

Het moge duidelijk zijn dat het van groot belang is te weten hoe commerciële plasma's zich gedragen in vergelijking met patiëntenplasma's, omdat dit bijvoorbeeld consequenties kan hebben voor externe audits.

Indien een (commercieel) kalibratie- of controle materiaal inter-assay eigenschappen presenteert die gelijk zijn aan het gebruikte patiëntenmateriaal, dan noemt men dat materiaal commuteerbaar.

Een probleem bij strikte toepassing van het EP14-P protocol is dat een onderscheid tussen (natieve) patiëntenmonsters en "processed" samples wordt gemaakt. Door het invriezen van de patiëntenplasma's beschikken we niet meer over natieve monsters maar alleen over processed samples, de ingevroren en patiëntenplasma's en de commerciële plasma's. Voor stollingsonderzoek is het, in tegenstelling tot de Kalibratie 2000 projecten in de klinische chemie, praktisch niet mogelijk op één dag met het tweelinglaboratorium de vereiste 15 monsters gespreid over het gehele meetbereik te verzamelen en uit te wisselen. In de maanden september en oktober dienen de deel-

nemers de monsters uit te wisselen en de drie series te bepalen, waarna de resultaten moeten worden ingestuurd. Na uitwerking van de meetgegevens kan hopelijk een keuze van commuteerbare plasma's plaatsvinden. Deze commuteerbare plasma's kunnen dan als kalibrator in de vervolgstudie worden gebruikt. Evaluatie van de resultaten van de vervolgstudie zal moeten uitwijzen of het gebruik van commuteerbare kalibratoren leidt tot harmonisatie.

Literatuur

1. Jansen RTP, Kuypers AWHM, Baadenhuijsen H, Besselaar AMHP van den, Cobbaert CM, Gratema JW, Klasen IS, Lentjes EGWH, Metz M de, Preijers FWMB, Ross HA, Steigstra H, Weykamp CW. Kalibratie 2000. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000; 25: 153-158.
2. Interference Testing in Clinical Chemistry; Proposed Guideline (1986), NCCLS document EP7-P, ISBN 1-56238-020-6.
3. Evaluation of Matrix Effects; Proposed Guideline (1998), NCCLS document EP14-P, ISBN 1-56238-345-0.

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 300-305

Laboratoriumdiagnostiek van heparine-geïnduceerde trombocytopenie

É. BIRÓ¹, R. NIEUWLAND¹, J.P.J. WESTER², F.J.L.M. HAAS³ en A. STURK¹

De laboratoriumdiagnostiek van heparine-geïnduceerde trombocytopenie (HIT) is gebaseerd op de pathogenese van dit ziektebeeld. In het algemeen ontstaat HIT door een IgG antistof tegen het complex van heparine en plaatjesfactor 4 (PF4), gevolgd door binding van het ternaire complex van de antistof met heparine en PF4 aan bloedplaatjes via het Fc-deel van de antistof aan FcγRIIa-receptoren op het bloedplaatje. Het bloedplaatje wordt daardoor geactiveerd en stoot PF4 uit dat opnieuw met heparine een complex kan vormen. Echter, ook IgA- en IgM-antistoffen tegen het heparine-PF4-complex kunnen HIT veroorzaken en ook kunnen antistoffen HIT veroorzaken die tegen op PF4 gelijkende eiwitten zijn gericht, waaronder NAP-2 en IL-8.

De uit te voeren testen kunnen in twee categorieën worden ingedeeld:

- meting van de antistoffen in het serum van de HIT-patiënt

- meting van het vermogen van het serum van de patiënt om bloedplaatjes van gezonde vrijwilligers te activeren.

Beide typen metingen hebben hun voor- en nadelen. Er zijn commerciële ELISA's beschikbaar voor de meting van de antistoffen. De ELISA's meten alleen de antistoffen tegen het heparine-PF4-complex, maar zowel IgG als IgA en IgM. De activatiemetingen aan bloedplaatjes betreffen zowel plaatjesaggregatie- als serotoninesecretiemetingen. Die testen zijn minder gevoelig voor IgA- en IgM-antistoffen en, door het bestaan van isovormen van de Fc-receptor op het bloedplaatje, sterk donorafhankelijk. Ook is recent een commercieel verkrijgbare agglutinatie techniek beschreven, de "particle gel immuno assay", die de antistoffen tegen het heparine-PF4-complex detecteert.

In een recente aanbeveling wordt aangeraden om bij een negatieve of twijfelachtige uitslag van een plaatjestest een ELISA te doen, en vice versa. Tevens dient een laboratorium dat HIT-diagnostiek uitvoert zich er daarbij van te vergewissen dat de methodologie juist wordt uitgevoerd en geïnterpreteerd.

In dit artikel wordt de laboratoriumdiagnostiek van heparine-geïnduceerde trombocytopenie (HIT) beschreven. Daarbij zal het ontstaansmechanisme in detail worden besproken, omdat dat ten grondslag ligt aan deze diagnostiek. In de bijdrage van dr. Wester in

Afdeling Klinische Chemie (CKCL), Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden¹, Intensive Care Heelkunde, Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit, Amsterdam² en Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein³.

Correspondentie: A. Sturk, Leids Universitair Medisch Centrum, Afdeling Klinische Chemie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden. E-mail: asturk@lumc.nl

dit nummer worden de prevalentie en de mogelijke therapie bij patiënten met HIT behandeld. Ook de definitie van HIT, dus waaraan moet een patiënt voldoen om van HIT te kunnen spreken, is in die bijdrage uitgebreid toegelicht, evenals het onderscheid dat moet worden gemaakt tussen HIT en bijvoorbeeld de daling van het aantal bloedplaatjes in de circulatie in de post-operatieve fase van een patiënt. Voor de huidige bijdrage is van belang dat de criteria waaraan een patiënt voor de diagnose HIT moet voldoen in de literatuur niet eenduidig zijn. In een recent overzichtartikel (1) werd als consensus voor de criteria voorgesteld:

- er moet een klinische verdenking zijn op de aanwezigheid van HIT doordat de concentratie bloedplaatjes meer dan 5 dagen na de start van heparine therapie meer dan 50% daalt of lager wordt dan $100 \times 10^9/l$, en er dan wel of niet een nieuwe trombotische of trombo-embolische gebeurtenis optreedt (men spreekt dan van HITT)
- het laboratorium met een gevoelige en specifieke bepaling een heparine-afhankelijke antistof aantoon.

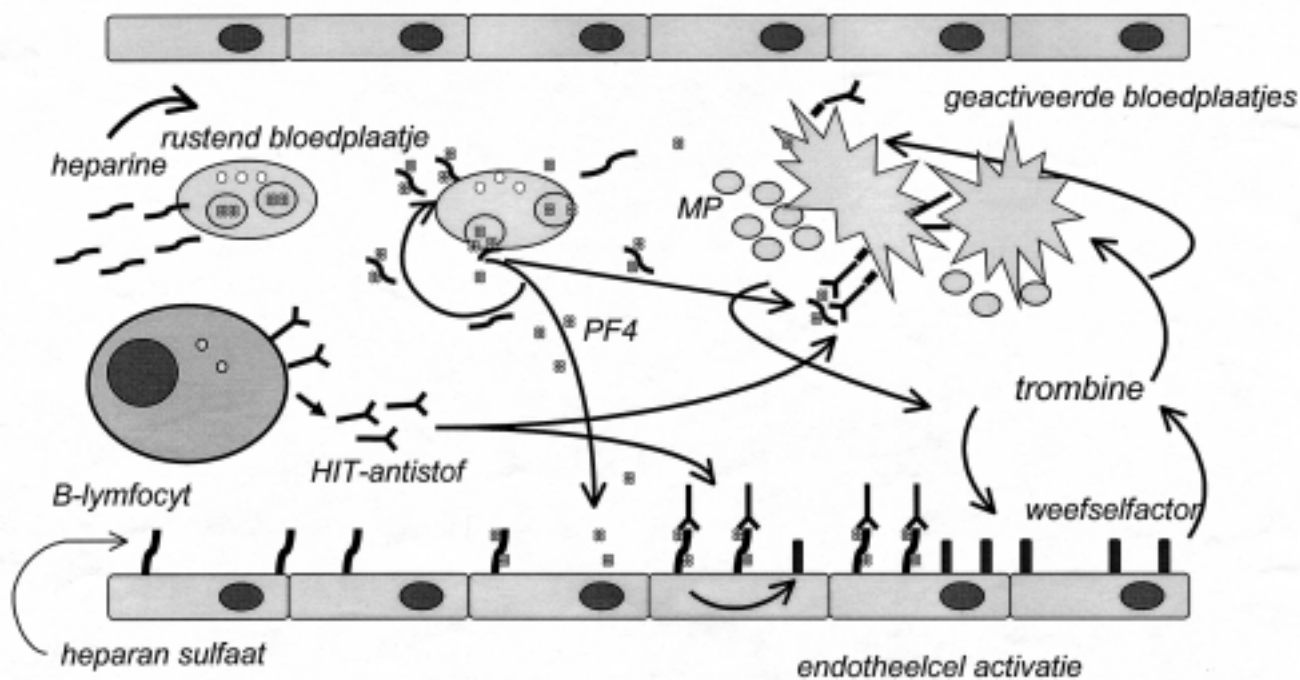
Het tweede aspect, de ondersteunende laboratoriumdiagnostiek van HIT, is het onderwerp van dit artikel.

Mechanisme van het ontstaan van HIT

Het veronderstelde mechanisme achter het ontstaan van HIT is weergegeven in figuur 1 (1-3). 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 en ook aan de heparine-achtige heparansulfaatstructuren op de endotheelcel. Door de binding

van PF4 aan heparine ontstaan op het PF4 neo-antigenen waartegen een antistof response 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-heparansulfaatcomplex geactiveerd, hetgeen leidt tot de expressie van weefselfactor op het oppervlak van de endotheelcel. De weefselfactorexpressie, 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.

De geschetste pathogenese geeft geen volledige verklaring voor alle bevindingen bij de HIT-patiënten. Bijvoorbeeld, ook IgA- en IgM-antistoffen tegen het heparine-PF4-complex kunnen HIT veroorzaken (4), terwijl de Fc-receptor op het bloedplaatje specifiek IgG herkent (zie "Antistoffen tegen PF4 en andere CXC-chemokinen"). Tevens worden de endotheelcellen niet via een Fc-receptor geactiveerd, maar via de binding van de antistof met zijn antigeenherkenningsplaatsen. Hoe dan de activatie van de endotheelcel plaatsvindt zal verder onderzoek moeten ophelderen.



Figuur 1. Pathogenese van HIT (gemodificeerde versie uit Visentin e.a. 2,3 en Warkentin e.a.1)

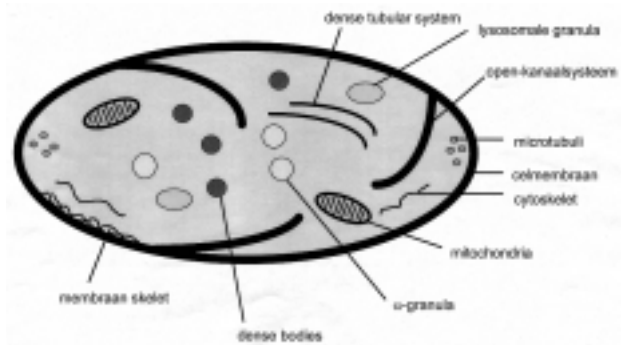
De structuur van een bloedplaatje

Een korte uitleg van de structuur van een bloedplaatje is noodzakelijk om de laboratoriumtesten bij HIT later beter te kunnen beschrijven. De structuur is schematisch weergegeven in figuur 2. Bloedplaatjes circuleren in niet-geactiveerde vorm in een afgeplatte bolvorm, die in stand wordt gehouden door de microtubuli die zich als een veer in het discoïde vlak bevinden. Het bloedplaatje wordt omsloten door een plasmamembraan, dat instulpingen vertoont die als "open canalicular system" te boek staan. Het bloedplaatje heeft diverse typen granula, waarbij vooral de α -granula en de dense bodies moeten worden vermeld. In de α -granula bevinden zich alle eiwitten die door een bloedplaatje na activatie worden uitgescheiden, zoals fibrinogeen en andere stollingsfactoren, PAI-1, PF4 en β -tromboglobuline (β -TG). De dense bodies verdienen hun naam aan het feit dat zij door hun inhoud "dicht" overkomen op elektronenmicroscopische foto's. In deze granula bevinden zich alle laag-moleculaire stoffen die het bloedplaatje na activatie uitscheidt, waaronder ADP, Ca^{2+} en serotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT).

Antistoffen tegen PF4 en andere CXC-chemokinen

PF4 is in monomere vorm een eiwit van 70 aminozuren. In de circulatie komt het echter als tetrameer voor. Het wordt niet alleen aangetroffen in de α -granula van bloedplaatjes, maar ook op de endotheelcel. Bewijs daarvoor is onder andere geleverd door de studies van O'Brien e.a. (5). Vijf minuten na intraveneuze toediening van heparine vonden deze auteurs bij gezonde proefpersonen PF4 en β -TG waarden in het plasma van gemiddeld resp. 160 en 30 μ g/l. Voorafgaand aan de toediening waren deze waarden resp. 3 en 27 μ g/l. Dit betekent dat het PF4 niet vrijkomt door een activatie van het bloedplaatje, omdat dan ook β -TG uit datzelfde compartiment - de α -granula - zou worden gesecreteerd. Het betekent ook, dat het boven geschetste mechanisme achter het ontstaan van HIT enigszins kan worden gemodificeerd. Heparinegeïnduceerde activatie van bloedplaatjes om PF4 vrij te krijgen voor de vorming van het complex heparine-PF4 is niet nodig. Vrijkomen vanaf het endotheelcelpoppervlak is waarschijnlijk al voldoende. Overigens hebben de auteurs ook laten zien dat de PF4-fractie aan het endotheel na 24 uur pas voor ongeveer 50% weer is aangevuld (5).

PF4 is lid van de familie van de laag-moleculaire CXC-chemokinen, waar bijvoorbeeld ook "neutrophil activating peptide" (NAP-2) en interleukine-8 (IL-8) deel van uitmaken. Bij HIT-patiënten kunnen antistoffen voorkomen die zijn gericht tegen deze sterk op PF4 gelijkende eiwitten. Een voorbeeld is de studie van Amiral e.a. (6). Van de door hen onderzochte 87 patiënten met HIT hadden 15 géén antistoffen gericht tegen het heparine-PF4-complex. Van deze 15 hadden 6 patiënten antistoffen gericht tegen IL-8 en 3 patiënten antistoffen tegen NAP-2. Van de 9 patiënten met een antistof tegen IL-8 of NAP-2 ontwikkelden 5 een trombose tijdens heparine behandeling, hetgeen niet significant in voorkomen verschilde van de patiënten met een antistof tegen het heparine-PF4-com-



Figuur 2. Schematische structuur van een niet-geactiveerd bloedplaatje

plex. De heparine-afhankelijkheid van de antistoffen was overigens niet duidelijk in vitro aanwezig (6). Antistoffen tegen het heparine-PF4-complex zijn niet altijd van de IgG-klasse. In een studie van Amiral e.a. (4) werden bij 26 van de 38 HIT-patiënten antistoffen tegen het heparine-PF4-complex aangetoond van de IgG-klasse. De andere 12 patiënten hadden alleen een IgA- en/of IgM-antistof. Deze bevinding geeft aan, dat de bovenstaand geschetste pathogenese van HIT (zie "Mechanisme van het ontstaan van HIT") niet volledig juist is. Bloedplaatjes hebben specifieke receptoren tegen het Fc-deel van IgG-antistoffen, de -receptor $Fc\gamma RIIA$. Aangezien ook IgA- en IgM-antistoffen tot HIT kunnen leiden is blijkbaar naast de interactie van IgG-antistoffen via een $Fc\gamma RII$ -receptor ook activatie van bloedplaatjes op andere wijze mogelijk, bijvoorbeeld via de PF4-receptor op bloedplaatjes of indirect via activatie van neutrofielen, monocyten of lymfocyten die wel receptoren hebben voor IgA en IgM (4).

$Fc\gamma RIIA$ -receptoren van bloedplaatjes en HIT

De $Fc\gamma RIIA$ -receptor op het bloedplaatje kent twee isovormen die op aminozuurplaats 131 verschillen. Daar kan zich een arginine (R) of een histidine (H) bevinden. De isovormen verschillen enigszins in de mate waarin zij IgG-antistofsubklassen binden. De $Fc\gamma RII-H^{131}$ -isovorm bindt IgG_2 met hogere affiniteit dan de $Fc\gamma RII-R^{131}$ -isovorm. Er zijn diverse artikelen verschenen waarin een mogelijke relatie gevonden werd tussen de aanwezigheid van één van de isovormen van de Fc-receptor en het wel of niet optreden van de klinische complicaties van HIT in patiënten waarbij een IgG-antistof tegen het heparine-PF4-complex kon worden aangetoond. Bijvoorbeeld, Brandt e.a. (7) vonden de frequentie van voorkomen van het H/H¹³¹-genotype bij 200 HIT-patiënten significant verhoogd (34%) ten opzichte van 100 patiënten die trombopenie hadden door andere oorzaken dan HIT (19%). Denomme e.a. (8) bevestigden deze bevindingen in een studie bij 84 HIT-patiënten versus 204 gezonde vrijwilligers. Bovendien toonden deze auteurs aan, dat HIT-antistoffen met name bloedplaatjes van normale donoren met het H/H¹³¹-genotype activeren. Dit in tegenstelling tot muizenantistoffen tegen de $Fc\gamma RII$ -receptor die met name R/R¹³¹-bloedplaatjes activeren (7,8). Arepally e.a. (9) konden echter in een studie bij 13 patiënten die HIT

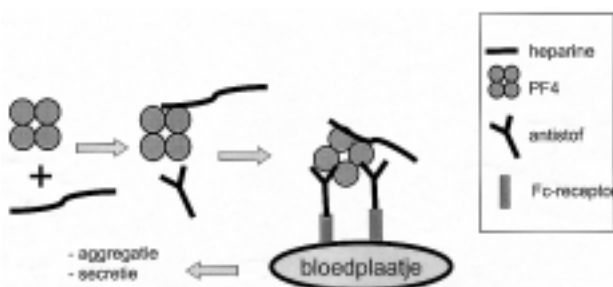
ontwikkelden, 23 patiënten die HIT ontwikkelden en 102 gezonde vrijwilligers geen verschillen vinden in het voorkomen van de H/H¹³¹-, H/R¹³¹- en R/R¹³¹-genotypen, die bij deze studiegroepen respectievelijk varieerden van 15 tot 26%, 48 tot 62%, en 23 tot 26%. Bovendien hadden de meeste patiënten IgG₁-antistoffen en kon er geen relatie worden aangetoond tussen het optreden van bijvoorbeeld HIT en de extra aanwezigheid van IgG₂-antistoffen. Hoewel de relatie tussen de isovormen van de Fc-receptor en HIT of HIT niet geheel vaststaat, heeft dit wel tot gevolg dat bloedplaatjes van normale donoren in vitro in verschillende mate reageren op een HIT-antistof van een bepaalde patiënt. Hiermee moet bij de laboratoriumdiagnostiek van HIT rekening worden gehouden.

Laboratoriumdiagnostiek van HIT

De laboratoriumdiagnostiek van HIT is gebaseerd op de vereenvoudigde pathogenese zoals weergegeven in figuur 3. Enerzijds zijn er ELISA-testen ontwikkeld om bij HIT optredende antistoffen aan te tonen, anderzijds kunnen aggregatie of secretie van donorbloedplaatjes door antisera van HIT-patiënten worden gemeten.

Metingen van de voor HIT verantwoordelijke antistof middels ELISA

Bij HIT-patiënten komen, zoals boven geschetst, antistoffen voor tegen complexen van heparine en PF4, maar ook tegen IL-8 en NAP-2. Bovendien kunnen de antistoffen IgG, IgA en IgM betreffen. Er zijn commerciële ELISA's beschikbaar 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. Ook wordt bij de momenteel beschikbare ELISA-kits geen standaard curve geleverd. Het gevolg is dat boven een arbitraire uitslag van bijvoorbeeld 0,7 optische dichtheid (OD) eenheden een patiëntenmonster als positief wordt beoordeeld, bij 0,5 - 0,7 OD-eenheden als "twijfelachtig" en onder de 0,5 OD-eenheden als negatief.



Figuur 3. Diagnostiek van HIT gebaseerd op dit vereenvoudigde model van de pathogenese.

Meting van de voor HIT verantwoordelijke antistof middels activatie van bloedplaatjes

Bij de testen die gebaseerd zijn op activatie van bloedplaatjes wordt plasma of serum van een patiënt geïncubeerd met bloedplaatjes van gezonde donoren. Bij aggregatietesten van bloedplaatjes kan dit zowel gewassen bloedplaatjes betreffen als plaatjesrijk plasma. Bij de plaatjesaggregatietesten (PAT) wordt de mate van aggregatie van de bloedplaatjes van donoren door een in het patiëntenserum aanwezige antistof gemeten (10). Bij de meting van de 5-HT-secretie (11) worden de bloedplaatjes eerst in plaatjesrijk plasma opgeladen met radioactief 5-HT en vervolgens gewassen om het niet-opgenomen 5-HT te verwijderen. Bloedplaatjes nemen 5-HT snel op en transporteren dat naar de dense bodies, zodat dat bij een secretiereactie kan worden uitgestoten. Bij deze bepaling, de "14C-serotonin release assay" (SRA), wordt dus de inductie van de secretiereactie door een aanwezige antistof gemeten.

Bij zowel de PAT als de SRA meting moeten bloedplaatjes van een aantal donoren (minstens 5), apart, worden getest. Dit gezien de grote variabiliteit in de mate van response tussen donoren, hetgeen waarschijnlijk het gevolg is van de heterogeniteit van de FcγRIIA-receptor. Ook moeten de testen worden uitgevoerd bij twee heparineconcentraties. De blankotest met fysiologisch zout (0,9% NaCl) moet negatief zijn, cave heparineresten! Bij 0,1 à 1,0 U/ml heparine moet een test positief zijn, en bij bijvoorbeeld 100 U/ml heparine negatief, om van HIT te kunnen spreken (11). De aggregatie- en secretiemetingen zijn niet of minder gevoelig voor IgA- en IgM-antistoffen, maar reageren waarschijnlijk wel als het IL-8- of NAP-2-antistoffen betreft.

De reguliere PAT wordt uitgevoerd in een aggregometer. Greinacher e.a. (12) hebben een aggregatietest beschreven in microtiterplaten, de "heparin-induced platelet activation assay" (HIPA), die gevoeliger lijkt dan de reguliere aggregatietest (zie "Vergelijkende studies van de laboratoriumtesten"). Ook is recent een test commercieel verkrijgbaar waarmee de agglutinatie onder invloed van een patiëntenserum wordt gemeten van polystyreenbolletjes gecoat met heparine-PF4-complex. Deze "particle gel immuno assay" (PaGIA), zou als voordeel ten opzichte van ELISA-metingen kunnen hebben dat er geen standaard curve behoeft te worden ingezet voor patiëntenmonsters die veelal solitair moeten worden bepaald, en ten opzichte van activatiemetingen van bloedplaatjes dat er geen bloed van - diverse - donoren behoeft te worden afgenomen en opgewerkt.

Er zijn nog diverse andere testen voor de diagnostiek van HIT beschreven, waaronder de mate van IgG-binding van bloedplaatjes, de verhoogde aanwezigheid van P-selectine op het oppervlak van bloedplaatjes van HIT-patiënten en het verhoogd voorkomen van micropartikels van bloedplaatjes in HIT-patiënten. Deze testen zijn niet in vergelijkende klinische studies bij HIT-patiënten geëvalueerd en zullen hier verder buiten beschouwing worden gelaten.

Tabel 1. Samenvatting van de vergelijkende klinische studies van HIT testen

	Studies	Patiënten	Controles	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)
Aggregatie	5	298	110	11 – 82	96 – 100
5-HT secretie	5	147	655	34 – 94	94 – 100
HIPA	2	243	–	33 – 41	–
ELISA	4	313	263	33 – 98	99 – 100

De tabel geeft een samenvatting van de resultaten van studies zoals die beschreven werden door Griffiths and Dzik (14).

Vergelijkende studies van de laboratorium testen

Er zijn diverse vergelijkende studies gepubliceerd naar de klinische waarde van de beschreven testen, bijvoorbeeld Greinacher e.a. (13). Deze auteurs bestudeerden 209 patiënten met verdenking HIT. Bij vergelijking van een plaatjesaggregatietest en een heparine-PF4-ELISA, waren 21 monsters positief in beide testen, 113 negatief in beide testen, 2 monsters positief in de aggregatietest en negatief in de ELISA en 37 positief in de ELISA maar negatief in de aggregatietest. Van 22 monsters had één of beide testen “twijfelachtig” als uitkomst. Bij vergelijking van hun HIPA-test en de heparine-PF4-ELISA, waren 48 monsters positief in beide testen, 93 negatief in beide testen, 18 monsters positief in de HIPA en negatief in de ELISA en 12 positief in de ELISA maar negatief in de aggregatietest. Van 20 monsters had één of beide testen “twijfelachtig” als uitkomst. Deze resultaten geven aan dat verschillende testen onderling sterk verschillende uitslagen geven en vaak geen duidelijk resultaat opleveren.

Een overzichtsartikel waarin de tot dan uitgevoerde vergelijkende studies werden beschreven is in 1997 gepubliceerd door Griffiths en Dzik (14). Een samenvatting van de resultaten is weergegeven in tabel 1. De auteurs analyseerden studies waarin een aggregatietest, de 5-HT-secretietest, de HIPA en / of een ELISA met elkaar werden vergeleken. Slechts een zeer beperkt aantal vergelijkende studies bleken te zijn uitgevoerd, 2 à 5 per test. Sensitiviteiten die varieerden van 11 tot 82% voor de plaatjesaggregatietesten, 34 tot 94% voor 5-HT-secretiemetingen, 33 tot 41% voor de HIPA-test en 33 tot 98% voor de ELISA werden gerapporteerd. Specificiteiten van 94 tot 100% werden gevonden. De sterk variërende sensitiviteiten tussen de studies zijn niet verbazingwekkend gezien de verschillen in definities van HIT tussen de studies, de reeds vermelde ongevoeligheden van de ELISA-testen voor andere antistoffen dan degene gericht tegen het heparine-PF4-complex, en de ongevoeligheid van bloedplaatjestesten voor IgA en IgM versus IgG plus donorafhankelijkheid van deze testen.

De reeds vermelde PaGIA-test werd tot nu toe in één vergelijkende studie geëvalueerd (15). De auteurs onderzochten sera van 135 patiënten die verdacht werden van HIT. Bij 116 patiënten waren de resultaten tussen de PaGIA- en de ELISA-test concordant (86%), bij 93 (69%) tussen de PaGIA- en de HIPA-test. De auteurs concluderen dat prospectieve studies nodig zijn om de juiste sensitiviteit en specificiteit van de PaGIA voor de diagnose HIT te bepalen.

Het optreden van antistoffen tegen het heparine-PF4-complex en de klinische consequenties

Niet alle patiënten met een antistof tegen het heparine-PF4-complex ontwikkelen HIT. Een voorbeeld van een studie waarin dit werd aangetoond is recent gepubliceerd door Pouplard e.a. (16). De auteurs onderzochten 328 patiënten die een open hart operatie moesten ondergaan. Alle patiënten kregen tijdens de bypassprocedure het reguliere, ongefractioneerde heparine en na de operatie werd de populatie verdeeld in een groep patiënten die dit heparine ook post-operatief kregen (157 patiënten) of een laag-moleculair heparine (Dalteparine, 171 patiënten). De patiënten werden gescreend met een heparine-PF4-ELISA en de in deze test positieve monsters getest op hun reactie in een 5-HT-secretiebepaling. In de ELISA waren antistoffen tegen het heparine-PF4-complex aanwezig in 83 patiënten, en wel in 46 patiënten die post-operatief ongefractioneerde heparine ontvingen (29%) en 37 (21%) die het laagmoleculair heparine ontvingen. Bij “slechts” 6 patiënten in de studiegroep die post-operatief het ongefractioneerde heparine ontvingen ontstond de verdenking op de ontwikkeling van HIT en deze patiënten hadden ook een positieve 5-HT-secretietest. Geen van de patiënten uit de laagmoleculair heparine groep ontwikkelden de verdenking op de aanwezigheid van HIT. Deze studie geeft twee belangrijke boodschappen: HIT komt voor, en waarschijnlijk meer dan wij denken en het aantonen van antistoffen tegen het heparine-PF4-complex heeft geen voorspellende waarde dat er HIT zal optreden.

Dus, hoe moet de laboratorium diagnostiek van HIT worden uitgevoerd?

Recent is een overzichtsartikel verschenen waarin aanbevelingen worden gedaan voor de diagnostiek van HIT, waaronder de bijdrage van de laboratoriumdiagnostiek (1). Deze staan samengevat in tabel 2. Samengevat moet er eerst een gegronde klinische verdenking zijn op de aanwezigheid van HIT op grond van een bepaalde mate van daling van het aantal bloedplaatjes. Het vermelde overzichtsartikel (1) geeft als criteria een daling van meer dan 50% of $< 100 \times 10^9/l$ aan. Deze grenzen zijn echter arbitrair en er is in de literatuur geen consensus over. Ook geeft het artikel als tweede grond voor een klinische verdenking op de aanwezigheid van HIT het optreden van een nieuwe tromboembolische complicatie aan. Er wordt dan gesproken van HITT. Het verdient ons inziens sterke aanbeveling om tot een internationale consensus voor deze klinische classificatie en de te hanteren criteria te komen.

Tabel 2. De diagnostiek van HIT

1. Klinische verdenking op HIT

- Daling in aantal bloedplaatjes met 50% of meer, meestal < 100 x 10⁹/l, minstens 5 dagen na de start van een heparine therapie
- Nieuwe trombo-embolische complicatie (HITT)

2. Laboratorium diagnostiek ter bevestiging diagnose

- Functionele bepaling op de aanwezigheid van een antistof, middels gewassen bloedplaatjes of plaatjes-rijk plasma, en wel of HIPA of 5-HT secretie bepaling; indien negatief of twijfelachtig, een ELISA bepaling uitvoeren
- Antigeen bepaling (Heparine-PF4-antistof ELISA); indien negatief of twijfelachtig, een functionele bepaling uitvoeren

Aanbevelingen voor de diagnose HIT, gebaseerd op Warkentin e.a. (1).

De laboratoriumdiagnostiek ter ondersteuning van de diagnose moet dan bestaan uit een functionele test, gevolgd door een ELISA-test indien de functionele test een negatief of twijfelachtig resultaat geeft, en vice versa. Overigens, de vermelde studie van Pouplard (16) maakt dan geen juist gebruik van de door die auteurs vermelde testen. Zij gebruiken de 5-HT-secretiereactie als bevestigende test voor de ELISA, terwijl uit dit artikel duidelijk moge zijn dat dit geen volledig overlappende testen zijn, integendeel. Tevens moge het duidelijk zijn dat de laboratoriumdiagnostiek van HIT zorgvuldig moet worden opgezet om enigszins betrouwbare resultaten te kunnen leveren. De geïnteresseerde lezer wordt voor recente overzichtsartikelen verwezen naar Warkentin (17, 18) en specifiek voor behandelingsaspecten naar het artikel van Greinacher (19).

Literatuur

1. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: Towards consensus. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1-7.
2. Visentin GP, Ford SE, Scott PJ, Aster RH. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 81-88.
3. Visentin GP. Heparin-induced thrombocytopenia: Molecular pathogenesis. *Thromb Haemost* 1999; 82: 448-456.
4. Amiral J, Wolf M, Fischer A, Boyer-Neumann C, Vissac A, Meyer D. Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haem* 1996; 92: 954-959.
5. O'Brien JR, Etherington MD, Pashley M. Intra-platelet platelet factor 4 (IP-PF4) and the heparin mobilisable pool of PF4 in health and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1984; 51: 354-357.
6. Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C. Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood* 1996; 88: 410-416.
7. Brandt JT, Isenhardt CE, Osborne JM, Ahmed A, Anderson CL. On the role of the platelet Fc gamma RIIa phenotype in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1995; 74: 1564-1572.
8. Denomme GA, Warkentin TE, Horsewood P, Sheppard JA, Warner MN, Kelton JG. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the Fc gamma RIIa "low responder" (his131) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 278-284.

9. Arepally G, McKenzie SE, Jiang XM, Poncz M, Cines DB. Fc gamma RIIa H/R¹³¹ polymorphism, subclass-specific IgG anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and clinical course in patients with heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Blood* 1997; 89: 370-375.
10. Fratantoni JC, Pollet R, Gralnick HR. Heparin-induced thrombocytopenia: Confirmation of diagnosis with in vitro methods. *Blood* 1975; 45: 395-401.
11. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1986; 67: 27-30.
12. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1991; 66: 734-736.
13. Greinacher A, Amiral J, Dummel V, Vissac A, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion* 1994; 34: 381-385.
14. Griffiths E, Dzik WH. Assays for heparin-induced thrombocytopenia. *Transfusion Med* 1997; 7: 1-11.
15. Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P. Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet* 1999; 354: 1525-1526.
16. Pouplard C, May MA, Iochmann S, Amiral J, Vissac A-M, Marchand M, Gruel Y. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin: Clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 1999; 99: 2530-2536.
17. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: A ten-year retrospective. *Annu Rev Med* 1999; 50: 129-147.
18. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: A clinicopathologic syndrome. *Thromb Haemost* 1999; 82: 439-447.
19. Greinacher A. Treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1999; 82: 457-467.

Summary

Laboratory diagnosis of heparin induced thrombocytopenia. Biró É, Nieuwland R, Wester JPJ, Haas FJLM and Sturk A. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 300-305.

Laboratory testing of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is based upon the pathogenesis of this disease. In general HIT is caused by an IgG antibody against the complex of heparin and platelet factor 4 (PF4), followed by binding of the ternary complex of heparin, PF4 and antibody to thrombocytes. This is thought to occur via the Fc part of the antibody and FcγRIIa receptors on the thrombocyte. The thrombocyte then becomes activated and secretes PF4 that may again bind heparin. However, IgA and IgM class antibodies against the heparin PF4 complex can also cause HIT, as well as antibodies against proteins similar to PF4 such as NAP-2 and IL-8.

The laboratory assays can be distinguished in two categories:

1. Measurement of the antibodies in the serum of the patient.
2. Measurement of the capacity of the serum of the patient to activate the thrombocytes of healthy blood donors. Both assay types have their advantages and disadvantages. Commercial ELISA assays are available for the measurement of the antibodies. The ELISA's only measure antibodies against the heparin - PF4 complex, but IgG as well as IgA and IgM. The platelet activation assays include aggregation and serotonin secretion assays. Those tests are less sensitive to IgA and IgM class HIT antibodies, and, due to the existence of isoforms of the Fc receptor on the thrombocyte, highly donor dependent. Recently a commercially available agglutination assay, the "particle gel immuno assay", has been described which also detects antibodies against the heparin PF4 complex.

In a recent recommendation it was advised to perform an ELISA if a platelet activation assay provides a negative or doubtful result, and vice versa. Also, a laboratory performing HIT diagnostics has to assure that the methodology is properly performed and interpreted.