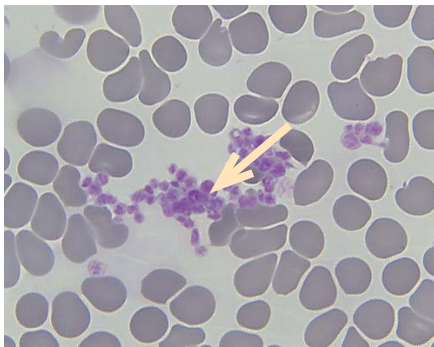


Diagnostik der Heparin-induzierten Thrombozytopenie

Hohe Letalität verlangt sensitive Tests

Unter Heparintherapie können Patienten Autoantikörper entwickeln, die zu einer Thrombozytenaktivierung und erhöhtem Thromboserisiko führen. Tests für die rasche Ausschlussdiagnostik müssen in jedem Krankenhaus vorgehalten werden.



Die Blutplättchen von HIT-Patienten neigen unter der Einwirkung von Heparin zur Aggregation und Thrombusbildung (www.mikroskopie-forum.de).

Im klinischen Alltag ist ein Mangel an Blutplättchen (*Thrombozytopenie*) häufig, und obwohl leicht erniedrigte Werte meist symptomlos bleiben, sollten sie doch stets Anlass für differenzialdiagnostische Überlegungen sein. Mögliche Ursachen sind Leukämien, Infektionskrankheiten, Vitaminmangel, Erkrankungen der Leber und Milz – um nur einige wichtige zu nennen.

Gelegentlich findet man erniedrigte Thrombozytenzahlen aber auch als unerwünschte Arzneimittelwirkung im Zusammenhang mit immunologischen Reaktionen. Hervorzuheben ist hier die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), die infolge thromboembolischer Komplikationen mit einer hohen Letalität von rund 30 Prozent belastet ist.

Ursache sind Antikörper, die sich in der Regel gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 (PF4) und Heparin richten und praktisch ausschließlich der Klasse IgG angehören. In einer soeben erschienenen

Arbeit (*Blood* 2013) wurden auch Antikörper gegen Komplexe aus Heparin und seinem therapeutisch genutzten Gegenspieler Protamin beschrieben.

Erhöhtes Thromboserisiko

Die hochmolekularen Immunkomplexe können Thrombozyten aktivieren und so eine Kaskade gefährlicher Ereignisse der zellulären und plasmatischen Hämostase auslösen. Blutplättchen aggregieren verstärkt, thrombogene Mikropartikel werden aus Gefäß- und Blutzellen freigesetzt, Thrombin- und Fibrinbildung führen zu intravasalen Gerinnseln. All dies trägt zu den typischen Zeichen der Krankheit bei: Thrombozytenabfall durch Verbrauch und massiv erhöhtes Thromboserisiko sowohl im venösen als auch im arteriellen System.

Die Häufigkeit des Auftretens einer HIT hängt unter anderem von der Art des verabreichten Heparins ab. In einer Metaanalyse wurde für unfraktioniertes Heparin (UHF) ein Risiko von 2,6 Prozent, für niedermolekulares Heparin (NMH) dagegen nur von 0,2 Prozent angegeben. Besonders gefährdet sind Patienten nach größeren Herz- oder orthopädischen Operationen sowie Unfallopfer mit Polytraumen; das Risiko für das Auftreten von Antikörpern beträgt hier bis zu 50 Prozent.

Bei HIT-Patienten muss Heparin (bzw. NMH) sofort abgesetzt und die Antikoagulation mit alternativen Medikamenten fortgeführt werden. Diese Entscheidung will allerdings gut bedacht sein, denn eini-

ge der neuen Antikoagulanzen weisen ein wesentlich höheres Blutungsrisiko auf und sind teurer als Heparin. Zudem fehlt in vielen Kliniken die ausreichende Erfahrung mit diesen Medikamenten. Keinesfalls darf also in die Krankenakte nur ein „Verdacht auf HIT“ ohne objektive Tests eingetragen werden; andernfalls würde dem Patienten bei erneuter Krankenhausaufnahme unnötigerweise Heparin vorenthalten.

Diagnostisches Stufenschema

Der Beweis einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie ist nicht ganz trivial, denn einerseits kann eine Thrombose gerade postoperativ ganz andere Ursachen haben, andererseits überlagern sich bei Operationen meist mehrere Prozesse: Zuerst kommt es zu einem Abfall der Thrombozytenzahlen, nach einigen Tagen jedoch zu einem reaktiven Wiederanstieg. Dieser kann den durch HIT-Antikörper bedingten zusätzlichen Verlust teilweise kompensieren und somit kaschieren.

Die Diagnostik erfolgt nach einem Stufenschema, das Labortests und klinische Beobachtungen kombiniert. Für HIT sprechen besonders das Auftreten der Thrombozytopenie zwischen 5 und 14 Tagen nach Heparinabgabe sowie ein rascher Verlust von mehr als 50 Prozent der Thrombozyten in wenigen Tagen. In verschiedenen Studien wurde allerdings gezeigt, dass auch in diesen Fällen Thrombozytopenie und Heparinabgabe nicht ursächlich verknüpft sein müssen. Bei ca. 80-90 Prozent der

Patienten bestätigt sich der aus dem 4T-Score (s. Abbildung) abgeleitete klinische Verdacht auf HIT nicht. Deshalb schließt sich zwingend der Antikörpernachweis an.

Wegen der hohen Letalität der Erkrankung zielt die Diagnostik im ersten Schritt vor allem auf einen schnellen und sicheren Ausschluss einer HIT ab. Dafür eignen sich Immunoassays, deren Grenzwerte so niedrig eingestellt sind, dass eine hohe Sensitivität – unter Inkaufnahme einer geringeren Spezifität – resultiert. Fällt der Immunoassay positiv aus, so muss Heparin sofort abgesetzt werden. Im weiteren Verlauf sollte die Erkrankung dann durch einen funktionellen Assay bewiesen werden.

Immunoassays

HIT-Immunoassays messen die Bindung von Antikörpern an Komplexe aus PF4/Heparin. Für die apparative Laboranalytik sind alle gängigen Verfahren wie Turbidimetrie, ELISA und Chemilumineszenz im Markt verfügbar. Zunehmend werden auch relativ einfach zu handhabende Schnelltests für die patientennahe

Diagnostik angeboten. Eine Übersicht findet sich auf der nächsten Doppelseite. Vor allem wenn der Test nur gelegentlich benötigt wird, sind Schnelltests von Vorteil, die auch bei Einzelmessungen eine komplette Ausnutzung der Reagenzien und Kontrollen gewährleisten. Unabhängig vom eingesetzten Verfahren ist die rasche Verfügbarkeit vor Ort wichtig, damit man innerhalb einer Stunde nach dem ersten klinischen Verdacht evidenzbasiert therapieren kann.

Funktionstests

Wurden Antikörper nachgewiesen, so ist eine Diagnosesicherung in Absprache zwischen behandelndem Arzt und Speziallabor anzustreben. Als „Goldstandard“ verwendet man einen Funktionstest, der erhöhten analytischen Aufwand sowie den Zugang zu ausgewählten frischen Spenderthrombozyten erfordert.

Beim international als „Goldstandard“ anerkannten *Serotonin Release Assay* (SRA) werden die Spenderthrombozyten mit radioaktiv markiertem Serotonin

versetzt und mit Serum des Patienten vermischt. Man bestimmt in Gegenwart von Heparin die freigesetzte Radioaktivität. Alternativ erfasst man mit dem „HIPA-Test“ (Heparin-induzierte Aggregation) die Trübungszunahme der gewaschenen Thrombozyten von vier Spendern. Dieses Verfahren ist in Deutschland gebräuchlicher und liefert mit dem SRA vergleichbare Werte.

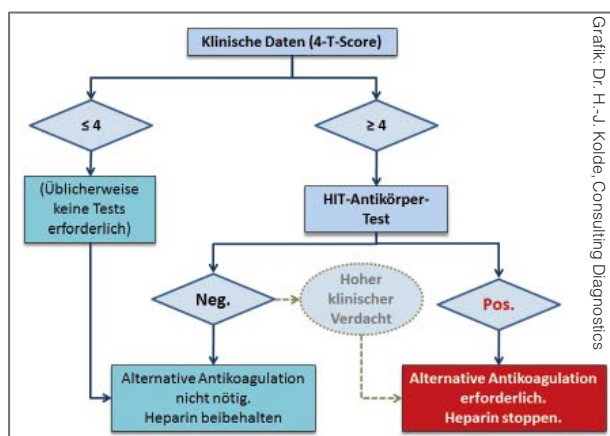
Beide Methoden sind bei sachgerechter Ausführung sowohl sensitiv als auch sehr spezifisch. Man erhält im Vergleich zu den Immunoassays erwartungsgemäß weniger positive Ergebnisse, weil im Funktionstest nur solche Antikörper nachgewiesen werden, die in Gegenwart von Heparin auch tatsächlich Plättchen aktivieren. Neuere IgG-spezifische Immunoassays stimmen mit den funktionellen Methoden besser überein als ältere Tests, die zusätzlich nicht-aktivierende Antikörper der Klassen IgA und IgM erfassen.

Auch wenn bei einem Ausschlussstest die Sensitivität – also die Vermeidung falsch negativer Befunde – im Vordergrund steht, ist die Spezifität ein wichtiges Kriterium für die Testauswahl, weil sie die Zahl unnötiger HIT-Bestätigungstests und Therapieumstellungen vermindert. Das Stufenschema entspricht dem heute üblichen Vorgehen bei diagnostischen Pfaden, das zunächst auf hohe Sensitivität zur Ausschlussdiagnostik und dann auf hohe Spezifität zum Nachweis einer Erkrankung abzielt.

Ausblick

Heparin bleibt auch in Zeiten neuer oraler Antikoagulanzen weiterhin unverzichtbar, und deshalb werden uns HIT-Tests noch einige Zeit begleiten. Für die Zukunft wäre zu wünschen, dass es gelingt, schnelle und spezifische immunchemische Tests zum Nachweis von Heparin-abhängigen und zugleich Plättchenaktivierenden Antikörpern zu entwickeln. Noch sinnvoller wäre ein einfacher und standardisierter funktioneller Test für HIT, der keine frischen Thrombozyten erfordert – eine attraktive Herausforderung für die IVD-Industrie. 🌸

gh



Grafik: Dr. H.-J. Kolde, Consulting Diagnostics

Der 4T-Score beinhaltet vier „T-Fragen“ (Online-Programm unter www.diaprof.org): Grad der Thrombozytopenie, Tag des Auftretens, Nachweis von Thrombosen, Thrombozytenabfall aus anderen Gründen. Bei einem Wert über 3 (max. 8) folgt ein Antikörpertest. Fällt auch er positiv aus, so muss Heparin sofort abgesetzt werden.

Tests für die Ausschlussdiagnostik

Immunoassays sind der „HIT“

Die potenziell tödlich verlaufende heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) stellt nicht nur eine medizinische und analytische, sondern vor allem auch eine organisatorische Herausforderung für das Labor dar. Auf der einen Seite ist die Krankheit selten, auf der anderen Seite muss sie relativ häufig ausgeschlossen werden. Das liegt daran, dass Heparinabgabe und niedrige Thrombozytenwerte im chirurgischen und intensivmedizinischen Krankengut häufig kombiniert auftreten, ohne dass ein ursächlicher Zusammenhang bestehen muss.

Die meisten Krankenhäuser befinden sich hier in einem Dilemma, denn der Goldstandard der HIT-Diagnostik ist ein aufwendiger Funktionstest, der nicht mit vertretbarem Aufwand vorgehalten werden kann. Die Lösung liegt in den auf dieser Seite vorgestellten Immunoassays, die jederzeit verfügbar und einfacher in der Handhabung sind. Sie liefern eine Ausschlussdiagnose, sprich: Im häufigen Fall eines negativen Befunds kann Heparin meist weiterhin eingesetzt werden. Bei positivem Befund sollte die Therapie in der Regel so lange auf alternative Antikoagulanzen umgestellt werden, bis das Ergebnis des Funktionstests aus dem Speziallabor vorliegt.

Tests für Einzelmessungen

Die Tabelle zeigt die gesamte Breite der im Markt erhältlichen Applikationsformate vom einfachen Schnelltest für die patientennahe Diagnostik bis zum Vollautomatentest für das Routine- und Speziallabor. Als einfache notfalltaugliche Tests bieten sich besonders der ID-PaGIA Heparin/PF4-Antikörpersuchtest von Bio-Rad (Geltest mit Zentrifugation) und der STic Expert HIT von Stago (*Lateral Flow*

Immunoassay mit integrierter Funktionskontrolle an. Beide können bei Bedarf als Einzeltests angewendet werden. Mit Hilfe eines Readers lässt sich die Ablesung der ID-PaGIA-Karten auch automatisieren und objektivieren.

Automatisierte Serienmessung



Bei allen halb- und vollautomatisierbaren Verfahren fällt ein gewisser Kalibrationsaufwand an. Für die Abarbeitung als ELISA* im offenen Mikrotiterplattenformat eignen sich der Zymutest HIA von Coachrom und der Asserachrom HPIA-IgG von Stago. Diese Tests kann man auf handelsübliche ELISA-Geräte adaptieren,

um die Wasch- und Pipettierschritte automatisiert durchzuführen.

Wer noch einen Schritt weiter in Richtung Vollautomation gehen möchte, für den ist Instrumentation Laboratory (IL) der richtige Anbieter. Die beiden Chemilumineszenz-Assays HemosIL AcuStar, die sich vor allem in der Spezifität unterscheiden, sind für den ACL AcuStar konzipiert, verwenden gebrauchsfertige Reagenzienkartuschen und können gekühlt bis zu 12 Wochen im Gerät vorgehalten werden. Der turbidimetrische HemosIL HIT-Ak kommt in den Geräten der ACL TOP-Familie zum Einsatz. 🌸

ge

* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

			
Ansprechpartner	Andrea Diestelmann 0151/171 298 34 andrea_diestelmann@bio-rad.com	Bernhard Kolmer 0800/246633-0 hyphen-biomed@coachrom.com	
Produkt	ID-PaGIA Heparin/PF4 Antikörpersuchtest	Zymutest HIA (Hyphen BioMed)	
Testprinzip	Partikel-Gel-IA (PaGIA)	ELISA	
Tests pro Packung	18 (3 x 6)	12 x 8 oder 4 x 8	
Zeit bis zum Resultat (in Min.)	< 20 (inkl. 10 für Zentrifugation)	130	
Ig-Spezifität	IgG	IgG (alternativ IgG/A/M)	
Probenmaterial	Frisches Serum	Serum oder Citratplasma	
Geräte	Banjo und Saxo ID-Reader	MTP-Reader	
Pipettierschritte	2 (Serum u. Partikellösung)	5	
Waschschritte	Nicht erforderlich	2	
Automatisierung	Ja (für die Ablesung)	Ja (ELISA Automaten)	
Kalibration erforderlich?	Nein	Nein	
Kontrolle (positiv / negativ)	Ja / Ja	Ja / Ja	
Reagenzienstabilität nach Öffnen	Mind. 3 Monate	2 Monate (2-8°C)	
Besonderheiten	Hoher NPV; als Einzeltest anwendbar; notfalltauglich	Erfasst Protaminsulfat-, NAP-2- und IL-8-Heparin Antikörper („Pseudo-HIT“)	

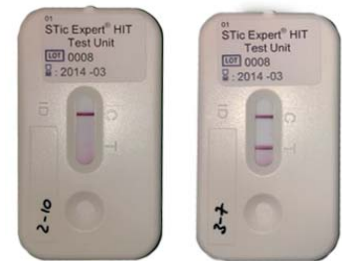
Abkürzungen: IA = Immunoassay, MTP = Mikrotiterplatten



Notfalltauglicher Ausschlusstest

Ein Test für die Heparin-induzierte Thrombozytopenie sollte in jeder Klinik ständig verfügbar sein, um bei erniedrigten Plättchenzahlen rasch Konsequenzen für die weitere Therapie ziehen zu können. Der innovative IgG-spezifische Lateral Flow Immunoassay *STic Expert® HIT* ermöglicht das in weniger als 15 Minuten. Bedienung und Auswertung sind sehr einfach: Positive Proben erzeugen eine gut ablesbare, intensiv gefärbte Linie (s. Abbildung). Die Testelemente sind einzeln verpackt, Reagenzverluste treten nicht auf. Eine Kontrolle ist integriert. In mehreren klinischen Studien erwies sich *STic Expert® HIT* zum Ausschluss einer HIT als ebenso geeignet wie verschiedene ELISAs, lieferte jedoch weniger falsch positive Ergebnisse. Diese werden von Experten zu Recht kritisiert, da in der Folge Heparin unnötig durch teure alternative Antikoagulanzen ersetzt werden muss. Das kann das Risiko von gefährlichen Blutungen, aber auch Thrombosen erhöhen. Außerdem fallen Kosten für teure Bestätigungstests in Referenzlabors und für das Monitoring der alternativen Medikamente an. Somit verbessert *STic Expert® HIT* die Therapie und senkt Kosten.

Die HIT-Diagnostik steht seit Jahren im Fokus der Forschung und Entwicklung von Stago. *Asserachrom HPIA* war der erste standardisierte ELISA für HIT überhaupt. Dessen neue IgG-spezifische Version korreliert noch enger mit funktionellen Tests. Für die umfassende Hämostasediagnostik bietet Stago innovative Geräte, Softwarelösungen sowie bereits vorkalibrierte Reagenzien für die gesamte Routine, Produkte für die Flowzytometrie (z. B. VASP, Plättchen-assoziierte Antikörper, PNH) und Thrombingeneration (CAT) sowie andere Spezialtests.



STic Expert HIT von Stago: Links negativer, rechts positiver Befund. Die zweite Bande unter der Kontrollbande ist klar zu erkennen.

Kontaktinformation

Stago Deutschland GmbH • Dr. Rüdiger Henze • 0211/913 237 18 • ruediger.henze@de.stago.com • www.stago.de



Martina Leplatoni
089/90907-115
Klausnerring 4, 85551 Kirchheim
m.leplatoni@il-ger.de, www.il-ger.de

Dr. Rüdiger Henze
0211/913 237-18
Kaiserswerther Straße 183 a, 40474 Düsseldorf
ruediger.henze@de.stago.com, www.stago.de

HemosIL HIT-Ak (PF4-H)	HemosIL AcuStar HIT-IgG	HemosIL AcuStar HIT (PF4-H)	STic Expert HIT	Asserachrom® HPIA-IgG
Latexverstärkter IA	Chemilumineszenz Assay	Chemilumineszenz Assay	Lateral Flow Immunoassay	ELISA
Ca. 50	25	25	5 / 20	48
13	30	30	12	160
IgG/A/M	IgG	IgG/A/M	IgG	IgG (alternativ IgG/A/M)
Citratplasma	Serum oder Citratplasma	Serum oder Citratplasma	Serum (Plasma in Vorb.)	Serum, Plasma
ACL TOP Familie	ACL AcuStar	ACL AcuStar	Nein	MTP-Reader
Vollautomatisch	Vollautomatisch	Vollautomatisch	1 (plus 1 Reagenztropfen)	4
Vollautomatisch	Vollautomatisch	Vollautomatisch	Nein	2
Ja	Ja	Ja	Nein	Möglich
Ja	Vorkal., Arbeitskurve/Charge	Vorkal., Arbeitskurve/Charge	Nein	Nein
Ja / Ja	Ja / Ja	Ja / Ja	Im Testelement integriert	Ja / Ja
Gekühlt 2 Monate; im Gerät: 36h (kontinuierlicher Betrieb)	12 Wochen im Gerät	12 Wochen im Gerät	Einzeln verpackte Testelemente, Tropfreagenz >1 Jahr	3 Teile à 16 Tests zur sofortigen Verwendung
Flüssigstabile Reagenzien; vollautomatische Abarbeitung rund um die Uhr	gebrauchsfertige Reagenzkartuschen im Gerät gekühlt bei 2-8°C; vollautomatische Abarbeitung rund um die Uhr		NPV = 100% Spezifität = 93%	NPV = 100% Spezifität: 92,7%

Die Tabelle basiert auf Herstellerangaben und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Richtigkeit.