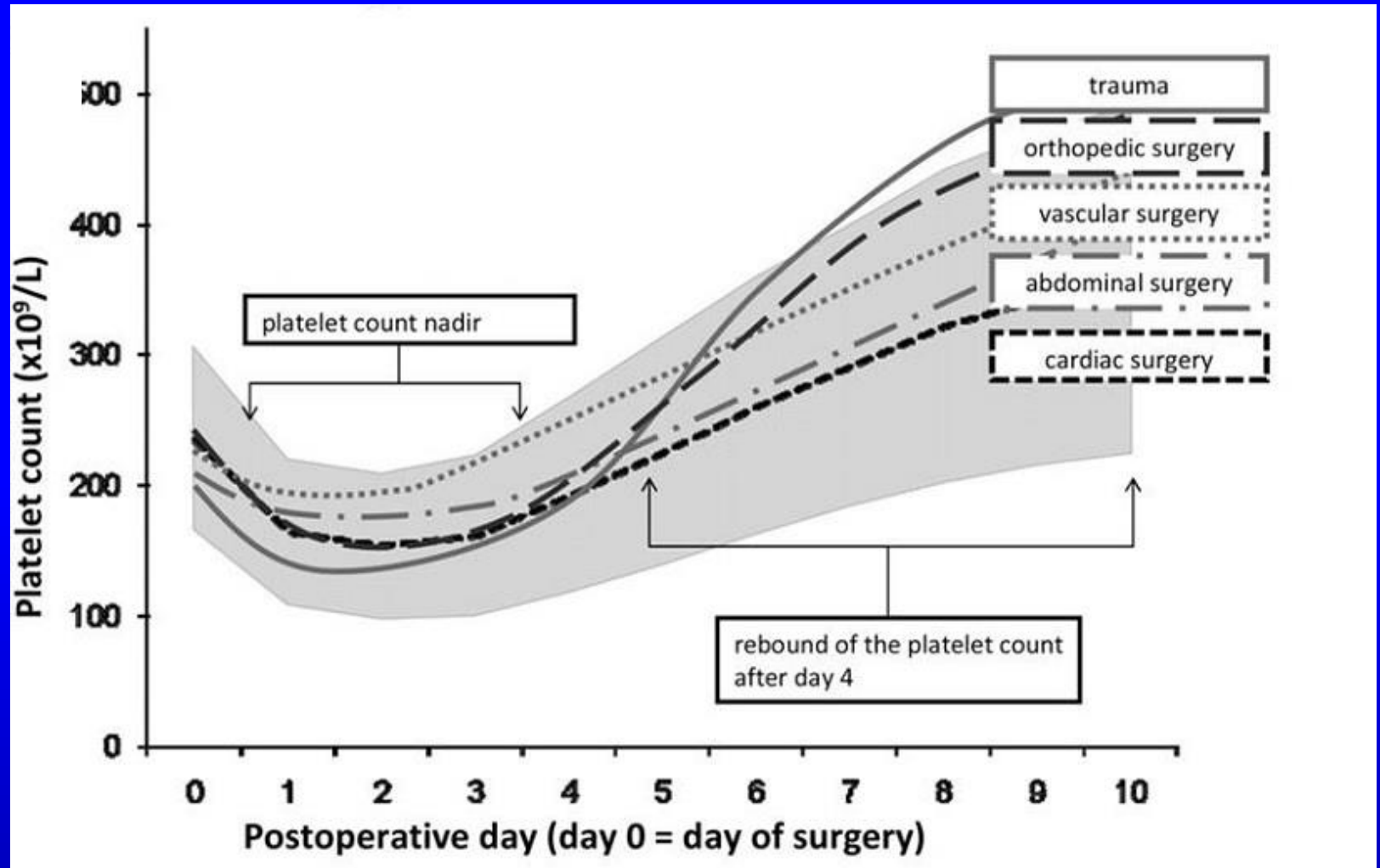


**A HEPARIN INDUKÁLTA
THROMBOCYTOPENIA (HIT)
LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKÁJA**

DR. FEHÉR ADRIENNE
SEMMELWEIS EGYETEM
LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET

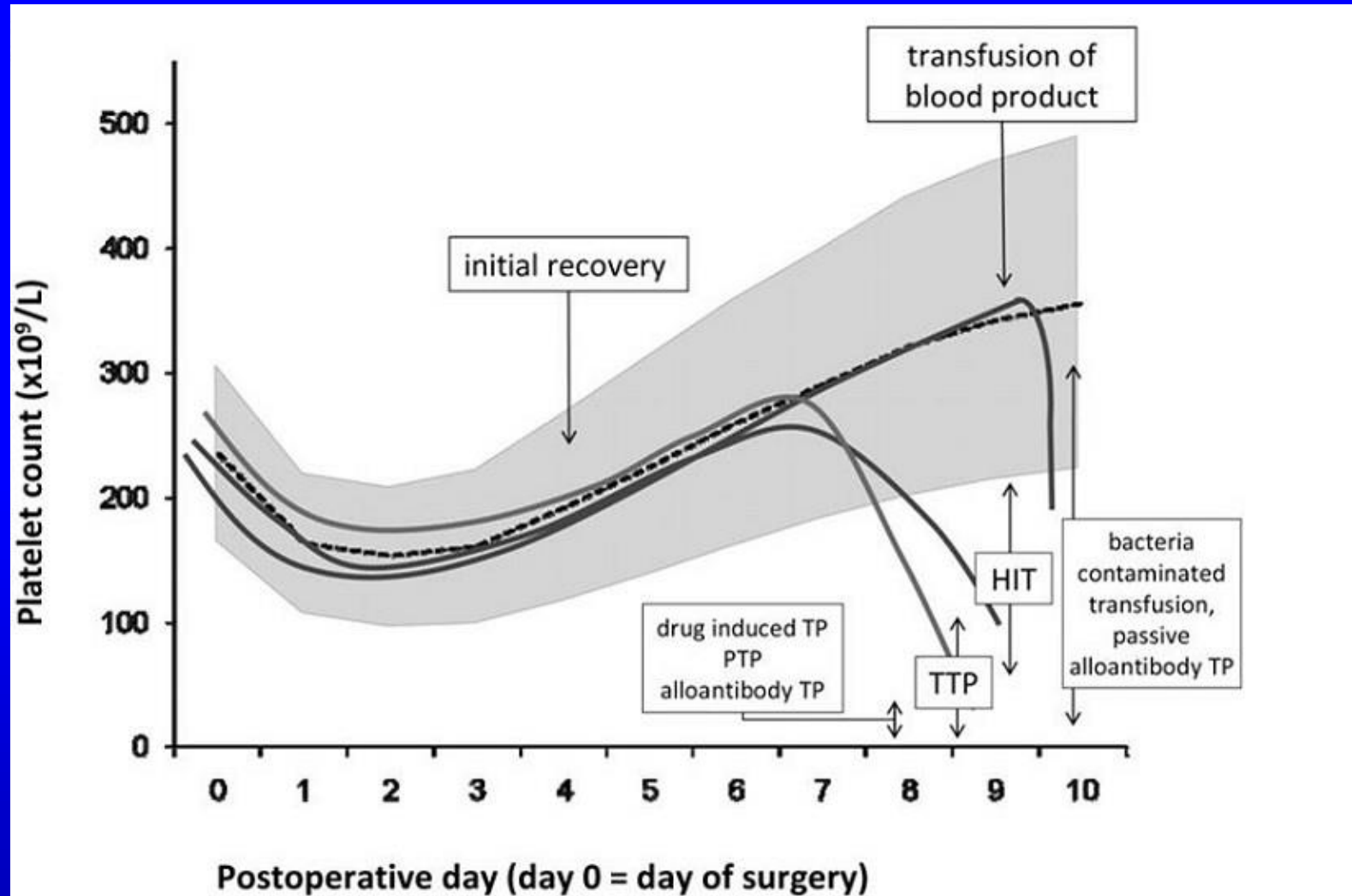


Platelet fall after surgery



Andreas Greinacher, and Kathleen Selleng Hematology
2010;2010:135-143

Platelet fall after recovery may suggest HIT



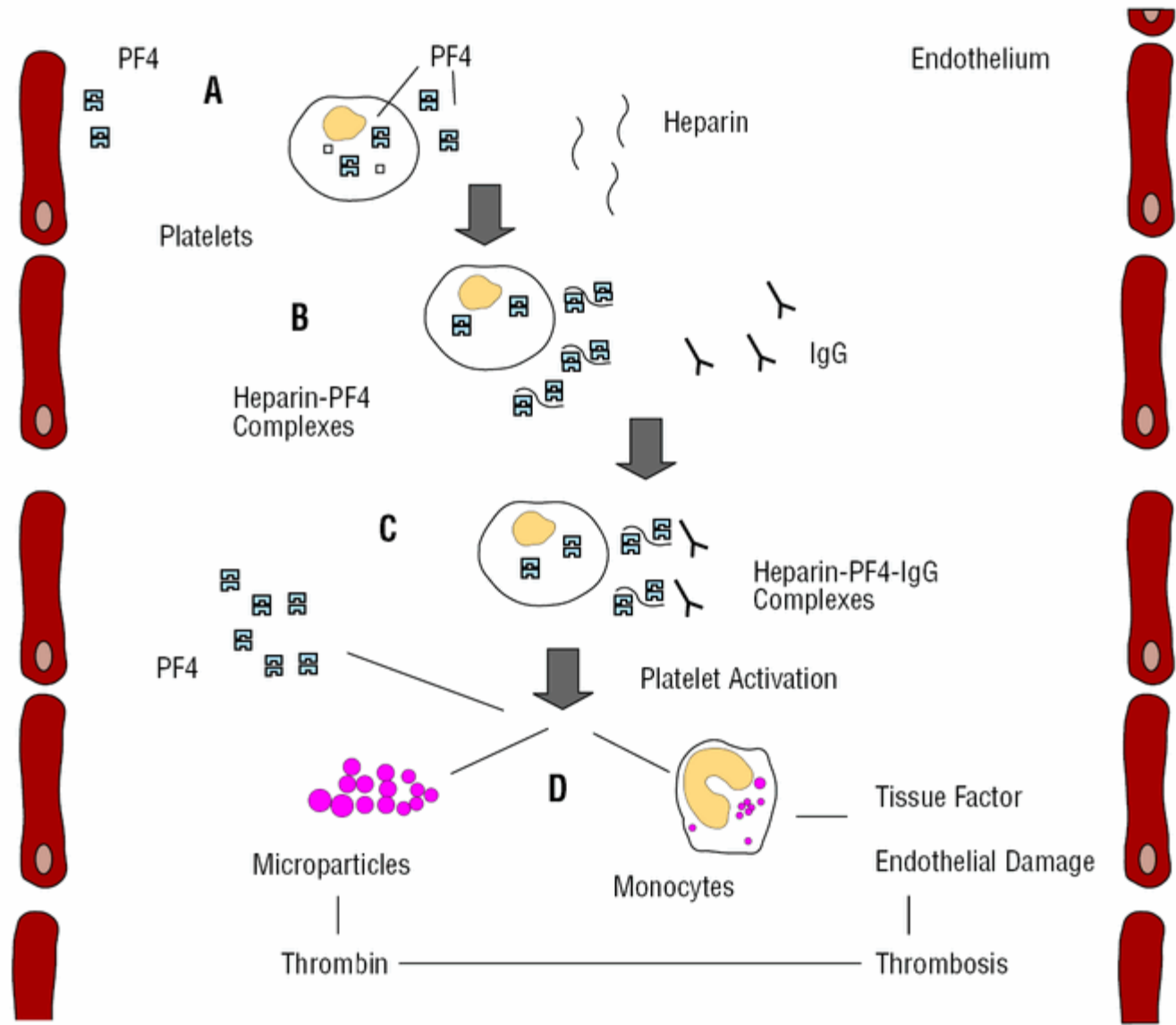
Andreas Greinacher, and Kathleen Selleng Hematology
2010;2010:135-143

HIT-I.

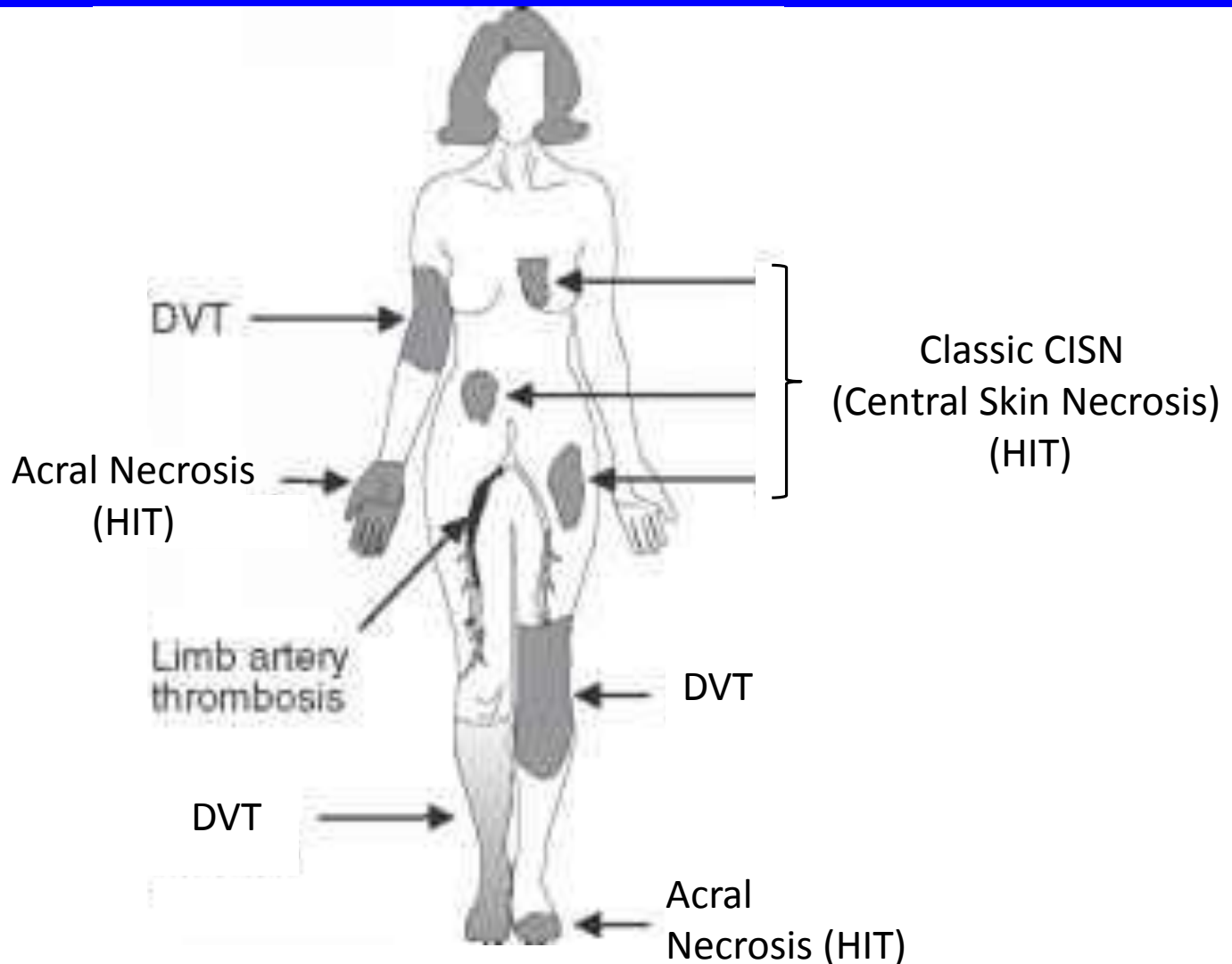
- A heparin kezelés első 5 napja során jelentkeznek
- Enyhe thrombocytopenia
 - Thrombocytaszám (PLT) csökkenés kisebb a kiindulási érték 30%-ánál

HIT-II.

- A heparin kezelés 5-14. napja között jelentkezik
- A folyamat IgG indukálta immun-thrombocytopenia
- Súlyos, életveszélyes thrombotikus, kisebb mértékben vérzéses szövődmények
- A thrombocytaszám két egymást követő meghatározás során 150G/L alatt van, vagy a kezelés előtti értékhez képest legalább 50%-ot csökken



Mit lát mindebből a klinikus?



HIT Pre-Test Probability Scoring

Suspicion of HIT based upon the "4 T's"		Pre-test Probability Score Criteria		
	Score	2	1	0
Thrombocytopenia	<input type="checkbox"/>	nadir 20-100, or >50% platelet fall	nadir 10-19, or 30-50% platelet fall	nadir <10, or <30% platelet fall
Timing of onset of platelet fall	<input type="checkbox"/>	day 5-10, or ≤day 1 with recent heparin*	>day 10 or timing unclear (but fits with HIT)	≤day 1 (no recent heparin)
Thrombosis or other sequelae	<input type="checkbox"/>	proven thrombosis, skin necrosis, or ASR†	progressive, recurrent, or silent thrombosis; erythematous skin lesions	none
Other cause of platelet fall	<input type="checkbox"/>	none evident	possible	definite
Total Pre-test Probability Score	<input type="checkbox"/>	periodic reassessment as new information can change pre-test probability (e.g., positive blood cultures)		

Total Pre-test Probability Score						
High			Moderate		Low	
8	7	6	5	4	3	2 1 0
Stop heparin‡, give alternative non-heparin anticoagulant argatroban¶ or lepirudin# or danaparoid** (or bivalirudin†† or fondaparinux‡‡)			Physician judgment		Continue (LMW) heparin	

4T SCORE

4 T score	2 pont	1 pont	0 pont
thrombocytopenia (thrombocytaszám esés)	> 20 G/L és (>50%)	10-19 G/L vagy (30-50%)	< 10 G/L vagy (<30%)
thrombocytaszám esés időpontja a heparin terápiát követően	5-10 nap, (< 24 óra, ha heparin 1 hónapon belül)	> 10 nap, 5-10 nap (?), (< 24 óra, ha heparin 30-100 nap)	< 5 nap
thrombosis vagy egyéb jelenség	új thrombosis, bőrnekrózis, anafilaxia	progresszív, ismétlődő thrombosis vagy gyanú, erythema	nincs
thrombocytopenia egyéb oka	nincs	lehetséges	van

HIT vizsgálati panel

- PLT szám meghatározása
 - Kezelés előtt, a kezelés 7. és 10. napja között, majd a továbbiak során hetente 1-szer
- Funkcionális tesztek
- Immunológiai tesztek

PLT szám meghatározása ADVIA 2120 készüléken

Next Sample : Human CBC / DIFF Auto Standby Canceled

Ready to Run

Operations Logs Utilities Procedures Customize Data Manager Info

Sample Cont. Panel **Review/Edit** QC Order Entry Remote QC Arch. Data Access Terminal Window

Sid# - Complete - Review And Edit

Access Parameter Sample View Customize

Name: Sid#: R&P#: 018-01
 Pat#: Age: Sex: U Date: 09/15/16 Time: 11:30 AM
 Pcom: Doc: Loc:
 Species: 0 Human Ocom:

QC	Test	C.Res	F	D	Prev.Run	F
	MCV	87.6				
	MCH	29.9				
	MCHC	342				
	CHCM	325				
	RDW	16.1				
	HYPO	+				
	FRAGM	0				
	%NRBC	*****				
	#NRBC	*****				
	PLT	23				
	MPV	10.9				
	IG	+++				
	BLASTS	+++				
	ANISO	+				
	CH	28.4				
	PDW	78.5				
	HDW	32.1				
	PCT	0.02				

Sid# KATONA - R&P# 018-01 - ASP.D/T 09/15/16 1

Units

Help

Ready NUM

ADVIA 2120 / 2 QC Sample Panel Manual Sample ID Run Screen Reagent Log Hydraulics

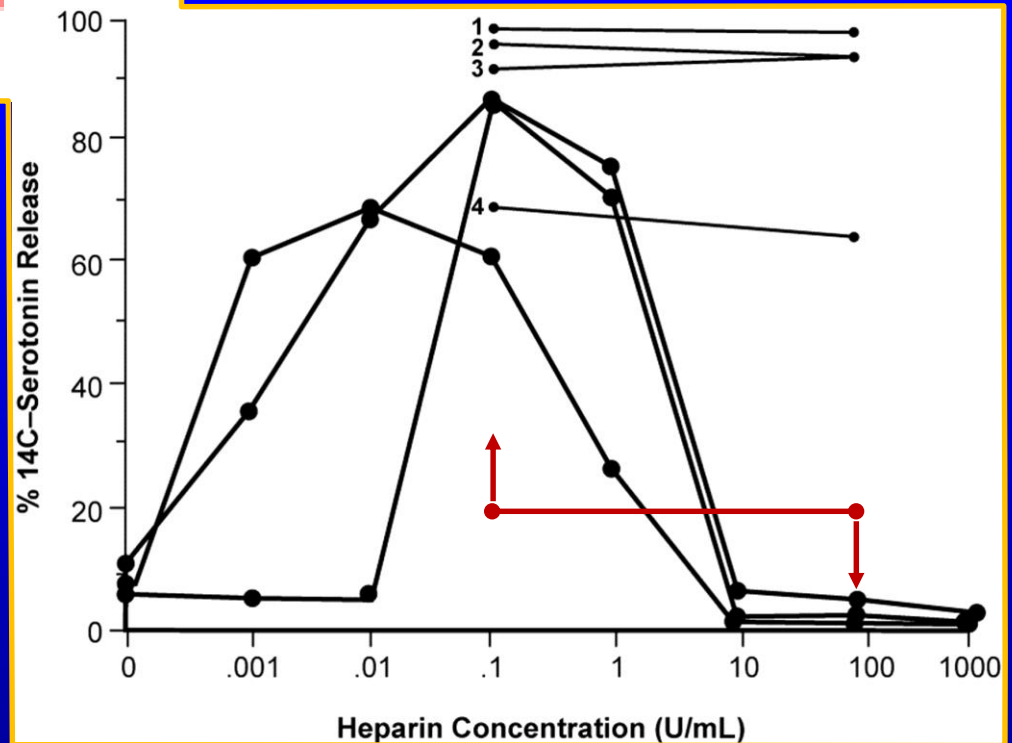
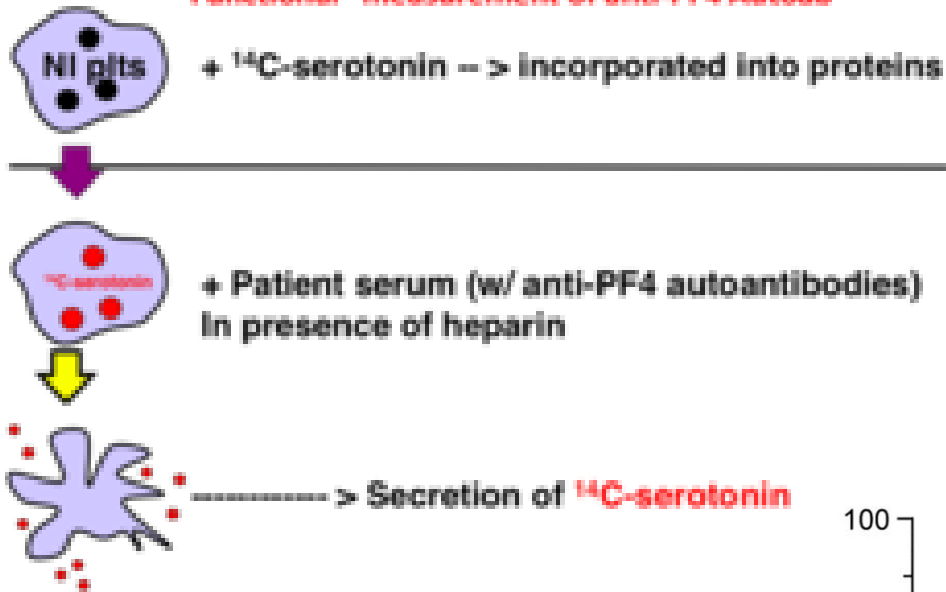
Funkcionális tesztek

- Serotonin felszabadulási teszt (SRA)

PLT aktiváció során felszabaduló mennyiségét méri, a vizsgálat során C-14-el jelzett serotoninnal telített thrombocyta készítményt használ. 90%-os szenzitivitas, 100%-os specificitas. Gold standard, Mo-on nem, főleg az USA-ban alkalmazzák.

Serotonin release assay:

"Functional" measurement of anti-PF4 Autoab

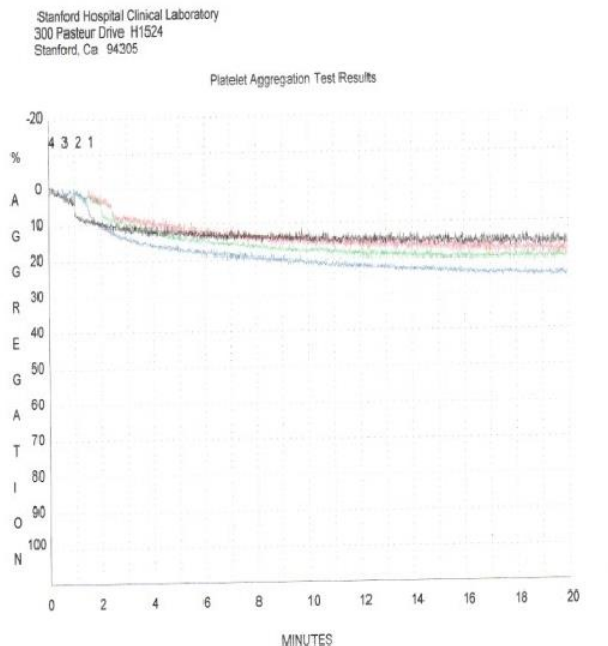


Funkcionális tesztek

- Serotonin felszabadulási teszt (SRA)
- Heparin indukálta thrombocyta aktiváció (HIPA)

A beteg plazmáját egészséges donorok mosott thrombocyta készítményéhez adják, majd hozzáadják kis koncentrációban a kezelésnél alkalmazott heparin készítményt. Pozitív esetben thrombocyta aktiváció és aggregáció alakul ki (magas sensitivitas, alacsony specificitas).

Heparin-induced Platelet Aggregation Results Examples

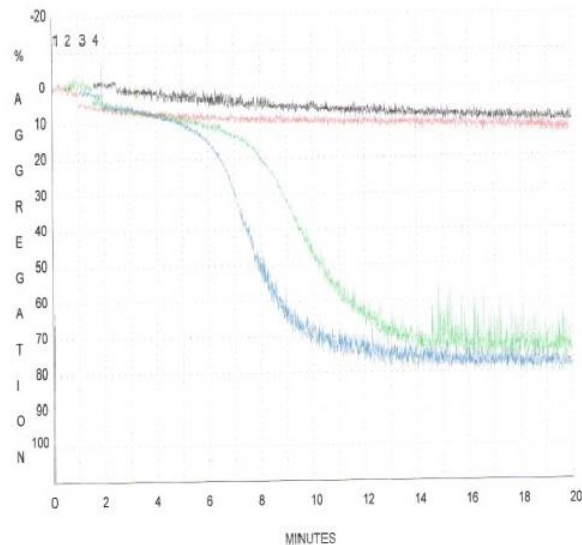


Channel	1	2	3	4
Patient Name:	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
Patient Number:	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
Reagent:	Heparin	Heparin	Heparin	Saline
Concentration:	100 u/mL	0.3 u/mL	0.2 u/mL	
Initial Agg:	18	19	25	15
Slope 1:	5	3	9	3
Final Agg:	18	19	25	15
Slope 2:	0	0	0	0
Lag Phase (sec):	0	0	0	0
Date Time:	3/16/2007 9:59:29 AM	3/16/2007 9:59:29 AM	3/16/2007 9:59:29 AM	3/16/2007 9:59:29 AM
Operator:	PAP	PAP	PAP	PAP

Comment 1: Patrick's Pits
Comment 2: Patrick's Pits
Comment 3: Patrick's Pits
Comment 4: Patrick's Pits

Stanford Hospital Clinical Laboratory
300 Pasteur Drive H1524
Stanford, Ca 94305

Platelet Aggregation Test Results



Channel	1	2	3	4
Patient Name:	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
Patient Number:	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
Reagent:	Saline	Heparin	Heparin	Heparin
Concentration:		0.2 u/mL	0.5 u/mL	100 u/mL
Initial Agg:	12	0	0	9
Slope 1:	6	1	2	4
Final Agg:	12	72	77	9
Slope 2:	0	10	13	0
Lag Phase (sec):	0	0	0	0
Date Time:	3/16/2007 1:09:27 PM	3/16/2007 1:09:27 PM	3/16/2007 1:09:27 PM	3/16/2007 1:09:27 PM
Operator:	PAP	PAP	PAP	PAP

Comment 1: Matt's Pits
Comment 2: Matt's Pits
Comment 3: Matt's Pits
Comment 4: Matt's Pits

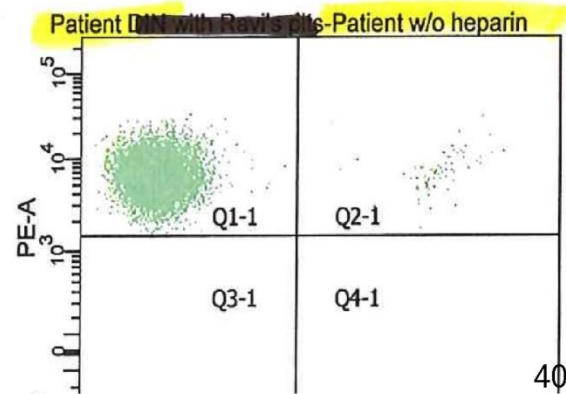
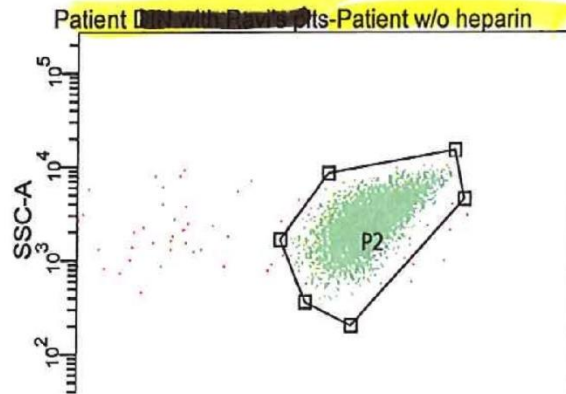
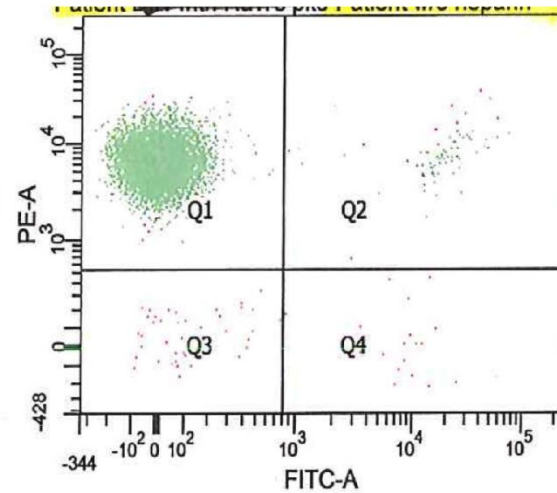
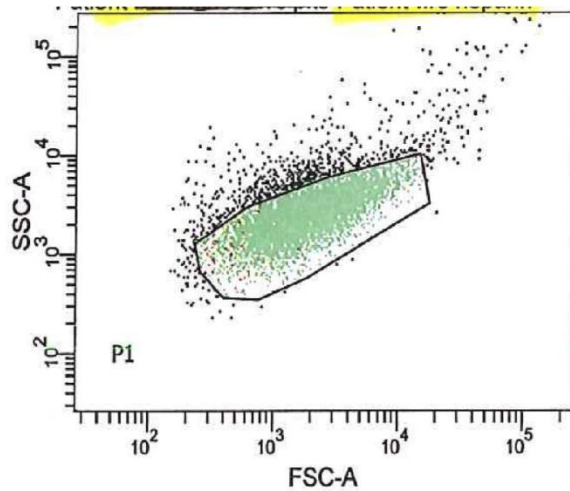
Funkcionális tesztek

- Serotonin felszabadulási teszt (SRA)
- Heparin indukálta thrombocytá aktiváció (HIPA)
- Áramlási cytometria alkalmazása

Áramlási cytometria módszerrel detektált, Annexin-V kötődésen alapuló thrombocytá aktiváció kimutatása. Az aktiváció során a thrombocytamembrán külső felszínére kerül a phosphatidil-serin, amihez kötődik a fluoreszcens festékkel jelölt Annexin-V.

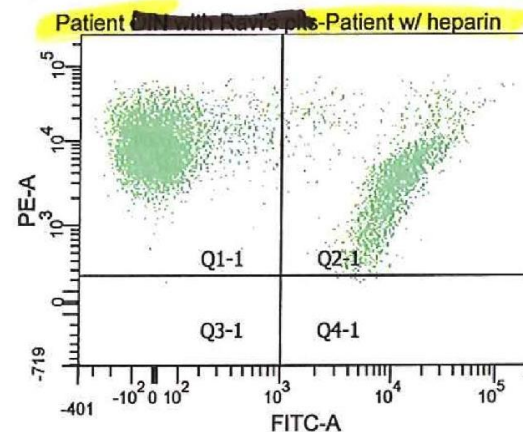
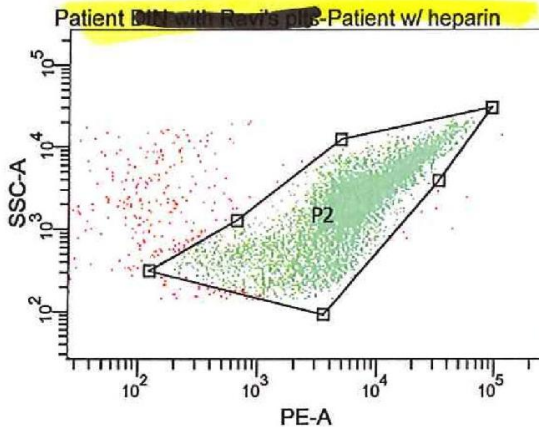
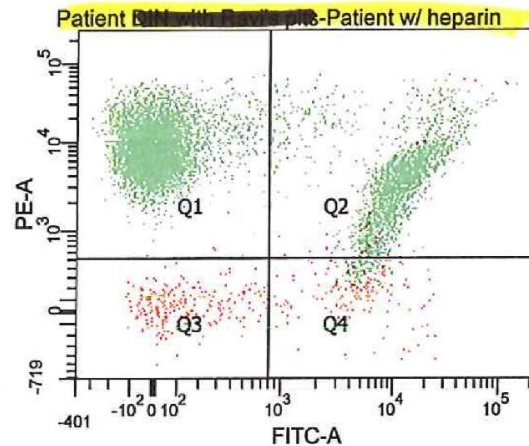
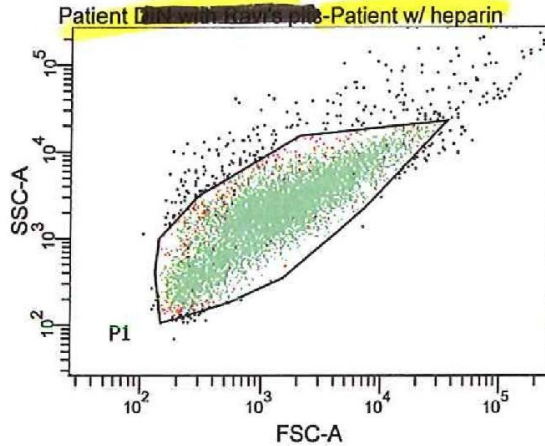
A teszt eredménye akkor pozitív, ha a donor thrombocyták legalább 11%-a aktiválódik és heparin jelenlétében legalább 1,5x annyi vérlemezke lesz Annexin-V pozitív, mint heparin nélkül. (Annexin ráta > 1,5)
Minden mérés alkalmával a PLT-mikroparticula arányt is le kell kérni.

Patient serum + nl platelets no heparin



Patient serum with nl platelets, UFH, 0.5 U/mL

FACSDiva Version 6.1.3



Immunológiai tesztek

- Partikulált gél immuno-assay (PaGIA)

Gélkártyás módszer, szűrőteszt, nagy szenzitivitás, alacsony specificitás.

Gél agglutinációs vizsgálat, melynek során a polisztirol mikropartikulumok felületén eloszaltott PF-4 – heparin komplex és a beteg szérumában HIT betegség esetén jelenlévő antigének agglutinációt okoznak (függetlenül az immunglobulinok izotípusától). Gélfiltrációt alkalmazva (centrifugálás) az agglutinált komplex a gél tetején fennmarad (pozitív), míg agglutináció hiányában a cső aljára kerül (negatív).

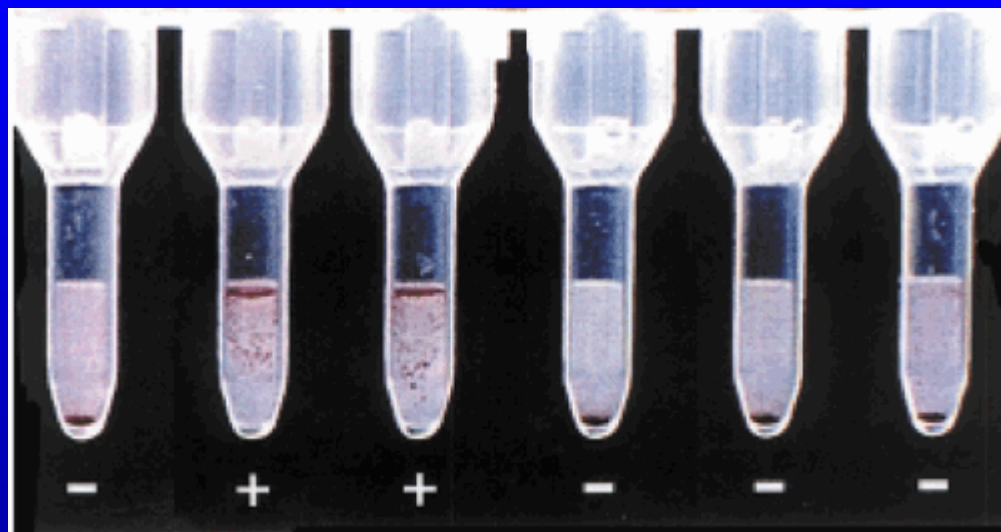


Fig. 2 - ID – PaGIA Chagas Test kit with positive and negative reactions

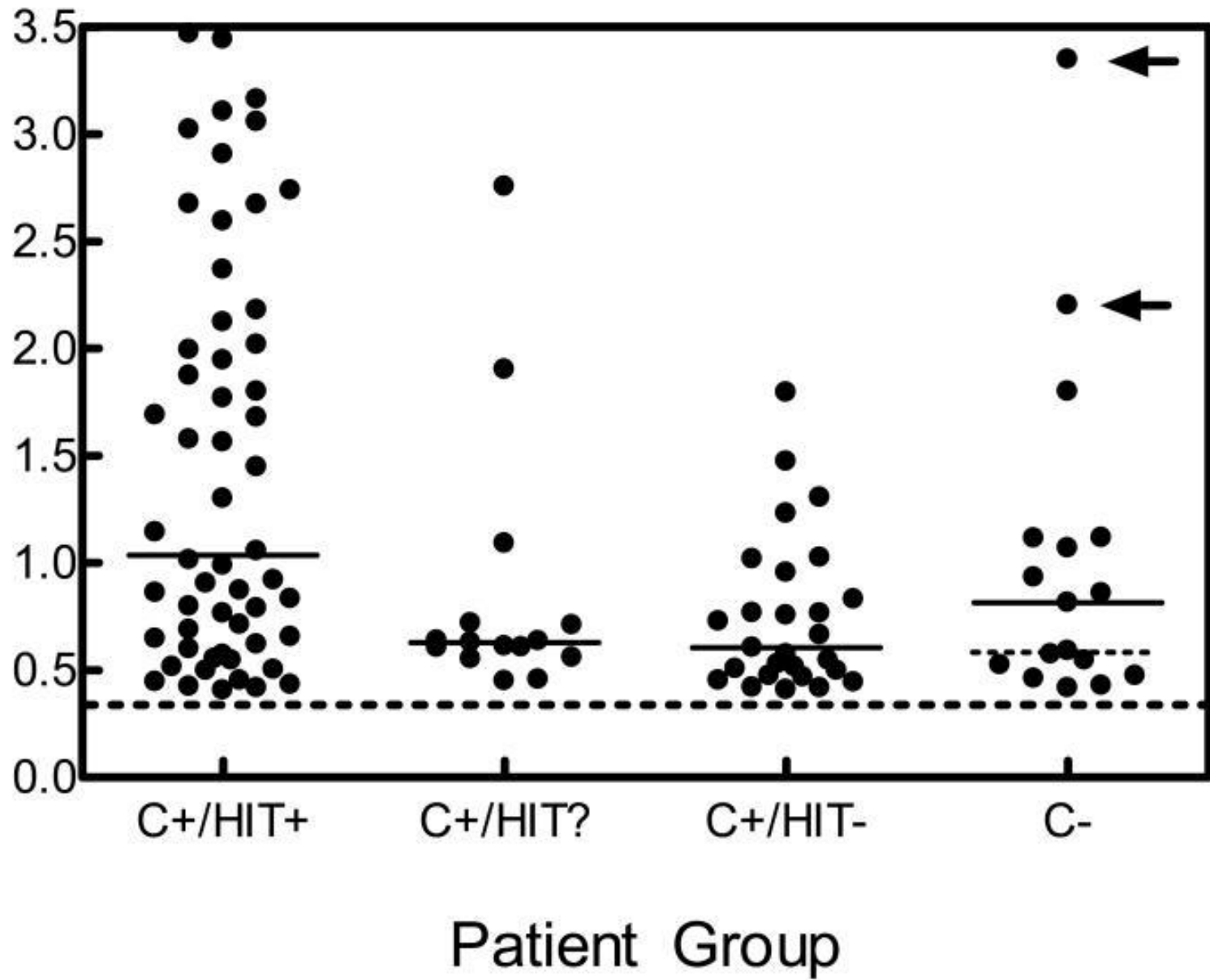
Immunológiai tesztek

- Partikulált gél immuno-assay (PaGIA)
- Enzim immuno-assay (Elisa)
 - Ha PaGIA szűrőteszt pozitív, akkor az antitestek jelenlétét ELISA technikával igazoljuk
 - A módszer sensitivitása kiváló, specificitása azonban alacsony

Ennek okai:

- Olyan kis mennyiségű antitest is kimutatható, ami nem jár még klinikai következménnyel
 - Ellentétben a funkcionális tesztekkel, nem tesz különbséget a thrombocytákat aktiváló és nem aktiváló antitestek között
 - Egyes ELISA tesztek kimutatják az klinikai jelentőséggel nem bíró IgA és IgM típust is
 - A csak PF4 – és nem a PF4/heparin komplex – ellen termelődő antitestet is képes detektálni
- Megoldás: olyan teszt, ami csak az IgG típusú HIT antitestet detektál
 - Minél magasabb az optikai denzitás (OD), annál nagyobb a HIT valószínűsége

Anti-heparin/PF4
Antibody OD Value



Lateral-flow immunoassay HIT antitest detektálására

High level of performances

100% NPV^[1]

combined with a pretest clinical score ^[2], allows clinicians to **exclude HIT** which means:

- ▶ Heparin therapy **can be continued**
- ▶ reduction of **bleeding risks and costs** associated with alternative anticoagulants^[3]

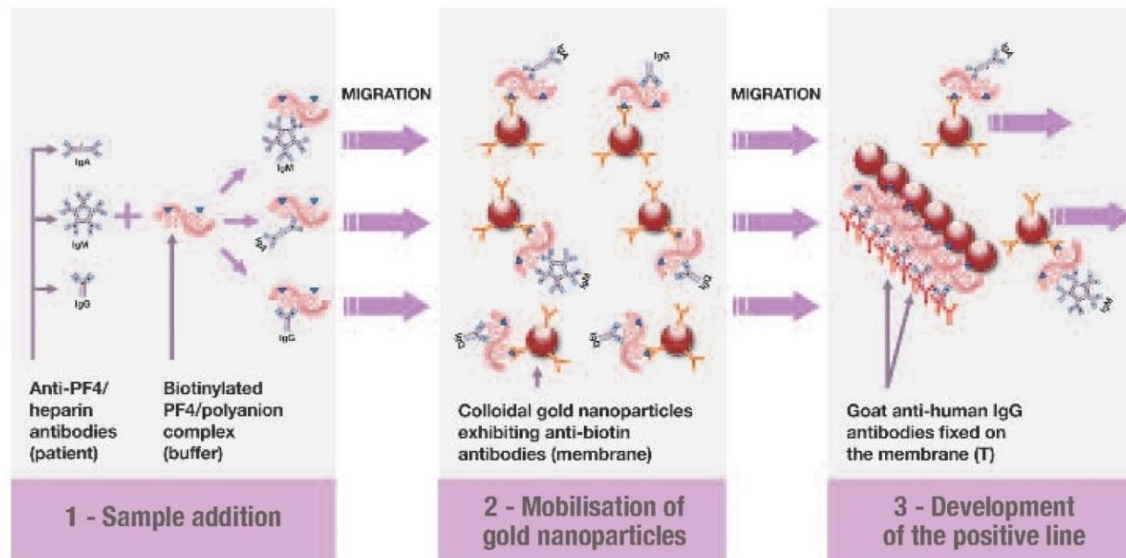
IgG isotype: 93% specificity^[1]

- ▶ reduces **overdiagnosis** of HIT^[3]
- ▶ reduces number of **confirmation tests**

Unitary test, easy to use and rapid

- ▶ available **24/7, STAT**
- ▶ adapted to **any type of laboratory**
- ▶ reduces **cost** of HIT **outsourcing tests**
- ▶ no need for **extra equipment**

Test principle: positive example



1- Sample addition

Patient's IgG, IgA, IgM antibodies bind biotinylated **PF4/polyanion complexes**.

2- Mobilization of gold nanoparticles

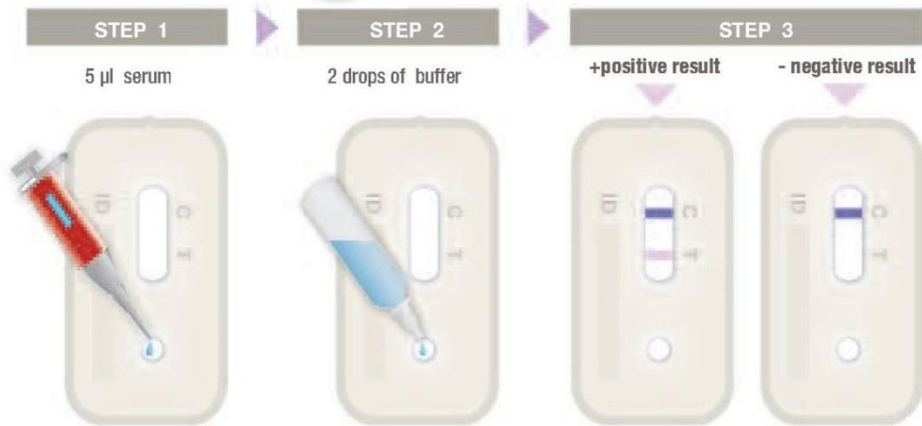
Anti-biotin antibodies from **gold nanoparticles** bind to the **biotin** of the immune complexes.

3- Development of the positive line

Goat **anti-human IgG** antibodies fixed on the membrane retain specifically the immune complexes with **IgG isotype**.

Other immune complexes (IgA, IgM isotypes) and free gold nanoparticles migrate as far as the **control line (C)** where specific antibodies will bind them. The development of the control line **validates the test**.

Ease of use



2 packaging sizes available

STic Expert® HIT 5	STic Expert® HIT 20
5 tests per kit*	20 tests per kit*
Cat. Nr. 01058	Cat. Nr. 01059

*individual tests in blister packs

References

- 1- Sachs UJ et al. Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost.* 2011; 106:1197-1202
- 2- Lo GK et al. Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4:759-65
- 3- Cuker A. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) in 2011: An epidemic of overdiagnosis. *Thromb Haemost.* 2011; 106: 993-994

Results obtained with 452 samples in different immunoassays, and predictive capabilities of these immunoassays calculated thereof

Test	Readout and cut-off	Positive results		Negative results		Specificity	Sensitivity	NPV	PPV
		true	false	true	false				
LFI-HIT	visually	34	29	389	0	0.93	1	1	0.54
LFI-HIT	scanner; 100 mV	33	30	388	1	0.928	0.971	0.997	0.524
LFI-HIT	scanner; 137 mV	33	22	396	1	0.947	0.97	0.997	0.6
GTI-IgG ELISA	photometry; OD = 0.4	34	45	373	0	0.892	1	1	0.43
HIA-IgG ELISA	photometry; OD = 0.5	34	53	365	0	0.873	1	1	0.39
PaGIA	visually	31	55	361	3	0.868	0.912	0.992	0.36

Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT).

Sachs UJ1, von Hesberg J, Santoso S, Bein G, Bakchoul T.

Thromb Haemost. 2011 Dec;106(6):1197-202.

Interpretation of laboratory results (EIA)

Patient type	Setting	Pre test Prob.	Sens.	Spec.	PPV	NPV
General pop.	Screening	0,01	0,90	0,97	0,23	0,99
Cardiac	Score<3	0,50	0,95	0,90	0,90	0,95
	Score≥3	0,90			0,99	0,67
Orthopedic	Score<3	0,50	0,95	0,92	0,92	0,95
	Score≥3	0,90			0,99	0,67

Heparin-Induced Thrombocytopenia

Ignacio Cruz-González,^a

María Sánchez-Ledesma,^a

Pedro L. Sánchez,^b

and Ik-Kyung Janga^a

^aCardiology Division, Massachusetts

General Hospital, Harvard Medical

School, Boston,

Massachusetts, USA

^bServicio de Cardiología, Hospital

General Universitario Gregorio

Marañón, Madrid, Spain

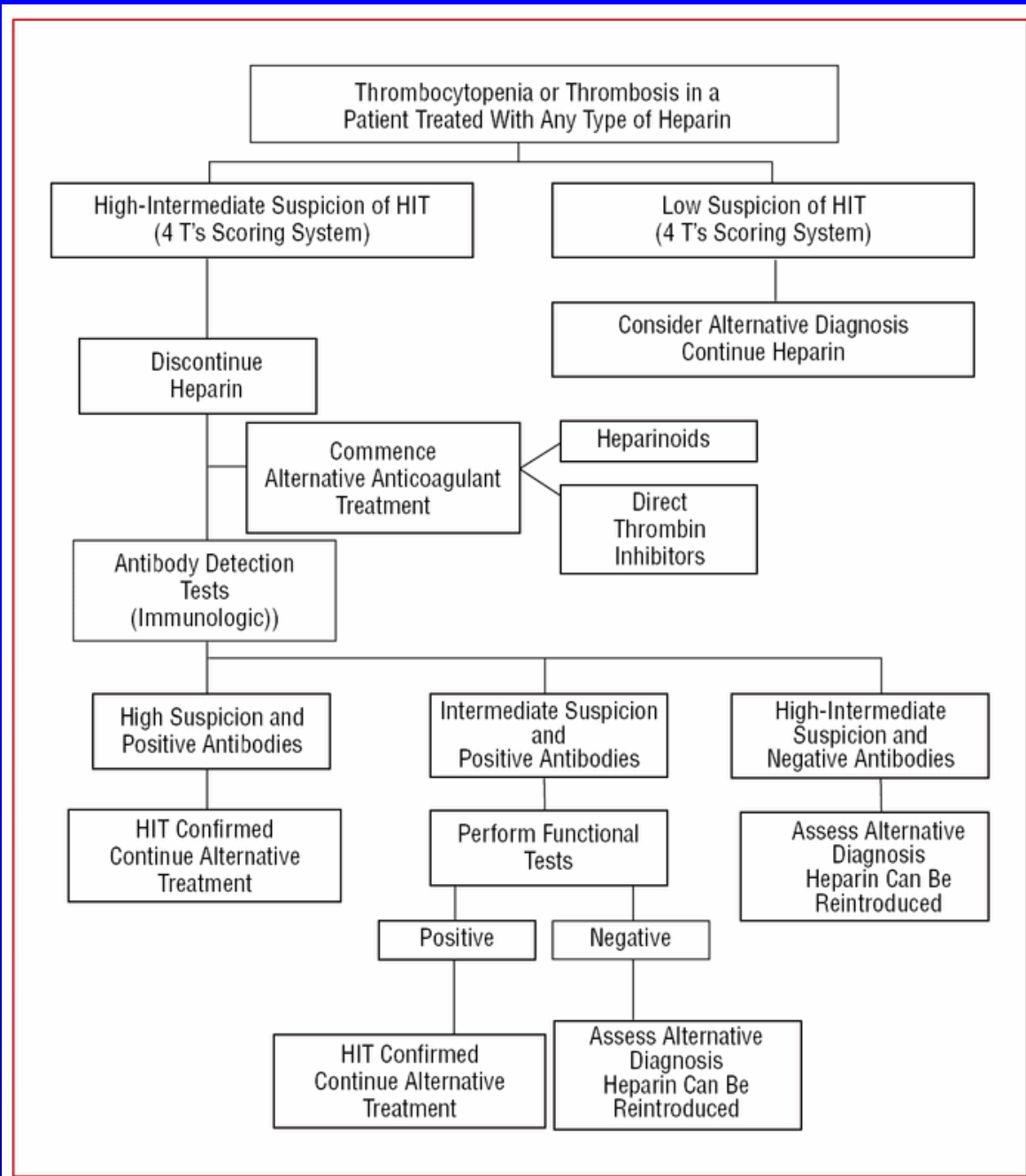


Figure 2.

Diagnostic and treatment algorithm for heparin-induced thrombocytopenia (HIT).

Hogyan történik hazánkban?

- Egyetemi intézetekben (Debrecen, Budapest)
- HIT irányú kivizsgálás nemzetközi ajánlások alapján
 - 4T score
 - Szűrőteszt(ek)
 - PaGIA
 - Immunoassay,
 - Lateral-flow immunoassay
 - Megerősítő teszt(ek)
 - Funkcionális teszt (áramlási cytometria)

Minta: 1 cső natív + 1 cső citráttal alvadásgátolt vér

Vizsgálatok: OEP által finanszírozott

A SE Laboratóriumi Medicina Intézet Haemostasis részlegén 2015.09.01-2016.08.31 között végzett HIT vizsgálatok

Minta	Objektum	HIT szűrés (PAGIA)	ELISA	No	rm.ért.
AD2C1A0F0H	2016.04.28	*pozitív	22,30 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A0ED3	2016.03.30	*pozitív	>300 U/ml		0.0-12.0
AS2C2A1QCH	2016.06.06	*pozitív	<1 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A3A1C	2015.11.25	*pozitív	17,30 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A36U8	2015.11.27	*pozitív	3,20 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A2Y8E	2016.01.19	*pozitív	2,70 U/ml		0.0-12.0
AD201A0F8E	2016.04.25	*pozitív	2,80 U/ml		0.0-12.0
AS292A0LAX	2016.04.29	*pozitív	1,50 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A2UTF	2015.08.03	*pozitív	3,20 U/ml		0.0-12.0
AS241A0Z7B	2015.12.14	*pozitív	67,00 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A0FE1	2015.12.22	*pozitív	2,50 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A2CHK	2016.04.15	*pozitív	27,70 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A37GP	2015.10.27	*pozitív	20,40 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A372I	2015.11.16	*pozitív	7,40 U/ml		0.0-12.0
AD2C1A1KO2	2016.05.23	*pozitív	5,00 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A0FDB	2016.01.04	*pozitív	52,80 U/ml		0.0-12.0
AS241A26NU	2015.08.30	*pozitív	9,70 U/ml		0.0-12.0
AD291A1OWQ	2016.03.17	*pozitív	2,20 U/ml		0.0-12.0
AD291A1OWZ	2016.03.17	*pozitív	24,10 U/ml		0.0-12.0
AS292A0UHU	2016.03.21	*pozitív	45,70 U/ml		0.0-12.0
AB2E1A2HG0	2016.07.19	*pozitív	18,20 U/ml		0.0-12.0
AS2C1A0OQW	2016.06.07	*pozitív	1,40 U/ml		0.0-12.0
AS241A096Y	2015.12.18	*pozitív	2,80 U/ml		0.0-12.0
Összesen: 131 szűrővizsgálat		*negatív: 108			
		*pozitív: 23			
		Eliza pozitív: 10			

AS241A0Z7B

2015.12.14

*pozitív 67,00 U/ml

0.0-12.0

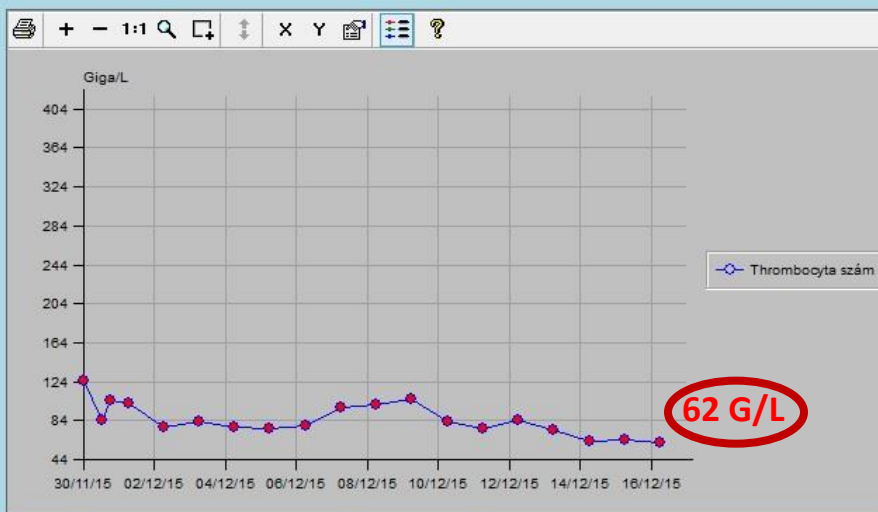
SOTE Központi Labor

Start Bejegyzés Szerkesztés Nézet Ablak Szövkör. Súgó

File Edit View Tools Windows Help

Property history for 1959.12.31, 022941882-05 (Előnézet)

Születési dátum: 31/12/1959
Idősz.: 29/11/2015 - 16/12/2015
Dát.: 26/09/2016



Sz.	Dát.	Anyag	Thrombocyta szám
1	30/11/15 00:30	edta plazma	125

Nyomtat Mégse

AM,AP,BI,BUN,CA,CK,CKAR,CKMB,CL,CRP,FVSA,GFR,GGT,GOT,GPT,RGB,AT,K,URE,
MCH,MCHC,MCV,MG,NA,P,PROCAL,RDW,THRCY,WVT

Opciók... Bezár

KÁLA GLIMSTERMBUDA ola01

A SE Laboratóriumi Medicina Intézet Haemostasis részlegén 2015.09.01-2016.08.31 között végzett HIT vizsgálatok

Minta	Objektum	HIT szűrés (PAGIA)	ELISA	No	rm.ért.
AD2C1A0F0H	2016.04.28	*pozitív	22,30 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A0ED3	2016.03.30	*pozitív	>300 U/ml		0.0-12.0
AS2C2A1QCH	2016.06.06	*pozitív	<1 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A3A1C	2015.11.25	*pozitív	17,30 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A36U8	2015.11.27	*pozitív	3,20 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A2Y8E	2016.01.19	*pozitív	2,70 U/ml		0.0-12.0
AD201A0F8E	2016.04.25	*pozitív	2,80 U/ml		0.0-12.0
AS292A0LAX	2016.04.29	*pozitív	1,50 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A2UTF	2015.08.03	*pozitív	3,20 U/ml		0.0-12.0
AS241A0Z7B	2015.12.14	*pozitív	67,00 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A0FE1	2015.12.22	*pozitív	2,50 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A2CHK	2016.04.15	*pozitív	27,70 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A37GP	2015.10.27	*pozitív	20,40 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A372I	2015.11.16	*pozitív	7,40 U/ml		0.0-12.0
AD2C1A1KO2	2016.05.23	*pozitív	5,00 U/ml		0.0-12.0
CC1X1A0FDB	2016.01.04	*pozitív	52,80 U/ml		0.0-12.0
AS241A26NU	2015.08.30	*pozitív	9,70 U/ml		0.0-12.0
AD291A1OWQ	2016.03.17	*pozitív	2,20 U/ml		0.0-12.0
AD291A1OWZ	2016.03.17	*pozitív	24,10 U/ml		0.0-12.0
AS292A0UHU	2016.03.21	*pozitív	45,70 U/ml		0.0-12.0
AB2E1A2HG0	2016.07.19	*pozitív	18,20 U/ml		0.0-12.0
AS2C1A0OQW	2016.06.07	*pozitív	1,40 U/ml		0.0-12.0
AS241A096Y	2015.12.18	*pozitív	2,80 U/ml		0.0-12.0
		*negatív: 108			
		*pozitív: 23			
		eliza pozitív: 10			

AS2C2A1QCH

2016.06.06

*pozitív

<1 U/ml 0.0-12.0

SOTE Központi Labor

Property history for 1949.02.05,

Születési dátum: 05/02/1949
Idősz.: 02/06/2016 - 08/06/2016
Dát.: 18/10/2016

Sz.	Dát.	Anyag	Thrombocyta szám
1	02/06/16 06:30	edta plazma	283

Nyomtat Mégse

Nézet KALA GLIMSTERMBUDA ola01

AD291A1OWZ

2016.03.17

*pozitív 24,10

U/ml

0.0-12.0

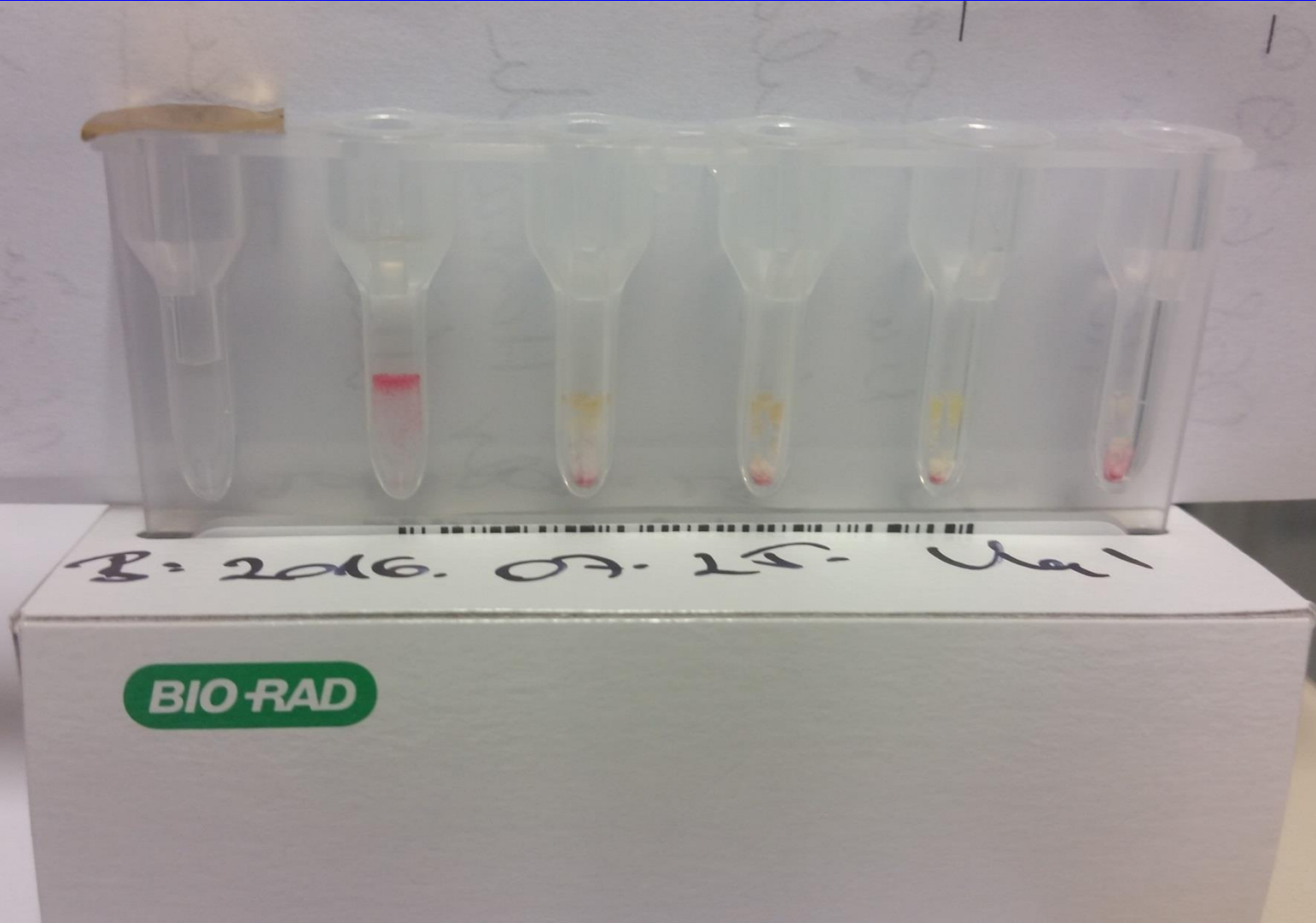
AS292A0UHU

2016.03.21

*pozitív 45,70

U/ml

0.0-12.0



FELMERÜLŐ GONDOLATOK

1. HIT/T gyógyulást követően alkalmazható-e ismételten heparin készítmény?
2. HIT lehetséges-e PF4/heparin ellenes antitest nélkül is?
3. A heparin molekula mérete is fontos!
4. Spontán HIT problémája!
5. Thrombocytá koncentrátum alkalmazása?



**KÖSZÖNÖM
A MEGTISZTELŐ FIGYELMET**