke preiskave prisotnosti protiteles HIT

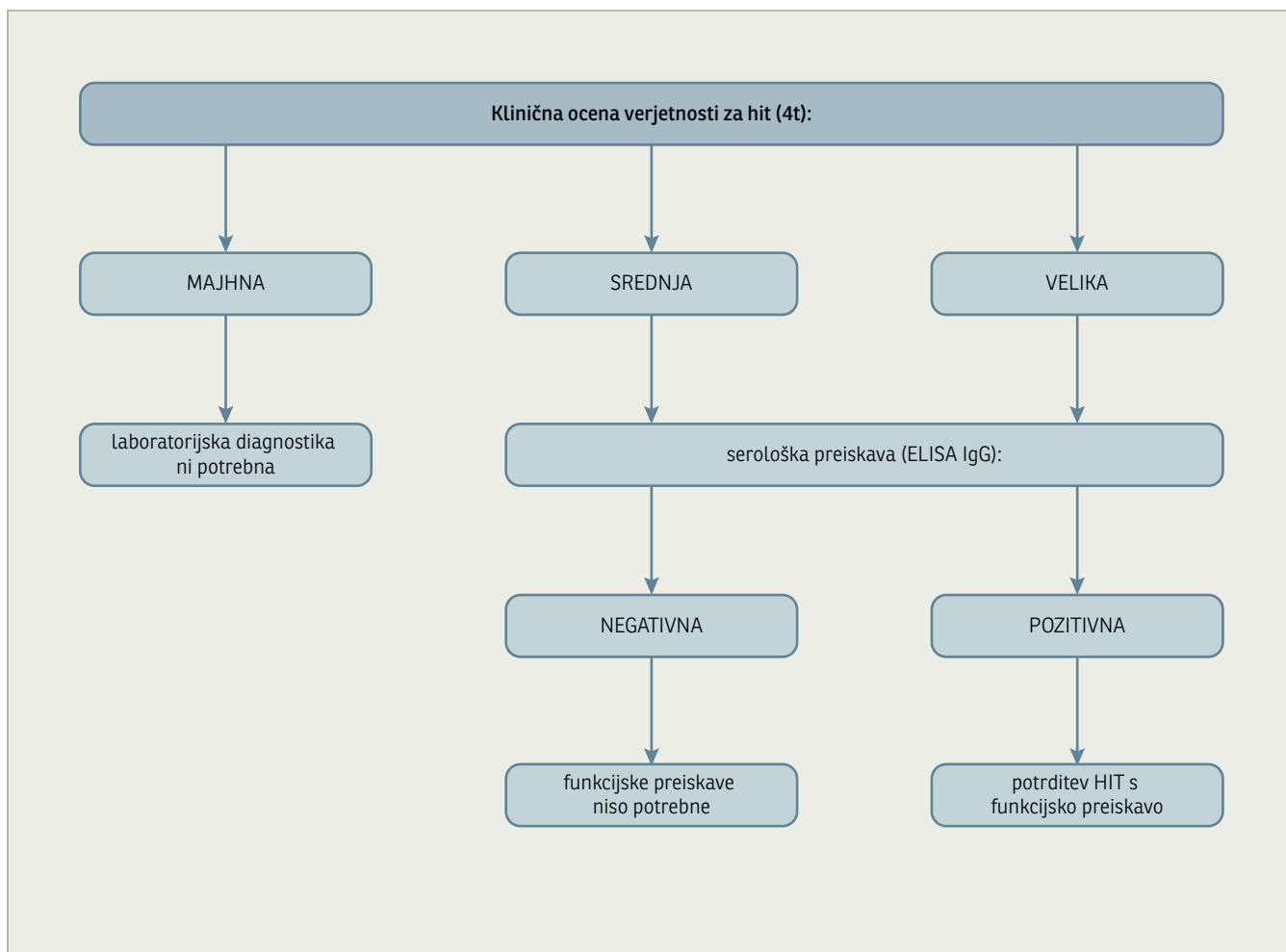
Od heparina izzvana protitelesa odkrivamo s poznanim antigenom. Pri tem si danes pomagamo s komercialno dostopnimi testi z umetnim antigenom PF₄/heparin, ki jih je najlažje standardizirati. Obstajata dve vrsti preiskav: preiskava ELISA in aglutinacijska preiskava.

a) Encimsko-imunski test s trdno fazo (*angl. solid-phase ELISA*)

V mikrotitrski vdolbinici je vezan kompleks PF₄ s heparinom ali polivinil sulfonatom, ki je heparinu podobna polimerna molekula. Ob dodatku bolnikovega seruma se morebitna protitelesa HIT vežejo na kompleks, nato pa jih potrdimo s sekundarnimi protitelesi anti-IgG, -IgM in -IgA, označenimi z encimom. Po dodatku kromogenega substrata s spektrofotometrom izmerimo spremembo barve in rezultat podamo z vrednostjo optične gostote (*angl. optical density, OD*). Vedno vzporedno izvedemo še t.i. potrditveni test, pri katerem testiranim vzorcem dodamo prebitek heparina, s čimer kompetitivno inhibiramo vezavo heparinskih protiteles na kompleks PF₄/heparin. Pri tem velja izkustveno pravilo, da mora pri prebitku heparina jakost reakcije pasti za več kot 50 %, če so v vzorcu dejansko prisotna protitelesa anti-PF₄/heparin. Test ELISA IgG/A/M je zelo občutljiv za določanje vseh razredov protiteles proti kompleksu PF₄/heparin, vendar je slabo specifičen. Občutljivost testa je 97–100 %, specifičnost pa med 46 in 86 %.^{25,26}

Tabela 2: Značilnosti laboratorijskih preiskav pri sumu na HIT.

Laboratorijske preiskave pri sumu na HIT	Značilnosti
Serološke – Odkrivanje protiteles HIT	visoko občutljive, nevarnost lažno pozitivnih rezultatov nizko specifične višje mejne vrednosti optične gostote (<i>angl. optical density, OD</i>) zvišajo specifičnost testa trajajo nekaj ur
Funkcijske – Določitev aktiviranja testnih trombocitov	visokoobčutljive visokospecifične tehnično zahtevne dolgotrajne



Slika 3: Diagnostični algoritem za HIT (prirejeno po Smock in Rodgers, 2009).³⁸

Greinacher s sod. je l. 2007 ugotovil, da rezultati testa ELISA IgG/A/M slabo sovpadajo z rezultati funkcijskega testa HIPA (*angl.* heparin-induced platelet activation assay), saj je bil pozitiven rezultat testov hkrati s potrjeno klinično obliko HIT prisoten pri samo 46,6 % bolnikov.²⁴ Zato meni, da je boljši test tisti, pri katerem določamo le protitelesa razreda IgG (ELISA IgG), in s katerim je bila skladnost večja, to je 54,8 %. Po drugi strani je Backhoul s sod. v študiji ugotovil, da je specifičnost takega testa 89 %, občutljivost pa 100 %.²⁵ Specifičnost encimske preiskave bi bilo mogoče povečati tudi z zvišanjem mejne vrednosti OD, saj so mejne vrednosti pri bolnikih s potrjeno diagnozo HIT višje, vendar bi se v tem primeru povečala verjetnost lažno negativnih rezultatov.^{27,28} Sklenemo torej lahko, da so imunsko-encimski testi zelo občutljivi, vendar dajo vsaj pri 10 % preiskovancev lažno pozitiven rezultat.

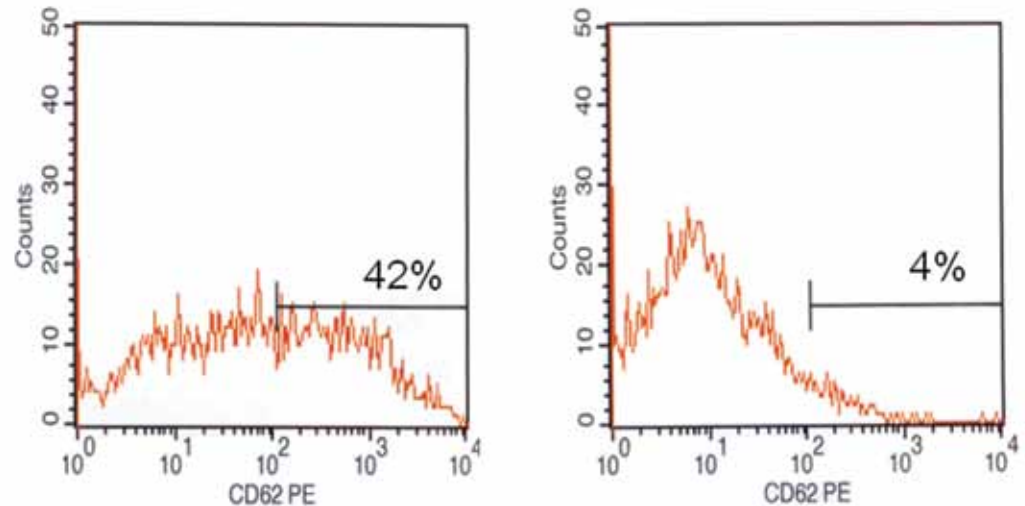
b) Aglutinacijski test z mikrodelci v gelu (*angl.* particle-gel immunoassay)

V kolonah z gelom so nanešeni obarvani polimerni delci, na katere so vezani antigeni kompleksi PF₄/heparin. Ob dodatku preiskovanega seruma se morebitno prisotna protitelesa vežejo na kompleks PF₄/heparin, polimerni delci v gelu pa aglutinirajo. Rezultate odčitamo s prostim očesom.^{25,29} Po nekaterih podatkih je specifičnost tega testa 87,8 %, občutljivost pa 94,2 %.²⁵

Funkcijske preiskave za potrditev HIT

Funkcijske preiskave za potrditev HIT temeljijo na določanju sposobnosti protiteles bolnika, da po vezavi na kompleks PF₄/heparin aktivirajo in kasneje tudi agregirajo testne trombocite. Te preiskave so zahtevnejše od seroloških in večinoma niso komercialno dostopne, trajajo dlje, za izvedbo pa potrebujemo sveže testne trombocite

Slika 4: Odkrivanje aktivacije trombocitov s pretočno citometrijo ob prisotnosti bolnikovega seruma (levo) ter inhibicija aktivacije ob prisotnosti bolnikovega seruma in visoki koncentraciji heparina (desno).



različnih zdravih darovalcev. Obstaja več različic te preiskave, ki se med seboj razlikujejo po tem, kateri parameter uporabimo za merjenje aktiviranja trombocitov.

Omenili smo že, da je aktiviranje trombocitov rezultat vezave kompleksov PF₄/heparin/IgG na receptor FcR na trombocitih, kar povzroči dodatno sproščanje α -granul, nastanek mikrodelcev trombocitov, spremembe v trombocitni membrani in trombocitno agregacijo. Za dokazovanje sposobnosti protiteles HIT za aktiviranje trombocitov uporabljamo več testov: test sproščanja serotonina (*angl.* SRA-14C-serotonin release assay), test s heparinom povzročene aktivacije trombocitov (*angl.* heparin-induced platelet-activation assay, HIPA), trombocitni agregacijski test (*angl.* platelet aggregation test, PAT) in določanje aktivacije trombocitov s pretočnim citometrom.^{3,5,24,30}

a) Test sproščanja serotonina (*angl.* Serotonin Release Assay, SRA)

Test sproščanja serotonina je najstarejši funkcijski test. Pri njem uporabimo standardne trombocite zdravih krvodajalcev. V α -granule trombocitov najprej vgradimo radioaktivni ¹⁴C-serotonin. Nato jim dodamo bolnikovo plazmo s heparinom v terapevtski koncentraciji, vzporedno pa še s heparinom v prebitku. Aktivacija trombocitov povzroči sproščanje radioaktivnega serotonina v supernatant, kjer ga izmerimo s števcem radioaktivnosti. Rezultat testa je pozitiven, če se pri vzorcih s terapevtsko koncentracijo heparina sprosti vsaj 20 % serotonina več kot

pri vzorcih s prebitkom heparina.^{31,32} Če je test pozitiven, je zelo velika tudi verjetnost, da ima bolnik HIT; test ima namreč visoko specifičnost in občutljivost (88–99 %).^{10,29} Slaba stran do testa pa je njegova dolgotrajnost in uporaba radioaktivnih izotopov, ki zahteva zapletene laboratorijske postopke in okolje.

b) Agregacijski test HIPA (*angl.* heparin-induced platelet aggregation)

Test HIPA temelji na oceni vidne agregacije trombocitov v mikrotitrski plošči. Trombocite štirih zdravih darovalcev posamično inkubiramo z bolnikovo plazmo ter heparinom v terapevtski koncentraciji in heparinom v prebitku. Raztopina je na začetku motna, ker so trombociti razpršeni v tekočini in lomijo svetlobo. Med inkubacijo raztopino mešamo z magnetnim mešalom. Test je pozitiven, če postane raztopina v vdolbinici s terapevtsko koncentracijo heparina prosojna pri vsaj dveh od štirih dajalčevih trombocitov, medtem ko raztopina v vdolbinicah s prebitkom heparina ostane motna. Prosojnost je znak, da so se trombociti aktivirali in agregirali, motnost pa pomeni, da so ostali neaktivirani in da prosto lebdijo v raztopini.^{25,31,33,34} Test ima podobno občutljivost in specifičnost kot test SRA.^{29,31,34}

c) Določanje aktivacije trombocitov s pretočno citometrijo

Pretočna citometrija je občutljiva metoda za analiziranje različnih celičnih populacij na osnovi njihovih morfoloških značilnosti ter izraženosti specifičnih molekul. Temelji na vezavi specifičnih ligandov (najpogostejše protiteles), označenih s fluorokromom na površinske ali znotrajcelične molekule. Prvi opisi testov za določitev HIT s pretočno citometrijo so iz leta 1997. Prvi komercialno dostopni protokol in reagenti pa so prišli na trg šele pred nekaj leti.

Pri funkcijski preiskavi testnim trombocitom ob dodatku preiskovanega seruma dodamo še heparin v terapevtski koncentraciji, vzporedno pa še heparin v prebitku. Testne trombocite po inkubaciji označimo s protitelesi proti glikoproteinom, ki jih izražajo vsi trombociti (npr. s protitelesi anti-CD61, ki označuje glikoprotein IIIa). Na membrani aktiviranih trombocitov pride do izražanja različnih molekul (povečata se npr. izražanje fosfatidil serina^{30,35,36} ali pa izražanje P-selektina (CD62P)).³⁷ Molekula CD62P je protein iz družine selektinov, ki se pri neaktiviranih trombocitih izraža na notranji strani membran α -granul. Aktiviranje trombocitov sproži degranulacijo α -granul, pri čemer se antigen CD62P izpostavi na površini trombocitov. Izpostavljene antigene na površini membrane trombocitov lahko označimo s protitelesi anti-CD62P, na katere je vezan fluorokrom, jakost imuno fluorescenca pa izmerimo na pretočnem citometru. Rezultat testa je pozitiven, če je izražanje CD62P v vzorcih s terapevtsko koncentracijo heparina vsaj za 20 % večja kot pri vzorcih s prebitkom heparina. Test s pretočno citometrijo ima specifičnost, ki je po naših izkušnjah primerljiva s testoma SRA in HIPA (arhiv Zavoda za transfuzijsko medicino). Tomer navaja, da ima preiskava s pretočno citometrijo 95-odstotno občutljivost in 100-odstotno specifičnost v primerjavi s preiskavo SRA.³⁰

Slika 4: Odkrivanje aktivacije trombocitov s pretočno citometrijo ob prisotnosti bolnikovega seruma (levo) ter inhibicija aktivacije ob prisotnosti bolnikovega seruma in visoki koncentraciji heparina (desno).

Razpravljanje

HIT se najpogostejše pojavlja pri kirurških bolnikih, največkrat pri ortopedskih bolnikih, redkeje pri pediatričnih bolnikih, bolnikih na hemodializi ter nosečnicah.^{10,39} Glede na različne okoliščine se klinična oblika HIT razvije samo pri približno 30 % bolnikov, ki imajo tudi sicer protitelesa HIT.¹ Pogostost je odvisna od imunogenosti uporabljenega heparina; kot vzrok prednjači nefrakcionirani heparin, približno 10-krat manj reakcij pa povzročajo nizkomolekularni heparini. Na nastanek HIT vplivajo še številne druge okoliščine, npr. odmerek uporabljenega heparina, stopnja izraženosti receptorjev Fc na makrofagih, spremljajoča vnetja, nepomičnost bolnika, predhodne gangrene, zdravljenje s kumarini, vstavljeni katetri itd.⁶

Za potrditev HIT in ustrezno nadomestno antikoagulantno zdravljenje moramo opraviti ustrezno klinično in laboratorijsko diagnosticiranje. Laboratorijske preiskave so potrebne v primeru, ko na podlagi kliničnih značilnosti in točkovanika 4T ocenimo, da obstaja srednja ali velika verjetnost za HIT. Sodobne serološke preiskave za odkrivanje protiteles proti kompleksom PF₄/heparin so sicer visoko občutljive, ne pa dovolj specifične za zanesljivo potrditev diagnoze. Zato izvajamo tudi dodatne funkcijske preiskave.

V Sloveniji laboratorijsko diagnosticiranje HIT trenutno opravljamo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino. S preiskavo ELISA dnevno določamo prisotnost HIT-protiteles razreda IgG v serumu preiskovancev in nato po potrebi opravimo še potrditveni funkcijski test, pri katerem trombocite analiziramo s pretočno citometrijo. Ker so funkcijske preiskave zapletene in ker zanje potrebujemo sveže trombocite 4 darovalcev s krvno skupino o, ki niso vedno na voljo, test izvajamo le enkrat tedensko, podobno kot drugi specializirani laboratoriji za preiskave trombocitov. V posebnih primerih, po dogovoru s kliničnim zdravnikom, pa lahko funkcijski test opravimo v najkrajšem možnem času.

Zaključek

Pri preiskavah na HIT priporočajo, da laboratorij, ki nima ustrezne opreme ali usposobljenega osebja za funkcijske preiskave, opravlja vsaj serološko testiranje, s katerim lahko zaznamo le protitelesa HIT razreda IgG, ker so protitelesa razredov IgM in IgA le redko klinično pomembna. V primeru, da je rezultat serološke preiskave negativen, so nadaljnje funkcijske preiskave smiselne le takrat, ko je klinična ocena verjetnosti za HIT velika.

Funkcijski test dokončno dokaže ali ovrže sposobnost protiteles HIT, da se vežejo na receptorje Fc in aktivirajo trombocite. Menimo, da je serološka potrditev protiteles HIT, podkrepljena s funkcijskim pretočnocitometričnim testom aktiviranja trombocitov, dovolj zanesljiva za zanesljivo diagnosticiranje klinične oblike HIT.

Literatura

1. Kelton JG, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective. *Blood* 2008; 112: 2607–16.
2. Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1286–92.
3. Warkentin TE, Heddle NM. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep* 2003; 2: 148–57.
4. Warkentin TE. Clinical picture of heparin-induced thrombocytopenia. Theodore E Warkentin and Andreas Greinacher eds. *Heparin-Induced Thrombocytopenia*. 3rd Ed. Marcel Dekker 2004: 53–106.
5. Kozak M, Dovč-Drnovšek T, Gmeiner-Stopar T. S heparinom povzročena trombocitopenija – HIT. *Zdrav Vest* 2008; 77: 239–45.
6. Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost*. 2005; Jul; 94(1): 132–5.
7. Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1995; 89: 431–9.
8. Tardy-Poncet B, Tardy B, Grelac F, Reynaud J, Mismetti P, Bertrand JC, Guyotat D. Pentosan polysulfate-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Am J Haematol* 1994; 45: 252–7.
9. Suh JS, Aster RH, Visentin GP. Antibodies from patients with heparin induced thrombocytopenia/thrombosis recognize different epitopes on heparin: platelet factor 4. *Blood* 1998; 91: 916–22.
10. Warkentin TE in Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment and prevention. *Chest* 2004; 126: 311–37S.
11. Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2000; 96:188–94.
12. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissoc AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1992; 68: 95–6.
13. Warkentin TE, Hayward CP, Boshkov LK, Santos AV, Sheppard JA, Bode AP, Kelton JG. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84: 3691–9.
14. Bjork I, Lindahl U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol Cell Biochem* 1982; 48: 161–82.
15. Chuang YJ, Swanson R. Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop sequence. Evidence for an exosite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. *J Biol Chem* 2001; 276: 14961–71.
16. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders, Pathophysiology, Pharmacology and

- Therapeutics. Edited by Gresele P, Page C, Fuster V, Vermeylen J. Cambridge University Press; 2002.
17. Warkentin TE, Makris M, Jay RM, Kelton JG. A spontaneous prothrombotic disorder resembling heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 2008; 121: 632–6.
18. Hirsh J, Heddle N, Kelton JG. Treatment of heparin-induced thrombocytopenia: a critical review. *Arch Intern Med*. 2004; Feb 23; 164: 361–9.
19. Warkentin TE. Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia—from purpura to thrombosis. *N Engl J Med*. 2007; Mar 1; 356: 891–3.
20. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management. *Circulation* 2004; 110: 454–8.
21. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759–65.
22. Levy JH, Hurstings M. Heparin-induced thrombocytopenia, a prothrombotic disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21: 65–88.
23. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P, Warkentin TE. 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; 8: 1666–73.
24. Backhoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJ. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1260–5.
25. Shaheed G, Malkovska V, Mendoza J, Patel M, Rees J, Wesley R, et al. PF4 ENHANCED assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in complex medical and surgical patients. *Crit Care Med* 2007; 35: 1691–5.
26. Zwicker JI, Uhl L, Huang WY, Shaz BH, Bauer KA. Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2133–7.
27. Altuntas F, Matevosyan K, Burner J, Shen YM, Sarode R. Higher optical density of an antigen assay predicts thrombosis in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2008; 80: 429–35.
28. Francis JL. A critical evaluation of assays for detecting antibodies to the heparin-PF4 complex. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 359–68.
29. Tomer A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1997; 98: 648–56.
30. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1986; 67: 27–30.
31. Kleinschmidt S, Seyfert UT. Heparin-associated thrombocytopenia (HAT)—still a diagnostic and therapeutic problem in clinical practice. *Angiology*. 1995; 46: 37–44.
32. Greinacher A. Heparin-associated thrombocytopenia. *Biomed Progr* 1994; 7: 53–6.
33. Prechel MM, Jeske WP, Walenga JM. Physiological changes in membrane-expressed platelet factor 4: implications in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* 2010; 125: 143–8.
34. Poley S, Mempel W. Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test. *Eur J Haematol* 2001; 66: 253–62.
35. Gobbi G, et al. New laboratory test in flow cytometry for the combined analysis of serologic and cellular parameters in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004; 58: 32–8.
36. Vitale M, Tazzari P, Ricci F, Mazza MA, Zauli G, Martini G, et al. Comparison between different laboratory tests for the detection and prevention of heparin-induced thrombocytopenia. *Cytometry* 2001; 15: 46: 290–5.
37. Smock JK, Rodgers MG. Heparin-Induced Thrombocytopenia. How Lab Results Contribute to Clinicopathologic Diagnosis. *Clinical Laboratory News* 2009; 35(5).
38. Arepally GA, Ortel TL. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2006; 355: 809–17.