

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO  
MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

MATEJA PIPUŠ

**PRIMERJAVA DVEH LABORATORIJSKIH PREISKAV ZA  
POTRDITEV S HEPARINOM IZZVANE  
TROMBOCITOPENIJE**

**COMPARISON OF TWO LABORATORY ASSAYS FOR  
CONFIRMATION OF HEPARIN – INDUCED  
THROMBOCYTOPENIA**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2014

**ZAHVALA:**

Zahvaljujem se mentorju, izr. prof. dr. Primožu Rožmanu, dr. med. spec. transf. med. in somentorici doc. dr. Elviri Maličev, univ. dipl. biol. za strokovno pomoč in usmerjanje pri delu.

Zahvalila bi se dr. Poloni Klemenc, univ. dipl. mikrobiol. za koristne nasvete in možu Goranu za pomoč pri oblikovanju magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi mojim domačim za podporo in potrpežljivost v času študija.

**IZJAVA:**

Magistrsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za pretočno citometrijo na Zavodu RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Primoža Rožmana, dr. med., spec. transf. med. in somentorstvom doc. dr. Elvire Maličev, univ. dipl. biol.

Mateja Pipuš

Ljubljana, september 2014

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Žiga Jakopin, mag. farm.

# VSEBINA

<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>III</b>
<b>SEZNAM PREGLEDNIC .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM SLIK IN GRAFOV .....</b>	<b>VI</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. HEPARIN .....	1
1.2. TROMBOCITNI FAKTOR 4 (PF4).....	2
1.3. S HEPARINOM IZZVANA TROMBOCITOPENIJA (HIT).....	3
1.3.1. HIT TIPA I .....	3
1.3.2. HIT TIPA II .....	3
1.3.2.1. Patofiziologija HIT .....	4
1.3.2.2. Epidemiologija HIT .....	5
1.3.2.3. Klinična slika in diagnostika HIT .....	5
1.4. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA HIT .....	8
1.4.1. SEROLOŠKE PREISKAVE ZA ODKRIVANJE HEPARINSKO ODVISNIH PROTITELES .....	9
1.4.1.1. Encimsko-immunski test s čvrsto fazo (ELISA, angl. Enzyme Linked Immunesorbent Assay).....	9
1.4.1.2. Aglutinacijski test z mikrodelci v gelu (PaGIA, angl. Particle-Gel Immunoassay) .....	10
1.4.1.3. Lateralna imunodifuzijska metoda (LFI-HIT, angl. Lateral-Flow Immunoassay) .....	10
1.4.2. FUNKCIJSKE PREISKAVE ZA POTRDITEV S HEPARINOM IZZVANE TROMBOCITOPENIJE.....	11
1.4.2.1. Test sproščanja serotonina (SRA, angl. Serotonin Release Assay).....	11
1.4.2.2. Test s heparinom povzročene agregacije trombocitov (HIPA, angl. Heparin Induced Platelet Aggregation).....	12
1.4.2.3. Določanje aktivacije trombocitov s pretočno citometrijo.....	12
1.4.3. NOVI DIAGNOSTIČNI TESTI ZA ODKRIVANJE HIT.....	13
1.4.4. PRISTOP K TESTIRANJU ZA POTRDITEV DIAGNOZE HIT .....	14
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1. PREISKOVANA SKUPINA BOLNIKOV .....	18
3.2. POTEK DELA.....	19
3.3. DOLOČANJE AKTIVACIJE TROMBOCITOV S PRETOČNO CITOMETRIJO .....	21
3.3.1. FUNKCIJSKI TEST HIT »IN-HOUSE« .....	21

3.3.1.1.	Princip testa .....	21
3.3.1.2.	Reagenti in materiali .....	21
3.3.1.3.	Vzorci .....	22
3.3.1.4.	Postopek izvedbe funkcijskega testa HIT »in-house«.....	22
3.3.2.	FUNKCIJSKI TEST HIT ALERT .....	24
3.3.2.1.	Princip testa .....	24
3.3.2.2.	Reagenti in materiali .....	24
3.3.2.3.	Vzorci .....	25
3.3.2.4.	Postopek izvedbe funkcijskega testa HIT Alert .....	26
<b>4.</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>31</b>
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>SKLEP.....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>47</b>
<b>8.</b>	<b>PRILOGA .....</b>	<b>53</b>

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>AK</b>	aminokislina
<b>CD</b>	celični označevalec (angl. cluster of differentiation)
<b>DIK</b>	diseminirana intravaskularna koagulacija
<b>ELISA</b>	encimsko imunska metoda (angl. enzyme linked immunosorbent assay)
<b>FITC</b>	fluorescein izotiocianat
<b>FSC</b>	sprednje sipanje svetlobe (angl. forward scatter)
<b>HEP</b>	točkovanik HEP (angl. HIT expert probability)
<b>HIPA</b>	test agregacije trombocitov (angl. heparin induced platelet aggregation)
<b>HIT</b>	s heparinom izzvana trombocitopenija (angl. heparin-induced thrombocytopenia)
<b>ITP</b>	idiopatična trombocitopenična purpura
<b>IU</b>	mednarodna enota (angl. international unit)
<b>IgA</b>	imunoglobulin A
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IgM</b>	imunoglobulin M
<b>LFI</b>	lateralna imunodifuzija (angl. lateral-flow immunoassay)
<b>NMH</b>	nizkomolekularni heparin
<b>OD</b>	optična gostota (angl. optical density)

<b>PA</b>	polianion
<b>PaGIA</b>	aglutinacijski test z mikrodelci v gelu (angl. particle-gel immunoassay)
<b>PBS</b>	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
<b>PC</b>	pretočna citometrija
<b>PE</b>	fikoeritrin
<b>PFA</b>	paraformaldehid
<b>PF4</b>	trombocitni faktor 4 (angl. platelet factor 4)
<b>PRP</b>	s trombociti bogata plazma (angl. platelet rich plasma)
<b>PVS</b>	polivinil sulfonat
<b>R</b>	raztopina
<b>ROC</b>	krivulja ROC (angl. receiver operating characteristic curve)
<b>SH</b>	standardni heparin
<b>SRA</b>	test sproščanja serotonina (angl. serotonin release assay)
<b>SSC</b>	stransko sipanje svetlobe (angl. side scatter)
<b>WBIA</b>	test agregacije trombocitov iz polne krvi (angl. whole blood impedance aggregometry)

## SEZNAM PREGLEDNIC

**Preglednica I.** Ocenjevanje verjetnosti za nastanek HIT–točkovalnik 4T

**Preglednica II.** Značilnosti laboratorijskih preiskav pri sumu na HIT

**Preglednica III.** Klinike in oddelki ter število preiskovanih bolnikov

**Preglednica IV.** Reagenti in njihove količine, potrebne za izvedbo funkcijskega testa HIT »in-house«

**Preglednica V.** Reagenti, ki jih vsebuje reagenčni sestav HIT Alert™

**Preglednica VI.** Načrt za pipetiranje vzorcev in reagentov za test HIT Alert

**Preglednica VII.** Načrt za pipetiranje vzorcev in reagentov za označevanje trombocitov s protitelesi

**Preglednica VIII.** Značilni pozitivni in negativni rezultati testa HIT Alert

**Preglednica IX.** Rezultati serološkega testa IgG-specifična ELISA

**Preglednica X.** Primerjava rezultatov serološkega testa IgG-specifična ELISA z rezultati funkcijskih testov HIT “in house” in HIT Alert

**Preglednica XI.** Prikaz števila PP, LP, PN in LN rezultatov testa HIT Alert v primerjavi s testom HIT »in-house«

**Preglednica XII.** Rezultati funkcijskih testov HIT »in-house« in HIT Alert, razporejeni po intervalih vrednosti OD

**Preglednica XIII.** Izračunana občutljivost in specifičnost testa IgG-specifična ELISA v primerjavi s testoma HIT »in-house« in HIT Alert

## SEZNAM SLIK IN GRAFOV

**Slika 1.** Kemijska struktura heparina

**Slika 2.** Kristalna tridimenzionalna struktura PF4

**Slika 3.** Shematski prikaz razvoja HIT

**Slika 4.** Diagnostični pristop ob sumu na HIT

**Slika 5.** Model ledene gore v diagnostiki HIT

**Slika 6.** Opravljene preiskave in pridobitev vzorcev za test HIT Alert

**Slika 7.** Točkovni diagrami populacije trombocitov

**Slika 8.** Prikaz populacij aktiviranih trombocitov (test HIT »in-house«)

**Slika 9.** Prikaz populacij aktiviranih trombocitov (test HIT Alert)

---

**Graf 1.** Primerjava števila pozitivnih in negativnih rezultatov funkcijskih testov HIT »in-house« in HIT Alert v posameznih intervalih vrednosti OD

**Graf 2.** Občutljivost in specifičnost testa IgG-specifična ELISA v primerjavi s testoma HIT »in-house« in HIT Alert



## POVZETEK

S heparinom izzvana trombocitopenija (HIT) je najpogostejša trombocitopenija, ki jo povzročajo zdravila in lahko predstavlja zaplet pri zdravljenju s heparinom. Stanje se pojavi pri 1–5 % bolnikov, ki prejemajo heparin več kot 5 dni. Izraža se z arterijskimi in venskimi trombozami, ki lahko povzročijo gangrene ali celo smrt bolnika. Glavno lastnost te bolezni predstavlja paradoks: kljub trombocitopeniji namreč ne prihaja do krvavitev, ampak do tromboz. Nadaljevanje zdravljenja s heparinom ima lahko hude posledice, zato je za ustrezno nadomestno zdravljenje ključnega pomena hitro diagnosticiranje HIT. Postavitev diagnoze HIT je zaradi nespecifičnih znakov zahtevna, saj ima trombocitopenija pri številnih bolnikih različne vzroke.

Z laboratorijsko diagnostiko z odkrivanjem specifičnih protiteles potrdimo ali ovržemo sum na HIT, vse boljše razumevanje patogeneze HIT pa vodi v razvoj zanesljivejših laboratorijskih metod. V literaturi lahko zasledimo več različnih pristopov k diagnosticiranju HIT, prav tako pa tudi podatke o uporabi različnih testov za odkrivanje heparinsko odvisnih protiteles oziroma določanju njihove patogenosti. Glavno vlogo pri tem imajo funkcijski testi, s katerimi ne odkrivamo le prisotnosti heparinsko odvisnih protiteles, ampak določamo tudi njihovo dejansko sposobnost aktivacije trombocitov. V naši nalogi smo se ukvarjali z eno izmed sodobnejših funkcijskih preiskav, ki temelji na pretočni citometriji. Za testiranje smo uporabili serum 47 bolnikov, pri katerih je bil postavljen sum na HIT. Po opravljenem presejalnem testu za ugotavljanje prisotnosti protiteles IgG z metodo ELISA smo izvedli dva funkcijska testa, in sicer že uveljavljeni test HIT »in-house« ter test z novim reagenčnim sestavom HIT Alert<sup>TM</sup>. Oba testa temeljita na uporabi trombocitov zdravega darovalca (testni trombociti), ki jih inkubiramo z bolnikovim serumom in heparinom v različnih koncentracijah. V primeru prisotnosti heparinsko odvisnih protiteles pride do aktivacije testnih trombocitov, ki so pri testu HIT »in-house« označeni s protitelesi anti-CD62P, pri testu HIT Alert pa s protitelesi anti-aneksin V.

Na podlagi naših rezultatov smo ocenili, da s testom IgG-specifična ELISA dobimo 36 % lažno pozitivnih rezultatov, če jo primerjamo s testom HIT »in-house« ter 46 % po primerjavi s testom HIT Alert. Primerjali smo tudi rezultate obeh funkcijskih testov in ugotovili, da sta testa med seboj primerljiva po zahtevnosti izvedbe in po času, ki ga za to

potrebujemo. Specifičnost testa HIT Alert glede na test HIT »in-house« je 100 %, občutljivost pa 79 %, vendar bi za natančnejši izračun potrebovali večje število vzorcev bolnikov in podatke o njihovih kliničnih slikah. Pomanjkljivost testa HIT Alert je uporaba trombocitov enega samega darovalca, medtem ko test HIT »in-house« izvajamo s trombociti štirih darovalcev. Zaradi polimorfizma trombocitnega receptorja FcγRIIa to pomeni nekoliko večjo zanesljivost testa HIT »in-house«. Glede na rezultate, ki smo jih dobili z novim funkcijskim testom HIT Alert menimo, da že vpeljanih postopkov za laboratorijsko testiranje HIT zaenkrat ne bi spreminjali.

## ABSTRACT

Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is the most common drug-associated thrombocytopenia, which may represent a complication of heparin treatment. This clinical condition occurs in 1–5 % of patients receiving heparin therapy for more than 5 days. It is associated with a high risk of arterial and venous thrombosis, which can induce limb gangrene and even death of the patient. The main clinical feature of the disease is a paradox: despite thrombocytopenia, bleeding is rare, while HIT is strongly associated with thrombosis. Prolonged administration of heparin may have serious adverse consequences, so prompt diagnosis is of key importance for the introduction of supplemental therapy. To diagnose HIT can often be difficult because the symptoms are non-specific, as well as thrombocytopenia can be result of many different diseases.

In order to confirm or refute suspected HIT, the laboratory diagnostic is based on the detection of heparin-induced antibodies. The understanding of the HIT pathogenesis has led to invention of more reliable and accurate laboratory assays. The experts describe different approaches in diagnosing HIT, as different assays to detect heparin-induced antibodies and determine their pathogenicity. Functional assays for the detection of heparin-induced antibodies and determination of their actual platelet-activating ability have a main role here as well. One of the newer functional assays is the flow cytometric analysis that was used in our study. In this assay, sera from 47 patients with suspected HIT were analysed. After the screening test ELISA for the detection of IgG antibodies two functional assays, the HIT »in-house« test and a new commercial HIT Alert™ test, were performed. In both tests, we used platelets obtained from healthy donors, which were incubated with the patient's sera and different concentrations of heparin. In case of the presence of heparin-induced antibodies, the platelets were activated. They were anti-CD62P labelled in the HIT »in-house« test and anti-annexin V labelled in the HIT Alert test.

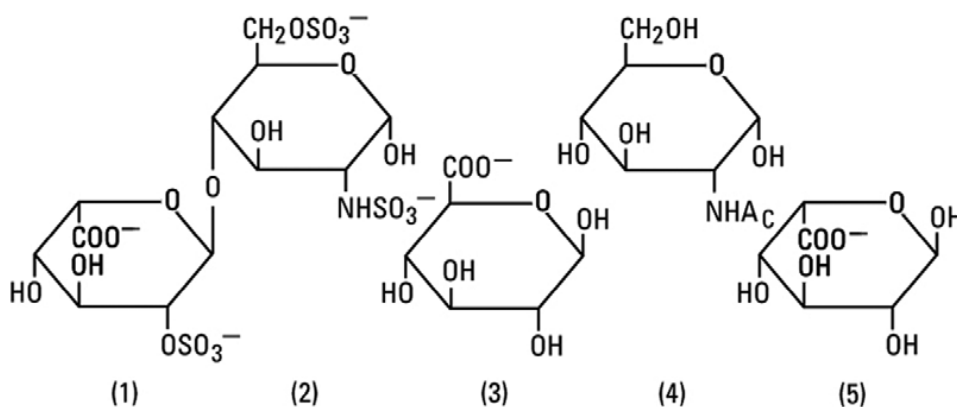
We estimated there were 36 % false positive results comparing IgG-specific ELISA to the HIT »in-house« test and 46 % false positive results comparing it to the HIT Alert test. The comparison of the results of two functional assays reveals that the tests are both equally demanding to perform and they have almost the same turnaround time. According to the HIT »in-house« test, the specificity of the HIT Alert test was 100 % and the sensitivity was

79 %. However, a study with more samples from patients and with information of their clinical picture would assure results, which would be more accurate. The lack of the HIT Alert test is the use of platelets from single donor, while the platelets from four donors are used in the HIT »in-house« test. Due to the Fc $\gamma$ RIIa receptor polymorphism the HIT »in-house« test provides a slightly higher reliability. According to the results of the new functional assay, we decided not to change our procedure in the laboratory testing for HIT.

# 1. UVOD

## 1.1. HEPARIN

Heparin je naravni ogljikohidratni polimer iz skupine glikozaminoglikanov. Sestavljen je iz ponavljajočih se disaharidnih enot, ki so močno sulfatirane in je od vseh poznanih bioloških molekul najmočneje negativno nabit (1).



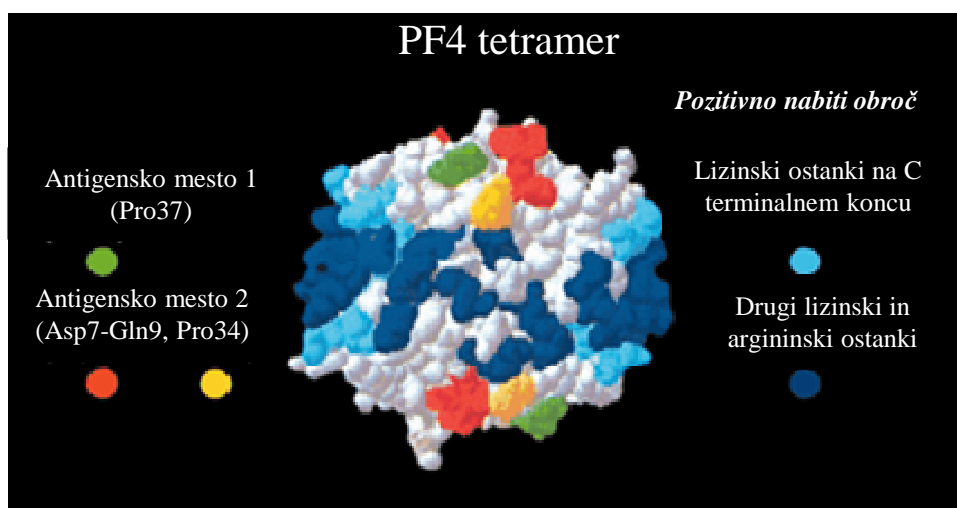
**Slika 1. Kemijska struktura heparina (2)**

Po svoji strukturi je heparin ena najbolj nenavadnih molekul, ki jih uporabljamo za zdravljenje. Izločajo ga bazofilci in mastociti iz svojih sekretornih granul, njegova fiziološka vloga pa je predvsem obramba pred mikroorganizmi, manj pa opravlja funkcijo antikoagulantna (3,4).

Heparin je zaradi enostavne uporabe, kratke razpolovne dobe in nizke cene še vedno nepogrešljivo zdravilo, ki ga izdelujejo iz mukoznih tkiv prašičev in goveda (5,6). Kot antikoagulantno zdravilo so ga poznali že pred 90 leti, vendar so šele po 40 letih uporabe opazili, da lahko ima tudi paradokсне učinke (5). Heparin in njegovi številni nizkomolekulski derivati preprečujejo strjevanje krvi in so učinkoviti pri preprečevanju globokih venskih tromboz in pljučnih embolij, ker inhibirajo delovanje faktorjev strjevanja krvi, serinskih proteaz XIa, Xa, IXa in IIa (trombin). Heparin se specifično veže na antitrombin III in do 1000-krat poveča njegovo aktivnost. Na tak način bistveno zavre nastajanje strdkov. Hkrati z vezavo na trombin heparin zavre tudi aktivacijo trombocitov (3,4). Za terapijo najpogosteje uporabljajo analoge heparina, še posebej njegove nizkomolekulske oblike, ki bolj kot na aktivnost antitrombina delujejo na aktivnost faktorja X. Tako bolj natančno urejajo strjevanje krvi (6).

## 1.2. TROMBOCITNI FAKTOR 4 (PF4)

Trombocitni faktor 4 (PF4) ima ključno vlogo pri nastanku HIT. To je majhna, pozitivno nabita tetramerna molekula, dolga 70 AK. Sestavljena je iz štirih podenot - enakih polipeptidnih verig, ki tvorijo tetramer, za katerega domnevajo, da je aktivna oblika molekule. Tetramerno strukturo stabilizirajo elektrostatske in vodikove vezi (7).



**Slika 2. Kristalna tridimenzionalna struktura PF4 (8)**

V tridimenzionalni strukturi molekule PF4 na Sliki 2 sta prikazana dva neoepitopa, ki tvorita pozitivno nabiti obroč. Prvi del je sestavljen iz lizinskih ostankov na C-terminalnem koncu PF4 (svetlo modro), drugi pa iz lizinskih in argininskih ostankov (temno modro). Za vezavo heparina pa sta poleg pozitivno nabitega obroča pomembni tudi dve antigenski mesti, in sicer antigensko mesto 1, ki je bogato s prolinom ter antigensko mesto 2, ki vsebuje asparagin, glutamin in prolin (7) (Slika 2).

PF4 je citokin, ki spada v skupino kemokinov CXC in je shranjen v  $\alpha$ -granulah trombocitov in v megakariocitih. Izloči se ob aktivaciji trombocitov in se veže na heparin in njemu podobne molekule. S tem ureja njihovo delovanje in preprečuje nenadzorovano širjenje antikoagulacije (1). PF4 zmanjšuje prevelik vpliv antitrombina, prav tako pa vpliva tudi na celjenje ran ter zmanjšuje vnetne reakcije na endoteliju (6). Veže se na trombocite, poleg tega pa tudi na endotelijske celice ter monocite (9,10). Heparin veže PF4 z visoko afiniteto. Ta vezava je odvisna od sestave, dolžine verige in stopnje sulfatiranja heparina. Koncentracija PF4 v plazmi je v mirovanju zelo nizka, vendar naraste, ko se sprosti v plazmo ob aktivaciji trombocitov ali po infuziji heparina (1).

### **1.3. S HEPARINOM IZZVANA TROMBOCITOPENIJA (HIT)**

S heparinom izzvana trombocitopenija (HIT) je klinično stanje oziroma imunsko dogajanje v organizmu, ki je posledica aplikacije heparina ali podobnih molekul. Prvič je HIT opisal Rhodes s sodelavci leta 1973 (1,11). Ločimo dve obliki. HIT tipa I je zmerna, neimunsko pogojena trombocitopenija, ki včasih spremlja zdravljenje s heparinom in ponavadi izzveni po 3 do 4 dneh. HIT tipa II pa je imunsko pogojena trombocitopenija, do katere pride zaradi tvorbe protiteles in predstavlja za bolnika resno stanje predvsem zaradi trombotičnih zapletov (1).

#### **1.3.1. HIT TIPA I**

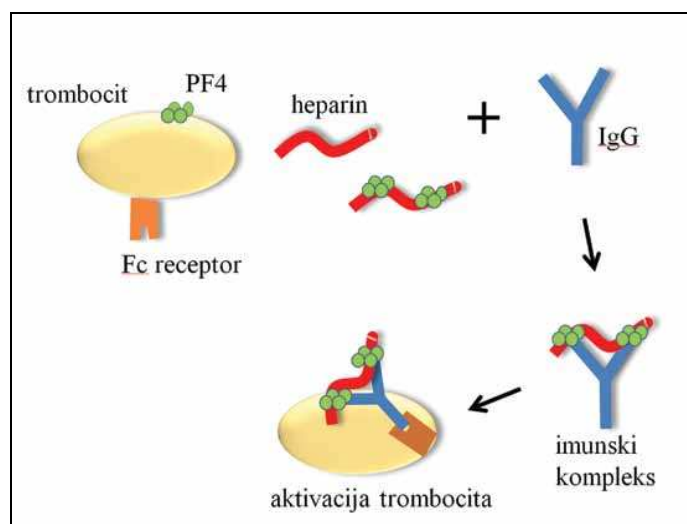
Za HIT tipa I je značilna zmerna trombocitopenija, nima pa kliničnih posledic in tudi ni imunsko pogojena. Verjetno gre pri tem za neposreden učinek heparina na aktivacijo trombocitov. Heparin se veže na trombocite in povzroči njihovo blago aktivacijo in tvorbo trombocitnih agregatov. Agregirani trombociti se nato razgradijo v retikuloendotelijskem sistemu. To lahko pojasni velik padec števila trombocitov, ki se pojavi v prvih štirih dneh po aplikaciji heparina. HIT tipa I običajno mine sama od sebe kljub nadaljevanju zdravljenja s heparinom (12). Pojavi se pri 10-30 % bolnikov s sepso, opekljami in žilnimi obolenji zaradi prisotnosti hiperaktivnih trombocitov pri teh stanjih. Število trombocitov redko pade pod 100 000/ $\mu$ L in se normalizira že po 1 do 2 dneh (12,13). Trombotičnih zapletov pri tej obliki HIT ni (12).

#### **1.3.2. HIT TIPA II**

HIT tipa II (v nadaljevanju HIT) je posledica preobčutljivostne reakcije imunskega sistema na heparin ali njemu podobne molekule (14). Pri tem nastanejo protitelesa proti kompleksu heparina z molekulami PF4, ki se sproščajo v okolico pri aktivaciji trombocitov (1,12,14). HIT nastane pri 1–5 % bolnikov, ki so prejeli heparin kot terapijo ali profilakso. Za HIT je značilno hitro znižanje števila trombocitov in njihov porast v nekaj dneh po ukinitvi heparina. Trombocitopenija se pojavi 5-15 dni po začetku zdravljenja, lahko pa tudi takoj po uvedbi heparina. Gre za resno, življenje ogrožajoče stanje, ki ga spremljajo arterijske in venske tromboze. Pri okoli 3–5 % bolnikov lahko HIT nastopi tudi nekaj dni po ukinitvi terapije s heparinom (zakasneni HIT) (15). Po 10. dnevu zdravljenja s heparinom se HIT pojavi redkeje (6).

### 1.3.2.1. Patofiziologija HIT

Kot smo že omenili, se v krvnem obtoku PF4 veže na heparin. Ko sta heparin in PF4 v optimalnem stehiometričnem razmerju, tvorita linearne večmolekulske komplekse heparin/PF4, ki predstavljajo neoantigene in lahko sprožijo imunski odziv (16). Nastanejo protitelesa anti-heparin/PF4, ki so imunoglobulini razredov IgG, IgM in IgA (17). Ob sproščanju PF4 iz  $\alpha$ -granul trombocitov nastaja vedno več kompleksov heparin/PF4, ki ostanejo vezani na njihovo površino, s čimer je omogočena vezava vedno večjega števila heparinskih protiteles. Protitelesa IgG se s svojim Fc delom skupaj s kompleksom heparin/PF4 vežejo na trombocite preko trombocitnega receptorja Fc $\gamma$ RIIa in jih aktivirajo. Vzpostavi se verižna reakcija, ki povzroči intenzivno aktivacijo trombocitov in tvorbo trombocitnih agregatov (1,5). Posledica aktivacije trombocitov je nadaljnje pospešeno sproščanje PF4 in protrombotičnih mikrodelcev, kar aktivira kaskadni koagulacijski sistem in pospeši nastajanje trombina (1). Razvoj HIT prikazuje Slika 3.



**Slika 3. Shematski prikaz razvoja HIT (6)**

Celotno dogajanje vodi v trombocitopenijo in trombotične zaplete, ki lahko povzročijo celo smrt bolnika. Heparinsko odvisna protitelesa, ki so v glavnem razreda IgG1, včasih pa tudi IgG3, se vežejo neposredno na mikrovaskularne endotelijske celice in jih aktivirajo (10,17). Vežejo se tudi na levkocite in monocite, kar verjetno pospeši celično sintezo in izražanje tkivnega faktorja (18). Posledica so okvare endotelija ter dodatno povečano tveganje za trombozo in diseminirano intravaskularno koagulacijo (DIK) (19).



### **1.3.2.2. Epidemiologija HIT**

Pojavnost HIT je močno odvisna od diagnoze bolnikov, njihovega kliničnega stanja in vrste uporabljenega heparina. Kirurški bolniki, ki prejemajo heparin, pogosteje razvijejo heparinsko odvisna protitelesa kot internistični bolniki, saj sta aktivacija trombocitov in posledično sproščanje PF4 iz  $\alpha$ -granul pogosti posledici operativnega posega (20). Nefrakcionirani ali standardni heparin (SH) pogosteje povzroča nastanek specifičnih protiteles kot nizkomolekulski heparin (NMH). Molekule NMH so namreč krajše od SH in imajo nižjo afiniteto do PF4, zato redkeje povzročijo nastanek protiteles (21). Tako NMH povzročajo do 10-krat manj primerov HIT (6). Znano pa je, da ima večina nastalih heparinsko odvisnih protiteles visoko navzkrižno reaktivnost tudi z NMH (4,17,19).

HIT lahko nastane tudi nenadno ob sepsi, brez predhodne izpostavljenosti heparinu. V takšnih primerih jo verjetno povzročijo že prej nastala heparinsko odvisna protitelesa razreda IgG, ki krožijo v krvnem obtoku. Avtorji namreč navajajo, da se trombocitni faktor PF4 lahko veže na različne bakterije, taki kompleksi pa povzročijo nastanek heparinsko odvisnih protiteles (22). Meyer in sod. opisujejo tudi primer prisotnosti protiteles razreda IgA pri bolniku s HIT, zato teh protiteles pri diagnostiki HIT ne smemo povsem izključiti (23).

Dejavnike tveganja, ki povzročijo HIT, lahko razdelimo v dve kategoriji: prva je povezana s heparinom, druga pa s številnimi spremenljivkami. V prvo kategorijo sodita vrsta heparina in trajanje njegovi izpostavljenosti, druga pa vsebuje spremenljivke kot so: starost, spol in vrsta bolnikov (24). Ob uporabi heparina pri operacijah srca kar 50–70 % bolnikov razvije heparinsko odvisna protitelesa, vendar pa se HIT pri njih klinično izrazi le v majhnem odstotku (1–3 %) (25). Najbolj ogroženi so bolniki po srčnih in ortopedskih operacijah (17).

### **1.3.2.3. Klinična slika in diagnostika HIT**

Diagnozo HIT postavimo na podlagi klinične slike in izsledkov laboratorijskih preiskav (15). Glavna klinična značilnost HIT je trombocitopenija s številom trombocitov pod  $150 \times 10^9/L$ , vendar le redko pod  $50-70 \times 10^9/L$ . Pojavi se pri 80–90 % bolnikov s HIT (17). Število trombocitov ponavadi pade za 50 % in več od izhodiščne vrednosti, po ukinitvi terapije s heparinom pa zopet naraste v 4-14 dneh. Če število trombocitov pade pod  $15 \times 10^9/L$ , je bolj verjetna kakšna druga diagnoza (17). Poleg trombocitopenije predstavljajo

pri HIT veliko težavo tudi venske in arterijske tromboze. Tveganje za nastanek tromboze pri bolnikih s HIT je kar 20 do 40-krat večje kot pri drugih bolnikih (26,27). Do 75 % bolnikov s HIT razvije arterijsko oziroma vensko trombozo ali obe (17). Venske tromboze so približno štirikrat pogostejše od arterijskih (5). Arterijski strdki lahko povzročijo kap, miokardni infarkt ali akutno ishemijo udov, venski pa trombozo globokih ven ali pljučno embolijo (25). Drugi pomembni zapleti so še nekrotične kožne spremembe na mestu dajanja heparina, sistemske reakcije po aplikaciji intravenskega odmerka heparina in pojav DIK (6,28).

V klinični sliki HIT je pomemben tudi časovni okvir pojavljanja trombocitopenije, ki ponavadi nastopi od 5 do 10 dni po začetku zdravljenja s heparinom (28,29). Stanje spremljata vročina in tresenje, nekateri bolniki pa razvijejo akutno respiratorno ali srčno disfunkcijo, ki se kaže kot hipertenzija, tahikardija, angina pectoris ali dispneja (14). Ponovna izpostavljenost heparinu po približno 100 dneh pa običajno ne povzroči HIT (12).

Postavitev diagnoze HIT je še posebej zahtevna pri kirurških bolnikih, ker se trombocitopenija pojavi in vztraja pri večini bolnikov tudi 72 ur po operaciji (25). Pri kliničnem stanju, kjer se pojavi nova tromboza med jemanjem heparina, kljub odsotnosti padca števila trombocitov, je potrebna še večja pozornost, saj je tudi v tem primeru možno, da je prišlo do HIT. Takrat je najpomembneje, da HIT prepoznamo in ukrepamo pred pojavom sekundarne tromboze (30).

Pri klinični oceni verjetnosti za HIT nam je v največjo pomoč točkovalnik 4T (angl. **t**hrombocytopenia, **t**iming, **t**rombosis, **a**bsence of other explanations). Ta točkovalni sistem so razvili z namenom zgodnjega odkrivanja HIT, upošteva in sešteva pa štiri glavne kazalce klinične oblike HIT: trombocitopenijo, čas pojava trombocitopenije po uporabi heparina, prisotnost tromboze ali drugih zapletov ter odsotnost drugih razlogov za trombocitopenijo (31). Seštevek 6 do 8 točk pomeni veliko verjetnost za nastanek HIT, 4 do 5 točk srednjo, 0 do 3 točk pa majhno verjetnost za HIT (Preglednica I). Ta sistem je široko uporaben v klinični praksi in ima zelo dobro negativno napovedno vrednost (32). Pri nizkem rezultatu (0 do 3 točke) lahko HIT izključimo z veliko verjetnostjo (97 %) (16,33).

## Preglednica I. Ocenjevanje verjetnosti za nastanek HIT–točkovačnik 4T (31)

<i>Točke</i> <i>Značilnosti</i>	<i>Predtestna verjetnost</i>		
	2	1	0
Trombocitopenija	> 50 % padec trombocitov ali št. trombocitov < 20 x 10 <sup>9</sup> /L	30-50 % padec št. trombocitov ali št. trombocitov 10-19 x 10 <sup>9</sup> /L	< 30 % padec ali št. trombocitov < 10 x 10 <sup>9</sup> /L
Pojav trombocitopenije	5-10 dni ali < ob predhodni izpostavljenosti heparinu (30 dni)	>10 dni ali < 1 dan ob nedavni izpostavljenosti heparinu (31-100 dni)	< 4 dni (brez predhodne izpostavljenosti heparinu)
Tromboza ali druge posledice	nove tromboze, kožne nekroze, akutna sistemska reakcija po intravenskem vbrizganju heparina	napredovanje ali ponovitve tromboze, eritematozne spremembe na koži, sum na trombozo	niso prisotni
Drugi vzroki za trombocitopenijo	niso prisotni	možni	prisotni

Pred nekaj leti so razvili še en sistem za klinično ocenitev verjetnosti HIT, in sicer točkovačnik HEP (angl. **HIT Expert Probability**), ki temelji na mnenjih 26 strokovnjakov s področja diagnostike HIT (34). Točkovanje v sistemu HEP temelji na osmih dejavnikih, ki so klinično pomembni. Vključuje obseg padca števila trombocitov (v odstotkih), njegov časovni interval po izpostavitvi heparinu, celotno število trombocitov, pojav tromboze, kožne nekroze in akutne sistemske reakcije, krvavitve ter prisotnost drugih vzrokov trombocitopenije. Ugotovili so, da se z njegovim upoštevanjem zmanjša uporaba alternativnih zdravil (neposrednih zaviralcev trombina) kar za 41 %. (32,34).

Postavitev diagnoze HIT je lahko precej zahtevna, saj imajo hudi bolniki različne dodatne potencialne vzroke za nastanek trombocitopenije. Več kot polovica bolnikov s HIT ima trombotične zaplete. Pri sumu na HIT je potrebno takoj prenehati z uporabo vseh vrst heparina ter heparinsko obdelanih katetrov in pripravkov ter obvezno spremeniti antikoagulantno zdravljenje. Alternativno zdravljenje predstavljajo zdravila, ki inhibirajo nastanek trombina. To so neposredni ali posredni zaviralci trombina (6,35). Neposredni zaviralci so npr. lepirudin, argatroban in bivalirudin, posredni zaviralci, ki zavirajo faktor Xa, pa npr. danaparoid in fondaparinux (6,15). Alternativna antikoagulantna terapija pomeni tudi večje tveganje za komplikacije kot so krvavitve, zato je pravočasna in zanesljiva diagnostika zelo pomembna (20). Večina avtorjev priporoča ukinitve terapije s

heparinom, ko je število zbranih točk s točkovalnikom 4T večje od 4 in že ob dokazu prisotnosti heparinsko odvisnih protiteles, še preden je opravljen potrditveni funkcijski test (28,32).

#### **1.4. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA HIT**

Diagnozo HIT postavljamo tako na podlagi kliničnih podatkov, kot tudi rezultatov različnih laboratorijskih preiskav. Laboratorijska diagnostika HIT temelji na dveh vrstah preiskav, ki se med seboj dopolnjujejo. Prve so serološke, s katerimi potrdimo prisotnost heparinsko odvisnih protiteles, druge pa funkcijske, s katerimi ocenimo dejansko sposobnost teh protiteles, da aktivirajo trombocite (6,15,36). Značilnosti obeh vrst preiskav prikazuje Preglednica II.

**Preglednica II. Značilnosti laboratorijskih preiskav pri sumu na HIT (20)**

<i>Laboratorijske preiskave</i>	<i>Značilnosti</i>
<b>Serološke preiskave</b> (ELISA, hitri testi)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• visoka občutljivost, toda nizka specifičnost, večinoma odkrivajo protitelesa razreda IgG, IgM, ali IgA, vendar so le protitelesa IgG patološka</li> <li>• višje mejne vrednosti optične gostote (OD) pri testu ELISA povečajo specifičnost testa</li> <li>• dolgotrajna izvedba</li> <li>• hitri testi so še v fazi preizkušanj</li> </ul>
<b>Funkcijske preiskave</b> (testi aktivacije trombocitov)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• visoka specifičnost</li> <li>• tehnično zahtevni testi, ki se izvajajo le v specializiranih laboratorijih</li> <li>• dolgotrajna izvedba</li> </ul>

Serološke preiskave so občutljive, a premalo specifične in z njihovo pomočjo ne moremo ločiti patoloških protiteles od nepatoloških (20). V zadnjem času so na tržišču že dostopni tako imenovani »hitri« imunski testi za dokazovanje heparinsko odvisnih protiteles, ki pa jih še preizkušajo. Funkcijske preiskave imajo višjo specifičnost, vendar pa je njihova izvedba zahtevnejša in omejena le na specializirane laboratorije (6). Tako rezultati seroloških kot funkcijskih preiskav postanejo po nekaj tednih ali mesecih negativni, saj heparinsko odvisna protitelesa ponavadi po 4 mesecih povsem izginejo iz krvnega obtoka (14).

V zadnjih nekaj letih je prišlo do velikih sprememb na področju diagnostike HIT. Največji klinični problem ni več neprepoznavanje, temveč diagnosticiranje in zdravljenje HIT v primerih, ko bolniki dejansko nimajo HIT, imajo pa pozitiven rezultat serološke preiskave (24,37). Včasih postavijo diagnozo HIT pri vsakem bolniku s pozitivnim rezultatom encimsko-immunskega testa za določanje HIT, ne da bi ob tem upoštevali nizko napovedno vrednost tega rezultata. Napake ob postavljanju diagnoze HIT so lahko naslednje: naročanje preiskav v primerih, ko je diagnoza malo verjetna, avtomatično naročilo ponovnega presejalnega testiranja, in najpomembnejše, nenaročanje enega izmed funkcijskih testov za potrditev HIT (38).

#### **1.4.1. SEROLOŠKE PREISKAVE ZA ODKRIVANJE HEPARINSKO ODVISNIH PROTITELES**

Serološke preiskave za odkrivanje heparinsko odvisnih protiteles so encimske (ELISA) in aglutinacijske. Danes so dostopni komercialni testi z umetnim antigenom heparin/PF4, ki jih je najlažje standardizirati, za njihovo izvedbo pa ne potrebujemo testnih trombocitov. Poznamo več vrst seroloških preiskav: encimsko-immunske, kot sta IgGAM ELISA in IgG-specifična ELISA PF4 enhanced (GTI Diagnostics, Inc., Waukesha, WI, USA), aglutinacijski test z mikrodenci v gelu PaGIA (Diamed, Cressier, Switzerland) in hitre teste, kot je npr. lateralna imunodifuzija LFI-HIT (Milenia Biotec, Giessen, Germany) (6,39-41).

##### **1.4.1.1. Encimsko-immunski test s čvrsto fazo (ELISA, angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

S tem testom odkrivamo prisotnost protiteles proti heparinu v serumu bolnika, pri katerem klinična slika kaže sum na HIT. Z večino testov ELISA odkrivamo protitelesa razredov IgG, IgM in IgA, čeprav so le protitelesa IgG sposobna aktivacije trombocitov preko svojih Fc $\gamma$ RIIa receptorjev. Z novejšimi komercialnimi testi ELISA tako določamo samo protitelesa razreda IgG, vendar pa tudi vsa protitelesa IgG ne povzročijo aktivacije trombocitov (20).

V mikrotitrski vdolbinici je vezan kompleks PF4 s heparinom ali polivinil sulfonatom (PVS), ki je heparinu podobna polimerna molekula. Ob dodatku bolnikovega seruma se heparinsko odvisna protitelesa vežejo na kompleks PF4/PVS, nato pa jih potrdimo s sekundarnimi protitelesi anti-IgG, -IgM in -IgA, označenimi z encimom. Po dodatku

kromogenega substrata s spektrofotometrom izmerimo spremembo barve in rezultat podamo v obliki izmerjene vrednosti optične gostote (OD). Za potrditev prisotnosti heparinsko odvisnih protiteles vzporedno izvedemo še potrditveni test, pri katerem testiranim vzorcem dodamo prebitek heparina in s tem kompetitivno inhibiramo njihovo vezavo na kompleks heparin/PF4 (6,43). Rezultat testa je pozitiven, če je vrednost OD večja od 0,4 in inhibicija pozitivne reakcije pri vzorcu s prebitkom heparina večja od 50 %, v primerjavi s pozitivno reakcijo vzorca brez dodanega heparina (15,42).

Slabost testa ELISA je, da zazna že nizek, klinično nepomemben titer protiteles. Rezultat je lahko pozitiven tudi pri bolnikih, ki klinično nimajo HIT, kar je še posebej pomembno za kirurške bolnike. To so lažno pozitivni rezultati, saj njihova protitelesa ne aktivirajo trombocitov (20). Negativen rezultat izključuje diagnozo HIT (40). Test ELISA je torej zelo občutljiv za določanje vseh razredov protiteles proti kompleksu heparin/PF4, vendar pa je slabo specifičen (17). Občutljivost testa je 97-100 %, specifičnost 46-86 % (43), napovedna vrednost pozitivnih rezultatov pa ne presega 90 % (4,6). Če uporabimo test ELISA, s katerim odkrivamo le protitelesa razreda IgG, lahko na ta način povečamo njeno specifičnost (44). Za potrditev diagnoze pa je poleg tega potrebno izvesti še funkcijski test (19).

#### **1.4.1.2. Aglutinacijski test z mikrodenci v gelu (PaGIA, angl. Particle-Gel Immunoassay)**

PaGIA se uporablja kot presejalni test, s katerim odkrivamo prisotnost heparinsko odvisnih protiteles in je hiter za izvedbo (30,45). V kolonah z gelom so nanešeni obarvani polimerni delci, na katere so vezani antigenski kompleksi heparin/PF4. Po dodatku preiskovanega seruma se morebitno prisotna protitelesa vežejo na kompleks heparin/PF4, polimerni delci v gelu pa aglutinirajo. Po centrifugiranju rezultate odčitamo vizualno (46,47). Tako kot ELISA, tudi aglutinacijski test ne prikaže sposobnosti protiteles za aktivacijo trombocitov (30). Kljub visoki negativni napovedni vrednosti pa se ta test v praksi redkeje uporablja.

#### **1.4.1.3. Lateralna imunodifuzijska metoda (LFI-HIT, angl. Lateral-Flow Immunoassay)**

LFI-HIT spada med hitre teste. Temelji na principu kapilarne reakcije, ki vzbudi tok testiranega vzorca vzdolž trdne faze (testni trak). Na testno ploščico naneseemo bolnikov serum in raztopino, ki vsebuje z ligandom (biotin) označen humani PF4 v kompleksu s

polianionom (PA). Med potovanjem po testnem traku označeni kompleks PF4/PA veže konjugat, ki ga predstavlja zlati nanodelec, prekrit z anti-ligandom. Če so v bolnikovem serumu prisotna protitelesa IgG, se vežejo na z biotinom označen kompleks PF4/PA. Sledi mobilizacija zlatih nanodelcev s pripetimi anti-biotinskimi protitelesi, s katerimi se vežejo na kompleks IgG-PF4/PA, ujet na imobilizirana kozja protitelesa, fiksirana na umetni membrani, ki specifično zadržijo oziroma vežejo imunski kompleks z IgG. Pozitivna reakcija je vidna kot intenzivno obarvana črta, kar lahko odčitamo vizualno ali kvantitativno s čitalcem. Če protitelesa niso prisotna, se črta ne pojavi. Prisotnost kontrolne črte nam kaže, da je bil test pravilno izveden (40,41). Rezultati so na voljo že po 30 minutah, metoda pa je zelo primerna za izključitev HIT. Prednost te metode je odkrivanje samo potencialno trombogenih protiteles razreda IgG, kar lahko zmanjša število lažno pozitivnih rezultatov in posledično prepoznavanje HIT v primerih, ko ta v resnici ni prisotna (41). Po podatkih proizvajalca (Diagnostica Stago) je občutljivost metode 100 %, specifičnost pa 93 % (48).

#### **1.4.2. FUNKCIJSKE PREISKAVE ZA POTRDIČEV S HEPARINOM IZZVANE TROMBOCITOPENIJE**

Funkcijske preiskave za potrditev HIT temeljijo na določanju sposobnosti protiteles bolnika, da po vezavi na kompleks heparin/PF4 aktivirajo in kasneje tudi agregirajo testne trombocite (6,20). Te preiskave so zahtevnejše od seroloških, trajajo dlje, za izvedbo pa potrebujemo sveže testne trombocite zdravih darovalcev. Obstaja več različic tovrstne preiskave, ki se med seboj razlikujejo po vrsti parametra, ki ga uporabimo za merjenje aktivacije trombocitov. Poznani funkcijski testi so: test sproščanja serotonina (SRA), test s heparinom povzročene agregacije trombocitov (HIPA) in določanje aktivacije trombocitov s pretočno citometrijo (20,21).

##### **1.4.2.1. Test sproščanja serotonina (SRA, angl. Serotonin Release Assay)**

Test sproščanja serotonina iz aktiviranih trombocitov je najstarejši funkcijski test. Temelji na označevanju testnih trombocitov z radioaktivnim <sup>14</sup>C-serotoninom, ki jim nato dodajamo bolnikovo plazmo in heparin v dveh različnih koncentracijah. Če so v bolnikovi plazmi prisotna heparinsko odvisna protitelesa, ta aktivirajo testne trombocite, kar zaznavamo kot sproščanje radioaktivnega serotonina v supernatant pri vzorcih, ki smo jim dodali heparin v nizki koncentraciji. Sproščeni serotonin izmerimo s števcem radioaktivnosti. Rezultat tega potrditvenega testa je pozitiven, če se v vzorcih z nizko

koncentracijo heparina sprosti vsaj 20 % serotonina več kot v tistih s prebitkom heparina (27,49,50). SRA velja v laboratorijski diagnostiki za »zlati standard«, saj so študije pokazale zelo visoko ujemanje njegovih rezultatov s klinično verjetnostjo za HIT (15,45).

Test SRA ima visoko specifičnost (89-100 %) in občutljivost (88-100 %), njegovi slabi lastnosti pa sta dolgotrajnost in uporaba radioaktivnih izotopov, kar zahteva zapletene laboratorijske postopke in kontrolirano okolje (29,39). Lažno pozitivne rezultate lahko povzroči kontaminacija s trombinom ali prisotnost protiteles, ki aktivirajo trombocite, vendar niso heparinsko odvisna (38). Zato moramo bolnikovo plazmo pred preiskavo toplotno inaktivirati, da uničimo ostanke trombina, potencialnega aktivatorja trombocitov.

#### **1.4.2.2. Test s heparinom povzročene agregacije trombocitov (HIPA, angl. Heparin Induced Platelet Aggregation)**

Test HIPA temelji na oceni vidne agregacije trombocitov v mikrotitrski plošči. Trombocite štirih zdravih darovalcev posamezno inkubiramo z bolnikovo plazmo in heparinom v terapevtski koncentraciji ter s heparinom v prebitku. Raztopina je na začetku motna, ker so trombociti razpršeni v tekočini in lomijo svetlobo. Med inkubacijo raztopino mešamo z magnetnim mešalom. Test je pozitiven, če postane raztopina s terapevtsko koncentracijo heparina prosojna pri vsaj dveh od štirih vdolbinic s trombociti darovalcev, medtem ko ostane suspenzija v vdolbinicah s prebitkom heparina motna. Prosojnost je znak, da so se trombociti aktivirali in agregirali, motnost pa pomeni, da so ostali neaktivirani in da prosto lebdi v suspenziji. Test ima podobno občutljivost in specifičnost kot test SRA (6,9).

#### **1.4.2.3. Določanje aktivacije trombocitov s pretočno citometrijo**

Pretočna citometrija je občutljiva metoda za analiziranje različnih celičnih populacij na osnovi njihovih morfoloških značilnosti ter izražanja specifičnih molekul. Temelji na vezavi specifičnih ligandov (najpogosteje protiteles), označenih s fluorokromi, na površinske ali znotrajcelične molekule.

Pri funkcijski preiskavi za potrditev HIT testnim trombocitom (trombociti zdravih darovalcev) ob dodatku preiskovanega seruma dodamo heparin v terapevtski koncentraciji, vzporedno pa še heparin v prebitku. Testne trombocite po inkubaciji označimo s protitelesi proti glikoproteinom, ki so značilni zanje (npr. anti-CD61). Na membranah aktiviranih trombocitov se spremeni izražanje številnih molekul. Povečata se npr. izražanje fosfatidil



serina ali pa P-selektina (CD62P) (20,51). Molekula CD62P je protein iz družine selektinov, ki se pri neaktiviranih trombocitih izraža na notranji strani membran  $\alpha$ -granul. Ob aktivaciji pride do degranulacije  $\alpha$ -granul, pri čemer se antigen CD62P izpostavi na površini trombocitov. Izpostavljene antigene na površini trombocitnih membran označimo s protitelesi anti-CD62P, na katere je vezan fluorokrom, jakost imunofluorescence pa izmerimo s pretočnim citometrom (6,9,39). Rezultat testa je pozitiven, kadar je izraženost CD62P v vzorcih s terapevtsko koncentracijo heparina vsaj za 50 % večja kot v tistih s prebitkom heparina. Na tem principu temelji test HIT »in-house«, ki ga obravnavamo v nalogi.

Kot označevalec aktiviranih trombocitov se pri testu HIT Alert namesto CD62P uporablja rekombinantni fosfolipid aneksin V, ki je izražen le na površinah aktiviranih trombocitov (6,52). Aktivacija trombocitov je povezana s translokacijo negativno nabitih fosfolipidov, v glavnem fosfatidilserina, iz notranje na zunanjo plast membrane, kar vodi v tvorbo prokoagulantne površine in je povezano z nastankom mikrodolcev. Izražanje fosfatidilserina lahko določimo s povečanjem vezave aneksina V, označenega s fluorokromom, ki se pripenja na negativno nabite fosfolipide. Poleg testiranega vzorca moramo uporabiti tudi dve negativni kontroli. Prva ne vsebuje heparina, s čimer izključimo neposredni vpliv plazme na trombocite in potrdimo odvisnost njihove aktivacije od heparina. Druga pa vsebuje visoko (presežno) koncentracijo heparina, da zavre imunsko odvisni mehanizem HIT in izključi možnost neposredne aktivacije trombocitov s prostim heparinom (nasičenje vseh vezavnih mest PF4 za heparin). Pozitivno kontrolo predstavlja vzorec, v katerem smo že določili prisotnost heparinsko odvisnih protiteles (52). Po podatkih iz literature je specifičnost testa s pretočno citometrijo 100 % in je primerljiva s testoma SRA in HIPA, občutljivost pa je 95 % (53).

### **1.4.3. NOVI DIAGNOSTIČNI TESTI ZA ODKRIVANJE HIT**

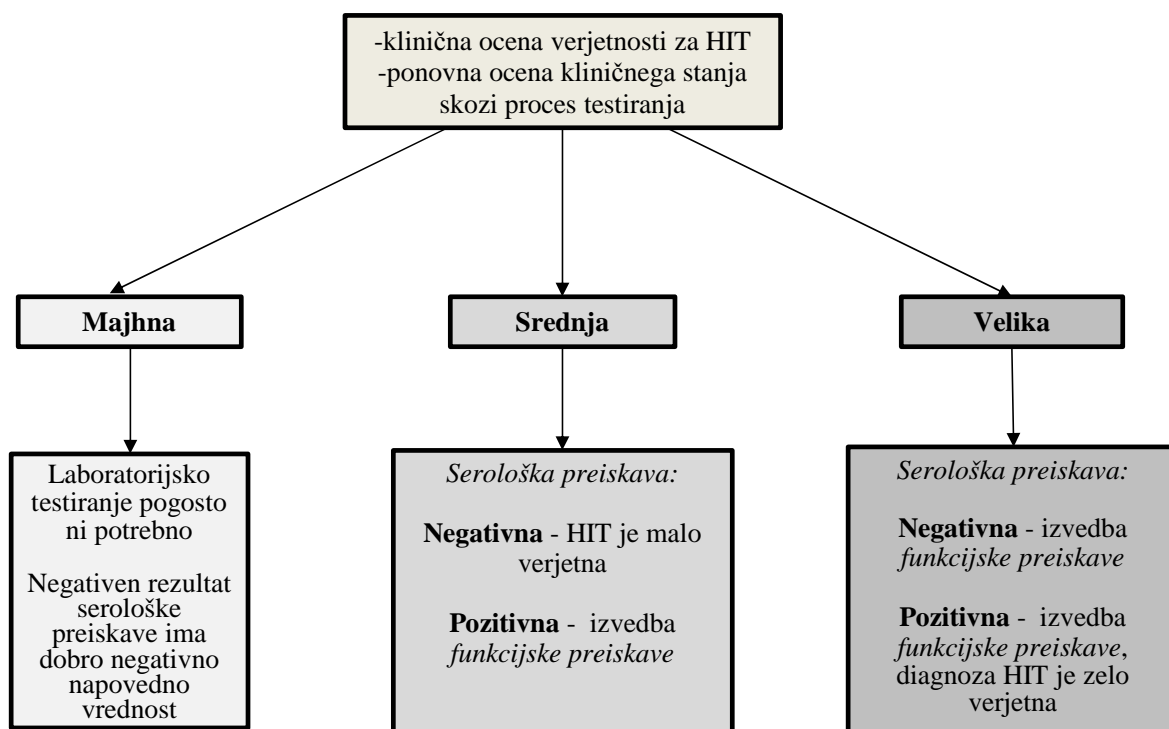
V novejši literaturi zasledimo nekaj novih diagnostičnih testov. Večina jih je še v fazi razvoja ali preizkušanj, nekateri pa so že validirani in tudi komercialno dostopni. To so predvsem hitri testi, saj je hitra in zanesljiva postavitev diagnoze zelo pomembna. Poleg serološke metode LFI-HIT so leta 2010 Legnani in sod. ovrednotili dva hitra, avtomatizirana, semikvantitativna kemiluminiscentna testa za odkrivanje heparinsko odvisnih protiteles razredov IgG, IgA in IgM. Testa sta pokazala visoko občutljivost in zanesljivost za izključevanje diagnoze HIT (54).

Funkcijski test, ki ga še preizkušajo, je test agregacije trombocitov iz polne krvi WBIA (whole blood impedance aggregometry). To je hiter, preprost in avtomatiziran test, ki ga izvajajo z analizatorjem za trombocite in temelji na merjenju spremembe prevodnosti med dvema paroma elektrod, ko se nanje vežejo aktivirani trombociti. Metoda ima primerljivo občutljivost s SRA (55,56).

Da bi izboljšali specifičnost laboratorijskega testiranja za odkrivanje HIT, so razvili nove diagnostične teste, kot sta inhibicijski test KKO-I ELISA in test DT40-luciferaza (57,58). V inhibicijskem testu ELISA so uporabili mišja monoklonska heparinsko odvisna protitelesa KKO, ki so imunoglobulini razreda IgG in pri miših povzročijo trombotično stanje s trombocitopenijo, podobno HIT. Protitelesa KKO so uporabili za ločevanje potencialno patogenih heparinsko odvisnih protiteles od nepatogenih (58). Test naj bi uporabljali v kombinaciji s testom DT40-luciferaza, s katerim merimo celično aktivacijo zaradi heparinsko odvisnih protiteles z uporabo celic DT40 (piščančji limfociti B), transficiranih s človeškim FcγRIIIa. Prednost te metode je, da namesto testnih trombocitov uporabljamo celično linijo, ki jo lahko hranimo zamrznjeno in po potrebi uporabimo za testiranje (57).

#### **1.4.4. PRISTOP K TESTIRANJU ZA POTRDITEV DIAGNOZE HIT**

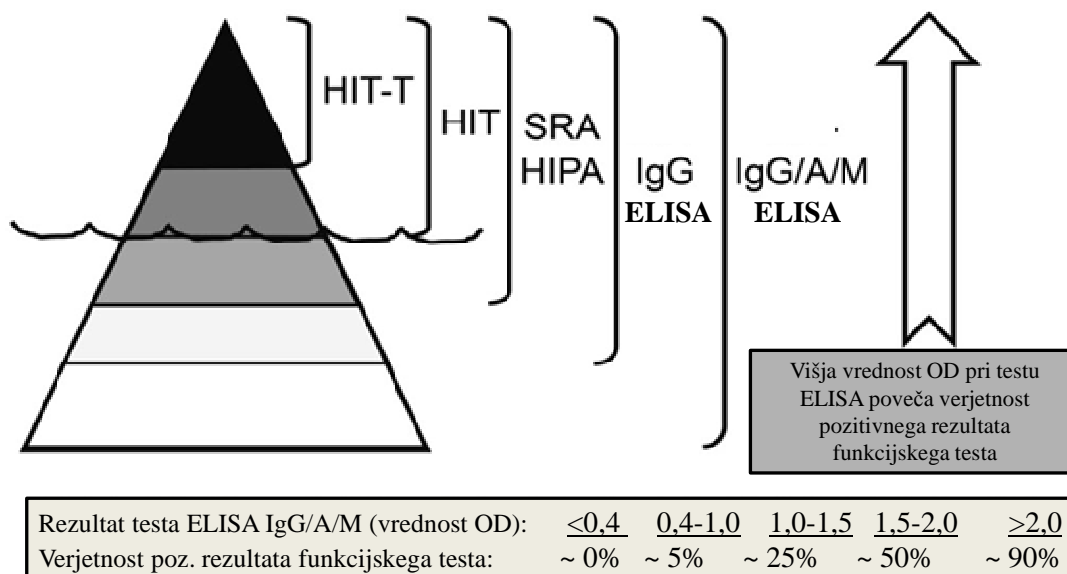
Večina pristopov k testiranju ob sumu na HIT izhaja iz klinične ocene verjetnosti za HIT oziroma iz točkovalnika 4T. Običajno je prvo testiranje za odkrivanje heparinsko odvisnih protiteles serološka preiskava (ELISA). Negativen rezultat testa ELISA v kombinaciji z majhno ali zmerno predtestno verjetnostjo po točkovalniku 4T ima dobro negativno napovedno vrednost, kar pomeni, da je verjetnost za HIT majhna. Bolnikom, ki imajo pozitiven rezultat testa ELISA in le zmerne klinične znake ter tistim z negativnim ali šibko pozitivnim rezultatom, pri katerih obstaja velika verjetnost za HIT, pa moramo opraviti tudi funkcijsko preiskavo. Primer diagnostičnega pristopa sta predstavila Smock in Rodgers, prikazuje pa ga Slika 4. Avtorja tega diagnostičnega algoritma priporočata laboratorijsko testiranje samo pri srednji in veliki klinični verjetnosti za HIT. Najprej moramo torej opraviti serološko preiskavo, pri njenem pozitivnem rezultatu in ob srednji verjetnosti pa sledi še funkcijska preiskava. Pri veliki verjetnosti za HIT svetujeta funkcijsko preiskavo, tako v primeru pozitivnega kot negativnega rezultata serološke preiskave (20).



**Slika 4. Diagnostični pristop ob sumu na HIT (20)**

Avtorja Cuker in Cines pa sta izdelala drugačen algoritem, kjer po oceni klinične verjetnosti in glede na rezultate seroloških in funkcijskih preiskav, določimo verjetnost za diagnozo HIT. V algoritmu je vključeno tudi svetovanje glede odločitve o zdravljenju s heparinom. Funkcijsko preiskavo priporočata pri pozitivnem rezultatu testa ELISA, in sicer pri vrednostih OD večjih od 0,4 in veliki klinični verjetnosti za HIT. Pri šibko pozitivnem rezultatu testa ELISA (OD 0,4–0,99) in srednji klinični verjetnosti diagnoza HIT ni verjetna in zato ni potrebno izvesti funkcijske preiskave. Pri posameznem bolniku se klinična verjetnost za HIT skozi čas lahko spremeni, zato je potrebno ponovno preverjanje stanja tistih bolnikov, pri katerih obstajajo nejasnosti v diagnostiki, prav tako pa tudi prilagajanje zdravljenja (24).

Število bolnikov, ki imajo prisotna heparinsko odvisna protitelesa daleč presega število tistih, ki imajo klinično izraženo HIT, kar lahko prikažemo z modelom ledene gore (17) (Slika 5). Model prikazuje značilnosti HIT v povezavi s preiskavami, ki jih uporabljamo v diagnostiki HIT. Heparinsko odvisna protitelesa najpogosteje odkrivamo s serološkim testom ELISA. Trombocite aktivira le določen delež teh protiteles, ki pa jih odkrijemo šele s funkcijskimi preiskavami. Rezultati so pozitivni z obema vrstama preiskav, kadar bolniki dejansko imajo HIT (27).



### Slika 5. Model ledene gore v diagnostiki HIT (38)

Klinično izražena HIT, ki vključuje HIT s trombozo (HIT-T) ali brez nje, predstavlja vrh ledene gore. Nad vodo je le 1/10 ledene gore, kar pomeni, da je le približno 10 % heparinsko odvisnih protiteles, ki jih odkrijemo pri določenem bolniku, sposobnih aktivacije trombocitov. Pri odkrivanju teh protiteles so največjega pomena funkcijske preiskave. Največji del ledene gore predstavlja subklinična HIT, pri kateri so prisotna heparinsko odvisna protitelesa, drugih kliničnih znakov pa ni. Ta protitelesa odkrivamo z visoko občutljivimi testi kot so SRA, HIPA, IgG-specifična ELISA in IgGAM ELISA. Med njimi imata najvišjo diagnostično specifičnost funkcijska testa SRA in HIPA, najnižjo pa IgGAM ELISA. Višja vrednost OD pri testu ELISA pomeni tudi večjo verjetnost za pozitiven rezultat funkcijskega testa SRA ali HIPA (38).

## 2. NAMEN DELA

S heparinom izzvana trombocitopenija je neželena reakcija, ki je povezana z zdravljenjem s heparinom. Stanje je lahko življenje ogrožajoče, zato je pomembna pravočasna postavitev diagnoze, kar pa ni enostavno. Strokovnjaki opisujejo različne modele diagnosticiranja HIT, prav tako pa v literaturi zasledimo uporabo različnih kombinacij laboratorijskih preiskav. Ne glede na to, se večina avtorjev strinja, da serološke preiskave za odkrivanje heparinsko odvisnih protiteles niso dovolj specifične in zato priporočajo, da v laboratorijsko diagnostiko HIT vključimo enega izmed funkcijskih testov za potrditev HIT.

Namen naloge je preizkusiti in primerjati dva različna funkcijska testa za potrditev HIT. Oba se izvajata s pretočnim citometrom. Prvi je test HIT »in-house«, s katerim analiziramo izražanje P-selektina na površini aktiviranih trombocitov, pri drugem pa uporabljamo komercialni sestav HIT Alert<sup>TM</sup>, ki temelji na določanju izraženosti fosfatidilserina na aktiviranih trombocitih. Rezultate bomo primerjali z izmerjenimi vrednostmi OD testa IgG-specifična ELISA. Na podlagi rezultatov in pregleda novejših strokovnih literatur bomo po potrebi spremenili že ustaljene postopke za laboratorijsko testiranje HIT.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. PREISKOVANA SKUPINA BOLNIKOV

V raziskavo smo vključili 47 bolnikov s sumom na HIT. Od teh je bilo 25 žensk in 22 moških, v starosti od 33 do 85 let. Povprečna starost bolnikov je bila 66 let. Vzorci njihove krvi so bili odvzeti na različnih klinikah oziroma oddelkih (Preglednica III). Pri bolnikih točkvalnika 4T nismo upoštevali, ker ga na klinikah v praksi žal večinoma ne uporabljajo.

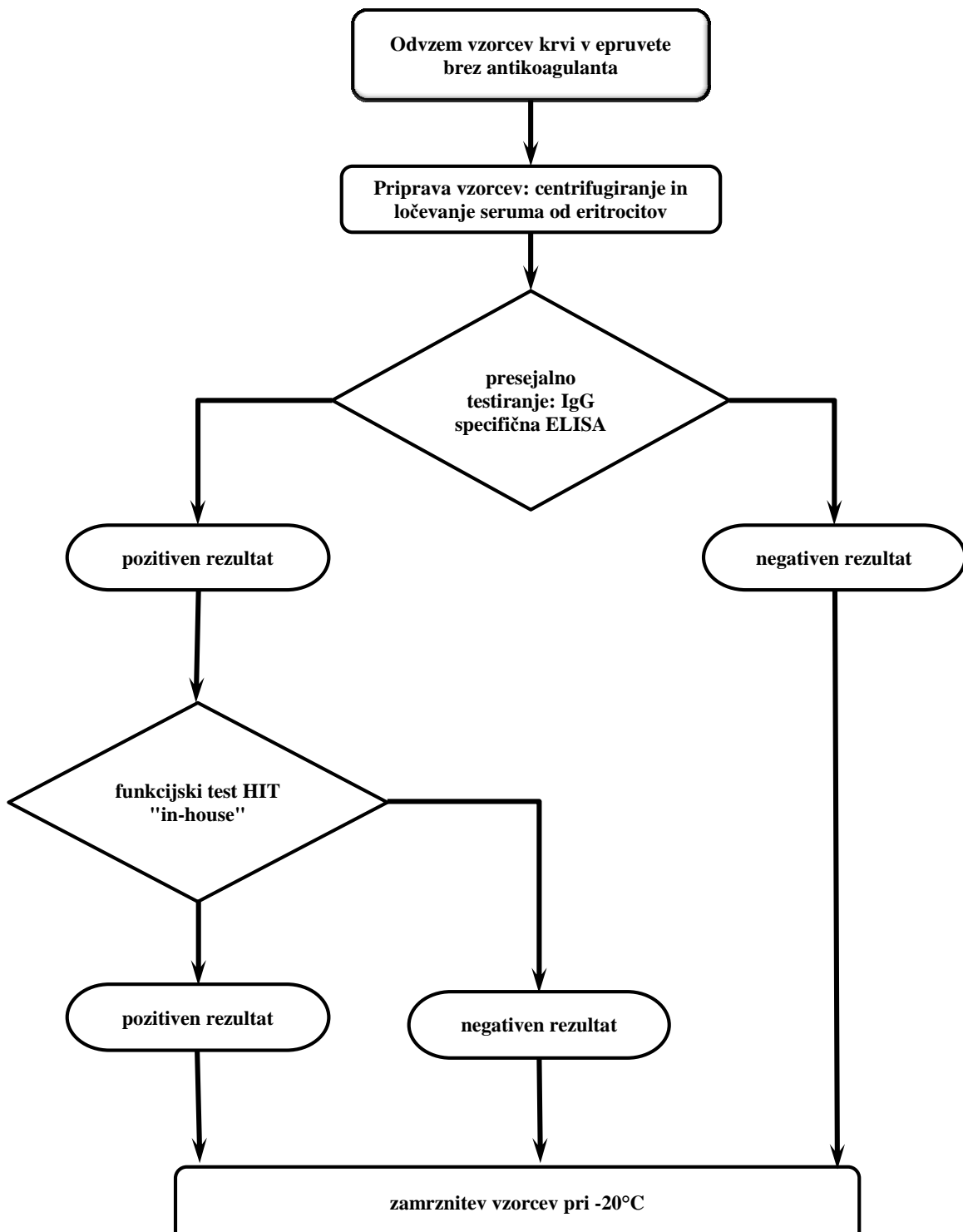
**Preglednica III. Klinike in oddelki ter število preiskovanih bolnikov**

<b>Klinika-oddelek</b>	<b>Število bolnikov</b>
UKC Ljubljana, Interna klinika, KO za žilne bolezni	6
UKC Ljubljana, Interna klinika, Center za bolezni srca in ožilja	6
UKC Ljubljana, Interna klinika, KO za intenzivno interno medicino	6
UKC Ljubljana, Klinika za kirurgijo srca in ožilja	4
Onkološki inštitut	4
UKC Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja	3
Splošna bolnišnica Celje	3
UKC Maribor, Oddelek za kardiologijo	2
UKC Maribor, Klinika za kirurgijo, Oddelek za anesteziologijo	2
Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za kardiologijo	2
UKC Maribor, Oddelek za interno intenzivno terapijo	1
UKC Maribor	1
UKC Ljubljana, Nefrološka klinika	1
Splošna bolnišnica Celje, Oddelek za intenzivno interno medicino	1
UKC Ljubljana, Travmatološka klinika	1
Splošna bolnišnica Slovenj Gradec, Enota za intenzivno interno medicino	1
Splošna bolnišnica Novo Mesto, Interni oddelek	1
Bolnišnica Golnik	1
Splošna bolnišnica Franca Derganca, Šempeter pri Novi Gorici	1

### **3.2. POTEK DELA**

Preiskave smo izvedli s 50 serumskimi vzorci 47 bolnikov. Najprej smo v okviru rutinskega testiranja v Laboratoriju za trombocitne in granulocitne preiskave Zavoda RS za transfuzijsko medicino izvedli presejalno testiranje s kvalitativnim encimsko-immunskim testom IgG-specifična ELISA PF4 enhanced (GTI Diagnostics, Inc., Waukesha, WI, USA), po navodilu proizvajalca. Test je bil pozitiven, če je bila izmerjena vrednost OD 0,4 ali več. Znotraj tega testiranja smo hkrati vedno izvedli tudi potrditveni test s prebitkom heparina (5000 i.e./mL). Inhibicija pozitivne reakcije z dodanim heparinom v obsegu 50 % ali več je pomenila potrditev prisotnosti heparinsko odvisnih protiteles.

Z vsemi 50 vzorci smo s pretočno citometrijo najprej izvedli funkcijski test HIT »in-house«, ki se uporablja za rutinsko diagnostiko HIT in je v pomoč zdravnikom na kliniki pri postavitvi diagnoze. Ostanke vzorcev smo po opravljenih preiskavah zamrznili in shranili pri -20°C. Nato smo jih odmrznili in izvedli še funkcijski test z novim reagenčnim sestavom HIT Alert™ Kit (IQ Products, Groningen, The Netherlands). Celoten postopek od odvzema vzorcev bolnikom do njihovega zbiranja za izvedbo testa HIT Alert prikazuje Slika 6.



Slika 6. Opravljene preiskave in pridobitev vzorcev za test HIT Alert



### **3.3. DOLOČANJE AKTIVACIJE TROMBOCITOV S PRETOČNO CITOMETRIJO**

#### **3.3.1. FUNKCIJSKI TEST HIT »IN-HOUSE«**

##### **3.3.1.1. Princip testa**

Funkcijski test HIT »in-house« temelji na določanju sposobnosti bolnikovih protiteles, da po vezavi na kompleks heparin/PF4 aktivirajo testne trombocite (trombociti zdravih darovalcev). Te po inkubaciji z bolnikovim serumom označimo s protitelesi proti glikoproteinu IIIa (CD61), ki ga izražajo vsi trombociti ter s protitelesi proti P-selektinu (CD62P), ki ga izražajo le aktivirani trombociti (6). Delež aktiviranih trombocitov določimo na podlagi degranulacije  $\alpha$ -granul, ki povzroči izražanje P-selektina na njihovih membranah, izmerimo pa ga z neposredno dvobarvno imunofluorescenco na pretočnem citometru. Za potrditev, da gre v resnici za od heparina izzvano aktivacijo trombocitov, izvedemo še vzporedni test, v katerem s prebitkom heparina v reakciji preprečimo aktivacijo trombocitov (5).

Delo je potekalo v naslednjih stopnjah:

- priprava vzorcev in reagentov
- pipetiranje na mikrotitrsko ploščo
- inkubacija
- dodatek protiteles (označevanje trombocitov)
- inkubacija
- analiza s pretočnim citometrom

##### **3.3.1.2. Reagenti in materiali**

###### **Reagenti:**

- s trombociti bogata plazma (PRP) iz vzorcev polne krvi štirih zdravih darovalcev s krvno skupino 0, odvzetih v epruvete z natrijevim citratom
- fosfatni pufer (PBS), pH: 7,2-7,4
- raztopina heparina za injekcije 25000 i.e./5mL (5000 i.e./mL), Krka
- raztopina heparina 1 : 1000; 1 $\mu$ L heparina (5000 i.e./mL) v 999  $\mu$ L PBS
- človeška monoklonska protitelesa anti-CD61, označena s fluorescenčnim barvilom fluorescein izotiocianat (FITC) (Becton Dickinson)

- človeška monoklonska protitelesa anti-CD62P, označena s fluorescenčnim barvilom fikoeritrin (PE) (Becton Dickinson)
- 1 % raztopina paraformaldehida (PFA)

#### **Materiali in aparature:**

- mikrotitrne plošče (96 vdolbinic, ravno dno)
- samolepilna folija
- centrifuga za epruvete
- Pasteurjeve pipete
- epruvete PVC, velikosti 12 x 75 mm
- epruvete za pretočni citometer (5 mL, Falcon, Becton Dickinson)
- nastavljive pipete z ustreznimi nastavki
- lateks rokavice za enkratno uporabo
- posoda za infektivne odpadke
- pretočni citometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson)
- računalniški program CellQuest Pro
- tiskalnik
- hladilnik in zamrzovalnik

#### **3.3.1.3. Vzorci**

Vzorci krvi bolnikov smo odvzeli v epruvete brez antikoagulantov, primerni pa so tudi vzorci, odvzeti z antikoagulantom natrijevim citratom. Funkcijski test smo izvedli s serumskimi vzorci. Z vsemi vzorci in reagenti smo ravnali kot s potencialno kužnim materialom.

#### **3.3.1.4. Postopek izvedbe funkcijskega testa HIT »in-house«**

##### **Priprava reagentov**

Vse vzorce in reagente smo pred uporabo ogreli na sobno temperaturo. Epruvete s krvjo darovalcev trombocitov smo označili z A, B, C in D in jih centrifugirali 5 minut pri 100g. Zgornjo plast suspenzije brez eritrocitov (PRP - testni trombociti) smo odpipetirali v nove, enako označene epruvete.

Reagente shranjujemo pri temperaturi od 2 do 8°C. Testni trombociti so uporabni do 24 ur, shranjujemo pa jih pri sobni temperaturi (22-25°C).

### **Postopek**

Skladno s pripravljenim načrtom smo označili vdolbinice na mikrotitrski plošči po pripravljenem načrtu in vanje odpipetirali testne trombocite, heparin in bolnikov serum, kot to prikazuje Preglednica IV. Za vsak vzorec potrebujemo 24 vdolbinic na mikrotitrski plošči (8 za bolnika, 8 za pozitivno in 8 za negativno kontrolo).

### **Preglednica IV. Reagenti in njihove količine, potrebne za izvedbo funkcijskega testa HIT »in-house«**

<b>TEST AKTIVACIJE</b>		<b>TEST INHIBICIJE</b>	
1.	13,4 µL trombocitov <b>A</b> + 1,6 µL heparina (iz R 1:1000) + 25 µL seruma	2.	13,4 µL trombocitov <b>A</b> + 1,6 µL heparina (iz R 5000 i.e./mL) + 25 µL seruma
3.	13,4 µL trombocitov <b>B</b> + 1,6 µL heparina (iz R 1:1000) + 25 µL seruma	4.	13,4 µL trombocitov <b>B</b> + 1,6 µL heparina (iz R 5000 i.e./mL) + 25 µL seruma
5.	13,4 µL trombocitov <b>C</b> + 1,6 µL heparina (iz R 1:1000) + 25 µL seruma	6.	13,4 µL trombocitov <b>C</b> + 1,6 µL heparina (iz R 5000 i.e./mL) + 25 µL seruma
7.	13,4 µL trombocitov <b>D</b> + 1,6 µL heparina (iz R 1:1000) + 25 µL seruma	8.	13,4 µL trombocitov <b>D</b> + 1,6 µL heparina (iz R 5000 i.e./mL) + 25 µL seruma

Za pozitivno kontrolo smo uporabili serum bolnika s klinično potrjeno HIT, za negativno kontrolo pa serum zdravega darovalca. Obe kontroli smo pripravili po istem postopku kot testirane vzorce bolnikov. Vzorce v mikrotitrski plošči smo premešali z rahlim nagibanjem in ploščo nato pokrili s samolepilno folijo. Mikrotitrsko ploščo z vzorci smo inkubirali 60 minut pri sobni temperaturi (22-25°C). Po inkubaciji smo trombocite označili s specifičnimi protitelesi:

- Po 10 µL vzorca iz vsake vdolbinice smo prenesli v označeno epruveto za pretočni citometer.
- V vsako epruveto smo dodali po 5 µL protiteles anti-CD61 in 5 µL protiteles anti-CD62.
- Epruvete smo inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi, v temi.
- V vsako epruveto smo dodali po 300 µL raztopine paraformaldehida (PFA).

Vzorci smo analizirali s pretočnim citometrom.

### **Interpretacija rezultatov**

Rezultat funkcijskega testa je pozitiven, kadar prebitek heparina v vzorcu zmanjša aktivacijo vsaj za 50 % (test inhibicije) v vsaj dveh od štirih uporabljenih vzorcev testnih trombocitov. Delež aktiviranih trombocitov (CD62P pozitivnih) odčitamo iz točkovnega diagrama glede na vse trombocite (populacija CD61 pozitivnih trombocitov). Značilne primere prikazuje Slika 8.

## **3.3.2. FUNKCIJSKI TEST HIT ALERT**

### **3.3.2.1. Princip testa**

HIT Alert™ je komercialni test za odkrivanje specifičnih protiteles proti heparinskim kompleksom, ki so sposobni aktivacije trombocitov in lahko povzročijo HIT. Za njegovo izvedbo uporabimo PRP zdravega darovalca, ki jo inkubiramo z bolnikovim serumom v prisotnosti oziroma odsotnosti heparina. Vzorec inkubiramo s protitelesi proti trombocitom, označenimi s PE in proti označevalcem aktivacije trombocitov (aneksin V), označenimi s FITC. Aneksin V se veže na fosfatidilserin na aktiviranih trombocitih. Če so prisotna heparinsko odvisna protitelesa, pride do aktivacije testnih trombocitov. Intenziteto fluorescence izmerimo s pretočnim citometrom (59).

Vzorci smo pripravili in analizirali po navodilih proizvajalca (IQ Products). Hkrati smo odmrznili po 3 do 4 vzorce, delo pa je potekalo v več stopnjah:

- odmrznitev vzorcev
- priprava PRP, reagentov in materiala
- pipetiranje vzorcev in reagentov na mikrotitrsko ploščo
- inkubacija
- dodatek protiteles (označevanje trombocitov)
- inkubacija
- analiza s pretočnim citometrom

### **3.3.2.2. Reagenti in materiali**

- s trombociti bogata plazma (PRP)
- reagenčni sestav HIT Alert™, ki vsebuje naslednje reagente (Preglednica V)

## Preglednica V. Reagenti, ki jih vsebuje reagenčni sestav HIT Alert™

Reagent A	pufer	5 mL
Reagent B	heparin (fiziološka koncentracija)	150 µL
Reagent C	aktivator trombocitov (Ca ionofor)	1 ampula
Reagent D	pufer za barvanje	20 mL
Reagent E	označevalec trombocitov: protitelesa anti-CD61	200 µL
Reagent F	označevalec aktiviranih trombocitov: protitelesa anti-aneksin V	200 µL
Reagent G	heparin (1000 enot/mL)	150 µL

Poleg reagenčnega sestava smo uporabili še naslednji material in aparature:

- epruveta z antikoagulantom (natrijev citrat)
- epruvete PVC, velikosti 12 x 75 mm
- Pasteurjeve pipete
- centrifuga
- 96 % etanol
- nastavljive pipete z ustreznimi nastavki
- mikrotitrne plošče
- samolepilna folija
- stresalec za mikrotitrne plošče
- epruvete, primerne za pretočni citometer, 5 mL
- pretočni citometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson)
- računalniški program CellQuest Pro (Becton Dickinson)
- tiskalnik
- hladilnik in zamrzovalnik

### 3.3.2.3. Vzorci

Za preiskavo z reagenčnim sestavom HIT Alert™ so primerni vzorci venske krvi, odvzeti v epruveto brez antikoagulanta ali zamrznjeni vzorci seruma, ki jih pred uporabo odmrzemo in centrifugiramo, da odstranimo agregate. Do obdelave lahko serumske vzorce hranimo pri sobni temperaturi do 12 ur. Za test HIT Alert smo uporabili odmrznjene vzorce seruma.

### **3.3.2.4. Postopek izvedbe funkcijskega testa HIT Alert**

#### **Priprava reagentov**

Reagenčni sestav smo pred uporabo vzeli iz hladilnika in pustili, da so se reagenti ogreli na sobno temperaturo. Neodprti reagenti so uporabni do označenega datuma uporabe. Shranjujemo jih pri temperaturi od 2 do 8°C.

Reagent C, ki ga potrebujemo za pozitivno kontrolo, smo raztopili v 200 µL 96 % etanola in vsebino epruvete dobro premešali. Po 20 minutah se je reagent popolnoma raztopil. Del te raztopine smo takoj uporabili za testiranje, ostanek pa zamrznili pri -20°C.

PRP smo pripravili iz vzorca venske krvi darovalca s krvno skupino 0, odvzete v epruveto z antikoagulantom natrijevim citratom. Epruveto smo narahlo premešali in nato centrifugirali 5 minut pri 100g z nizkim pospeševanjem in brez zavore. PRP smo odpipetirali v novo, prazno epruveto.

#### **Postopek**

Najprej smo odmrznili po 3 ali 4 vzorce serumov bolnikov. Za vsak vzorec smo uporabili po 5 vdolbinic na mikrotitrski plošči:

- I:** vzorec PRP s heparinom; za prikaz spontane aktivacije testnih trombocitov zaradi odvzema krvi in rokovanja z vzorcem,
- II:** vzorec PRP s Ca-ionoforom; za prikaz aktiviranih trombocitov,
- III:** vzorec PRP z bolnikovim serumom; za prikaz od heparina neodvisne aktivacije trombocitov,
- IV:** vzorec PRP z bolnikovim serumom in fiziološko koncentracijo heparina; s tem testom prikažemo aktivirane trombocite zaradi prisotnosti kompleksov heparin/PF4, ki vežejo heparinsko odvisna protitelesa,
- V:** vzorec PRP z bolnikovim serumom in prebitkom heparina (1000 enot/mL); za prikaz zmanjšane deleža aktiviranih trombocitov v primeru pozitivnega rezultata v vzorcu IV.

#### ***1. PIPETIRANJE VZORCEV IN REAGENTOV***

V vdolbinice mikrotitrške plošče smo odpipetirali vzorce in reagente skladno z načrtom za pipetiranje (Preglednica VI). Vzorce za analizo smo označili s številkami od I do V.

## Preglednica VI. Načrt za pipetiranje vzorcev in reagentov za test HIT Alert

Vzorci za analizo:	Reagent A	PRP	Vzorec bolnika	Reagent B	Reagent G	Reagent C
I	35 µL	10 µL	-	5 µL	-	-
II	35 µL	10 µL	-	-	-	5 µL
III	30 µL	10 µL	10 µL	-	-	-
IV	25 µL	10 µL	10 µL	5 µL	-	-
V	25 µL	10 µL	10 µL	-	5 µL	-

Mikrotitrsko ploščo z ustreznimi količinami vzorcev in reagentov smo eno uro inkubirali na stresalcu pri sobni temperaturi (20-25°C).

### 2. OZNAČEVANJE TROMBOCITOV

Za vsak vzorec smo si pripravili po 5 epruвет, primernih za pretočni citometer in jih označili z oznakami I, II, III, IV in V. Vanje smo dodali reagente D, E in F, tako kot prikazuje Preglednica VII.

## Preglednica VII. Načrt za pipetiranje vzorcev in reagentov za označevanje trombocitov s protitelesi

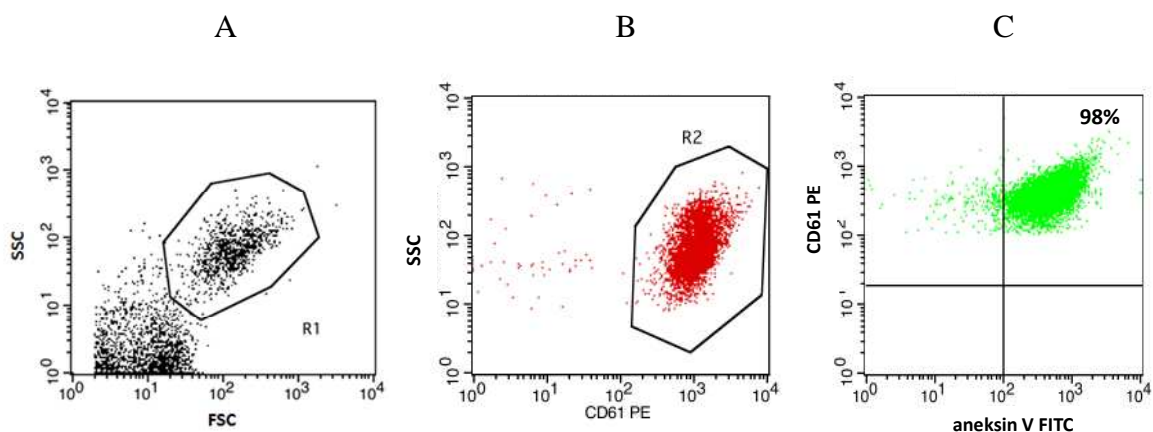
Epruveta	Vzorci za analizo (5 µL)	Reagent D	Reagent E	Reagent F
I	I	35 µL	5 µL	5 µL
II	II	35 µL	5 µL	5 µL
III	III	35 µL	5 µL	5 µL
IV	IV	35 µL	5 µL	5 µL
V	V	35 µL	5 µL	5 µL

Epruvete smo inkubirali 15 minut v temi pri sobni temperaturi. Po preteku inkubacije smo v vsako epruveto dodali po 400 µL reagenta D, s čimer smo trombocite pripravili za vrednotenje s pretočnim citometrom.

### 3. ANALIZA S PRETOČNIM CITOMETROM

Pred pričetkom analize smo morali najprej umeriti pretočni citometer. Za določitev območja merjenja smo sledili navodilom proizvajalca. Parameter sprednjega sipanja

svetlobe (Forward Scatter-FSC), ki meri sipanje v smeri laserskega žarka, poda informacijo o velikosti trombocitov. Parameter stranskega sipanja svetlobe (Side Scatter-SSC), ki meri sipanje svetlobe v pravokotni smeri glede na laserski žarek, pa nam daje informacijo o granuliranosti trombocitov. Na točkovnem diagramu FSC/SSC tako lahko vidimo različne populacije trombocitov glede na njihovo velikost in granuliranost (Slika 7).



**Slika 7. Točkovni diagrami populacije trombocitov**

Naredili smo tri točkovne diagrame: FSC/SSC z logaritemsko skalo za prikaz trombocitov, PE/SSC za prikaz trombocitov, označenih s protitelesi anti-CD61PE in točkovni diagram FITC/PE za prikaz aktiviranih trombocitov. Točkovni diagram A prikazuje trombocite glede na njihovo velikost in granuliranost. Točkovni diagram B predstavlja populacijo vseh trombocitov, ki so označeni s protitelesi proti CD61 in obarvani s PE (R2). Na točkovnem diagramu C pa je prikazana populacija aktiviranih trombocitov, ki so označeni z obema vrstama protiteles, anti-CD61PE in anti-aneksin V FITC.

Epruvete z vzorci smo namestili v pretočni citometer in izvedli meritve s pomočjo programa CellQuest Pro. Rezultate smo vrednotili na osnovi točkovnih diagramov, ki prikazujejo aktivirane trombocite v zgornjem desnem kvadrantu. Odstotek aktiviranih trombocitov smo izrazili kot odstotek od celotne populacije trombocitov. Za vsak vzorec bolnika smo izvedli po 5 meritev (vzorci, označeni od I do V).



### Interpretacija rezultatov

**Vzorec I:** Vseboval naj bi manj kot 1 % aktiviranih trombocitov. V kolikor je odstotek višji od 5 %, moramo analizo ponoviti.

**Vzorec II:** Vzorec vsebuje Ca-ionofor, zato je v njem več kot 80 % trombocitov aktiviranih (Slika 7, točkovna diagrama B in C).

**Vzorci III, IV in V:** Odstotek aktiviranih trombocitov odčitamo iz točkovnih diagramov in jih interpretiramo, kot to prikazuje Preglednica VIII. Vzorec IV (PRP s heparinom in bolnikovim serumom) mora imeti delež aktiviranih trombocitov večji ali enak 8 %, da je rezultat testa pozitiven. Če je odstotek aktiviranih testnih trombocitov v epruveh III in V manjši od 5 %, je rezultat negativen in bolnik nima HIT. Kadar pa je odstotek aktiviranih testnih trombocitov v vzorcih III in V  $\leq 50$  % aktiviranih trombocitov v vzorcu IV, je rezultat pozitiven in bolnik najverjetneje ima HIT (59,60).

#### **Preglednica VIII. Značilni pozitivni in negativni rezultati testa HIT Alert**

Vzorec	Negativen rezultat, HIT ni prisotna	Pozitiven rezultat, HIT je zelo verjetna
I	< 5 %	< 5 %
II	80–100 %	80–100 %
III	< 5 %	manj kot polovična vrednost aktivacije v vzorcu IV
IV	< 8 %	$\geq 8$ %
V	< 5 %	manj kot polovična vrednost aktivacije v vzorcu IV

Pri vrednotenju rezultatov obstajajo naslednje izjeme:

1. Bolnikov vzorec lahko že vsebuje komplekse heparina s protitelesi, ki so v njegovem krvnem obtoku. Delež aktiviranih trombocitov je večji ali enak 8 %, vendar ni značilne razlike med vzorcema III in IV. V vzorcu V zaznamo značilno nižji delež aktiviranih trombocitov (polovica ali manj kot v vzorcu IV). Aktivacija trombocitov je v tem primeru odvisna od heparina, tak rezultat pa je značilen za HIT.
2. Aktivacija ni odvisna od heparina: odstotek aktiviranih trombocitov v vzorcu IV je  $\geq 8$  %, vendar med vzorci III, IV in V ni značilnih razlik. Dodatek fizioloških ali

visokih koncentracij heparina ne vpliva na odstotek aktiviranih trombocitov; njihova aktivacija torej ni odvisna od heparina in je ponavadi enaka v vseh treh vzorcih.

#### **Omejitve testa HIT Alert**

- Oseba, ki analizira vzorce s pretočnim citometrom, mora biti za to usposobljena in mora znati interpretirati rezultate.
- Pretočni citometer mora biti redno vzdrževan in kalibriran.
- Test lahko da lažno pozitivne rezultate, če uporabimo PRP darovalca krvne skupine A, B ali AB, in sicer zaradi prisotnosti antigenov A oziroma B na trombocitih.
- Hemolitični, ikterični, lipemični ali bakterijsko onesnaženi vzorci lahko dajo napačne rezultate.
- Nezanosljive rezultate lahko dobimo pri bolnikih, ki imajo prisotne hladne aglutinine ali avtoprotitelesa.

## 4. REZULTATI

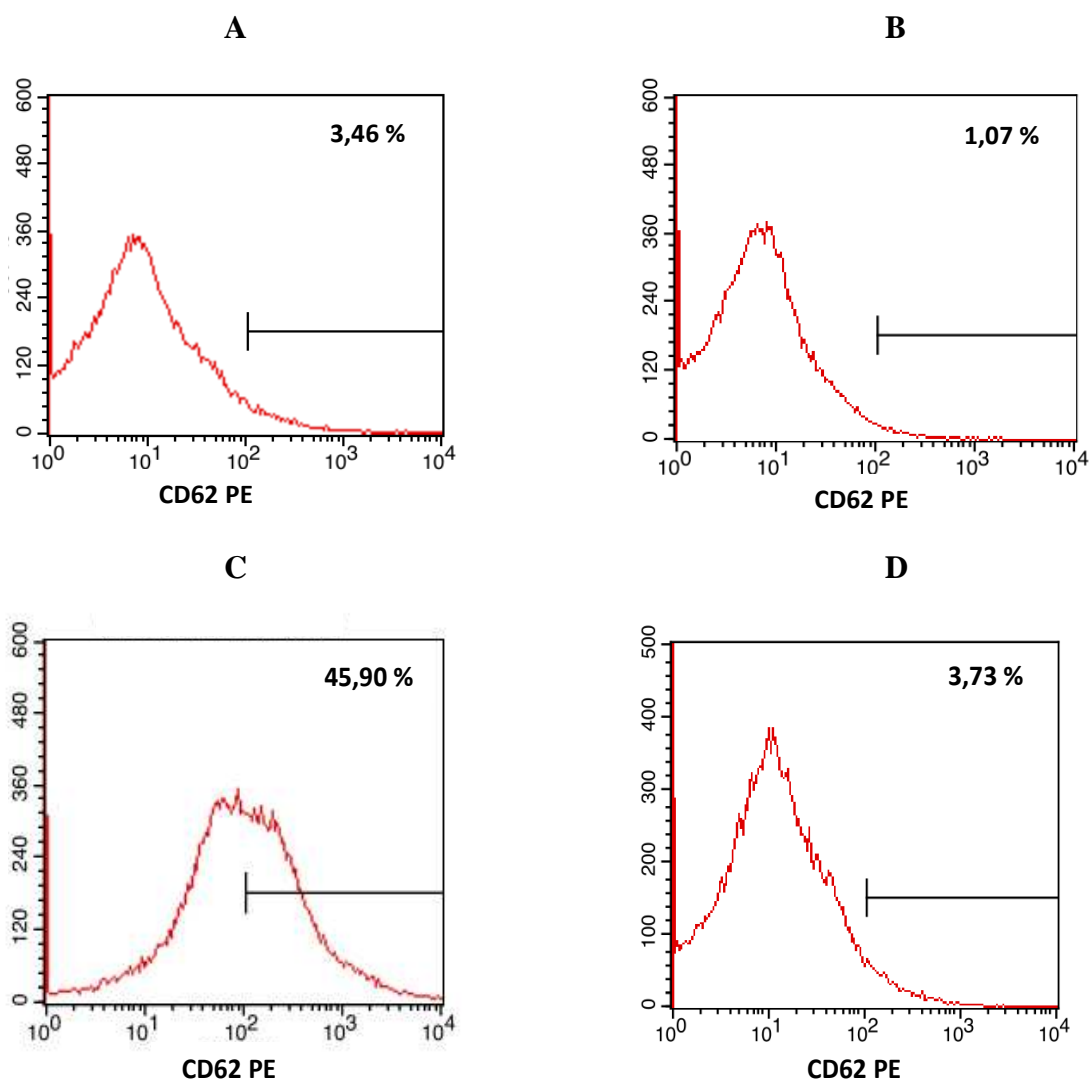
Pri 47 bolnikih s sumom na HIT smo ugotavljali prisotnost heparinsko odvisnih protiteles v 50 serumskih vzorcih in določili njihovo sposobnost aktivacije testnih trombocitov. Za vse vzorce smo pridobili tudi rezultate serološkega testa ELISA PF4 Enhanced, ki so jo kot del rutinskega testiranja izvedli v Laboratoriju za trombocitno in granulocitno serologijo Zavoda RS za transfuzijsko medicino. Rezultati (vrednosti OD) so zbrani v Preglednici IX. Ta prikazuje tudi izsledke potrditvenega testa, narejenega vzporedno z dodatkom prebitka heparina.

**Preglednica IX. Rezultati serološkega testa IgG-specifična ELISA**

Vzorec št.	OD (test brez heparina)	OD (test s prebitkom heparina)	Rezultat
1	0,47	0,06	+
2	0,07	0,06	-
3	0,88	0,40	+
4	1,55	0,35	+
5	3,19	0,05	+
6	2,13	0,06	+
7	0,40	0,24	+
8	1,44	0,10	+
9	0,96	0,17	+
10	1,73	0,05	+
11	0,58	0,08	+
12	1,35	0,08	+
13	0,88	0,08	+
14	0,60	0,09	+
15	0,56	0,04	+
16	2,39	0,08	+
17	0,04	0,04	-
18	0,13	0,11	-
19	0,08	0,08	-
20	1,19	0,08	+
21	1,19	0,06	+
22	0,44	0,08	+

23	0,42	0,06	+
24	1,01	0,11	+
25	1,40	0,08	+
26	0,48	0,05	+
27	2,84	0,06	+
28	0,60	0,11	+
29	0,40	0,05	+
30	1,42	0,06	+
31	2,10	0,06	+
32	2,13	0,08	+
33	1,34	0,14	+
34	0,06	0,06	-
35	0,06	0,05	-
36	2,35	0,14	+
37	0,05	0,05	-
38	2,73	0,04	+
39	2,96	0,05	+
40	0,06	0,05	-
41	2,85	0,07	+
42	1,99	0,07	+
43	0,86	0,24	+
44	0,95	0,10	+
45	2,40	0,16	+
46	0,50	0,05	+
47	1,07	0,09	+
48	2,33	0,08	+
49	3,14	0,17	+
50	0,53	0,11	+

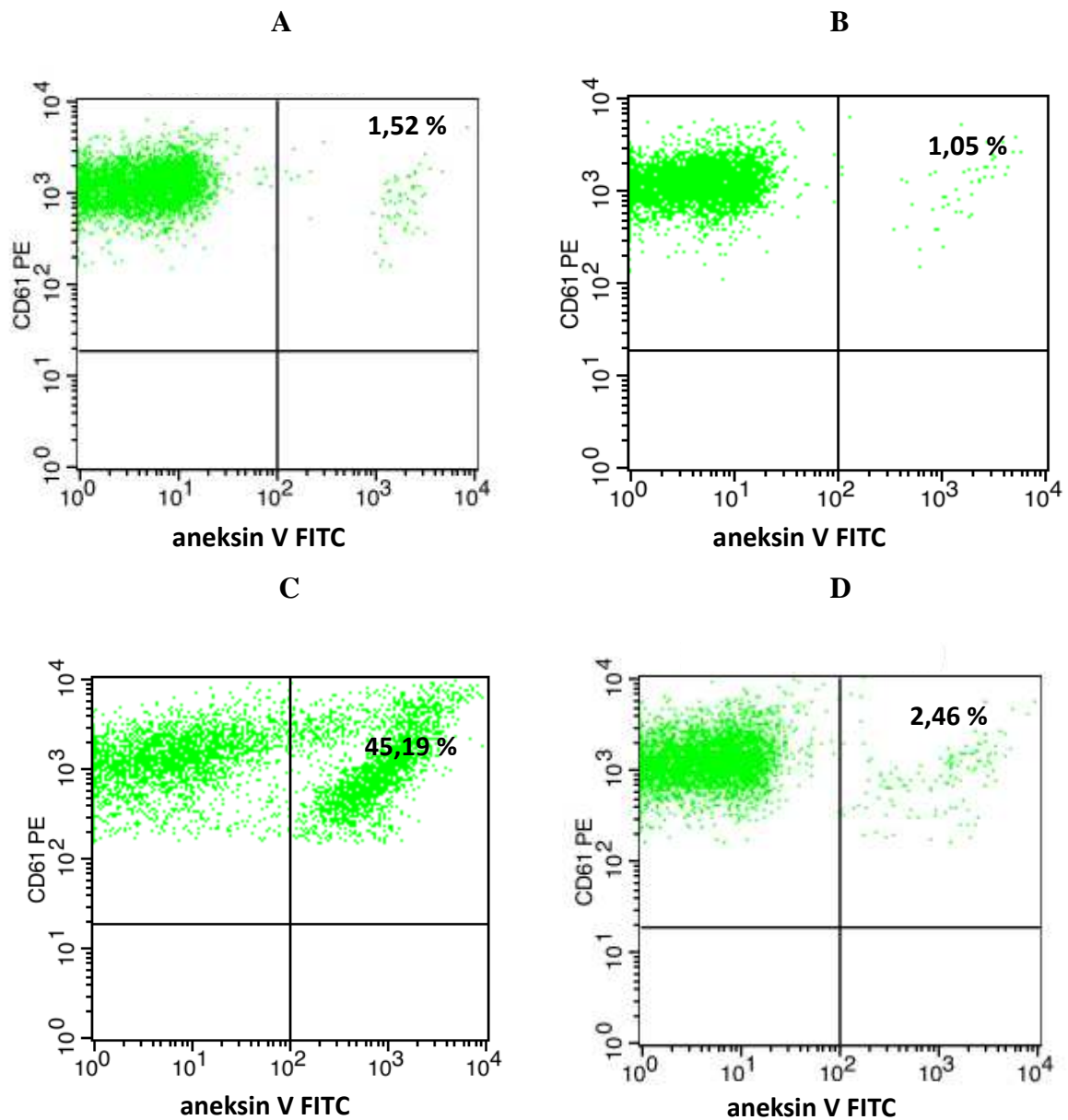
Nato smo z vsemi 50 serumskimi vzorci bolnikov opravili še funkcijska testa HIT »in house« in HIT Alert. Rezultate obeh testov smo natisnili v obliki histogramov oziroma točkovnih diagramov, ki smo jih izdelali s programom CellQuest Pro. Slika 8 prikazuje histograme z značilnimi negativnimi in pozitivnimi rezultati funkcijskega testa HIT »in house«, Slika 9 pa prikazuje točkovne diagrame z značilnimi negativnimi in pozitivnimi rezultati funkcijskega testa HIT Alert.



**Slika 8. Prikaz populacij aktiviranih trombocitov (test HIT »in-house«)**

Histograma **A** in **B** prikazujeta značilen negativen rezultat testa HIT »in-house«. Na histogramu **A** je prikazan delež aktiviranih trombocitov, ki so označeni s protitelesi anti-CD62 PE in znaša 3,46 %, na histogramu **B** pa delež 1,07 % aktiviranih trombocitov v prisotnosti seruma s prebitkom heparina. Delež aktiviranih trombocitov s serumom, ki ga uporabljamo kot negativno kontrolo, ob dodatku odmerka nizke in visoke koncentracije heparina, ne sme biti večji od 10 %.

Na histogramih **C** in **D** je prikazan značilen pozitiven rezultat testa HIT »in-house«. Aktivirani trombociti so označeni s protitelesi anti-CD62 PE. Histogram **C** prikazuje delež aktiviranih trombocitov, ki je 45,90 %, na histogramu **D** pa je njihov delež manjši, in sicer 3,73, kar pomeni, da je v prisotnosti prebitka heparina prišlo do inhibicije, kar potrjuje pozitiven rezultat testa (Slika 8).



**Slika 9. Prikaz populacij aktiviranih trombocitov (test HIT Alert)**

Točkovna diagrama **A** in **B** predstavljata tipičen negativen rezultat testa HIT Alert. Trombociti so označeni s protitelesi anti-CD61 PE in aneksin V FITC. V desnem zgornjem kvadrantu točkovnega diagrama **A** so prikazani aktivirani trombociti (1,52 % vseh trombocitov), točkovni diagram **B** prikazuje inhibicijo zaradi prebitka heparina (1,05 %). Točkovna diagrama **C** in **D** prikazujeta pozitiven rezultat testa HIT Alert. Na točkovnem diagramu **C** je prikazan delež aktiviranih trombocitov (45,19 %), točkovni diagram **D** pa prikazuje zmanjšan delež aktiviranih trombocitov (2,46 %), ker je prišlo do inhibicije reakcije zaradi dodatka prebitka heparina (Slika 9).

Rezultate, ki smo jih dobili na podlagi testiranja 50 vzorcev s serološkim testom IgG-specifična ELISA in dvema funkcijskima testoma, smo zbrali v Preglednici X in jih označili z znakoma + in - . 42 rezultatov je bilo pozitivnih s testom ELISA, od teh je bilo 24 pozitivnih s testom HIT "in house", 19 pa s testom HIT Alert. V 5 primerih (10 %) se rezultati funkcijskih testov niso ujemali (osenčena polja v Preglednici X), saj so bili pozitivni s testom HIT »in-house« in negativni s testom HIT Alert. Rezultate testa HIT Alert prikazujemo v Prilogi.

**Preglednica X. Primerjava rezultatov serološkega testa IgG-specifična ELISA z rezultati funkcijskih testov HIT "in house" in HIT Alert**

Vzorec št.	Rezultati testa IgG-specifična ELISA	Rezultati testa HIT "in house"	Rezultati testa HIT Alert
1	+	+	+
2	-	-	-
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	+	+	+
11	+	-	-
12	+	-	-
13	+	-	-
14	+	+	+
15	+	-	-
16	+	+	+
17	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	+	-	-
21	+	+	-
22	+	+	+
23	+	-	-
24	+	-	-
25	+	+	+

26	+	-	-
27	+	+	+
28	+	-	-
29	+	-	-
30	+	-	-
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	-	-	-
35	-	-	-
36	+	+	-
37	-	-	-
38	+	+	+
39	+	+	+
40	-	-	-
41	+	+	+
42	+	+	-
43	+	-	-
44	+	+	-
45	+	+	+
46	+	-	-
47	+	-	-
48	+	+	+
49	+	+	+
50	+	-	-

Rezultate izvedenih testov smo ovrednotili s parametri kot so diagnostična občutljivost in specifičnost ter pozitivna in negativna napovedna vrednost.

**Diagnostična občutljivost (O):** Diagnostična občutljivost preiskave je njena sposobnost, da odkrije bolnike z določeno boleznijo, torej da prikaže odstotek bolnih s patološkim rezultatom preiskave.

$$O = \frac{PP}{PP + LN}$$

PP: število pravilno pozitivnih rezultatov

LN: število lažno negativnih rezultatov



**Diagnostična specifičnost (S):** S tem parametrom merimo sposobnost preiskave, da izloči preiskovance brez določene bolezni. Prikaže nam odstotek zdravih z normalnim rezultatom preiskave.

$$S = \frac{PN}{PN + LP}$$

PN: število pravilno negativnih rezultatov

LP: število lažno pozitivnih rezultatov

**Pozitivna napovedna vrednost (PNV):** predstavlja delež pravilnih oziroma dejanskih patoloških rezultatov med vsemi patološkimi rezultati

$$PNV = \frac{PP}{PP + LP}$$

**Negativna napovedna vrednost (NNV):** predstavlja delež pravilnih oziroma dejanskih normalnih rezultatov med vsemi normalnimi rezultati

$$NNV = \frac{PN}{PN + LN}$$

V naši nalogi smo primerjali občutljivost in specifičnost testa HIT Alert z že uvedenim testom HIT »in-house«. Ker nismo imeli podatkov o bolezni (klinično izražena HIT), smo kot referenco upoštevali rezultate testa HIT »in-house« ter predpostavili, da so pravilno pozitivni rezultati (PP) tisti, ki so pozitivni z obema metodama, lažno pozitivni (LP) tisti, ki so pozitivni s testom HIT Alert in negativni s testom HIT »in-house«, lažno negativni (LN) tisti negativni s testom HIT Alert in pozitivni s testom HIT »in-house« ter pravilno negativni (PN) tisti, ki so negativni z obema testoma. Število posameznih vrst tako opredeljenih rezultatov prikazuje Preglednica XI.

**Preglednica XI. Prikaz števila PP, LP, PN in LN rezultatov testa HIT Alert v primerjavi s testom HIT »in-house«**

		HIT »in-house«			
		POZ		NEG	
HIT Alert	POZ	PP	<b>19</b>	LP	<b>0</b>
	NEG	LN	<b>5</b>	PN	<b>26</b>

Izračunani parametri testa HIT Alert v primerjavi s testom HIT »in-house« so:

O = 79 %

S = 100 %

PNV = 100 %

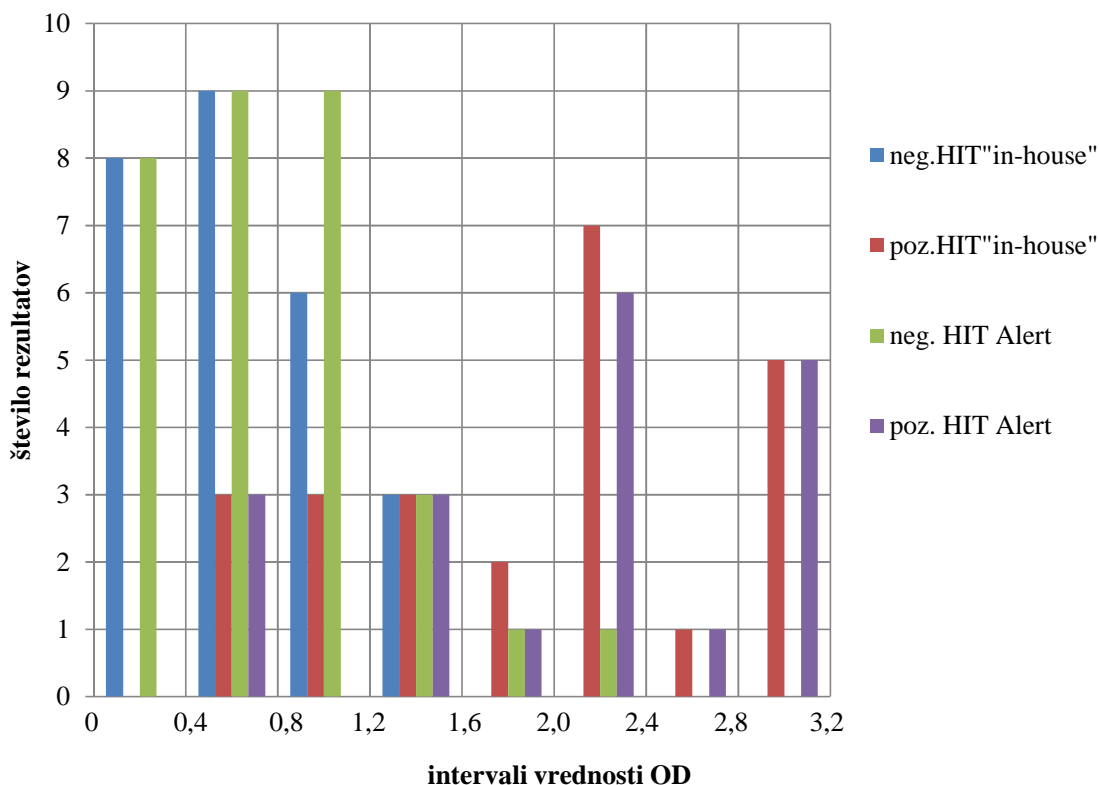
NNV = 84 %

Rezultate obeh funkcijskih testov smo primerjali tudi z vrednostmi OD, ki smo jih izmerili v testu IgG-specifična ELISA. Vrednosti OD smo uredili v intervale in glede na to razvrstili rezultate funkcijskih testov med pozitivne oziroma negativne. Preglednica XII prikazuje, kako so razporejeni negativni in pozitivni rezultati, ki smo jih dobili s funkcijskima testoma HIT »in-house« in HIT Alert, glede na OD vrednosti, izmerjene v testu IgG-specifična ELISA. Vrednosti OD smo razvrstili v intervale z razponi po 0,4. Pri vrednostih OD > 2,4 je število pozitivnih in negativnih rezultatov obeh primerjanih funkcijskih testov enako, prav tako v intervalu od 1,2 do 1,6. V ostalih intervalih so rezultati obeh testov razporejeni neenakomerno. Število negativnih rezultatov (pod mejno vrednostjo OD 0,4) je enako pri obeh testih.

**Preglednica XII. Rezultati funkcijskih testov HIT »in-house« in HIT Alert, razporejeni po intervalih vrednosti OD**

ELISA (OD)	HIT »in-house«		HIT Alert	
	pozitivni rezultati	negativni rezultati	pozitivni rezultati	negativni rezultati
2,8-3,2	.....	/	.....	/
2,4-2,8	.	/	.	/
2,0-2,4	.....	/	.....	.
1,6-2,0	..	/	.	.
1,2-1,6	...	...	...	...
0,8-1,2	...	.....	/	.....
0,4-0,8	...	.....	...	.....
< 0,4	/	.....	/	.....

Število posameznih rezultatov smo ponazorili tudi v obliki stolpčnega diagrama (Slika 10).

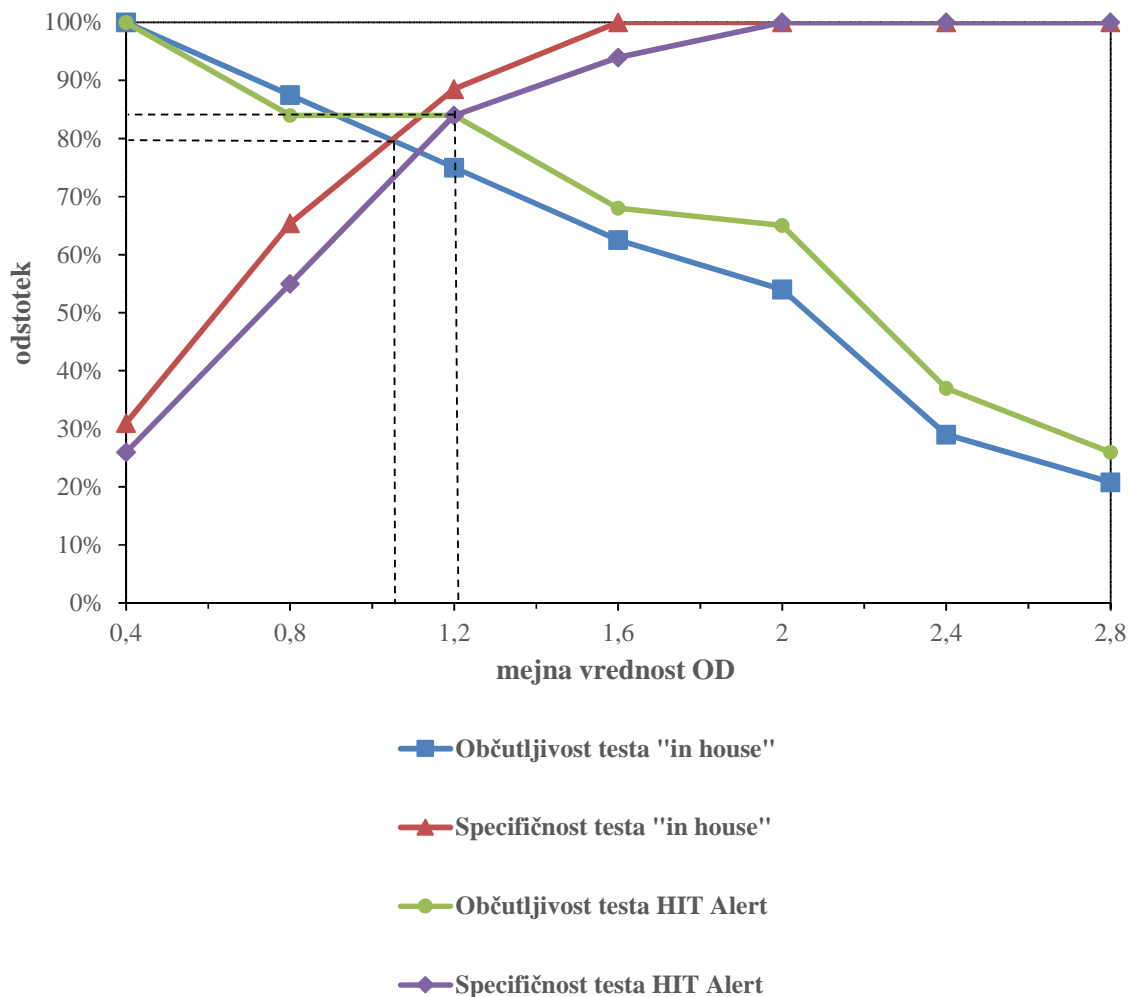


**Graf 1. Primerjava števila pozitivnih in negativnih rezultatov funkcijskih testov HIT »in-house« in HIT Alert v posameznih intervalih vrednosti OD**

Pri različnih mejnih vrednostih OD (od 0,4 do 2,8) smo nato izračunali še občutljivost in specifičnost testa IgG-specifična ELISA, v primerjavi s testoma HIT »in-house« in HIT Alert (Preglednica XIII) ter rezultate prikazali v obliki grafa (Graf 2).

**Preglednica XIII. Izračunana občutljivost in specifičnost testa IgG-specifična ELISA v primerjavi s testoma HIT »in-house« in HIT Alert**

Mejna vrednost OD	ELISA / HIT »in-house«		ELISA / HIT Alert	
	Občutljivost	Specifičnost	Občutljivost	Specifičnost
<b>0,4</b>	100 %	31 %	100 %	26 %
<b>0,8</b>	88 %	65 %	84 %	55 %
<b>1,2</b>	75 %	89 %	84 %	84 %
<b>1,6</b>	63 %	100 %	68 %	94 %
<b>2,0</b>	54 %	100 %	65 %	100 %
<b>2,4</b>	29 %	100 %	37 %	100 %
<b>2,8</b>	21 %	100 %	26 %	100 %



**Graf 2. Občutljivost in specifičnost testa IgG-specifična ELISA v primerjavi s testoma HIT »in-house« in HIT Alert**

Krivulje prikazujejo, kako ob naraščanju specifičnosti občutljivost testa IgG-specifična ELISA upada. V grafu sta označeni točki, kjer se sekata krivulji občutljivost/specifičnost testa ELISA v primerjavi s funkcijskima testoma. Najvišjo specifičnost pri najvišji občutljivosti testa ELISA (80 %), dobimo pri mejni vrednosti OD 1,05 v primerjavi s testom HIT »in-house«. Podobne vrednosti dobimo tudi v primerjavi s testom HIT Alert, in sicer je najvišja specifičnost pri najvišji občutljivosti 84 %, pri mejni vrednosti OD 1,2.

## 5. RAZPRAVA

S heparinom izzvana trombocitopenija (HIT) je redko in včasih težko prepoznavno stanje pri bolnikih, ki so bili zdravljeni s heparinom. S hitro diagnostiko in posledično pravilnim ukrepanjem se lahko izognemo hudim trombotičnim zapletom in usodnemu poteku bolezni. V zadnjem času je postala diagnostika HIT nekoliko lažja zaradi razvoja bolj specifičnih in občutljivih metod, napredek pri zdravljenju pa predstavljajo nova antikoagulantna zdravila.

Strokovnjaki priporočajo, da preiskavo za določanje prisotnosti heparinsko odvisnih protiteles opravimo vedno ob sumu zdravnika na HIT, običajno zaradi nepričakovane trombocitopenije ali tromboze pri tistih bolnikih, ki prejemajo ali so v zadnjem času prejeli heparin (60). Ob tem se zdravniki mnogokrat srečujejo s problemom prehitrega diagnosticiranja HIT, in sicer le na podlagi rezultatov seroloških preiskav, ne da bi pri tem opravili tudi enega izmed potrditvenih funkcijskih testov. Funkcijski test lahko potrdi diagnozo pri bolnikih s HIT, obenem pa zmanjša število tistih bolnikov, ki bi po nepotrebnem dobili alternativne antikoagulate zaradi lažno pozitivnih rezultatov seroloških preiskav (46). Heparinska terapija je namreč poceni in že dolgo poznana, medtem ko so alternativni antikoagulanti dragi in zahtevni za spremljanje, njihovi učinki pa še niso dovolj preizkušeni in raziskani. Tako v nekaterih primerih še vedno obstaja dilema, ali uporabljati heparin ali pa preiti na alternativni antikoagulant (40).

Idealna diagnostična preiskava bi morala imeti visoko občutljivost in specifičnost, biti hitra in tehnično preprosta za izvedbo ter cenovno dostopna. Da bi čim hitreje in s kar največjo zanesljivostjo prišli do pravilne diagnoze za HIT, so razvili in še razvijajo različne laboratorijske teste, a kljub temu diagnostika HIT ostaja problematična. Večina strokovnjakov priporoča izvedbo tako serološke kot tudi funkcijske preiskave, saj z njihovo kombinacijo dosežemo najboljšo občutljivost in specifičnost. Čeprav imajo serološke preiskave visoko občutljivost (> 90 %), pa je njihova specifičnost omejena z dejstvom, da z njimi odkrijemo heparinsko odvisna protitelesa tudi pri tistih bolnikih, pri katerih HIT klinično sploh ni izražena. Pozitivna napovedna vrednost teh preiskav pa variira med 10 in 93 %, odvisno od preiskovane populacije bolnikov. Ker pa je negativna

napovedna vrednost visoka (>95 %), lahko z njimi HIT z veliko verjetnostjo izključimo (28). Največja težava funkcijskih preiskav pa je, da jih težko standardiziramo (60).

Najbolj razširjena serološka preiskava je ELISA, s katero večinoma odkrivamo tako patogena kot nepatogena protitelesa razreda IgG ter nepatogena protitelesa razredov IgA ali IgM. Z negativnim rezultatom seroloških preiskav lahko HIT izključimo z veliko verjetnostjo, s pozitivnim rezultatom pa te diagnoze ne potrdimo. Občutljivost testa ELISA je višja od 90 %, avtorji pa navajajo specifičnost od 50 do 70 % (17,43). Ugotovili so, da je vrednost OD pri testu ELISA neposredno povezana s pozitivnim rezultatom funkcijskega testa, z rezultatom točkovalnika 4T in s tveganjem za trombozo. Prav tako poročajo, da pri uporabi različnih testov ELISA mejna vrednost OD, ki odraža prisotnost heparinsko odvisnih protiteles, variira med 1 in 1,4. (44). Specifičnost lahko izboljšamo z izvedbo testa IgG-specifična ELISA, saj protitelesa razreda IgG najpogosteje povzročijo HIT, vendar pa se s tem rahlo zmanjša občutljivost testa (44). Bakchoul in sod. so primerjali dva različna komercialna sestava za določanje heparinsko odvisnih protiteles z IgG-specifičnim testom ELISA in ugotovili, da dodatek potrditvenega koraka z uporabo visoke koncentracije heparina izboljša napovedno vrednost seroloških preiskav pri diagnostiki HIT (61). Kljub tem dejstvom pa naj bi bil močno pozitiven rezultat polispecifičnega testa ELISA veliko boljši napovednik HIT kot šibko pozitiven rezultat IgG-specifičnega testa (38).

Javela in sod. navajajo, da so izmerjene vrednosti OD večje pri bolnikih, ki že imajo potrjeno diagnozo HIT in tistih, ki so imeli trombotične zaplete. Oboje je pogostejše pri ženskah (44). Retrospektivne študije so pokazale, da je tveganje za trombozo večje pri bolnikih z višjim nivojem heparinsko odvisnih protiteles oziroma z vrednostmi OD, večjimi od 1,5 (28). V kolikor dvignemo mejno vrednost OD iz 0,4 na 1, lahko povečamo specifičnost testa iz 65 na 83 % (13). Naše rezultate, ki smo jih dobili s testom IgG-specifična ELISA, smo razvrstili glede na definirani kriterij proizvajalca, po katerem so vrednosti OD večje ali enake 0,4, pozitivne. Izračunana specifičnost testa ELISA glede na test HIT »in-house« je bila 31 %, občutljivost pa 100 %. Od 50 rezultatov smo s testom ELISA dobili 18 lažno pozitivnih v primerjavi s testom HIT »in-house« ter 23 lažno pozitivnih rezultatov v primerjavi s testom HIT Alert. Na podlagi primerjave testa IgG-specifična ELISA z omenjenima funkcijskima testoma pa smo ugotovili, da bi tudi mi lahko izboljšali specifičnost serološkega testa ELISA tako, da bi mejno vrednost OD

postavili višje. Pri mejni vrednosti 0,4 je namreč specifičnost zelo nizka (26 % v primerjavi s testom HIT Alert in 31 % v primerjavi s testom HIT »in-house«), pri OD 0,8 pa se poveča na 55 % oziroma 65 %, vendar se pri tem občutljivost zmanjša na 88 % oziroma 84%. Ker je v tem primeru občutljivost prenizka, menimo, da je kljub vsemu bolje obdržati mejno vrednost 0,4. Glede na odčitane vrednosti iz Grafa 2 pa opazimo, da dosežemo najvišjo občutljivost pri najvišji specifičnosti (80 %) pri vrednosti OD 1,05 v primerjavi s testom HIT »in-house« ter 84 % pri vrednosti OD 1,2 v primerjavi s testom HIT Alert. V poteku obeh krivulj ni značilnih razlik, kar kaže, da je test ELISA precej nespecifičen.

Po primerjavi klinične ocene in laboratorijskih preiskav za diagnosticiranje HIT avtorji ugotavljajo, da je najbolj zanesljiva kombinacija pozitivnega rezultata encimsko-immunskega testa in srednja ali visoka ocena verjetnosti po točkovaniku 4T. Sam test ELISA pa je kljub razširjeni uporabi le zmeren napovednik HIT (25,62). Uporaba točkovanika 4T za napoved verjetnosti klinično izražene HIT je lahko problematična pri velikem deležu bolnikov z drugimi sočasnimi stanji, kot so: okužbe, DIK, ITP, pri preoperativni hemodiluciji in pri zdravljenju z drugimi zdravili, saj je tudi v teh primerih lahko prisotna trombocitopenija. Točkovanik 4T ima visoko negativno napovedno vrednost, novi točkovanik HEP pa bolje korelira s klinično obliko HIT (33). Njegova uporaba je še posebej v pomoč pri izključevanju diagnoze HIT, saj majhno število točk pomeni manj kot 2 % verjetnost za pozitiven rezultat funkcijskega testa. Tudi če je verjetnost za HIT »velika«, pa ima le približno 50 % bolnikov pozitiven rezultat potrditvenega funkcijskega testa (34,38). Ker je bil točkovanik HEP preizkušen le v eni ustanovi na premajhnem številu vzorcev, bo potrebno še nadaljnje vrednotenje, da bo točkovanik lahko prešel v klinično uporabo (32,34).

Med funkcijskimi preiskavami je v ZDA in Avstraliji najbolj razširjena preiskava SRA, ki pa je dolgotrajna in kompleksna ter omejena le na specializirane laboratorije, njeni rezultati pa so na voljo šele po 3 do 4 dneh (24,42). Metodo odlikujeta visoka občutljivost in specifičnost, prav tako pa tudi zelo visoka napovedna vrednost pozitivnega rezultata (blizu 100 %) (29,38). Čeprav naj bi bila SRA najbolj zanesljiva metoda v laboratorijski diagnostiki HIT, pa moramo kljub temu upoštevati tudi klinične diagnostične kriterije (25). Tako kot SRA, je tudi HIPA precej bolj specifična kot serološke preiskave in uporabna za potrjevanje pozitivnih rezultatov testa ELISA. Test HIPA se uporablja predvsem v Evropi, je tehnično nezahtevna in razmeroma hitro izvedljiva preiskava in dobro korelira s SRA

(39,63). Njegova občutljivost je v referenčnih laboratorijih večja od 90 %, podatki za specifičnost pa variirajo od 77 do 100 % (28).

Analiza aktivacije testnih trombocitov s pretočno citometrijo je ena izmed sodobnih funkcijskih preiskav, ki se uporablja kot potrditveni test pri pozitivnih rezultatih seroloških preiskav. Metoda je kompleksna in zahteva usposobljeno osebje, ima pa visoko občutljivost in specifičnost. Ker ne obstaja absolutni standard za odkrivanje heparinsko odvisnih protiteles oziroma sposobnosti aktivacije testnih trombocitov, smo rezultate testa HIT Alert primerjali s testom HIT »in house«, ki je že vpeljan v našem laboratoriju in ga uporabljamo kot potrditveni test za vzorce, ki so pozitivni s testom IgG-specifična ELISA. Analizirali smo 50 serumskih vzorcev, odvzetih 47 bolnikom. Podatkov o kliničnem poteku HIT pri večini bolnikov nismo imeli na razpolago, saj na klinikah točkovačnika 4T pogosto ne uporabljajo, zato smo lahko med seboj primerjali le rezultate dveh funkcijskih testov. Pri našem delu smo sledili veljavnemu diagnostičnemu algoritmu za potrjevanje oziroma izključevanje HIT, po katerem najprej določimo prisotnost heparinsko odvisnih protiteles s presejalnim testom IgG-specifična ELISA, nato pa izvedemo še funkcijski test. Funkcijska testa HIT »in-house« in HIT Alert smo izvedli z vsemi 50 vzorci, med katerimi je bilo tudi 8 s testom IgG-specifična ELISA negativnih rezultatov. Te vzorce smo uporabili tudi za negativno kontrolo pri obeh funkcijskih testih. Po primerjavi omenjenih testov smo ugotovili, da se je ujemalo 90 % rezultatov, 10 % pa jih je bilo pozitivnih s testom HIT »in-house«, s testom HIT Alert pa negativnih. Vzrok za neujemanje rezultatov je morda tudi v uporabi trombocitov različnih darovalcev. Ker pri funkcijskem testu HIT »in-house« zaradi zanesljivosti uporabljamo trombocite štirih darovalcev, je to dejstvo najverjetneje njegova dodatna prednost. Do razlik je lahko prišlo tudi zaradi tega, ker so bili vzorci že stari, nekateri pa tudi večkrat odmrznjeni in ponovno zamrznjeni. Zato je bila sposobnost aktivacije testnih trombocitov lahko zmanjšana. Proizvajalec namreč priporoča uporabo seruma, ki je bil odmrznjen le enkrat.

Kot zagotavlja proizvajalec, je mejna vrednost 8 % aktivacije trombocitov pri testu HIT Alert najboljša za ločevanje pozitivnih rezultatov od negativnih. Pri tem je verjetnost, da s tem testom odkrijemo HIT (občutljivost) 78 %, specifičnost pa 98 % (59). Na podlagi krivulj ROC, ki so jih izdelali glede na točkovačnik 4T, so ugotovili, da lahko z uporabo reagenčnega sestava HIT Alert<sup>TM</sup> zanesljivo odkrijemo bolnike z veliko verjetnostjo za HIT, kar so opisali tudi Solano in sod. Primerjali so 4 metode, in sicer PaGIA, WBIA,



SRA in PC (test HIT Alert). Študijo so izvedli z vzorci 37 bolnikov s sumom na HIT. Glede na metodo SRA, ki so jo uporabili kot standardno, je primerjava pokazala, da lahko s pretočno citometrijo zelo izboljšamo specifičnost laboratorijske diagnostike HIT (tudi do 100 %), ne da bi se zmanjšala občutljivost, ki znaša 81 % (46). S primerjavo testa HIT Alert s testom HIT »in-house« smo ugotovili, da se specifičnost in občutljivost ujemata s podatki iz literature, saj smo pri testu HIT Alert dobili 100 % specifičnost in 79 % občutljivost. Še boljšo primerjavo pa bi imeli, če bi lahko pridobili klinično oceno verjetnosti za HIT in podatke o diagnozah obravnavanih bolnikov.

Naši izsledki so pokazali, da je tudi test HIT Alert primeren za laboratorijsko diagnostiko HIT, saj je primerljiv s testom HIT »in-house«, in sicer tako glede zahtevnosti izvedbe kot časa, ki ga za posamezni test potrebujemo. Da bi natančneje določili občutljivost in specifičnost novega testa, bi bilo potrebno naša testiranja ponoviti na večjem številu svežih serumskih vzorcev, pri čemer bi morali obvezno pridobiti podatke o kliničnem poteku bolezni (število točk po točkovalniku 4T). Če bi bili testni trombociti genotipizirani na polimorfizme trombocitnega receptorja FcγRIIa, bi s tem lahko še nekoliko povečali zanesljivost funkcijskih testov. Glede na ugotovitve, objavljene v strokovni literaturi in primerjave dveh funkcijskih testov za določanje sposobnosti aktivacije testnih trombocitov, je pri nas uveljavljeni postopek, ki vključuje izvedbo presejalnega testiranja (IgG-specifična ELISA) in funkcijski test HIT »in-house«, dovolj zanesljiv za diagnosticiranje HIT. Predlagamo pa še dosledno uporabo in izpolnjevanje točkovalnika 4T na klinikah. Ker je uveljavljeni funkcijski test HIT »in-house« zaradi uporabe trombocitov štirih darovalcev nekoliko zanesljivejši od testa HIT Alert, zamenjava testa v našem laboratoriju ni smiselna. Glede na dejstvo, da komercialni sestav HIT Alert™ zadostuje za izvedbo le 6 testov, se je izkazalo, da je test HIT »in-house« tudi cenejši. V kolikor bi tudi za test HIT Alert uporabili trombocite štirih darovalcev, bi to še povečalo razliko v ceni preiskave, narejenes primerjanima testoma. Vsa ta dejstva so vplivala na našo odločitev, da torej obdržimo ustaljeni funkcijski test HIT »in-house« kot potrditveni test za določanje HIT.

## 6. SKLEP

Našo nalogo zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- Oba testa, izvedena z metodo pretočne citometrije, HIT »in-house« in HIT Alert, sta primerna za določanje patogenosti heparinsko odvisnih protiteles.
- Čas, potreben za izvedbo testa HIT »in-house« je približno enak tistemu, ki ga potrebujemo za izvedbo testa HIT Alert.
- Pomanjkljivost testa HIT Alert je uporaba trombocitov (PRP) enega samega darovalca, medtem ko pri funkcijskem testu HIT »in-house« zaradi večje zanesljivosti uporabljamo trombocite štirih darovalcev. S tem zmanjšamo tudi možnost lažno negativnih rezultatov.
- En komercialni sestav HIT Alert<sup>TM</sup> zadostuje za preiskave za samo 6 bolnikov, kar pomeni, da je preiskava dražja, kot če bi jo izvedli s testom HIT »in-house«. Če bi ob tem uporabili trombocite štirih darovalcev, bi to še dodatno podražilo preiskavo.
- Glede na rezultate menimo, da menjava že vpeljanega testa HIT »in-house« s testom HIT Alert ni smiselna, saj se ta ni izkazal kot boljši.
- Za rutinsko diagnostiko HIT je še vedno najprimernejši ustaljeni postopek, pri katerem najprej izvedemo test IgG-specifična ELISA, ob njegovem pozitivnem rezultatu pa potrjevanje nadaljujemo s funkcijskim testom HIT »in-house«.

## 7. LITERATURA

1. Michelson AD. Platelets, Elsevier Science, 2007 Chapter 48 Heparin-Induced Thrombocytopenia, 861-86
2. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders, Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics. Edited by Gresele P, Page C, Fuster V, Vermynen J. Cambridge University Press; 2002
3. Bjork I, Lindahl U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. *Mol Cell Biochem* 1982;48: 161-82
4. Chuang YJ, Swanson R. Heparin enhances the specificity of antithrombin for thrombin and factor Xa independent of the reactive center loop sequence. Evidence for an exosite determinant of factor Xa specificity in heparin-activated antithrombin. *J Biol Chem* 2001;276:14961-71
5. Kelton JG, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective. *Blood* 2008;112: 2607-16
6. Maličev E, Dovč-Drnovšek T, Rožman P. Serološke in funkcijske preiskave pri diagnosticiranju trombocitopenije, povzročene s heparinom (HIT). *Zdrav Vestn* 2012; 81: 149-58
7. Zhang X, Chen L, Bancroft DP, Lai CK, Maione TE. Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry* 1994;33(27): 8361-6
8. Li ZQ, Liu W, Park KS, Sachais BS, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood* 2002;99(4): 1230-6
9. Schallfner A, Rhyn P, Schoedon G, Schaer DJ. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes-role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J Leukoc Biol.* 2005;78(1): 202
10. Blank M. et al. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. *International Immunology*; 14(2): 121-9

11. Warkentin TE. Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia – from purpura to thrombosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 891-3
12. Jaax ME, Greinacher A. Management of heparin-induced thrombocytopenia. *Expert Opin Pharmacother* 2012, 13(7): 987-1006
13. Sakr Y. Heparin-induced thrombocytopenia in the ICU: an overview. *Crit Care* 2011, 15(2): 211
14. Rožman P. Diagnostika trombocitopenije – trombocitne preiskave v nosečnosti <http://www.ztm.si/res/publication/974.pdf>
15. Kozak M, Dovč-Drnovšek T, Gmeiner-Stopar T. S heparinom povzročena trombocitopenija – HIT. *Zdrav Vestn* 2008;77: 239-45
16. Selleng K, Selleng S, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia in intensive care patients. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(5): 425-38
17. Lanzarotti S, Weigelt JA. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Surg Clin N Am* 92 (2012), 1559-72
18. de Maistre E, Gruel Y, Lasne D. Diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia. *Can J Anaesth* 2006; 53(6): 123-34
19. Šoštarič M, Geršak B, Preložnik-Zupan I. Srčna operacija pri bolniku s heparinom povzročeno trombocitopenijo. *Zdrav Vestn* 2008; 77: 247-53
20. Smock KJ, Rodgers GM. Heparin-induced thrombocytopenia. How lab results contribute to clinicopathologic diagnosis. *Clinical Laboratory News* 2009;35(5)
21. Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2003; 1(7): 1471–8
22. Olah Z, Kerenyi A, Kappelmayer J, Schlammadinger A, Razso K, Boda Z. Rapid-onset heparin-induced thrombocytopenia without previous heparin exposure. *Platelets* 2012;23(6): 495-8

23. Meyer O, Aslan T, Koster A, Kiesewetter H, Salama A. Report of a patient with heparin-induced thrombocytopenia type II associated with IgA antibodies only. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006; 12(3): 373-5
24. Cuker A, Cines DB. How I treat heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2012;119(10): 2209-18
25. Demma L, Levy JH. Diagnosing heparin-induced thrombocytopenia in cardiac surgical patients: not as easy as you think. *Anesth Analg* 2011;112(4): 747-9
26. Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126(3): 311S-37S
27. Warkentin TE. New Approaches to the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Chest* 2005;127(2):35S-45S
28. Arepally GM, Ortel TL. Heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 2006;355(8): 809-17
29. Ortel TL. Heparin-induced thrombocytopenia: when a low platelet count is a mandate for anticoagulation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009; 225-32
30. Hassell K. Heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management, *Thromb Res* 2008;123, Suppl 1, S16-21
31. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. 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): 759–65
32. Cuker A, Gimotty PA, Crowther MA, Warkentin TE. Predictive value of the 4T scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood* 2012, 120(20): 4160-7
33. Tan CW, Ward CM, Morel-Kopp MC. Evaluating heparin-induced thrombocytopenia: the old and the new. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(2): 135-43

34. Cuker A, Arepally G, Crowther MA, Rice L, Datko F, Hook K, Probert KJ, Kuter DJ, Ortel LT, Konkle BA, Cines DB. The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2642-50
35. Whitlatch NL, Kong DF, Metjian AD, Arepally GM, Ortel TL. Validation of the high-dose heparin confirmatory step for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia, *Blood* 2010;116(10): 1761-6
36. Brandt JT. Diagnosing heparin-induced thrombocytopenia. *CAP Today* 2000;14(5)
37. Cuker A. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) in 2011: An epidemic of overdiagnosis. *Thromb Haemost* 2011; 106: 993-4
38. Warkentin TE. How I diagnose and manage HIT. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 143-9
39. Denys B, Stove V, Philippe J, Devreese K. A clinical-laboratory approach contributing to a rapid and reliable diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis Research* 2008; 123, 137-45
40. Sachs UJ, Hesberg J, Santoso S, Bein G, Backhoul T. Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thromb Haemost* 2011;106(6): 1197-202
41. Kolde HJ, Dostatni R, Mauracher S. Rapid and simple IgG specific test for the exclusion of heparin induced thrombocytopenia (HIT). *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(12): 2065–8
42. Dellaria SM, Greilich PE, Sarode R. Urgent cardiac surgery in a patient with a remote history of heparin-induced thrombocytopenia: use of the anti-PF4/heparin ELISA confirmatory test. *Anesth Analg* 2008;107(2): 379-81
43. Shaheed G, Malkovska V, Mendoza J, Patel M, Rees J, Wesley, Merryman P, Horne M. PF4 ENHANCED assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in complex medical and surgical patients. *Crit Care Med* 2007; 35(7): 1691–5

44. Javela K, Kekomaki R, Koskinen S. Significance of quantitative measurement of heparin-induced platelet antibodies. *Eur J Haematol* 2010; 84(2): 169-74
45. Warkentin TE, Heddle NM. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep* 2003;2: 148-57
46. Solano C, Mutsando H, Self M, Morel-Kopp MC, Mollee P. Using HitAlert flow cytometry to detect heparin-induced thrombocytopenia antibodies in a tertiary care hospital. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2013; 24(4): 365-70
47. Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P. Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet* 1999; 354: 1525-6
48. Navodilo proizvajalca: STic Expert® HIT, Diagnostica Stago S.A.S., France
49. Prechel MM, Jeske WP, Walenga JM. Physiological changes in membrane-expressed platelet factor 4: Implications in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Res* 2010;125(4): e143-8
50. Greinacher A. Heparin-associated thrombocytopenia. *Biomed Progr* 1994; 7: 53–6
51. Gobbi G, Mirandola P, Tazzari PL, Talarico E, Caimi L, Martini G, Papa S, Conte R, Manzoli FA, Vitale M. New laboratory test in flow cytometry for the combined analysis of serologic and cellular parameters in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;58(1): 32–8
52. Poley S, Mempel W. Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test. *Eur J Haematol* 2001;66(4): 253-62
53. Tomer A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1997;98(3): 648-56
54. Legnani C, Cini M, Pili C, Boggian O, Frascaro M, Palareti G. Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2010;104(2): 402-9

55. Morel-Kopp MC, Aboud M, Tan CW, Kulathilake C, Ward C. Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Thromb Res* 2010; 125(5): e234-9
56. Morel-Kopp MC, Tan CW, Brighton TA, McRae S, Baker R, Tran H, Mollee P, Kershaw G, Joseph J, Ward C. Validation of whole blood impedance aggregometry as a new diagnostic tool for HIT: results of a large Australian study. *Thromb Haemost* 2012;107(3): 575-83
57. Cuker A, Rux AH, Hinds JL, Dela Cruz M, Yarovoi SV, Brown IA, Yang W, Konkle BA, Arepally GM, Watson SP, Cines DB, Sachais BS. Novel diagnostic assays for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2013;121(18): 3727-32
58. Sachais BS, Litvinov RI, V. Yarovoi SV, Rauova L, Hinds JL, Rux AH, Arepally GM, Poncz M, Cuker A, Weisel JW, Cines DB. Dynamic antibody-binding properties in the pathogenesis of HIT. *Blood* 2012;120(5): 1137-42
59. Navodilo proizvajalca: HIT Alert™ KIT, IQ Products, Groningen, The Netherlands
60. Warkentin TE, Sheppard JA. Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev* 2006;20(4): 259-72
61. Bakchoul T, Giptner A, Bein G, Santoso S, Sachs UJH. Performance characteristics of two commercially available IgG-specific immunoassays in the assessment of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). *Thrombosis Research* 127; 2011; 345-8
62. Demma LJ, Winkler AM, Levy JH. A Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia with Combined Clinical and Laboratory Methods in Cardiothoracic Surgical Intensive Care Unit Patients. *Anest Analg* 2011; 113:697-702
63. Meganathan K, Sarfraz A, Jawed F, Renu S. Diagnostic strategy in heparin induced thrombocytopenia. *East J Med* 2009;14: 78-83



## 8. PRILOGA

### Priloga: Rezultati funkcijskega testa HIT Alert

Vzorec št.	Dodatek fiziološke koncentracije heparina: <b>AKTIVACIJA (%)</b>	Dodatek prebitka heparina: <b>INHIBICIJA (%)</b>	Rezultat
1	25,53	2,88	+
2	5,85	6,59	-
3	3,25	2,98	-
4	9,97	5,07	+
5	43,85	6,40	+
6	41,74	13,39	+
7	2,72	2,18	-
8	5,04	3,47	-
9	2,86	1,97	-
10	9,15	2,86	+
11	3,30	3,35	-
12	4,15	5,30	-
13	3,60	3,35	-
14	12,85	4,26	+
15	4,14	3,77	-
16	27,00	2,36	+
17	3,69	3,35	-
18	2,88	3,48	-
19	2,40	1,97	-
20	6,86	2,49	-
21	4,66	2,49	-
22	8,41	8,00	+
23	3,74	3,53	-
24	5,06	3,50	-
25	12,27	9,45	+
26	10,87*	7,91	-
27	20,37	2,87	+
28	3,56	2,55	-
29	7,72	4,45	-
30	5,64	4,46	-
31	15,80	5,56	+
32	88,75	7,33	+
33	43,83	3,65	+

34	2,89	2,61	-
35	2,17	2,04	-
36	4,27	3,20	-
37	1,77	2,28	-
38	91,33	7,95	+
39	95,86	1,62	+
40	5,63	3,31	-
41	95,50	41,26	+
42	2,62	1,74	-
43	2,71	1,28	-
44	2,04	2,07	-
45	18,34	1,30	+
46	3,72	2,57	-
47	1,25	0,73	-
48	83,60	2,59	+
49	31,70	1,58	+
50	1,33	0,94	-

\* od heparina neodvisna aktivacija, bolnik nima heparinsko odvisnih protiteles