

LABORDIAGNOSTIK BEI HEPARIN-INDUZIERTER THROMBOPENIE Typ 2 (HIT Typ 2)

Empfohlenes Vorgehen bei Verdacht auf HIT:

- 1) Den „4T-Score“ bestimmen, d.h. die **klinische** Wahrscheinlichkeit einschätzen, dass Heparin-induzierte, Plättchen-aktivierende Komplexe vorliegen: Bitte füllen Sie die auf Seite 3 bereitgestellte Tabelle gewissenhaft aus.
- 2) Anforderung zusammen mit Angabe des 4T-Scorewertes, online ("HIT-II-AK/PF4") oder auf Beleg.
- 3) Bei niedrigem 4T-Score (3 oder weniger Punkte): eine HIT-2 ist sehr unwahrscheinlich - Heparin weiter, Testergebnis abwarten.
- 4) Bei nicht niedrigem 4T-Score (d.h. 4 bis 8 Punkte): Heparin möglichst durch Alternative ersetzen z.B. Argatroban, Fondaparinux, Danaparoid, Lepirudin (event. Dabigatran oder Rivaroxaban); Reevaluierung der Therapie nach Vorliegen des HIT-Testergebnisses.
- 5) In Zweifelsfällen können weiterhelfen: Verlauf (Score, HIT-Test), Kontaktaufnahme mit dem Labor oder mit anderen Gerinnungsexperten.
- 6) Die aussagekräftigsten Labortests für HIT sind funktionelle Tests (SRA, HIPA) d.h. der Nachweis von Plättchen-aktivierenden Heparin-Protein-Komplexen. Die Durchführung ist nur in einzelnen hochspezialisierten auswärtigen Labors sinnvoll. Wir können gerne bei Organisation behilflich sein. Ansprechpartner sind Dr. Markus Anliker (DECT 82116) und Univ. Prof. Dr. Günter Weigel (DECT 82549).

Was unsere HIT-Tests messen:

Unsere HIT-Tests messen die Konzentration von Antikörpern, die gegen Heparin/Plättchenfaktor-4 gerichtet sind. Niedrige Konzentrationen berichten wir als „Negativ“, hohe als „Positiv“, und Werte im schmalen Graubereich als „Schwach Positiv“.

Was benötigen wir von Ihnen ?

1 x		Gerinnung Citrat 1:10	+	+ Online-Anforderung >HIT-II-AK/PF4 (AGM/G)< mit 4T-Scorewert (im Feld >4T-Scorewert< eintragen)
-----	---	--------------------------	---	---

Wie gehen wir vor ?

1) Probenannahme – Überprüfung der Vollständigkeit der Anforderung

Bei Eintreffen der Probe im Labor bis 10:00 Uhr vormittags erfolgt die Analyse am selben Tag. Bei späterem Eintreffen der Probe erfolgt die Bearbeitung am nächsten „Routine“ Arbeitstag d.h. Mo-Fr.

2) Zur Feststellung des Heparin Gehaltes in der eingesandeten Probe führen wir ein Screening auf anti Fxa durch: Wenn anti FXa >1 IU/ml: Verständigung des Einsenders und keine Durchführung der Antikörperbestimmung.

3) Wenn anti FXa ≤ 1 IU/ml: Zeitgleiche Durchführung des polyspezifischen IgGAM ELISA und des monospezifischen IgG ELISA. Zur Bestätigung der Heparinabhängigkeit der Antikörper wird ein sog. Heparin-Hemmtest durchgeführt.

Folgende ELISA Tests werden im ZIMCL verwendet:

- Zymutest HIA IgGAM Screening Test (Fa. Hyphen Biomed): Qualitativer Screening Test zum Nachweis Heparin-abhängiger Antikörper der Isotypen IgG, IgA, IgM. CE-IVD.
- Zymutest HIA IgG (Fa. Hyphen Biomed): Qualitativer ELISA zum Nachweis Heparin-abhängiger Antikörper vom Isotyp IgG. CE-IVD.
- Zum Nachweis der Heparinabhängigkeit der Antikörper wird die verdünnte Patientenprobe mit unfraktioniertem Heparin (Endkonzentration 2 IU/ml) vermischt und so in den Zymutest HIA IgG eingesetzt. Bei Vorliegen Heparin-abhängiger AK wird deren Anbindung an die Beschichtung der ELISA-Platte verhindert.

Aussagekraft:

1) Hohe Aussagekraft zum Ausschluss von HIT: Labor und Score

- Ein negatives Ergebnis unserer HIT-Tests zeigt eine sehr niedrige Wahrscheinlichkeit an, dass Heparin-abhängige, Plättchen-aktivierende Antikörper vorliegen (negativ prädiktiver Wert, NPV: ca. 99.5%)
- Eine ähnlich starke, ausschließende Aussage liefert der klinische HIT-Score („4T-Score“). Ein niedriger Score, d.h. Punktezahl nicht größer als 3, schließt eine HIT mit ähnlich hohem NPV (ca.99%) aus.

2) Eingeschränkte Aussagekraft für die Bestätigung von HIT-Verdacht:

- Ein positives Ergebnis mit unseren HIT-Tests reicht **nicht** aus, um verlässlich eine HIT zu diagnostizieren (positiv prädiktiver Wert, PPV: ca. 50%)
- Ein klinischer Score („4T-Score“) über 3 ist mit ähnlicher Aussagekraft verbunden; der PPV liegt zwischen 20 und 100%.

Auf den Seiten 4-10 dieses Rundschreibens finden Sie detaillierte Informationen zu HIT, die Bedeutung der diversen Testverfahren, Empfehlungen des ACCP, sowie Literaturangaben.



Univ. Prof. Dr. G. Weigel



Univ. Prof. Dr. C. Pechlaner



Univ. Prof. Dr. A. Griesmacher

Das HIT-Scoring System (4 T's)

Bitte bestimmen Sie den Score gewissenhaft!

Die 4 T's	2 Punkte	1 Punkt	0 Punkte	Score
Thrombopenie - Ausmaß (Ausgangswert ist der letzte Wert vor Beginn des Abfalls)	Abfall >50% und niedrigster Wert \geq 20000	Abfall 30-50%, oder niedrigster Wert 10000-19000	Abfall < 30%, oder niedrigster Wert < 10000	
Tag des Beginns des Thrombozyten-Abfalls Tag 0 = Beginn d. Heparintherapie	Eindeutig Tag 5-10, oder: Tag \leq 1 bei Heparintherapie innerhalb der letzten 30d	Tag >10, oder unsicher ob Tag 5-10, oder: Tag \leq 1 bei Heparintherapie innerhalb der letzten 30-90d	Tag <4 und keine rezente Heparintherapie	
Thrombosen oder andere Komplikationen	Gesicherte neue Thrombose, oder Hautnekrose, oder akute systemische Reaktion nach Heparinbolus	Rezidivierende oder progrediente Thrombose, oder lediglich Thrombose verdacht ohne Dg.-Sicherung, oder nicht-nekrotische Hautläsionen	Keine der angeführten Komplikationen	
Thrombopenie - andere (o_Ther) Ursachen als HIT-2 ?	Keine ersichtlich oder sehr unwahrscheinlich	Möglich, denkbar	Gesichert oder sehr wahrscheinlich	
			Summe der Zeilen 1-4	

Bitte den erhobenen 4T-Scorewert bei der Online-Anforderung im Feld >4T-Scorewert< eintragen bzw. bei Anforderung mittels Beleg am Beleg vermerken ! Danke.

RICHTLINIEN ZUR PRÄANALYTIK UND DIAGNOSTIK DER HEPARIN-INDUZIERTEN THROMBOPENIE Typ 2 (HIT Typ 2)

Definition:

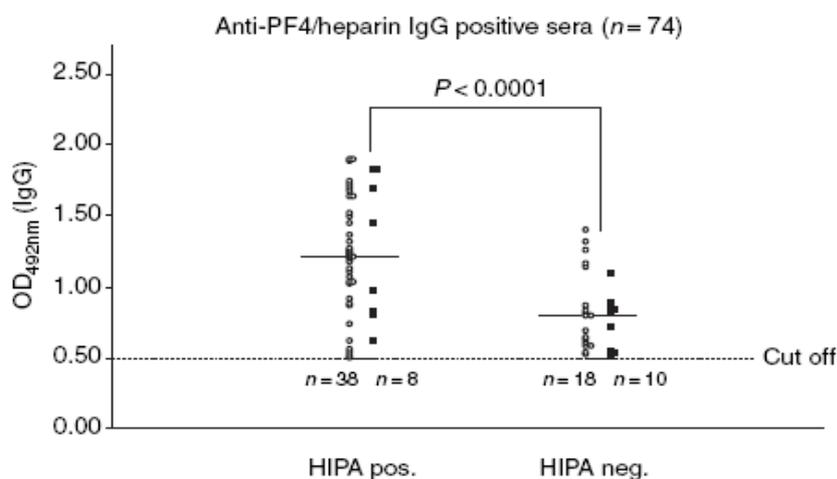
Heparin-abhängige Antikörper sind Immunglobuline, die im Plasma von Patienten mit Verdacht auf Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), Typ 2 vorkommen. **HIT, Typ 2**, die immunallergische Variante, tritt während einer Heparinbehandlung auf [1] und ist eine der wesentlichen Komplikationen dieser Therapie. In Gegensatz zur HIT Typ 2 manifestiert sich HIT Typ 1 bereits in den ersten Tagen einer Heparinbehandlung und ist durch einen mäßigen Thrombozytenabfall, welcher sich rasch und spontan zurückbildet, charakterisiert. Es handelt sich um eine direkte Thrombozytenaktivierung durch das Medikament, eine Therapie ist in der Regel nicht notwendig.

Pathomechanismus der HIT Typ II:

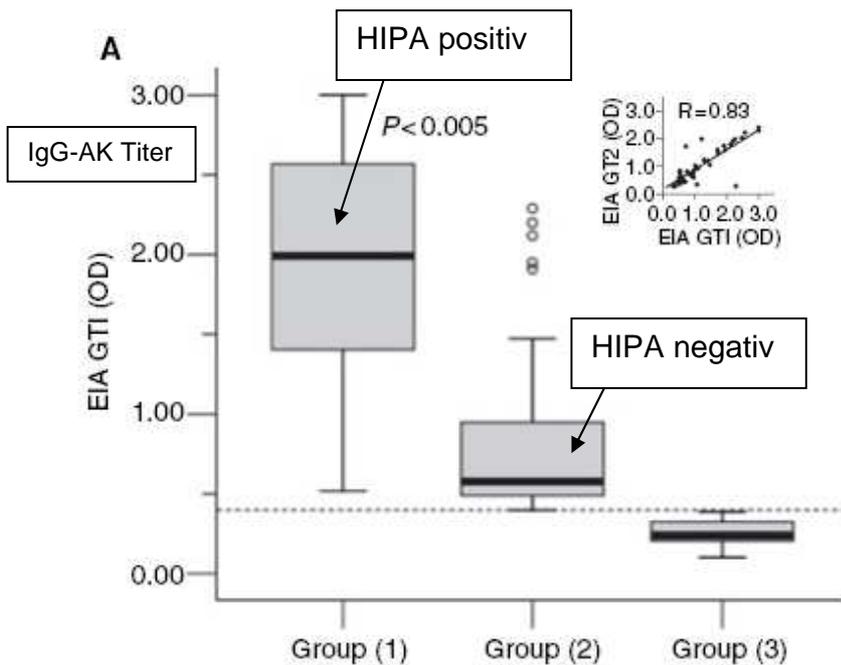
Grundlage der Erkrankung ist die Entwicklung von Antikörpern gegen makromolekulare Heparin-Protein-(in der Regel Plättchenfaktor 4 [PF4]) Komplexe [2-3]. Heparin geht auf Grund seiner negativen Ladung eine Bindung mit den aus Thrombozyten freigesetzten und stark positiv geladenen PF4 Molekülen ein, wodurch diese näher aneinander rücken sollen und antigen wirksam werden. Die HIT-Antikörper binden einerseits an den Heparin/PF4 Komplex und vernetzen andererseits mit ihrem Fc-Teil die FcγIIa-Rezeptoren an der Plättchenoberfläche, wodurch diese aktiviert werden.

Neben Antikörpern gegen PF4-Heparin wurden in einigen Patienten auch Antikörper gegen andere Chemokine wie *Neutrophil-Activating Peptide* (NAP2) und Interleukin-8 (IL-8) nachgewiesen [4]. Die Entwicklung einer Pathologie ist im Wesentlichen mit Heparin-abhängigen Antikörpern vom Isotyp IgG assoziiert. Oftmals bleiben Heparin-abhängige Antikörper asymptomatisch, im Speziellen Antikörper vom Isotyp IgM. Die klinische Assoziation ist bei hohen Antikörperkonzentrationen sowie dem Isotyp IgG höher (siehe nachfolgende Abbildungen).

Assoziation des HIT-IgG Antikörpertiters mit einem positiven Testergebnis im funktionellen Plättchenaktivierungs-Assay (HIPA) (aus Lit 5).

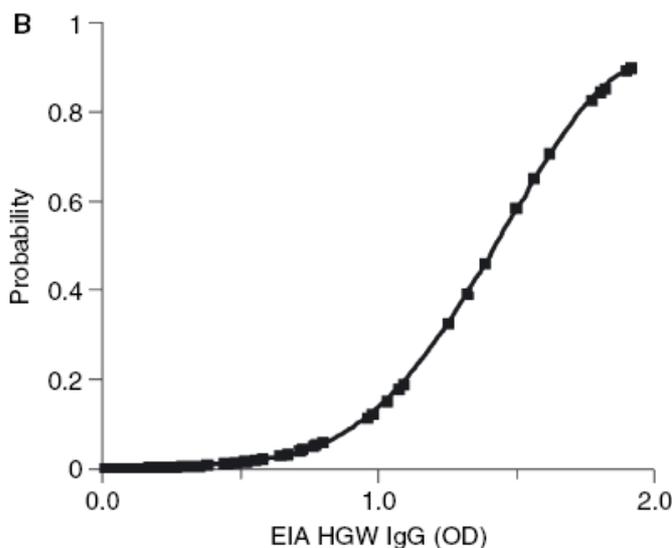


Assoziation des HIT-IgG Antikörpertiters mit einem positiven Testergebnis im funktionellen Assay (HIPA) (aus Lit. 6)



- Group 1: Plättchenaktivierende AK im funktionellen Test nachgewiesen (n=10)
- Group 2: Keine Plättchenaktivierung im funktionellen Test nachgewiesen (n=53)
- Group 3: Keine AK im monospezifischen IgG ELISA nachweisbar (n=50)

Wahrscheinlichkeiten der Plättchenaktivierung durch mittels monospezifischem IgG-ELISA (in-house IgG ELISA Transfusionsmedizin Greifswald) nachgewiesene HIT-Antikörper (aus Lit. 6)



Cave: Obige Abbildung dient lediglich der Darstellung der Assoziation von AK-Titer (OD-Wert) und Plättchen-aktivierender Eigenschaft der AK. Diese Abbildung darf nicht die alleinige Grundlage für die Diagnosestellung HIT Typ2 sein bzw. einer Therapie-

entscheidung zu Grunde gelegt werden ! Aus diesem Grund geben wir keine OD-Werte am Befund aus.

Korrelationen von Ergebnissen des polyspezifischen ELISA (kombinierter Nachweis von Antikörpern der Subklassen IgG, IgA, IgM) mit dem funktionellen HIPA-Test (aus Lit.5)

Table 1. Results of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) antibody tests in the heparin-induced platelet activation (HIPA) test and in the platelet factor (PF4)/heparin IgG/A/M ELISA of 755 patients referred for diagnosis of HIT

HIPA test, n (%)	PF4/heparin IgG/A/M ELISA, n (%)		
	Positive	Negative	Total
Positive	50 (6.6)	3 (0.4)	53 (7.0)
Indeterminate	4 (0.5)	15 (2.0)	19 (2.5)
Negative	51 (6.7)	632 (83.7)	683 (90.4)
Total	105 (13.9)	650 (86.1)	755

Prävalenz von Antikörper-Subklassen bei positivem polyspezifischen (IgG/A/M) ELISA sowie bei positivem funktionellen Test (HIPA) (aus Lit.5)

Table 2. Prevalence of antibodies of the IgG-, IgM-, and IgA-class in 105 patients with clinically suspected heparin-induced thrombocytopenia (HIT) and positive IgG/M/A platelet factor (PF4)/heparin ELISA

Immunoglobulin classes of HIT antibodies	Monospecific PF4/heparin ELISA positive, n (%)	HIPA positive of 105 ELISA positive patients, n (%)
IgG only	18 (17.1)	8 (7.6)
IgG and IgA	10 (9.5)	7 (6.7)
IgG and IgM	23 (21.9)	14 (13.3)
IgG, IgA, and IgM	23 (21.9)	17 (16.2)
All IgG	74 (70.5)	46 (43.8)
IgM only	22 (20.9)	2 (1.9)
IgM and IgA	6 (5.7)	1 (1)
IgA only	0	0
Indeterminate ¹	3 (2.8)	1 (1)
Total	105 (100)	50 ² (47.6)

Labordiagnostik:

Allgemein

Zur Abschätzung des Risikos der Entwicklung der klinischen Komplikation HIT ist die Bestimmung der globalen IgG/A/M Isotypen als prognostischer Marker dieser Komplikation hilfreich. Der polyspezifische ELISA hat zwar eine geringere Spezifität, jedoch eine höhere Sensitivität als der monospezifische IgG Test und sollte daher zum Screening durchgeführt werden. Gleichzeitig oder nachfolgend sollten Antikörper gegen Heparin/PF4 Komplexe vom Isotyp IgG bestimmt werden. Zur Bestätigung der Heparin-Abhängigkeit dieser Antikörper kann noch ein sog. Heparin-Bestätigungstest durchgeführt werden, in welchem die heparinabhängige Bindung der AK im positiven IgG ELISA durch Zusatz hoher Heparindosen geblockt wird.

Die Plättchen-aktivierende Eigenschaft vorliegender AK kann jedoch nur in einem funktionellen Test (HIPA [Heparininduzierter Plättchenaktivierungsassay], SRA [Serotonin release assay]) bewiesen werden. Da die Durchführung eines funktionellen Tests einen enormen organisatorischen Aufwand darstellt (es werden frisch isolierte Thrombozyten von 3-4 gesunden Spendern der BG 0 pro Ansatz benötigt) und bei diesem Test auch immer wieder größere Probleme bei der Standardisierung auftreten, hat sich die Durchführung in wenigen spezialisierten Zentren als sinnvoll erwiesen. Die nachfolgende Abbildung soll die Spezifität der einzelnen Testsysteme in einem sog. Eisberg-Modell verdeutlichen (aus Lit 7).

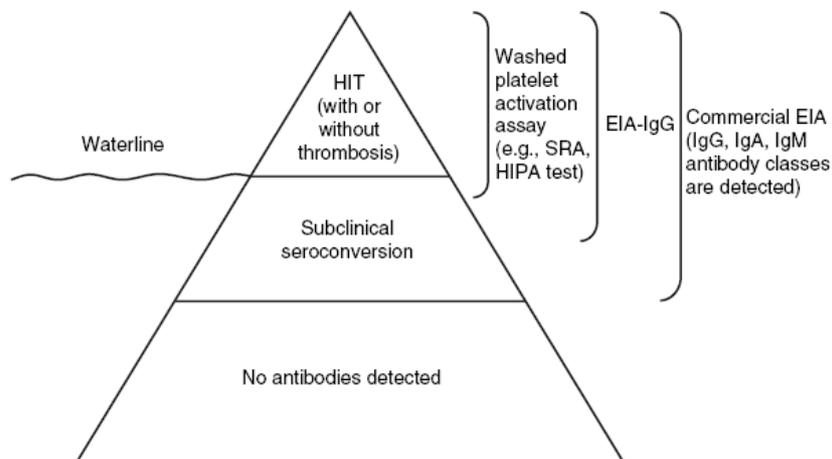


Fig. 1. Iceberg model of heparin-induced thrombocytopenia (HIT): implications for differing diagnostic specificities of tests for HIT. Clinical HIT (with or without thrombosis) is represented by the portion of the iceberg above the waterline. Three different types of assay for HIT antibodies are shown: washed platelet activation assays, PF4–heparin enzyme immunoassays (EIAs) that detect only IgG class antibodies (EIA-IgG), and a commercially available PF4–polyanion EIA that detects anti-PF4/heparin antibodies of all three major immunoglobulin classes. The model indicates that the three assays have different specificity for clinical HIT (in rank order, washed platelet activation assay > EIA-IgG > commercial EIA-IgG/IgA/IgM), but that all three assays have similar high diagnostic sensitivity for HIT. (Not shown is the particle gel immunoassay, which is believed to have a specificity intermediate between that of the EIA-IgG and the EIA-IgG/IgA/IgM.) This model is supported by several studies, including that of Schenk *et al.* [6]. HIPA, heparin-induced platelet activation; SRA, serotonin release assay.

Einschränkungen der Labordiagnostik bei HIT Typ2:

- Wie bei allen Autoantikörpertesten kann es in klinischen Situationen wie entzündlichen Zuständen, infektiösen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen zu hohen Hintergrundsignalen kommen, die im Graubereich bzw. im schwach positiven Bereich liegen können. In diesem Fall ist eine spätere Probe auf die mögliche Anwesenheit von Antikörpern zu überprüfen.
- Die Ergebnisse der HIT Typ2 AK Untersuchung mittels ELISA sollten keinesfalls als alleinige Grundlage für eine klinische Entscheidung herangezogen werden. Obwohl eine positive Reaktion in diesem Test ein Hinweis auf Heparin-induzierte Antikörper sein kann, ist ein positiver Nachweis dieser Antikörper noch KEINE BESTÄTIGUNG der HIT Typ2. Einige Patienten können natürlich vorkommende Antikörper gegen PF4 oder andere Chemokine aufweisen, die jedoch keine Plättchen-aktivierende Wirkung haben und zu keinen Komplikationen führen.
- Bei einem Thrombozytenabfall denken Sie bitte auch an andere Ursachen wie Thrombopenie durch andere Medikamente, Vorhandensein von anti-thrombozytären Auto- od. Alloantikörpern wie HPA- oder HLA-Antikörpern, EDTA-bedingte Pseudothrombozytopenie.
- Bei klinischem Verdacht auf HIT Typ2 muss vor der Anforderung der Bestimmung von Heparin/PF4 AK der 4T-Scorewert des Patienten ermittelt werden. Der 4T-Scorewert hat einen negativen prädiktiven Wert, der bei nahezu 100% liegt. Patienten mit einem niedrigen Score (<4) haben eine Wahrscheinlichkeit von <2% für das Vorhandensein von HIT Typ2-Antikörpern.
- Bei einem 4T-Scorewert <4 ist HIT Typ2 extrem unwahrscheinlich!!
- Zum Nachweis der Plättchen-aktivierenden Eigenschaften der Antikörper ist die zeitnahe Durchführung eines funktionellen Tests (HIPA, SRA) empfohlen. Der HIPA wird beispielsweise im Inst. für Immunologie und Transfusionsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt Universität (Vorstand: Prof. Dr. Andreas Greinacher, Tel.: 0049-38 34 DW 865479) in D-17489 Greifswald, Sauerbruchstraße, angeboten.

Die Beurteilung des ELISA-Ergebnisses muss in Zusammenschau mit der klinischen Symptomatik sowie dem zum Zeitpunkt der Untersuchungsanforderung erhobenen 4T-Scorewert erfolgen.

Was tun bei positivem Testergebnis im HIT-Typ2 ELISA (positiver Nachweis von AK gg. Heparin/PF4 Komplexe)?

Bei Nachweis von HIT Typ2 AK vor allem jedoch entsprechender klinischer Symptomatik und hohem 4T Score ist die sofortige Umstellung der Heparintherapie auf zugelassene, alternative Antikoagulanzen notwendig.

Laut ACCP-Guidelines 2008 (8) sind derzeit folgende Substanzen empfohlen:

- Danaparoid [Orgaran]: Grade 1B recommendation
- Argatroban [Argatra] oder Lepirudin [Refludan]: Grade 1C recommendations
- Fondaparinux oder Bivalirudin: Grade 2C recommendations

Originalzitat aus den ACCP-Guidelines 2008 (8):

>>For patients with strongly suspected (or confirmed) HIT, whether or not complicated by thrombosis, we recommend use of an alternative, nonheparin anticoagulant (danaparoid [Grade 1B], lepirudin [Grade 1C], argatroban [Grade 1C], fondaparinux [Grade 2C], or bivalirudin [Grade 2C]) over the further use of unfractionated heparin (UFH) or low-molecularweight heparin (LMWH) therapy or initiation/continuation of vitamin K antagonists (VKAs) [Grade1B]. The guidelines include specific recommendations for nonheparin anticoagulant dosing that differ from the package inserts.<<

Zur Bestätigung der Plättchen-aktivierenden Eigenschaften der nachgewiesenen Antikörper empfehlen wir dennoch die zeitnahe Durchführung eines funktionellen Tests (HIPA, SRA).

Was tun bei negativem od. schwach positivem/nicht eindeutigem Testergebnis im HIT-Typ2 ELISA, jedoch entsprechender klinischer Symptomatik und hohem 4T Score?

Das Vorliegen von HIT-Typ2 Antikörpern kann nicht ausgeschlossen werden (unbekannte Testinterferenz, Zeitfaktor, etc.). Eine Kontrolleinsendung nach 48h ist empfohlen. Die Umstellung der Therapie auf zugelassene, alternative Antikoagulanzen (Danaparoid, Argatroban, Lepirudin, Fondaparinux, Bivalirudin, s.o.) liegt im Ermessen und in der Verantwortung der behandelnden Ärztin/des Arztes.

Literatur:

1. Warkentin TE, Levine MN, Hirsch J et al : Heparin induced thrombocytopenia in patients treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. N Eng J Med 1995; 332:1330-1335.
2. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M et al : Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparine induced thrombocytopenia : Thromb Haemost, 1992, 68 : 95-96
3. Amiral J, Bridey F, Wolf M et al : Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. Thromb Haemost 1995; 73: 21-28.
4. Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M et al: Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin associated thrombocytopenia. Blood, 1996; 78:78-449 (abstract).
5. Juhl D, Eichler P, Lubenow N, Strobel U, Wessel A, Greinacher A: Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia. Eur J Haematol 2006;76:420-26.
6. Schenk S, El-Banayosy A; Morshuis M, et al.: IgG classification of anti-PF4/heparin antibodies to identify patients with heparin-induced thrombocytopenia during mechanical circulatory support. J Thromb Haemost 2007;5:235-41.
7. T.E. Warkentin. PF4-dependent immunoassays and inferential detection of HIT antibodies, J Thromb Haemost 2007;5:232-4.
8. T.E. Warkentin, A. Greinacher, A. Koster, A.M. Lincoff: Treatment and Prevention of Heparin-Induced Thrombocytopenia. ACCP Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest 2008;133:340S-380S.