

Etablering av testrepertoar med høy klinisk sensitivitet og spesifisitet for heparin-indusert trombocytopeni



MED- 39505 5. årsoppgave – Profesjonsstudiet i medisin ved
Universitetet i Tromsø

Av: Marte Simonsen og Anniken Cesilie Strøm, MK-10

Veileder: Bjørn Ragnar Skogen, Professor II medisinsk biologi

Vår 2015, Tromsø

Innholdsfortegnelse

Sammendrag	3
1. Innledning	4
1.1 Formålet med oppgaven	4
1.2 Definisjon av heparinindusert trombocytopeni	4
1.2.1 Insidens.....	4
1.2.2 Patogenese.....	5
1.2.3 Kinisk presentasjon	6
1.2.4 Monitorering av platetall	7
1.3 Diagnostisering av HIT	8
1.3.1 4 T score	9
1.3.2 Oversikt over laboratorietester.....	10
1.3.3 Dagens analysemetode ved UNN Tromsø.....	16
1.4 Behandling	16
2. Materiale og metode	18
2.1 Studiedesign	18
2.2 Inklusjonskriterier	19
2.3 Assays	19
2.3.1 Gelkort PaGIA	19
2.3.2 HemosIL AcusStar HIT-IgG.....	19
2.3.3.PF4/heparin ELISA	19
2.3.4 HIPA.....	19
2.4 Arbeidsprosessen	20
3. Resultater	22
3.1 Testresultater	22
3.1.1 Gelkort PaGIA	22
3.1.2 HemosIL AcusStar HIT-IgG.....	22
3.1.3 PF4/heparin ELISA	22
3.1.4 HIPA.....	22
3.1.5 Sammendrag av testresultater	22
3.2 Testegenskaper og diagnostiske egenskaper	24
3.2.1 Gelkort PaGIA	24
3.2.2 HemosIL AcusStar IgG.....	24
3.2.3 PF4/Heparin ELISA	24
4. Diskusjon	26
4.1 Diagnostisk algoritme	27
4.2 Feilkilder	29
5. Vedlegg	30
Vedlegg 1: HemosIL AcusStar HIT-IgG	30
Vedlegg 2: PF4/heparin ELISA	31
Vedlegg 3: Heparin-indusert plateaktiverings-assay (HIPA)	33
Vedlegg 4: Gelkort PaGIA	35
Vedlegg 5: Testresultat HemosIL AcusStar HIT-IgG	36
Vedlegg 6: Testresultat PF4/Heparin ELISA	38
Vedlegg 7: Testresultat HIPA	39
Kildehenvisning	41

Sammendrag

Formålet med denne oppgaven er å forbedre diagnostikken av heparinindusert trombocytopeni (HIT) ved laboratoriet på UNN, ved å innføre ytterligere en enkelttest i testrepertoaret og utforme et forslag til en behandlingsalgoritme for pasienter med mistanke om klinisk HIT.

HIT er en immunmediert medikamentbivirkning som oppstår etter eksponering for ufraksjonert heparin, lavmolekylært heparin eller enkelte andre polyanioner. Dannelse av komplekser bestående av platefaktor 4 og negativt ladede polyanioner, oftest heparin, resulterer i antistoffdannelse hos en andel av pasientene som blir heparinbehandlet. Klinisk HIT er karakterisert av et fall i platetall som typisk inntreffer mellom dag 5 og 14 etter heparineksponering, og som ofte kompliseres av tromboemboliske hendelser.

Vi har gjennomført en retrospektiv studie med utgangspunkt i serum samlet fra 62 pasienter med klinisk mistanke om HIT og som hadde vært behandlet med heparin. Serumet var fra før av testet ved hjelp av en gelkort-teknikk. Det ble så valgt ut to antigen-assay, AcuStar Hemosil HIT IgG og PF4/heparin ELISA, i tillegg til et funksjonelt assay, HIPA, som ble brukt som referansetest. Analysene ble gjennomført ved avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin ved universitetssykehuset i Greifswald, som er ledende innen forskning på HIT.

Etter analysering ble testenenes egenskaper beregnet. Disse er presentert i tabeller under resultatdelen av oppgaven. Testen vi anbefaler å innføre i testrepertoaret ved UNN er AcuStar HIT IgG fra HemosIL. Med bakgrunn i våre resultater, gjeldende retningslinjer ved anerkjente laboratorier, gjennomgang av tidligere utførte studier, samt en vurdering av gjennomførbarhet med tanke på kostnader, tidsbruk og arbeidsmengde, er det utformet et forslag til hvordan man bør gå frem ved diagnostisering av pasienter med klinisk mistenke om HIT. Dette er presentert i et flytskjema under diskusjonsdelen av oppgaven. Dersom denne algoritmen tas i bruk, vil det føre til redusert feildiagnostisering og forbedret behandling, hos pasienter med mistanke om klinisk HIT ved UNN Tromsø.

1. Innledning

1.1 Formålet med oppgaven

Formålet med denne oppgaven er å forbedre diagnostikken av heparinindusert trombocytopeni (HIT) ved laboratoriet på UNN ved å innføre ytterligere én enkelttest i testrepertoaret og utforme et forslag til en behandlingsalgoritme for pasienter med mistanke om klinisk HIT. Det eksisterer i dag flere kommersielle tester for diagnostikk av HIT, men det er ingen enkelttest som har den spesifisiteten og sensitiviteten som er ønskelig. Det er derfor vanlig at man bygger sin laboratoriediagnostikk på et utvalg av to eller flere tester.

1.2 Definisjon av heparinindusert trombocytopeni

Heparinindusert trombocytopeni er en protrombotisk, immunmediert medikamentbivirkning som oppstår etter eksponering for ufraksjonert heparin (UFH), lavmolekylært heparin (LMWH), eller enkelte andre polyanioner. In vivo-dannelse av sterkt immunogene komplekser bestående av platefaktor 4 (PF4) og negativt ladede polyanioner, oftest heparin, resulterer i antistoffdannelse hos en andel av pasientene som blir heparinbehandlet [1, 2]. Av disse er det derimot bare en liten andel som utvikler klinisk HIT. Klinisk HIT er karakterisert av et fall i platetall som typisk inntreffer mellom dag 5 og 14 etter heparineksponering, og som ofte kompliseres av tromboemboliske hendelser [3].

HIT er en sjelden bivirkning, men pga det høye antallet pasienter som behandles med heparin, blir det absolute antallet pasienter så høyt at det sannsynligvis er blant de vanligste medikamentbivirkningene, og definitivt den vanligste av de immunmedierte, medikamentinduserte blodcellesykdommene [4].

1.2.1 Insidens

Prospektive og retrospektive studier viser at HIT oppstår hos 0,1-5 % av heparineksponerte pasienter, og sykdomsinsidensen varierer med medikament- og/eller vertsrelaterte risikofaktorer. Insidensen er ti ganger høyere ved bruk av UFH sammenlignet med LMWH.[5]. Andre faktorer som påvirker, om enn i mindre grad, er

varigheten av behandlingen og hvilket dyr heparinet er fremstilt fra [6]. Kirurgiske pasienter har større risiko enn medisinske pasienter. Det er uvanlig hos pediatriske pasienter, obstetriske pasienter og pasienter som får kronisk hemodialyse [7].

Grunnen til at noen pasienter utvikler en immunrespons mot PF4/heparin-komplekset, er foreløpig dårlig forstått. Det pågår studier som blant annet peker mot at antistoffsensitiveringen er assosiert med tidligere bakterielle infeksjoner og at de biofysiologiske egenskapene til de sirkulerende PF4/heparin-kompleksene bidrar til immunogenisiteten [8].

1.2.2 Patogenese

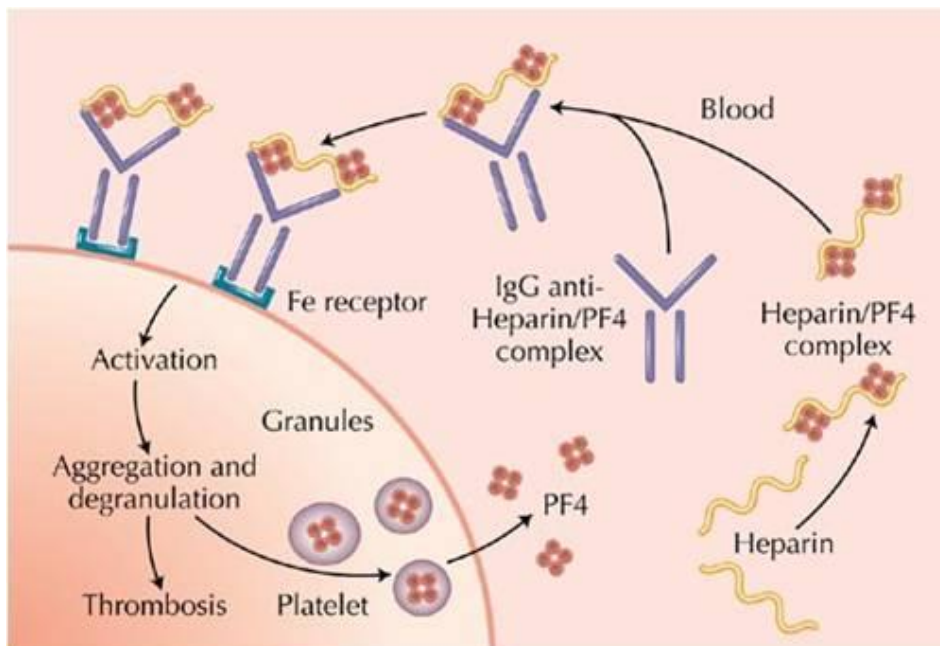
HIT skyldes plateaktiverende antistoffer som gjenkjenner PF4 i kompleks med et polyanion, vanligvis heparin [9]. Oftest finner man HIT-antigenene på PF4 bundet til heparin eller andre sulfaterte polysakkarider [1]. Det er antistoffene rettet mot disse som forårsaker tilstandens protrombotiske natur, på grunn av deres evne til å indusere plateaktivering [10, 11].

Heparin er et glycosaminoglycan (GAG) som består av lineære polymerer med repeterende disakkarid-subenheter som varierer i kjedelengde og grad av sulfatering. Binding til PF4 er uavhengig av heparins antitrombinkatalyserende egenskaper. Platefaktor 4 består av 70 aminosyrer (7780 Da) og tilhører en subfamilie av kjemokiner som kalles C-X-C. Fire PF4 går sammen og danner kompakte tetramerer med en globulær struktur. PF4 har overvekt av basiske aminosyrer som danner en ring med positiv ladning. Den positive ladningen gjør det mulig for heparin å binde seg. PF4 lagres i alfa-granuler i blodplatene, hvor de er bundet til et GAG. Under normale omstendigheter finner man bare spormengder av PF4 (ca. 3 ng/ml) i humant plasma, mens konsentrasjonen øker 15-30 ganger ved heparininfusjon og holder seg på dette nivået i mange timer. Dette skjer fordi PF4 løsner fra endotelcelleoverflaten [12].

Både størrelsen, kvantiteten og stabiliteten til PF4-heparinkompleksene påvirker immunogenisiteten. Ufraksjonert heparin er mer immunogent enn lavmolekylær heparin. Den patogene immunoglobulin-isotypen ved HIT er IgG. Plateaktiveringen indueres ved at trombocyttenes Fc-reseptor (Fcγ2a/CD32a) kryssbindes av flere IgG-molekyler [13]. Dette fører til generering av platederiverte mikropartikler,

aktivering av monocyttar og endotelceller, og til slutt aktivering av koagulasjonskaskaden som resulterer i massiv trombindannelse. Ved HIT skyldes altså ikke trombocytopenien fagocytose i det retikuloendoteliale system, men intravaskulær plateaktivering [4, 14].

Det er som sagt bare anti-PF4/heparin-antistoffer av IgG-type som har evne til å aktivere plater, men innenfor denne gruppen er det bare en liten andel av antistoffene som viser seg å ha plateaktiverende egenskaper. Dette fører til at laboratorietester som påviser de HIT-assosierte antistoffene vil gi et høyt antall falskt positive. Andel falske positive kan reduseres ved bruk av laboratorietester som påviser plateaktivering, som er det essensielle trinnet i utvikling av HIT [15, 16].



Figur 1: Patogenese ved HIT. Etter eksponering for heparin eller andre polyanioner dannes svært immunogene komplekser av disse og PF4. Disse kompleksene fører til dannelse av de klinisk signifikante immunoglobulinene IgG. Binding av IgGs Fc-del til trombocyttenes Fc-reseptorer (kryssbinding av flere IgG-molekyler) fører til plateaktivering med påfølgende utslipp av protrombotiske mikropartikler fra platenes granuler [17].

1.2.3 Kinisk presentasjon

Ved HIT ses som regel et fall i trombocytter på > 50 % etter fire dager med heparinbehandling. Samtidig ses ofte tromboemboliske hendelser. Disse inntreffer typisk på dag 5-14 etter oppstart av behandling med heparin i profylaktisk eller terapeutisk dose [18].

De tromboemboliske komplikasjonene er hovedsakelig venøse, ikke arterielle. Andre og mer sjeldne komplikasjoner er hudnekrose, hemorragisk nekrose i binyrene eller anafylaktiske reaksjoner etter en bolusdose med heparin. Dersom det oppstår en tromboemboliske hendelse i forløpet av heparinbehandling, må man alltid mistenke HIT. HIT-assosierte tromboser oppstår ofte idet reduksjonen i platetall nærmer seg 50 % [19].

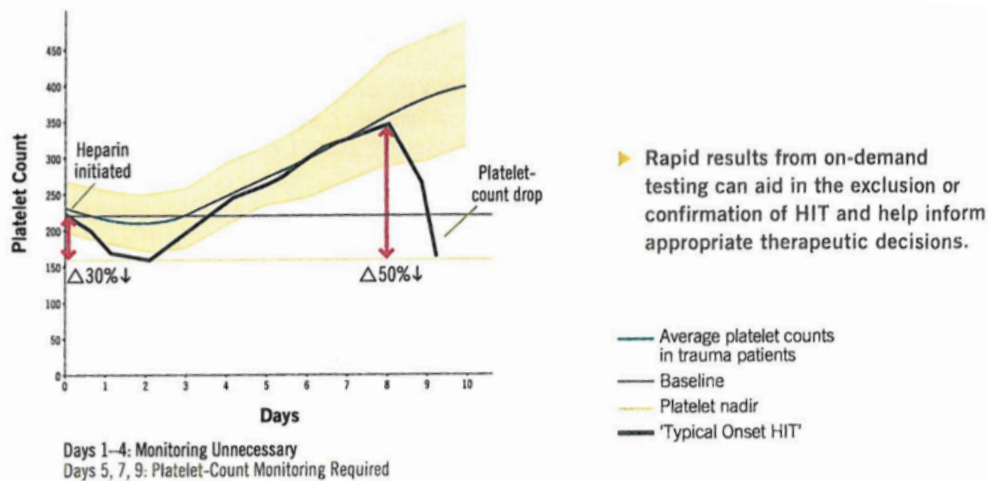
Et fall i platetall de første fire dager etter oppstart av heparinbehandling er vanligvis ikke HIT, med mindre pasienten har vært preimmunisert og allerede har sirkulerende PF4/heparin-antistoffer [20, 21]. Hos disse pasientene skjer platetallreduksjonen vanligvis innen få timer etter behandlingsstart. Dette kalles «rapid onset HIT». Heparinavhengige antistoffer har en tendens til å synke raskt i titer, og blir umulig å detektere hos > 90 % av pasientene innen 100 dager. Hos de fleste pasienter forsvinner antistoffene mye raskere, typisk innen 30 dager. På grunn av dette bør man hovedsakelig mistenke "rapid onset HIT" primært hos pasienter som har mottatt heparinbehandling i løpet av de siste 30 dagene [4].

1.2.4 Monitorering av platetall

På bakgrunn av PF4/heparin-kompleksets kinetikk har man funnet ut hvordan man best kan monitorere trombocytene hos pasienter for å mest effektivt kunne oppdage en eventuell heparinindusert trombocytopeni. Man bør gjennomføre platetelling ved oppstart av behandling samt dag 5, 7 og 9. Dette er tilstrekkelig for å kunne avdekke HIT-diagnosen hos det store flertallet av pasienter. Dersom pasientene nylig har fått heparinbehandling bør man i tillegg, for å kunne avdekke «rapid onset HIT», telle trombocytter 12-24 timer etter heparineksponering. [22].

Spesielt hos kirurgiske pasienter kan det å sammenligne platetall ved tidspunkt for HIT-mistanke med utgangsverdien, være villedende. Dette fordi disse pasientene typisk har en reaktiv økning i platetall, med høye verdier i den andre post-operative uke. Ved slike tilfeller vil graden av platetallreduksjon underestimeres [4].

Platelet-Count Monitoring



Figur 2:

Platetellingsmønster med reaktiv økning i platetall etter traumekirurgi. Reaktiv trombocytose etter avansert kirurgi er vanlig og regnes som en godartet tilstand, men gjør diagnostisering av HIT utfordrende. Å gjenkjenne en reduksjon i platetall på >50 % krever at man kan sammenligne det faktiske platetallet med platetallet på dag 5-10 etter oppstart av heparinbehandling. Det blir feil å sammenligne platetallet med utgangsverdien før behandlingsstart, fordi det vil underestimere reduksjonen i trombocytter [4].

1.3 Diagnostisering av HIT

HIT er en diagnose som er umulig å stille kun med bakgrunn i pasientens klinikk. Økende bruk av UFH/LWMH som tromboseprofylakse hos hospitaliserte pasienter, kombinert med en høy frekvens av trombocytopeni (spesielt blant svært syke pasienter) gjør det umulig å klinisk skille HIT fra andre mulige årsaker til trombocytopeni [23].

Den kliniske presentasjonen overlapper med en rekke tilstander som er langt mer vanlige. I en nylig publisert studie av 1000 pasienter behandlet med profylaktiske doser heparin, oppfylte 19 % kravene for en HIT-diagnose, men bare 5 % av pasientene fikk diagnosen [24]. Dette indikerer at andre årsaker til trombocytopeni, for eksempel infeksjoner eller andre medikamenter, er en langt mer sannsynlig etiologisk forklaring på trombocytopeni, selv hos pasienter behandlet med heparin [8].

To fremgangsmåter kan hjelpe klinikere med å utelukke HIT-diagnosen: 1) Systematisk vurdering av den kliniske presentasjonen ved hjelp av scoringsmodeller som regner ut pretest- sannsynligheten for HIT. 2) *In vitro* demonstrasjon av anti-PF4/heparin-antistoffer [25].

1.3.1 4 T score

Det mest brukte scoringssystemet for å regne ut pretest sannsynlighet for HIT kalles 4T-score. Dette scoringssystemet baseres på fire faktorer:

- Trombocytopeni
- Timing
- Trombose
- Other causes

En oversikt over 4T-scoringssystemet er gjengitt i tabell 1. En nylig publisert metaanalyse av 12 ulike studier som vurderte bruk av denne skåringsmodellen, viste at en lav score (< 3) er assosiert med en negativ prediktiv verdi (NPV) for HIT på 99,8 % [26]. Den positive prediktive verdien (PPV) var derimot relativt lav. PPV er beregnet til 14 % ved intermediaær sannsynlighet (score 4-5) og 64 % ved høy sannsynlighet (skåre > 6). Dette vil si at 4T-scoringssystemet har lav diagnostisk verdi ved høy eller intermediaær score, men er godt egnet til utelukke HIT ved lav score. Ved høy score bør man gå videre med laboratorietesting [8].

	2 poeng	1 poeng	0 poeng
Trombocytopeni	Fall i platetall > 50 % og plate nadir > 20 x 10 ⁹ /L	Fall i platetall 30-50 % eller plate nadir 10-19 x 10 ⁹ /L	Fall i platetall <30 % eller plate-nadir <10 x 10 ⁹ /L
Tidspunkt for reduksjon i platetall	Tydelig start dag 5-10 eller platefall < 1 dag (tidligere heparineksponering de siste 30 dager)	Sammenfallende med dag 5-10, men ikke sikkert; start etter dag 10; eller fall < 1 dag ved heparineksponering for 30-100 dager siden	Fall i platetall < 4 dager, uten tidligere heparineksponering
Tromboser/andre sekveler	Ny påvist trombose; hudnekrose; akutt systemisk reaksjon etter bolusdose med UFH	Progressiv eller tilbakevendende trombose; ikke-nekrotiserende hudlesjoner;mistenkt trombose (ikke påvist)	Ingen
Andre årsaker til trombocytopeni	Ingen åpenbare	Mulig	Definitivt

Tabell 1: Pretest scoringssystem for HIT, 4T-score. Adaptert fra Warkentin et al. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings [27].

1.3.2 Oversikt over laboratorietester

Sammen med et scoringssystem for bestemmelse av klinisk sannsynlighet for HIT, er påvisning av PF4/heparin-antistoffer den viktigste metoden for å bekrefte eller avkrefte HIT-diagnosen hos pasienter hvor tilstanden mistenkes. Siden symptombildet ved HIT overlapper med det man ser ved mange tilstander som er vanlig hos alvorlig syke pasienter, er det ofte nødvendig med denne typen tester [9].

Tester for påvisning av HIT-antistoffer er utviklet i takt med forståelsen av patofysiologien som ligger bak denne tilstanden, og i dag er det mange tester å velge mellom. To grupper med serologiske tester er tilgjengelig på markedet [28]. Den første gruppen er antigen-assayer, eller immunologiske assayer. Felles for disse er at de gjenkjenner antistoffer som binder til komplekser av PF4 og heparin. Eksempler innen denne gruppen inkluderer latex-agglutinasjon, ELISA, partikkelgel-immuno-assay og partikkel-immunofiltrasjon-assayer. I den senere tid har også to automatiserte metoder kommet på markedet. Den ene metoden er basert på latexagglutinasjon og kompetitiv inhibering, mens den andre er basert på kjemiluminiscens [25].

Den andre gruppen av serologiske tester er de funksjonelle testene, også kaldt "washed-platelet" assays eller plateaktiveringsassay [9]. Denne gruppen oppdager heparinavhengig plateaktivering forårsaket av pasientens serum. Den store fordelen med de funksjonelle testene er at de kun påviser de antistoffene som er klinisk signifikante: De antistoffene som er i stand til å aktivere trombocytter. Det er denne aktiveringen som er det essensielle tippet i utviklingen av HIT [29].

1.3.2.1 Immunologiske assays

Det finnes to hovedtyper immunologiske assays, som begge påviser anti-PF4/heparin-antistoffer: 1) Enzymkoblet immunsorbent-assay (ELISA) og 2) partikkelbaserte immunoassays [25].

1.3.2.1.1 Enzymkoblet immunsorbent analyse – ELISA

Det er utviklets minst fire kommersielt tilgjengelige ELISA for påvisning av humane PF4/H-antistoffer. Hovedforskjellen mellom de ulike assayene er hvilket antigen som er brukt, PF4 med heparin eller PF4 med polyvinyl sulfonate (PVS) [1, 25].

ELISA-teknologien går ut på at man kler et fast stoff, vanligvis veggene i mikroplate-brønner, med PF4 i kompleks med heparin eller andre polyanioniske komponenter, for eksempel PVS. Etter inkubering og vasking tilsettes et anti-humant antistoff merket med alkalisk fosfatase (ALP) eller horseradish peroxidase (HRP). Dersom det er HIT-antistoffer tilstede, vil disse klemmes mellom PF4/heparin eller -PVS antigenene som brønneren er kledd med, og de tilsatte anti-humane antistoffene. Dette kan i neste trinn oppdages ved å tilsette para-nitrophenyl-fosfat (pNPP) eller tetramethylbenzidine substrat (TMB) og lese av ved 405 nm (ved bruk av pNPP) eller 450 nm (ved bruk av TMB) på en mikroplateleser [4, 30]. Intensiteten av fargeforandringen er proporsjonal med mengden bundet antistoff og måles i optisk tetthet (OD) [4, 31, 32]. Fullstendig fremgangsmåte for gjennomføring av PF4/heparin ELISA finnes i vedlegg 2.

ELISA har veldig høy NPV og er dermed godt egnet til å utelukke HIT. Spesifisiteten er lav (mellom 40-80 %) og man får dermed mange falskt positive [25].

Disse assayene er kvalitative og utførelsen krever ca 2 timer dersom trinn 1-2 i fremgangsmåten (vedlegg 2) er utført på forhånd, slik det som regel er. Avhengig av de ALP- eller HRP-kledde antistoffene som tilsettes, kan alle immunoglobulinklasser eller bare en individuell klasse (for eksempel IgG) bestemmes [4, 25].

1.3.2.1.2 Partikkelbaserte immunoassays

Partikkelbaserte immunoassays oppdager anti-PF4/H-antistoffer ved agglutinasjon av partikler med PF4/heparin-komplekser. Et eksempel innen denne kategorien er gelkorttesten som har vært standard ved laboratoriet i Tromsø. Et annet eksempel er de fullt automatiserte kjemiluminescerende immunosayene fra HemosIL: AcuStar HIT-Ab og HemosIL AcuStar HIT-IgG, som er basert på binding av anti-PF4/H-antistoffer til PF4/PVS. De kan skille mellom ulike antistoffklasser (enten kun IgG eller total mengde antistoff) [25].

Gelkort PaGIA

Dette er en heparin/PF4-antistofftest fra DiaMed. Den er utformet som en gelkorttest (partikkel gel immunoassay). Rødfargede partikler sensibilisert med Heparin/PF4-komplekser mikses med pasientens serum. Dersom pasienten har antistoff mot dette komplekset, fører det til agglutinerings av partiklene. For å separere agglutinerte og ikke-agglutinerte partikler blir reaksjonsløsningen sentrifugert gjennom en gel-filtrasjonsmatrix. Ved positiv reaksjon vil agglutinerte partikler forme en rød linje på overflaten av gelen eller fordeles nedover i gelen. I negativ prøve vil polymerpartiklene vandre gjennom gel-kolonnen og samles i bunnen av røret [33].

Gelkort-metoden har høy sensitivitet og er dermed god til å indentifisere syke individer, men har til gjengjeld dårlig spesifisitet. Dermed vil man ved bruk av bare denne testen få en betydelig overdiagnostisering av HIT, med påfølgende seponering av heparinbehandling hos for mange pasienter [34].

Testresultatet evalueres visuelt, er ikke-kvantitativt og skiller ikke mellom antistoffklasser. Hovedfordelen ved denne testen er at den bare tar 15 minutter å gjennomføre [25]. Det er få prospektive studier som har sammenlignet PaGIA og ELISA, men to studier som er gjort viser et høyt antall falskt positive ved bruk av denne testen [29, 35].

HemosIL AcusStar HIT-IgG/Ab

HemosIL AcuStar er et full-automatisert kjemiluminiserende immunosay som enten kan påvise total mengde antistoffer (IgG, IgA og IgM) som reagerer med PF4/heparin-komplekser eller mengden IgG-antistoffer som reagerer med PF4/heparin-komplekser. Prøvematerialet er citrert plasma eller serum. Denne metoden krever tilgang på en AcuStar-maskin og et AcuStar HIT-IgG eller -Ab kit, avhengig av om man vil bestemme mengde IgG eller total mengde antistoff [36].

HemosIL AcuStar HIT IgG er et to-trinns assay bestående av magnetiske partikler kledd med PF4/PVS-komplekser. Disse kompleksene vil fange eventuelle PF4/heparin-antistoffer som er tilstede i prøven. Etter inkubering, magnetisk separasjon og vasking, vil en tracer bestående av isoluminol-kledde anti-humane IgG antistoffer tilsettes. Disse

kan så binde PF4/heparin IgG på partiklene. Etter en ny runde inkubering, magnetisk separasjon og vasking, tilsettes et reagens som trigger luminescensreaksjonen. Det emiterte lyset måles i relative lysenheter (RLU) av ACL AcuStars optiske system. Antall RLU er direkte proporsjonal med PF4/heparin IgG-konsentrasjon i prøven [4, 37]. For fullstendig fremgangsmåte for gjennomføring av HemosIL AcuStar, se vedlegg 1.

Ved hjelp av HemosIL AcuStar HIT oppnår man prøvesvar i løpet av 30 minutter. Man kan teste spesifikt for IgG, eller for antistoffer generelt. Som følge av at assayet er automatisert oppnår man svært presise og brukeruavhengige resultater [38]. Disse assayene er vist å ha høy PPV. Særlig er et sterkt positivt resultat assosiert med høy sannsynlighet (> 85 %) for at prøven inneholder plateaktiverende antistoffer [25].

1.3.2.2 Funksjonelle assay

Dette er en gruppe tester som påviser heparinavhengig plateaktivering. Fordelen med denne typen assay er at de *in vitro* demonstrerer den immunologiske kaskaden som er nødvendig for å utvikle HIT. De går altså et skritt lengre enn de immunologiske assayene ved at de demonstrerer antistoffenes evne til å aktivere plater. Funksjonelle assay vil dermed ha høyere PPV for HIT enn de immunologiske [4]. Siden mange PF4/heparin-antistoffer ikke har evne til å aktivere plater, er det bare rundt 50 % av de som tester positivt i immunologiske tester som også tester positivt i de funksjonelle testene [16].

Bruk av denne typen tester er avhengig av tilgang på humane donorplater fra friske givere, noe som kan by på praktiske utfordringer. På mindre laboratorium kan det å skaffe til veie donorplater representere en utfordring i seg selv, og vil ofte utelukke muligheten for å rutinemessig utføre denne typen assay. I tillegg er det vist at donorplater fra ulike givere har ulik evne til å aktiveres av HIT-antistoffene [39]. Man må dermed identifisere donorer som er reaktive for det assayet man har valgt å bruke [4].

Bruk av vaskede normale plater forbedrer sensitiviteten sammenlignet med bruk av platerikt plasma [40], men vaskingen av platene øker den tekniske kompleksiteten og begrenser dermed bruken av denne typen assay til erfarne laboratorier [41].

1.3.2.2.1 Serotonin release assay (SRA)

Serotonin release assay er vist å samlet sett inneha best testegenskaper og anses i dag som gullstandard når det kommer til å bestemme om en pasient har HIT eller ikke [42, 43]. Til tross for den høye sensitiviteten og spesifisiteten sammenlignet med mange av de andre testene, utføres denne testen stort sett kun på noen få høyt spesialiserte laboratorier. Dette som følge av høy kompleksitet og bruk av radioaktive materialer [28].

SRA ble introdusert av Sheridan D et al. i 1986 [44]. Vaskede normale donorplater inkuberes med radiomerket serotonin (^{14}C -5-hydroksytryptamine; 5-HT). Plater som er metabolsk aktive vil da inkorporere og lagre serotonin i sine delta-granuler. De radioaktive platene inkuberes så med pasientens serum, både med og uten terapeutisk konsentrasjon heparin (0,2-1,0 U/ml), samt klart supraterapeutisk konsentrasjon (100 U/ml). Etter inkubering måles mengden radioaktivitet i supernatanten ved scintillasjonstelling og prosentandel som er frigitt sammenlignet med total mengde radioaktivitet ved start regnes ut. > 20 % løslatelse ved terapeutisk heparinkonsentrasjon og < 20 % løslatelse ved supraterapeutisk konsentrasjon anses som positivt resultat [4, 45, 46].

Den viktigste fordelen ved bruk av SRA er den meget sensitive målingen av plateaktivering som følge av bruk av en radioisotopspor. De største ulempene er at man må håndtere radioaktivt materiale, noe som mange laboratorier nå prøver å unngå, assayets kompleksitet og at det tar relativt lang tid å utføre testen [45].

1.3.2.2.2 Plateaggregeringstest (PAT)

Plateaggregeringstest var det første funksjonelle assayet for påvisning av HIT og ble lansert av Carter CJ et al. i 1984 [47]. Serum, ulike konsentrasjoner av heparin og donorplater inkuberes sammen før man måler eventuell plateaggregering. Positiv test indikeres av tilstrekkelig aggregering ved tilstedeværelse av terapeutisk konsentrasjon av heparin, men ikke ved supraterapeutisk konsentrasjon. Fordelen med denne testen er at den er noe enklere å gjennomføre, da man her benytter platerikt plasma i stede for vaskede plater. Sensitiviteten varierer avhengig av heparinkonsentrasjon og platedonor [48].

1.3.2.2.3 Heparin-Induced Platelet Activation Assay (HIPA)

HIPA ble først beskrevet av Greinacher et al. i 1991 [49]. Dette er et sensitiv og hurtig funksjonelt assay for PF4/H-antistoff, basert på visuell evaluering av heparin-indusert plateaktivering i mikrotiterplatebrønner. Donorplater inkuberes med pasientserum og heparin. Positivt serum brukes som positiv kontroll og buffer brukes som negativ kontroll. Inkuberingen skjer med to stålkuler i brønnen og magnetisk røring. Til slutt graderes brønnes gjennomskinnelighet på en skala fra 1-4, hvor 1 korresponderer til positiv kontroll

[50]. Fullstendig fremgangsmåte for gjennomføring av HIPA-assay finnes i vedlegg 3.

HIPA er vist å ha lignende sensitivitet og spesifisitet som SRA og er overlegent bedre enn PAT [3]. Fordeler med HIPA at det er en relativt enkel test å utføre. En ulempe er at evalueringen av testresultat gjøres visuelt og dermed er brukeravhengig. Best sensitivitet og spesifisitet oppnås ved bruk av vaskede plater og prescreening av platedonorer [4, 50].

1.3.2.3 Oppsummering av tester

Test	Immunologiske assay			Funksjonelle assay	
	ELISA	HemosIL AcuStar	Gelkort	HIPA	SRA
Tidsbruk	2 t	30 min	15-20 min	2 t (+ 2 t forberedelse)	Som regel ikke svar før etter inntil 2 dage
Sensitivitet	94-100 %	96-100 %	91-94 %	> 95 %	Gullstandard
Spesifisitet	81-93 %	85-97 %	87-95 %	> 95 %	Gullstandard
Antistoffklasse påvist	IgG eller alle	IgG eller alle	Alle	IgG	IgG
Evalueres	Digitalt	Digitalt	Visuelt	Visuelt	Digitalt
Fordeler	Høy NPV. Billig.	Automatisert. Rask.	Rask. Enkel. Billig.	Høy sensitivitet og spesifisitet. Relativt rask.	Høyest sensitivitet og spesifisitet av alle assays.
Ulemper	Mange falskt positive.	En del falskt positive.	Mange falskt positive. Skiller ikke mellom Ig-klasser.	Behov for donorplater. Teknisk krevende.	Bruk av radioaktivt materiale. Behov for donorplater. Tidkrevende. Teknisk krevende.

Tabell 2: Oppsummering av ulike tester brukt ved diagnostisering av HIT. Informasjon om sensitivitet og spesifisitet er hentet fra en studie om diagnostikk av HIT Adam Cuker fra 2014 [51].

1.3.3 Dagens analysemetode ved UNN Tromsø

Avdelingen ved UNN Tromsø har siden 1995 hatt status som Nasjonalt laboratorium for avansert blodplateimmunologi [3]. På nåværende tidspunkt utføres det kun én analysemetode for diagnostisering av HIT ved UNN Tromsø – gelkortttesten PaGIA.

1.4 Behandling

Trombindannelse er en av de klinisk viktigste karakteristikene ved HIT. Derfor er det ikke tilstrekkelig å stoppe heparinbehandling når diagnosen mistenkes. Man bør også starte alternativ antikoagulerende behandling [25]. Vitamin K-antagonister er kontraindisert på grunn av deres initiale protrombotiske effekt som følge av virkningen på protein C. Ved bruk av disse vil det lett oppstå distal venøs trombose og/eller hudnekrose i det ekstremt hyperkoaguabile miljøet hos HIT-pasienter. Dersom pasienten allerede behandles med vitamin K-antagonist når HIT-diagnosen erkjennes, anbefales det å administrere vitamin K for å reversere den uønskede effekten av medikamentet [41].

Ved HIT benytter man alternative antikoagulantia. Da bruk av disse svært sjelden er indisert, har mange klinikere begrenset erfaring med disse medikamentene. Dette øker risikoen både for blødning på grunn av overdosering og trombotiske hendelser på grunn av underdosering [25].

Det finnes tre medikamenter på markedet som er godkjent for bruk hos HIT-pasienter: To direkte trombinhemmere, lepirudin og argatroban, og et heparinoid. Bruk av alle alternative antikoagulantia innebærer signifikant risiko for blødning (0,8-1,25 % per behandlingsdag), og det finnes ingen antidot [41].

Trombocytopeni er det viktigste funnet når HIT mistenkes hos intensivpasienter. Det er viktig å huske at dette er en vanlig problemstilling hos denne pasientgruppen og at det kan ha mange årsaker. Insidensen av HIT hos intensivpasienter med trombocytopeni er bare 0,5 % [52]. Da denne gruppen pasienter har økt risiko for blødning, anbefales det hos de med lav til moderat klinisk sannsynlighet for HIT, profylaktiske doser med

alternative antikoagulantia i stedet for terapeutisk dose mens man venter på laboratorieresultatene [41].

2. Materiale og metode

2.1 Studiedesign

Denne studien er utført retrospektivt. Mellom 2009 og 2015 ble det ved laboratoriet ved UNN Tromsø samlet serum fra 62 pasienter med klinisk mistanke om HIT og som hadde vært behandlet med heparin. Serumet ble umiddelbart testet ved hjelp av gelkortteknikk, før det ble lagret i nedfrost tilstand med tanke på å senere gjøre analyser for å bestemme hvilke(n) laboratorietest(er) som er best egnet til diagnostikk av HIT ved UNNs laboratorium.

Man ønsket å bestemme pretest-sannsynlighet for HIT ved hjelp av 4T-score, men som følge av mangelfull informasjon i pasientjournalene lot ikke dette seg gjennomføre.

Det ble valgt ut to antigen-assay, i tillegg til gelkorttesten som allerede var utført: AcuStar HemosIL HIT IgG og PF4/Heparin ELISA. Assayene ble valgt basert på følgende kriterier:

- Sensitivitet
- Spesifisitet
- Kostnader
- Tidsbruk
- Gjennomførbarhet ved laboratoriet ved UNN Tromsø

For å kunne sammenligne de tre immunologiske testene, ble det på prøver som gav positivt resultat i én eller flere av de tre assayene utført et funksjonelt assay – HIPA, som her er brukt som referansetest. Dette kan forsvares da det er vist at HIPA har lignende testegenskaper som SRA, som er den testen som ses på som gullstandard for påvisning av HIT [3].

De 62 nedfrosne pasientprøvene ble medbrakt til avdelingen for immunologi og transfusjonsmedisin ved universitetssykehuset i Greifswald, som er ledende innen forskning på HIT. PF4/heparin ELISA, AcuStar HemosIL HIT IgG og HIPA ble utført ved deres laboratorium etter opplæring fra, og i samarbeid med personalet der. Dette personalet jobber daglig for å påvise eller utelukke HIT.

2.2 Inklusjonskriterier

Studien inkluderer pasienter ved UNN Tromsø som har vært behandlet med heparin og hvor det var klinisk mistanke om heparinindusert trombocytopeni mellom 2009 og 2015.

2.3 Assays

2.3.1 Gelkort PaGIA

Ved tidspunktet da pasientprøvene ble innsamlet, fungerte gelkorttesten PaGIA som standardtest for påvisning av HIT-relaterte antistoffer ved klinisk mistanke om HIT. Denne testen ble utført på alle pasientprøvene i henhold til laboratoriets retningslinjer. Rød linje på overflaten av gelen ble tolket som positiv test. Se vedlegg 4 for fullstendig fremgangsmåte for gjennomføring av denne testen.

2.3.2 HemosIL AcusStar HIT-IgG

HemosIL AcuStar HIT-IgG ble utført i henhold til produsentens instruksjoner. Alle trinnene ble utført av den automatiserte HemosIL AcuStar HIT-maskinen i ved laboratoriet i Greifswald. Et HemosIL AcuStar HIT-IgG resultat $\geq 1,00$ U/ml ble etter leverandørens anbefalinger tolket som positiv test. For fullstendig fremgangsmåte, se vedlegg 1.

2.3.3.PF4/heparin ELISA

PF4/heparin ELISA ble gjennomført i henhold til retningslinjene og fremgangsmåten ved laboratoriet i Greifswald, se vedlegg 2 for detaljert beskrivelse av fremgangsmåte. Optisk tetthet i hver brønn ble målt ved hjelp av en mikroplateleser ved 450 nm, man trakk så fra optisk tetthet i målt i blanke brønner (brønner med kun buffer uten pasientprøve, i vårt tilfelle 0,5 OD). Resultat $> 0,5$ OD ble etter laboratoriets anbefalinger tolket som positiv test.

2.3.4 HIPA

HIPA ble utført som beskrevet i vedlegg 3. Hver prøve ble testet med vaskede plater fra tre ulike friske donorer både med og uten tilstedeværelse av heparin. En prøve ble tolket som positiv hvis platene fra minst to donorer aggregerte i løpet av 30 minutter ved tilstedeværelse av heparin, men ikke ved fravær av heparin.

2.4 Arbeidsprosessen

Vi ønsket begge å skrive en oppgave innenfor immunologi. Hver for oss tok vi i desember -13 kontakt med Bjørn Skogen i immunologisk forskningsgruppe ved UNN Tromsø med spørsmål om forslag til et prosjekt. Skogen fortalte at han i en årrekke hadde samlet prøver fra pasienter med mistanke om HIT. Tanken var at disse prøvene en gang skulle brukes i et prosjekt for utbedring av diagnostikken av denne tilstanden.

Ingen av oss hadde tidligere hørt om HIT. Vi brukte derfor litt tid på å sette oss inn HITs epidemiologi, patofysiologi og klinikk før vi tok en avgjørelse. Begge syntes det hørt ut som et interessant prosjekt. Som følge av prosjektets størrelse fulgte vi Skogens anbefaling om å gjøre det sammen, med ham som veileder. Prosjektbeskrivelse og veilederkontrakt ble så utformet før utgangen av januar 2014.

I utgangspunktet var meningen at vi etter gjennomgang av litteratur og seleksjon av to til tre alternative laborietester for diagnostikk av HIT, skulle gjennomføre testene ved UNN Tromsøs laboriefasiliteter. Da Anniken er bioingeniør fra tidligere trodde vi dette skulle kunne gjennomføres. I juni -14 hadde vi derfor én ukes omvisning og opplæring på laboriet. Det viste seg imidlertid at noen av analysene, særlig de funksjonelle testene, er såpass spesialiserte at vi ikke kunne gå i gang alene uten opplæring i disse analysene. Det ble dermed besluttet at Marte skulle besøke avdelingen for immunologi og transfusjonsmedisin ved universitetssykehuset i Greifswald, som er ledende innen forskning på HIT. Her fikk hun opplæring i utføring av PF4/heparin ELISA, AcuStar HemosIL HIT IgG og HIPA. Under oppholdet ble PF4/heparin ELISA og AcuStar HemosIL HIT IgG utført på alle prøvene. HIPA er en meget avansert analyse, som ikke er aktuell for implementering i diagnostikken ved UNN Tromsø, men som i studien vår er brukt som referansetest. For å unngå unødvendige feilkilder ble denne derfor utført av bioingeniører ved laboriet i Greifswald. Detaljert oversikt over arbeidet med oppgaven finnes i tabellen under:

Hva:	Tidsrom (tid per student)
Finne oppgave og veileder og sette seg inn i temaet	Desember -13
Prosjektbeskrivelse og veileder kontrakt	Januar -14
Omvisning og opplæring på UNNs laboratorium	Èn uke, juni -14
Innsamling av aktuell litteratur	To uker, mars -15
Gjennomgang av aktuell literatur	Fire uker, mars og april -15
Gjennomgang av pasientjournaler (4T score)	Èn uke, april -15 *
Laboratoriearbeid i Greifswald	Èn uke, april -15 **
Gjennomgang og bearbeiding av analysesvar	Èn uke, april -15
Utforming av oppgavetekst og forslag til algoritme	Fire uker, mai -15

*Tabell 3: Illustrerer arbeidet med oppgaven. En oversikt over hva som er gjort og tidsbruk. Vi har jobbet sammen under hele oppgaven, med to unntak: Laboratoriearbeid og gjennomgang av journaler for å forsøke å bestemme 4T-score. * Kun Anniken, ** Kun Marte.*

3. Resultater

3.1 Testresultater

3.1.1 Gelkort PaGIA

Alle de 62 pasientprøvene ble testet ved hjelp av Gelkort PaGIA-testen som påviser IgG-, IgA- og/eller IgM-antistoffer mot PF4/heparin-komplekser. 29 (46,8 %) av pasientprøvene var positive. Blant disse var det 10 (29 %) som også testet positivt i HIPA.

3.1.2 HemosIL AcuStar HIT-IgG

Alle de 62 pasientprøvene ble testet ved hjelp av HemosIL AcuStar HIT-IgG som påviser IgG-antistoffer mot PF4/heparin-komplekser. 12 (19,4 %) av pasientprøvene var positive. Blant disse var det 9 (75,0 %) som også testet positivt i HIPA. Fullstendig testresultat finnes i vedlegg 5.

3.1.3 PF4/heparin ELISA

Alle de 62 pasientprøvene ble testet ved hjelp av PF4/Heparin ELISA som påviser IgG-antistoffer mot PF4/heparin-komplekser. 22 (35,5 %) av pasientprøvene var positive. Blant disse var det 12 (54,6 %) som også testet positivt i HIPA. Fullstendig testresultat finnes i vedlegg 6.

3.1.4 HIPA

Av de 62 pasientprøvene var det 34 som gav positivt resultat i én eller flere av de tre immunologiske testene. Alle disse ble så testet ved hjelp av HIPA. Av disse var det 12 (35,3 %) som gav positivt resultat. Fullstendig testresultat finnes i vedlegg 7.

3.1.5 Sammendrag av testresultater

Prøve-ID	PaGIA	AcuStar HIT-IgG	PF-ELISA	HIPA
1	Pos	Pos	Pos	Pos
2	Neg	Neg	Neg	-
3	Neg	Neg	Neg	-
4	Neg	Neg	Pos	Neg
5	Pos	Pos	Pos	Pos
6	Pos	Pos	Pos	Pos
7	Neg	Neg	Neg	-
8	Neg	Neg	Neg	-
9	Pos	Neg	Neg	Neg
10	Neg	Neg	Neg	-
11	Neg	Neg	Pos	Pos

MED-39505 5.årsoppgaven – Profesjonsstudiet i medisin ved UiT

12	Pos	Pos	Pos	Pos
13	Pos	Pos	Pos	Pos
14	Pos	Neg	Neg	Neg
15	Pos	Neg	Pos	Neg
16	Pos	Pos	Pos	Neg
17	Pos	Neg	Neg	Neg
18	Neg	Neg	Neg	-
19	Neg	Neg	Neg	-
20	Pos	Pos	Pos	Pos
21	Pos	Neg	Neg	Neg
22	Neg	Neg	Neg	-
23	Neg	Neg	Pos	Pos
24	Neg	Neg	Neg	-
25	Neg	Neg	Neg	-
26	Pos	Neg	Neg	Neg
27	Pos	Pos	Pos	Pos
28	Pos	Pos	Pos	Pos
29	Neg	Neg	Neg	-
30	Neg	Neg	Neg	-
31	Pos	Pos	Pos	Neg
32	Neg	Neg	Pos	Neg
33	Pos	Pos	Pos	Neg
34	Neg	Neg	Neg	-
35	Neg	Neg	Neg	-
36	Neg	Neg	Neg	-
37	Pos	Neg	Pos	Neg
38	Neg	Neg	Neg	-
39	Neg	Neg	Neg	-
40	Pos	Neg	Pos	Neg
41	Pos	Neg	Neg	Neg
42	Neg	Neg	Neg	-
43	Pos	Neg	Neg	Neg
44	Neg	Neg	Neg	-
46	Pos	Neg	Neg	Neg
47	Neg	Neg	Neg	-
48	Neg	Neg	Neg	-
49	Neg	Neg	Neg	-
50	Pos	Neg	Neg	Neg
51	Neg	Neg	Neg	-
52	Neg	Neg	Neg	-
53	Pos	Neg	Neg	Neg
54	Neg	Neg	Pos	Neg
55	Pos	Neg	Neg	Neg
56	Neg	Neg	Neg	-
57	Pos	Neg	Pos	Pos
58	Pos	Neg	Pos	Neg
59	Neg	Neg	Neg	-
60	Pos	Pos	Pos	Pos
62	Neg	Neg	Neg	-

63	Neg	Neg	Neg	-
64	Pos	Neg	Neg	Neg

Tabell 4: Resultat for alle de 62 pasientprøvene ved testing med henholdsvis Gelkort PaGIA, HemosIL AcuStar HIT-IgG, PF4/Heparin ELISA og HIPA. HIPA ble bare utført på de pasientprøvene hvor én eller flere av de tre immunologiske assayene gav positivt resultat.

3.2 Testegenskaper og diagnostiske egenskaper

Testegenskaper (sensitivitet og spesifisitet) og diagnostiske egenskaper (positiv prediktiv verdi og negativ prediktiv verdi) er regnet ut på bakgrunn av vårt testresultat. HIPA er brukt som referansetest.

3.2.1 Gelkort PaGIA

- Sensitivitet: 83,3 %
- Spesifisitet: 62,0 %
- Positiv prediktiv verdi: 29,0 %
- Negativ prediktiv verdi: 93,4 %

	HIPA positiv	HIPA negativ	Sum	
PaGIA positiv	10	19		29
PaGIA negativ	2	31		33
Sum	12	50		62

Tabell 5: Resultat fra Gelkort PaGIA sammenlignet med resultat fra HIPA fremstilt i en 2x2-tabell.

3.2.2 HemosIL AcuStar IgG

- Sensitivitet: 75,0 %
- Spesifisitet: 94,0 %
- Positiv prediktiv verdi: 75,0 %
- Negativ prediktiv verdi: 94,0 %

	HIPA positiv	HIPA negativ	Sum	
HemosIL positiv	9	3		12
HemosIL negativ	3	47		50
Sum	12	50		62

Tabell 6: Resultat fra HemosIL AcuStar IgG sammenlignet med resultat fra HIPA fremstilt i en 2x2-tabell.

3.2.3 PF4/Heparin ELISA

- Sensitivitet: 100,0 %

- Spesifisitet: 80,0 %
- Positiv prediktiv verdi: 54,6 %
- Negativ prediktiv verdi: 100,0 %

	HIPA positiv	HIPA negativ	Sum	
ELISA positiv	12	10	22	
ELISA negativ	0	40	40	
Sum	12	50	62	

Tabell 7: Resultat fra PF4/Heparin ELISA sammenlignet med resultat fra HIPA fremstilt i en 2x2-tabell.

4. Diskusjon

Det er viktig med korrekt diagnostisering av HIT. Det vil redusere risikoen for trombotiske hendelser hos pasienter med tilstanden. I tillegg vil det hindre unødig seponering av heparin hos pasienter med klinisk mistanke om diagnosen, men som har trombocytopeni som følge av en av de mange vanligere årsakene til dette.

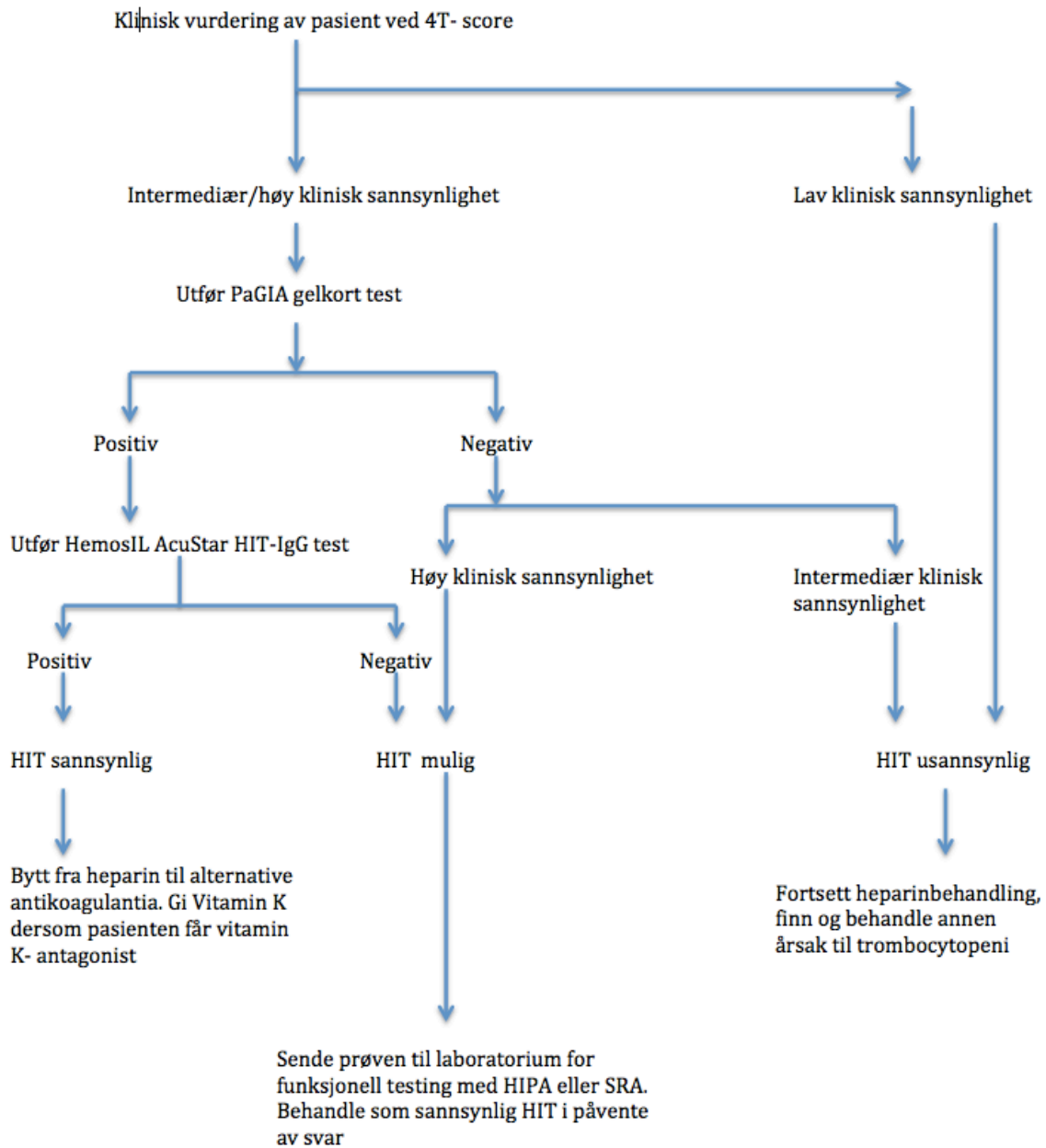
Overdiagnostisering er et problem hos pasienter med mistanke om HIT. Bytte fra heparin til et av de alternative antikoagulantia medfører risiko for komplikasjoner. Det er generelt lite erfaring med bruk av disse medikamentene, noe som medfører risiko for over- og underdosering og dermed henholdsvis blødning og trombotiske hendelser. I tillegg mangler man antidot. Disse faktorene understreker viktigheten av nøyaktig diagnostikk og færrest mulig falske positive pasienterprøver. En pålitelig diagnose er essensielt for trygg og kostnadseffektiv pasientbehandling, da både over- og underdiagnostisering har potensielt livstruende konsekvenser.

Som følge av de alvorlige konsekvensene, både med tanke på pasientsikkerhet og ressursbruk, og dagens mangelfulle diagnostiske tilbud ved mistanke om HIT ved UNN Tromsø, vurderes det som nødvendig å sette inn tiltak for å forbedre diagnostiseringen. Ved bruk av dagens metode får man en stor andel falske positive. Her ligger det et betydelig forbedringspotensial. Det var et ønske om å fylle dette potensialet som var bakgrunnen for arbeidet med dette prosjektet.

Med bakgrunn i våre analyser, gjeldende retningslinjer ved anerkjente laboratorier, gjennomgang av tidligere utførte studier, samt en vurdering av gjennomførbarhet med tanke på kostnader, tidsbruk og arbeidsmengde ved laboratoriet på UNN Tromsø, har vi kommet frem til et forslag for hvordan man bør gå frem ved diagnostisering av pasienter med klinisk mistenke om HIT. Som følge av det relativt lille utvalget i denne studien, er det i tillegg til våre resultater også lagt vekt på resultater fra større studier som har vurdert bruken av de ulike testene.

Vårt forslag til håndtering av pasienter med klinisk mistanke om HIT er presentert i et flytskjema (figur 3).

4.1 Diagnostisk algoritme



Figur 3: Flytskjemaet demonstrerer vår anbefalte håndtering av pasienter med klinisk mistanke om HIT, ved UNN Tromsø

Det er hensiktsmessig å begynne utredningen av HIT med scoringssystemet 4T før man går videre med laborietesting. Dette som følge av at HIT i utgangspunktet er en meget sjelden diagnose hvor den kliniske presentasjonen overlapper med en rekke tilstander som er langt mer vanlig. Uten å benytte et slikt system vil man ende opp med

å analysere uforholdsmessig mange pasientprøver. Dette medfører unødig tid- og ressursbruk og vil i tillegg resultere i mange falskt positive prøvesvar. Den høye negative prediktive verdien til scoringssystemet gjør at man ved lav score kan utelukke diagnosen uten videre testing.

Hos pasienter med 4T-score mellom 4 og 8 poeng anbefaler vi å gå videre med gelkorttesten PaGIA. Grunnen til dette er at denne testen allerede er godt etablert ved laboratoriet, er rask og relativt billig å utføre, samt har høy sensitivitet og NPV. De immunologiske analysene har generelt høyere NPV enn de funksjonelle testene. Disse kan derfor brukes til å utelukke HIT på samme måte som man bruker analysering av d-dimer for å utelukke venøs tromboembolisme. I vår analyse fikk vi en noe dårligere sensitivitet enn det som er funnet i andre studier. Dette tilskrives størrelsen på utvalget vårt.

Dersom man får et positivt resultat med gelkorttesten er det, som følge av en relativt lav PPV, nødvendig med videre testing for å kunne bekrefte eller avkrefte diagnosen. Av de analysene som har blitt gjennomført i arbeidet med denne oppgaven, er det, utenom HIPA, AcuStar HIT- IgG-testen fra Hemosil® som har høyest spesifisitet og dermed er best egnet. ELISA hadde en langt lavere spesifisitet. Bruk av ELISA fremfor AcuStar vil dermed resultere i en unødvendig høy overdiagnostisering av HIT, med påfølgende negative konsekvenser av bytte fra heparin til alternative antikoagulantia som diskutert tidligere. Aller høyest spesifisitet har de funksjonelle testene, men da disse er både er teknisk svært krevende og tar relativt lang tid, er de forbeholdt mer spesialiserte laboratorier.

I tillegg til at AcuStar HIT- IgG har de beste diagnostiske egenskapene av de gjennomførte analysene, er dette en helautomatisert metode. Testresultatet vil dermed ikke være brukeravhengig, som ved ELISA, hvor testresultatet er avhengig av ekspertisen hos den som utfører testen.

Basert på en helhetsvurdering velger vi å anbefale innføring av AcuStar HIT-IgG som en del av en ny diagnostisk algoritme ved laboratoriet ved UNN Tromsø. Dersom denne

algoritmen tas i bruk, vil det føre til redusert feildiagnostisering og forbedret pasientbehandling.

En forutsetning for at denne algoritmen skal ha ønsket effekt på diagnostikken av HIT, er at alle leger som er involvert i pasientbehandling har kjennskap til tilstanden, algoritmen og korrekt bruk av 4T-scoringssystemet.

4.2 Feilkilder

Under analysering av pasientprøver er det alltid en rekke feilkilder, og det er om å gjøre å redusere disse mest mulig.

Den viktigste feilkilden i denne studien, er nok størrelse på utvalget av pasientprøver. For å kunne trekke konklusjoner basert på testegenskaper og diagnostiske egenskaper, bør utvalget som testes være av en viss størrelse. Fordi lignende, men større studier med noen unntak har vist samme resultater som ble oppnådd i denne studien, velger vi å bruke våre resultater sammen med resultater i andre større studier til å anbefale hvilken test som bør implementeres.

En annen og viktig feilkilde som er verdt å nevne, er at det ikke var kjent hvilken 4T-score pasientene hadde. På grunn av blant annet manglende journalopplysninger og sendeprøver fra andre sykehus, lot ikke scoringen seg gjennomføre. Om klinikerer som hadde bestilt gelkortanalyse hadde tatt stilling til denne scoringen, vites heller ikke. Det er derfor mulig at pasientprøver med lav klinisk sannsynlighet for HIT, altså 4T score < 4, er tatt med i utvalget. Dette vil i så fall gi seg utslag i dårligere testegenskaper og diagnostiske egenskaper for de gjennomførte assayene.

Når det gjelder feilkilder ved selve gjennomføringen av assayene, regnes det med at disse er på et minimum. PF4/Heparin ELISA og HemosIL AcusStar HIT IgG ble utført etter grundig opplæring og HIPA ble utført av erfarent laboratoriepersonell ved laboratoriet i Greifswald som kjører disse analysene til daglig.

5. Vedlegg

Vedlegg 1: HemosIL AcuStar HIT-IgG

Innhold av og fremgangsmåte for gjennomføring av HemosIL AcuStar HIT-IgG-test er som følger [37]:

1. Innhold: Et AcuStar HIT-IGg-kit inneholder:
 - a. HIT-IgG-patron for 25 bestemmelser: En patron inneholder 1 glass magnetisk partikkel-suspensjon kledd med PF4-PVS-komplekser, 1 glass assay-buffer, 1 glass med tracer som består av et monoklonalt antihumant antistoff av IgG-klasse kledd med isoluminol, 1 glass fortynningsvæske brukt til fortykning av prøvene. Reagensene er i en fosfat- eller Tris-buffer som inneholder bovine serum albumin, bovine føtalt serum, PF4-PVS-kompleks, monoklonalt IgG fra mus, stabilisatorer og konserveringsmiddel
 - b. HIT-IgG kalibrator 1: Tube med en løsning bestående av humanisert monoklonalt ant-PF4-H-antistoff i Tris buffer bestående av bovine serum albumin, stabilisatorer og konserveringsmiddel
 - c. HIT-IgG kalibrator 2: Tube med en løsning bestående av humanisert monoklonalt anti-PF4-H antistoff i Tris buffer bestående av bovine serum albumin, stabilisatorer og konserveringsmiddel

Obs: AcuStar HIT-kontroller er ikke en del av kitet og må kjøpes separat
2. Forberedelse:
 - a. HIT-IgG patron: Mikropartiklene må blandes etter sending og lagring. Første gang patronen brukes skal den forsiktig vendes 30 ganger, unngå skumdannelse. Sjekk om partiklene er fullstendig oppløst, om ikke, fortsett vending av patronen til de er fullstendig oppløst. Dersom dette ikke oppnås skal patronen ikke brukes. Når partiklene er fullstendig oppløst plasseres patronen på et fast underlag før en rød sikring fjernes. Press ned lokket på patronen til låst posisjon. Patronen plasseres så i AcuStar-maskinen
 - b. HIT-IgG kalibrator 1 og 2 er flytende. For å sikre homogenitet må de blandes ved forsiktig vending før bruk. Unngå skumdannelse
3. Kontroll: Det anbefales to nivåer av kontroll for å oppnå høyes mulig kvalitet på resultatet. Hvert laboratorium bør bestemme egen gjennomsnittlige deviasjon og

standarddeviasjon. Det bør i tillegg etableres et kvalitetskontrollprogram for monitorering av testingen. Kontroller bør analyseres minst en gang i løpet av et 8-timers skift, så lenge testing pågår

4. Resultater: HemosIL AcuStar HIT-IgG-resultater oppgis i U/ml ved 0,00-128,00 U/ml. Ved resultat > 128,00 U/ml oppgis resultatet som > 128 U/ml.
5. Begrensninger: HIT-IgG-resultater påvirkes ikke av hemoglobin opp til 500 mg/dl, bilirubin opp til 18 mg/dl, triglyserider opp til 1250 mg/dl, heparin (LMWH og UFH) opp til 1 IU/ml og reumatoid faktor opp til 800 IU/ml. Assayet påvirkes ikke av prozone effekt. Assayet er ikke påvirket av antifosfolipidantistoffer
6. Forventede verdier: Tilstedeværelse av PF5-H-antistoffer i en normal populasjon er ikke forventet.
7. Cut-off: Det er utført flere studier for å bestemme cut-off for HemosIL AcuStar HIT-IgG
 - a. 50 plasmaprøver fra antatt friske individer (blodbankdonorer) ble testet, 95 % referanseintervallet 0,03-0,39 U/ml
 - b. Prøver fra 91 personer som hadde vært eksponert for heparin uten klinisk mistanke om HIT ble testet, 95 % referanseintervall 0,04-1,34 U/ml
 - c. Sammenligning med serotonin release assay på 201 prøver fra pasienter med klinisk mistanke om HIT indikerte ved hjelp av ROC analyse at optimal cut-off-verdi var 1,00 U/ml.
 - d. Basert på disse studiene er det bestemt at ved analyse av prøver fra pasienter som er eksponert for heparin, indikerer et HemosIL AcuStar HIT-IgG resultat $\geq 1,00$ U/ml tilstedeværelse av HIT-antistoffer. Svaret bør tolkes sammen med annen informasjon, inkludert pasientens klinikk

Vedlegg 2: PF4/heparin ELISA

PF4/Heparin ELISA gjennomføres på følgende måte [32]:

1. Generering av PF4/heparin-komplekser: 20 μ l/ml PF4, 0,5 IU/ml ufraksjonert heparin (UFH) tilsettes kledningsbuffer 2. Dette inkuberes i forseglede tuber ved romtemperatur i 1 time.
2. Kledning av mikroplatebrønner med vaskebuffer 1: Platen tømmes ved at den snus over en vask, før den settes opp-ned på noen lag tørkepapir slik at resterende væske fjernes. Platen vaskes ved at brønneren fylles med buffer og står i

2 minutter før platen tømmes på ny som beskrevet over. Vaskingen gjentas fire ganger. Tilsett 100 µl av PF4/heparin-kompleks-blandingen i hver brønn. Forsegle platen for å unngå fordamping. Inkuber i 16 timer ved 4 grader for fullstendig binding. Mikrobrønn-platene kan nå lagres ved 4 grader i 2-3 uker.

3. PF4-testing:

- a. Inkubering med testmateriale: Tøm platen og vask den 5 ganger med vaskebuffer 2. Prøve, negativ og positiv kontroll fortynnes 1:200 med fortynningsbuffer. Tilsett 100 µl per brønn i mikrotiterplaten og inkuber ved romtemperatur i 1 time. Alle tester gjøres i duplikat. To brønner skal være blanke (inneholder bare fortynningsbuffer).
- b. Inkubering med deteksjon av antistoffer: Tøm platen og vask den 5 ganger med vaskebuffer 2 (200-300 µl vaskebuffer bør brukes for hvert vasketrinn). De POD-kledde antistoffene mot humant IgG, IgA og IgM fortynnes med fortynningsbuffer. Løsningen bør tilpasses det ønskede måleområdet som bestemmes i separate titeringseksperimenter. Vanligvis er løsninger mellom 1:10 000 og 1:15 000 passende. Tilsett 100 µl fortynnet kledde antistoffer per brønn i mikrotiter-platen. Forsegle platen og inkuber ved romtemperatur i 1 time.
- c. Inkubering med substrat-reagens (TMB substrat): Tøm platen og vask den 5 ganger med vaskebuffer 2. Forbered TMB-substrat-løsning innen 15 minutter før bruk. Tilsett 100 µl TMB-substrat per brønn i mikrotiter-platen. Inkuber ved romtemperatur i mørke. Positive brønner vil nå få blå farge. Den enzymatiske reaksjonen stoppes etter 10 min ved å tilsette 100 µl 1 mol/l svovelsyre. Den blå fargen vil da bli gul. Optisk tetthet (OD) for hver brønn leses av i en mikroplate leser ved 450 nm.

4. Dataanalyse: Trekk gjennomsnittlig OD i de blanke brønnene fra OD i de andre brønnene. Cut-off verdi for å oppdage IgG, IgA og IgM bør defineres ved å bestemme gjennomsnittlig standardavvik i 100 normale plasma. Vanligvis er cut-off på 0,5 OD hvis assayet er i riktig sensitivitetssområde.

5. Buffere:

- a. Kledningsbuffer 1: 0,10 M NaH₂PO₄ x H₂O, 10,15 M NaCl p.a. og 1 mM EDTA Triplex. Justert til pH 7,5.
- b. Kledningsbuffer 2: 0,05 M NaH₂PO₄ x H₂O, 0,1 % NaN₃

- c. Vaskebuffer 1: 0,10 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,15 M NaCl p.a og 9,8 mM $\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$. Justert til pH 7,5.
- d. Vaskebuffer 2: 1,5 M NaCl p.a. og 1 % Tween 20. Justert til pH 7,5. Man lager en arbeidskonsentrasjon med vaskebuffer 2 ved å blande 1:10 med destilert vann.
- e. Fortynningsbuffer: 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,15 M NaCl p.a og 7,5 % geiteserum. Juster til pH 7,5.

Vedlegg 3: Heparin-indusert plateaktiverings-assay (HIPA)

HIPA-assay gjennomføres over flere trinn på følgende måte [53]:

1. Forberedelse av plater:

- a. Samle 20 ml citrert blod fra 3 friske donorer som ikke har mottatt noen form for medisin i løpet av de siste 10 dager.
- b. Det citrerte blodet inkuberes i forseglede tuber ved romtemperatur i 15 minutter i en vinkel på 45 grader.
- c. Det citrerte blodet sentrifugeres ved 120 g i 20 min ved romtemperatur uten pause, slik at det dannes platerikt plasma (PRP). Det er viktig at sentrifugen er velbalansert og at man unngår vibrasjoner.
- d. Etter sentrifugering overføres ca 5-6 ml PRP til 10 ml tuber. En tube per donor.
- e. Tilsett 111 μl ACD-A (adenine-citrat-dextrose) per ml PRP.
- f. Tilsett 5 μl apyrase (1000 U/ml) per ml.
- g. Sentrifuger PRP ved 650 g i 4 minutter, uten pause.
- h. Fjern supernatanten ved å snu tuben for å så sette den opp-ned på 4-6 lag med tørkepapir, dette vil fjerne det resterende plasma og gjøre vaskingen mer effektiv. Løs opp plate-pelleten forsiktig i 1 ml vaskebuffer. Bufferen må tilsettes pelleten så raskt som mulig etter sentrifugering. Bruk en 1000 μl Eppendorf pipette for å løse opp plate-pelleten ved å aspirere ca 300 ml gjentatte ganger. Unngå skum og bobler. Plate-pelleten vil, om dette gjøre korrekt, løses opp uten at det dannes noen form for aggregater. Det skal ikke være noen røde blodceller i pelleten (vanskelig å få til i praksis). Når pelleten er løst opp, tilsettes 5 ml vaskebuffer.

- i. Platene inkuberes i forseгла tuber i minst 15 min (20 min for best resultat) ved 37 grader, før de sentrifugeres igjen ved 650 g i 7 min, uten pause.
 - j. Etter sentrifugering fjernes supernatanten, før man på ny løser opp plate-pelleten forsiktig i 1 ml suspensjonsbuffer, gjøres på samme måte som tidligere.
 - k. Ved hjelp av suspensjonsbuffer fortynnes løsningen slik at man får en konsentrasjon av vaskede plater på $300 \times 10^9/L$. Prøvene forsegles så og inkuberes i 45 minutter ved 37 grader.
2. Forberedelse av prøver og assay-setup:
- a. Hvert serum testes med plater fra tre ulike donorer. Alle tester gjøres i duplikat.
 - b. 20 μ l varme-inaktivert (56 grader i 30 min) pasientserum legges i U-forma brønner i en mikrotiter-plate. Hver brønn inneholder to rustfrie stålkuler med en diameter på 2 mm.
 - c. 10 μ l suspensjonsbuffer (negativ kontroll) og 10 μ l kollagen (1 μ l/ml, positiv kontroll) plasseres i de U-forma brønnene i mikrotiter-platen.
 - d. Høy-konsentrasjons (10 μ l, 1050 IU/ml = 100 IU/ml f.c.) ufraksjoner heparin tilsettes for å mette alle heparin-bindingssteder på PF4.
 - e. Så tilsettes platesuspensjon (75 μ l), hirudin (10 μ l, 500 IU/ml = 50 IU/ml f.c.) og lav-konsentrasjons (10 μ l, 2,1 IU/ml = 50 IU/ml f.c.) heparin for å tillate dannelse av PF4/heparin-komplekser under optimale forhold.
 - f. Mikrotiter-platen inkuberes ved romtemperatur på en magnetisk rører (1000 rpm) i 45 minutter.
 - g. Gjennomskinneligheten til suspensjonen vurderes ved hjelp av en indirekte lyskilde hvert 5. minutt.
3. Diagnostiske kriterier:
- a. En prøve anses som positiv for HIT-antistoffer hvis suspensjonen blir transparent pga plateaggresjon med 0,2 U/ml heparin (f.c.) med ikke med 100 U/ml heparin (f.c.).
 - b. En prøve anses som positiv hvis positive resultater oppnås med plater fra minst 2 av de 3 donorene.

- c. Hvis platene aktiveres med alle testplatene ved både lav- og høykonsentrasjonsheparin, anses prøven som intermediaær pga ikke-spesifikk reaksjon.
 - d. Høye heparinkonsentrasjoner inhiberer HIT-IgG-mediert plateaktivering, men ikke aktivering som følge av sirkulerende immunkomplekser.
 - e. Det er mulig å unngå ikke-spesifikk plateaktivering som følge av sirkulerende immunkomplekser ved å tilsette at Fc-reseptor-blokkerende monoklonalt antistoff som inhiberer HIT-IgG-mediert plateaktivering.
 - f. Kryss-reaktivitet av heparin-induserte antistoffer med heparinoid danaparoid-sodium måles ved å bruke 0,2 aFXa enheter (f.c.) danaparoid-sodium i stede for heparin.
4. Buffere:
- a. Modifisert Tyrodes buffer: 80 ml a. dest + 5,00 ml bikarbonatbuffer + 1,75 ml bovine serum albumine 20 % (uten NaN₃) + 1,00 ml glukoseløsning 10 %. Tilsett destillert vann inntil 100 ml.
 - b. Vaskebuffer: Modifisert Tyrodes buffer ved 37 grader, tilsatt 25 U asyrase og 10 µl hirudin, titrert til pH 6,3 med 0,1M HCl.
 - c. Suspensjonsbuffer: 50 ml modifisert Tyrodes buffer ved 37 grader, tilsatt 0,212 M MgCl₂ og 0,196 M CaCl₂, titrert til pH 7,2 med 0,1 M HCl.
 - d. Bikarbonatbuffer: 16,0 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,0 g NaHCO₃ og 0,1 g NaH₂PO₄. Tilsett destilert vann inntil 100 ml.
 - e. Magnesiumkloridløsning: 21,723 g MgCl₂ x 6H₂O. Tilsett destillert vann inntil 500 ml.
 - f. Kalsiumkloridløsning: 7,35 g CaCl₂ x 2H₂O. Tilsett destillert vann inntil 500 ml.

Vedlegg 4: Gelkort PaGIA

Gjennomføring av ID-H/PF4- PaGIA fra DiaMed [54]:

1. Innhold:
 - a. ID-PaGIA Gelkort Heparin/PF4 antistofftest.
 - b. ID-PaGIA Polymerpartikler sensibilisert med Heparin/PF4-kompleks.
 - c. ID-PaGIA Heparin/PF4 positiv og negativ kontroll.
2. Utførelse:

- a. Prøver og reagenser må ha romtemperatur før bruk. Gelkort som er skadet, uttørket eller har bibler i gelen skal ikke benyttes. Sjekk at det er væske over gelen på gelkortene, hvis ikke sentrifugeres kortet en gang på ID-sentrifugen før kortet benyttes.
- b. Merk mikrotubene på gelkortet med hhv negativ kontroll, positiv kontroll og prøvenummer.
- c. Pipetter 10 µl kontroll/pasientserum til mikrotuben.
- d. Bland polymerpartiklene godt i 5 sekunder på vortexmikser, tilsett 50 µl av partikkelsuspensjonen til mikrotubene. Pas på å ikke berøre veggen på mikrotuben med pipettespissen.
- e. Inkuber gelkortet i 5 min ved romtemperatur.
- f. Sentrifuger gelkortet i 10 min i ID-sentrifuge.
- g. Les av reaksjonene visuelt.

3. Resultat:

- a. Positiv reaksjon: Agglutinerte partikler vil forme en rød linje på overflaten av gelen eller fordeles oppover i gelen.
- b. Negativ reaksjon: Kompakt knapp av partikler i bidden av mikrotuben.
- c. Ved usikker reaksjon må prøven retestet etter at serumet har blitt sentrifugert ved 1500 g i 10 min.

Vedlegg 5: Testresultat HemosIL AcuStar HIT-IgG

Prøve ID	Assay	Resultat (RLU i U/ml)	Tolkning
1	HIT-IgG	12,43	Pos
2	HIT-IgG	0,14	Neg
3	HIT-IgG	0,07	Neg
4	HIT-IgG	0,4	Neg
5	HIT-IgG	7,27	Pos
6	HIT-IgG	16,11	Pos
7	HIT-IgG	0,03	Neg
8	HIT-IgG	0,07	Neg
9	HIT-IgG	0,08	Neg
10	HIT-IgG	0,15	Neg
11	HIT-IgG	0,08	Neg
12	HIT-IgG	61,87	Pos
13	HIT-IgG	2,72	Pos
14	HIT-IgG	0,12	Neg
15	HIT-IgG	0,55	Neg
16	HIT-IgG	1,81	Pos
17	HIT-IgG	0,82	Neg
18	HIT-IgG	0,08	Neg

19	HIT-IgG		0,06	Neg
20	HIT-IgG	>128,0		Pos
21	HIT-IgG		0,78	Neg
22	HIT-IgG		0,04	Neg
23	HIT-IgG		0,3	Neg
24	HIT-IgG		0,08	Neg
25	HIT-IgG		0,11	Neg
26	HIT-IgG		0,65	Neg
27	HIT-IgG		1,35	Pos
28	HIT-IgG		1,2	Pos
29	HIT-IgG		0,13	Neg
30	HIT-IgG		0,04	Neg
31	HIT-IgG		25,04	Pos
32	HIT-IgG		0,16	Neg
33	HIT-IgG		3,72	Pos
34	HIT-IgG		0,16	Neg
35	HIT-IgG		0,12	Neg
36	HIT-IgG		0,08	Neg
37	HIT-IgG		0,34	Neg
38	HIT-IgG		0,04	Neg
39	HIT-IgG		0,1	Neg
40	HIT-IgG		0,28	Neg
41	HIT-IgG		0,12	Neg
42	HIT-IgG		0,05	Neg
43	HIT-IgG		0,09	Neg
44	HIT-IgG		0,08	Neg
46	HIT-IgG		0	Neg
47	HIT-IgG		0	Neg
48	HIT-IgG		0	Neg
49	HIT-IgG		0	Neg
50	HIT-IgG		0	Neg
51	HIT-IgG		0	Neg
52	HIT-IgG		0	Neg
53	HIT-IgG		0	Neg
54	HIT-IgG		0	Neg
55	HIT-IgG		0,02	Neg
56	HIT-IgG		0,07	Neg
57	HIT-IgG		0,85	Neg
58	HIT-IgG		0,28	Neg
59	HIT-IgG		0,1	Neg
60	HIT-IgG		4,52	Pos
62	HIT-IgG		0,07	Neg
63	HIT-IgG		0,06	Neg
64	HIT-IgG		0,18	Neg

Tabell 8: Viser resultat fra de 62 pasientprøve testet ved hjelp av HemosIL AcuStar HIT-IgG testen. Resultatet måles i relative lysenheter og oppgis i enheter per milliliter. Cutoff er satt til 1,00 U/ml etter produsentens anbefalinger. RLU = Relative lysenheter. Pos = Positivt prøvesvar. Neg = Negativt prøvesvar.

Vedlegg 6: Testresultat PF4/Heparin ELISA

Prøve-ID	anti IgG OD450nm	anti IgG OD450nm - LW	anti IgG OD450nm	anti IgG OD450nm - LW	Tolkning
1	1,420	1,370	1,490	1,440	Pos
2	0,240	0,190	0,260	0,210	Neg
3	0,110	0,060	0,110	0,060	Neg
4	0,590	0,540	0,620	0,570	Pos
5	2,120	2,070	2,090	2,040	Pos
6	2,290	2,240	2,25	2,200	Pos
7	0,240	0,190	0,25	0,200	Neg
8	0,260	0,210	0,25	0,200	Neg
9	0,190	0,140	0,19	0,140	Neg
10	0,290	0,240	0,35	0,300	Neg
11	0,69	0,640	0,76	0,710	Pos
12	2,130	2,080	2,08	2,030	Pos
13	2,230	2,180	2,15	2,100	Pos
14	0,290	0,240	0,27	0,220	Neg
15	0,750	0,700	0,72	0,670	Pos
16	2,230	2,180	2,22	2,170	Pos
17	0,38	0,330	0,35	0,300	Neg
18	0,140	0,090	0,14	0,090	Neg
19	0,100	0,050	0,12	0,070	Neg
20	2,190	2,140	2,07	2,020	Pos
21	0,400	0,350	0,36	0,310	Neg
22	0,11	0,060	0,11	0,060	Neg
23	1,010	0,960	0,86	0,810	Pos
24	0,250	0,200	0,26	0,210	Neg
25	0,200	0,150	0,19	0,140	Neg
26	0,240	0,190	0,24	0,190	Neg
27	1,890	1,840	1,78	1,730	Pos
28	1,030	0,980	0,970	0,920	Pos
29	0,300	0,250	0,280	0,230	Neg
30	0,070	0,020	0,070	0,020	Neg
31	2,130	2,080	2,150	2,100	Pos
32	0,600	0,550	0,550	0,500	Pos
33	0,640	0,590	0,67	0,620	Pos
34	0,250	0,200	0,25	0,200	Neg
35	0,220	0,170	0,18	0,130	Neg
36	0,190	0,140	0,17	0,120	Neg
37	1,560	1,510	1,57	1,520	Pos
38	0,14	0,090	0,13	0,080	Neg
39	0,160	0,110	0,1	0,050	Neg
40	2,360	2,310	2,32	2,270	Pos
41	0,470	0,420	0,53	0,480	Neg
42	0,120	0,070	0,12	0,070	Neg
43	0,150	0,100	0,16	0,110	Neg
44	0,15	0,100	0,13	0,080	Neg
46	0,410	0,360	0,4	0,350	Neg
47	0,070	0,020	0,07	0,020	Neg

MED-39505 5.årsoppgaven – Profesjonsstudiet i medisin ved UiT

48	0,120	0,070	0,11	0,060	Neg
49	0,120	0,070	0,1	0,050	Neg
50	0,19	0,140	0,18	0,130	Neg
51	0,130	0,080	0,12	0,070	Neg
52	0,110	0,060	0,1	0,050	Neg
53	0,110	0,060	0,1	0,050	Neg
54	1,320	1,270	1,2	1,150	Pos
55	0,220	0,110	0,230	0,130	Neg
56	0,420	0,310	0,420	0,320	Neg
57	2,320	2,210	2,250	2,150	Pos
58	1,100	0,990	1,210	1,110	Pos
59	0,250	0,200	0,240	0,190	Neg
60	2,080	2,030	2,01	1,960	Pos
62	0,160	0,110	0,17	0,120	Neg
63	0,150	0,100	0,15	0,100	Neg
64	0,390	0,340	0,39	0,340	Neg

Tabell 9: Viser resultat fra de 62 pasientprøvene testet ved hjelp av PF4/heparin ELISA testen. Optisk tetthet (OD) ble lest av i hver brønn ved hjelp av en mikroplateleser ved 450 nm. Gjennomsnittlig OD i de blanke brønnene (i vårt tilfelle 0,5 OD) trekkes fra OD i de andre brønnene. Cutoff er satt til 0,5 OD.

OD = Optisk tetthet. LW = Gjennomsnittlig optisk tetthet i blanke brønner. Pos = Positivt prøvesvar. Neg = Negativt prøvesvar.

Vedlegg 7: Testresultat HIPA

Prøve-ID	Buffer	Reviparin	Lav kons. heparin	Høy kons. heparin	Tolkning
1	2/3	3/3	2/3	0/3	Pos
4	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
5	3/3	3/3	0/3	0/3	Pos
6	0/3	3/3	0/3	0/3	Pos
9	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
11	1/3	3/3	0/3	0/3	Pos
12	2/3	2/3	2/3	0/3	Pos
13	3/3	3/3	0/3	0/3	Pos
14	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
15	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
16	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
17	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
20	0/3	3/3	0/3	0/3	Pos
21	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
23	3/3	3/3	3/3	0/3	Pos
26	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
27	1/3	2/3	0/3	0/3	Pos
28	1/3	3/3	1/3	0/3	Pos
31	0/3	3/3	0/3	0/3	Neg
32	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
33	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
37	0/3	3/3	0/3	0/3	Neg
40	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg

MED-39505 5.årsoppgaven – Profesjonsstudiet i medisin ved UiT

41	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
43	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
46	0/3	1/3	0/3	0/3	Neg
50	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
53	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
54	0/3	1/3	0/3	0/3	Neg
55	0/3	1/3	0/3	0/3	Neg
57	3/3	3/3	0/3	0/3	Pos
58	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg
60	3/3	3/3	3/3	0/3	Pos
64	0/3	0/3	0/3	0/3	Neg

Tabell 10: 34 av de 62 pasientprøvene gav positivt resultat i én eller flere av de tre immunologiske testene. På disse prøvene ble det utført en funksjonell test – HIPA. Resultatet ses i tabellen over. Vaskede plater fra tre normale donorer ble inkubert med varme-inaktivert pasientserum ved tilstedeværelse av lavkonsentrasjons-heparin, Riviparin, høykonsentrasjons-heparin og buffer. Plateaggregering ho minst to av tre donorer ved tilstedeværelse av lavkonsentrasjons-, men ikke høykonsentrasjons-heparin, ble ansett som positiv prøve. Pos = Positivt prøvesvar. Neg = Negativt prøvesvar. Lavkonsentrasjons-heparin = 0,2 IU/ml. Riviparin = LMWH.

Kildehenvisning

1. Amiral, J., et al., *Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia*. *Thromb Haemost*, 1992. **68**(1): p. 95-6.
2. Greinacher, A., et al., *Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen*. *Thromb Haemost*, 1994. **71**(2): p. 247-51.
3. Warkentin, T.E. and A. Greinacher, *Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. *Chest*, 2004. **126**(3 Suppl): p. 311s-337s.
4. Greinacher, A., *Heparin-induced Thrombocytopenia assay panel - features and Technical Description*. *Informasjonssak* 2013: p. 28.
5. Arepally, G.M. and T.L. Ortel, *Heparin-induced thrombocytopenia*. *Annu Rev Med*, 2010. **61**: p. 77-90.
6. Cuker, A. and D.B. Cines, *How I treat heparin-induced thrombocytopenia*. *Blood*, 2012. **119**(10): p. 2209-18.
7. Linkins, L.A., et al., *Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *Chest*, 2012. **141**(2 Suppl): p. e495S-530S.
8. Lee, G.M. and G.M. Arepally, *Heparin-induced thrombocytopenia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013. **2013**: p. 668-74.
9. Bakchoul, T. and A. Greinacher, *Recent advances in the diagnosis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia*. *Ther Adv Hematol*, 2012. **3**(4): p. 237-51.
10. Tardy-Poncet, B., et al., *Thrombin generation and heparin-induced thrombocytopenia*. *J Thromb Haemost*, 2009. **7**(9): p. 1474-81.
11. Warkentin, T.E., et al., *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**(11): p. 3691-9.
12. Warkentin, T.E., *Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(4): p. 535-55.
13. Kelton, J.G., et al., *Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies*. *Blood*, 1988. **72**(3): p. 925-30.
14. Chong, B.H., et al., *Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders*. *Blood*, 1994. **83**(6): p. 1535-41.
15. Warkentin, T.E., *How I diagnose and manage HIT*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011. **2011**: p. 143-9.
16. Greinacher, A., et al., *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. **5**(8): p. 1666-73.
17. Klundt, C. *Heparin Induced Thrombocytopenia*. 2013 [cited 2015 25.05.15]; Available from: <https://www.studyblue.com/?closeForm=false#flashcard/review/1047766>.
18. Arepally, G.M. and T.L. Ortel, *Clinical practice. Heparin-induced thrombocytopenia*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(8): p. 809-17.

19. Greinacher, A., et al., *Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients.* Thromb Haemost, 2005. **94**(1): p. 132-5.
20. Lubenow, N., et al., *Heparin-induced thrombocytopenia: temporal pattern of thrombocytopenia in relation to initial use or reexposure to heparin.* Chest, 2002. **122**(1): p. 37-42.
21. Warkentin, T.E. and J.G. Kelton, *Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia.* N Engl J Med, 2001. **344**(17): p. 1286-92.
22. Hinz, P., et al., *[Thrombosis prophylaxis in trauma surgery units in Germany: a survey].* Unfallchirurg, 2009. **112**(12): p. 1029-33.
23. Zhou, A., et al., *Is the incidence of heparin-induced thrombocytopenia affected by the increased use of heparin for VTE prophylaxis?* Chest, 2012. **142**(5): p. 1175-78.
24. Wang, T.Y., et al., *Incidence of thrombocytopenia among patients receiving heparin venous thromboembolism prophylaxis.* Am J Med, 2012. **125**(12): p. 1214-21.
25. Bakchoul, T., H. Zollner, and A. Greinacher, *Current insights into the laboratory diagnosis of HIT.* Int J Lab Hematol, 2014. **36**(3): p. 296-305.
26. Cuker, A., et al., *Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis.* Blood, 2012. **120**(20): p. 4160-7.
27. Lo, G.K., et al., *Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(4): p. 759-65.
28. Griffiths, E. and W.H. Dzik, *Assays for heparin-induced thrombocytopenia.* Transfus Med, 1997. **7**(1): p. 1-11.
29. Bakchoul, T., et al., *Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(8): p. 1260-5.
30. Chan, C.M., et al., *The Role for Optical Density in Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Cohort Study.* Chest, 2015.
31. Amiral, J., et al., *Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases.* Thromb Haemost, 1995. **73**(1): p. 21-8.
32. Greifswald, E.M.A.U., *Prosedyre ved PF4/Heparin ELISA.* 2014.
33. Prosedyre, *Prosedyre ved utredning av antistoff-avhengig trombocytopeni,* Nasjonalt-referanselaboratorium-for-avansert-blodplateimmunologi, Editor. 2005.
34. Prosedyre, *Prosedyre Gelkort PaGIA,* Nasjonalt-referanselaboratorium-for-avansert-blodplateimmunologi, Editor. 2008.
35. Pouplard, C., et al., *Prospective evaluation of the '4Ts' score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia.* J Thromb Haemost, 2007. **5**(7): p. 1373-9.
36. Van Hoecke, F. and K. Devreese, *Evaluation of two new automated chemiluminescent assays (HemosIL(R) AcuStar HIT-IgG and HemosIL(R) AcuStar HIT-Ab) for the detection of heparin-induced antibodies in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia.* Int J Lab Hematol, 2012. **34**(4): p. 410-6.
37. Laboratory, I., *HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H),* in *HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H),* H.A. HIT-IgG(PF4-H), Editor. 2013, Instrumentation Laboratory: HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H).

38. Althaus, K., et al., *Evaluation of automated immunoassays in the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia*. *Thromb Res*, 2013. **131**(3): p. e85-90.
39. Warkentin, T.E., et al., *Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia*. *J Lab Clin Med*, 1992. **120**(3): p. 371-9.
40. Greinacher, A., et al., *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**(5): p. 381-5.
41. Warkentin, T.E., et al., *Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*, 2008. **133**(6 Suppl): p. 340s-380s.
42. Eichler, P., et al., *The new ID-heparin/PF4 antibody test for rapid detection of heparin-induced antibodies in comparison with functional and antigenic assays*. *Br J Haematol*, 2002. **116**(4): p. 887-91.
43. Arepally, G., et al., *Comparison of PF4/heparin ELISA assay with the 14C-serotonin release assay in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia*. *Am J Clin Pathol*, 1995. **104**(6): p. 648-54.
44. Sheridan, D., C. Carter, and J.G. Kelton, *A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia*. *Blood*, 1986. **67**(1): p. 27-30.
45. Francis, J.L., *A critical evaluation of assays for detecting antibodies to the heparin-PF4 complex*. *Semin Thromb Hemost*, 2004. **30**(3): p. 359-68.
46. Warkentin, T.E., et al., *The platelet serotonin-release assay*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(6): p. 564-72.
47. Kelton, J.G., et al., *Clinical usefulness of testing for a heparin-dependent platelet-aggregating factor in patients with suspected heparin-associated thrombocytopenia*. *J Lab Clin Med*, 1984. **103**(4): p. 606-12.
48. Chong, B.H., J. Burgess, and F. Ismail, *The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia*. *Thromb Haemost*, 1993. **69**(4): p. 344-50.
49. Greinacher, A., et al., *A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia*. *Thromb Haemost*, 1991. **66**(6): p. 734-6.
50. Watson, H., S. Davidson, and D. Keeling, *Guidelines on the diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia: second edition*. *Br J Haematol*, 2012. **159**(5): p. 528-40.
51. Cuker, A., *Clinical and laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: an integrated approach*. *Semin Thromb Hemost*, 2014. **40**(1): p. 106-14.
52. Crowther, M.A., et al., *Thrombocytopenia in medical-surgical critically ill patients: prevalence, incidence, and risk factors*. *J Crit Care*, 2005. **20**(4): p. 348-53.
53. Greifswald, E.M.A.U., *Prosedyre ved heparin-indusert platelet activation assay* 2014.
54. *Prosedyre, Gelkort PaGIA Heparin/PF4 antistofftest*, Nasjonalt-laboratorium-for-avansert-blodplateimmunologi, Editor.