doi: 10.48095/cctahd2022prolekare.cz11

Současné možnosti laboratorní diagnostiky heparinem indukované trombocytopenie v České republice

Heparin-induced thrombocytopenia – current options of laboratory diagnostics in the Czech Republic

Sadílek P., Fátorová I., Dulíček P.

IV. interní hematologická klinika FN Hradec Králové

SOUHRN: Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je závažná komplikace léčby heparinem. Je způsobena protilátkami třídy IgG namířenými proti komplexu destičkový faktor 4 (PF4)/heparin a dochází zde k silné aktivaci krevních destiček. I přes antikoagulační léčbu a trombocytopenii je zde vysoké riziko rozvoje žilní i arteriální trombózy. Diagnostika HIT vyžaduje jak průkaz klinických symptomů, tak laboratorní potvrzení patogenních protilátek. Laboratorní testy k diagnostice HIT rozdělujeme do dvou skupin, a to na imunologické a funkční. Imunologické (antigenní) testy slouží k detekci protilátek namířených proti komplexu PF4/heparin. Funkční testy jsou založeny na vlastnosti protilátek aktivovat v přítomnosti heparinu dárcovské krevní destičky. Cílem tohoto článku je vytvořit stručný přehled laboratorních testů k diagnostice HIT dostupných v ČR.

Klíčová slova: heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) – laboratorní diagnostika HIT – imunologické testy – funkční testy

SUMMARY: Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a serious complication of heparin treatment. It is caused by IgG class antibodies directed against the platelet factor 4 (PF4)/heparin complex with subsequent strong platelet activation. Despite anticoagulant therapy and thrombocytopenia, there is a high risk of venous and arterial thrombosis. Diagnosis of HIT requires both evidence of clinical symptoms and laboratory confirmation of pathogenic antibodies. We divide laboratory tests for the diagnosis of HIT into two groups, immunological and functional. Immunological (antigenic) tests are used to detect antibodies directed against the PF4/heparin complex. Functional assays are based on the ability of antibodies to activate donor platelets in the presence of heparin. The aim of this article is to present a brief overview of laboratory tests for the diagnosis of HIT available in the Czech Republic.

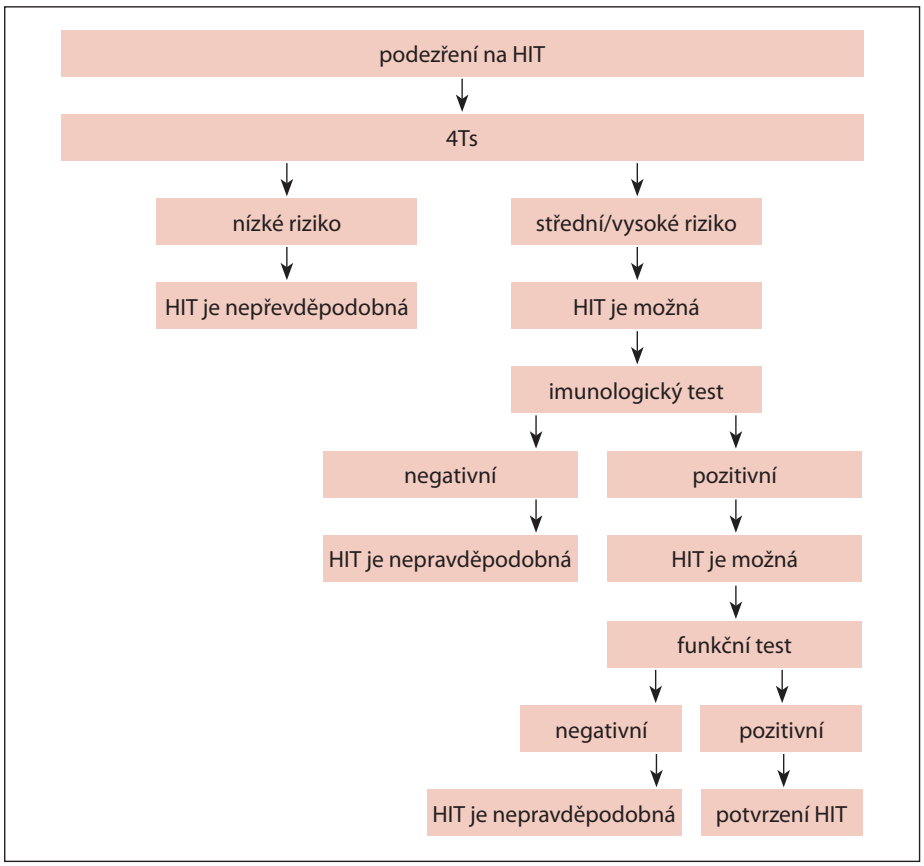
Key words: heparin-induced thrombocytopenia (HIT) – laboratory diagnostics of HIT – immunoassays – functional tests

ÚVOD

Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je závažná protrombotická imunitní komplikace léčby heparinem. Je způsobena protilátkami třídy IgG namířenými proti komplexu destičkový faktor 4 (PF4)/heparin. Dochází zde k silné aktivaci krevních destiček vazbou HIT protilátek na destičkové receptory FcγRIIa. Komplexy PF4/heparin/HIT protilátky se vážou také na monocyty, což vede k expresi tkáňového faktoru a iniciaci koagulační kaskády s následnou tvorbou trombinu. I přes antikoagulační léčbu a trombocytopenii je zde vysoké riziko rozvoje žilní i arteriální trombózy. K imunizaci dochází podstatně častěji při léčbě nefrakcionovaným heparinem (UFH) než při léčbě nízkomolekulárním heparinem (*low-molecular-weight heparin* – LMWH), raritně po užívání pentasacharidu [1–6].

Výskyt protilátek proti komplexu PF4/heparin je však mnohem vyšší než výskyt klinické HIT. Zejména imunologické laboratorní testy využívané v diagnostice HIT mají vysokou negativní prediktivní hodnotu, ale poměrně nízkou pozitivní prediktivní hodnotu, pokud nejsou interpretovány v kontextu s klinickým obrazem. Proto by měla být diagnostika HIT založená jak na klinickém obraze, tak na detekci patogenních protilátek imunologickými i funkčními testy [7].

Typický klinický obraz HIT je charakterizován poklesem krevních destiček o 30–50 % (v některých případech i o více než 50 %) a/nebo novou trombózou, objevující se 5.–14. den po zahájení léčby heparinem [8]. HIT se může objevit při podávání profylaktických i terapeutických dávek léčiva. Tromboembolické



Obr. 1. Algoritmus diagnostiky HIT; upraveno dle [11].
HIT – heparinem indukovaná trombocytopenie

komplikace postihují zejména žilní systém, až u 40 % pacientů se vyvine plicní embolie. Trombóza spojená s HIT se vyskytne u přibližně 30 % pacientů stejný den jako pokles krevních destiček, u přibližně 30 % pacientů během 3–4 dnů po tomto poklesu. Až u 33 % pacientů se trombóza projeví 1–2 dny před poklesem trombocytů [9]. U některých pacientů se můžeme setkat s opožděným nástupem HIT, tzn. déle než 3 týdny po zahájení terapie heparinem [8]. V tomto případě reagují protilátky nezávisle na heparinu a HIT se stává autoimunitním onemocněním.

Diagnostika HIT vyžaduje jak průkaz klinických symptomů, tak laboratorní potvrzení patogenních protilátek. Laboratorní testy by se měly provádět pouze u pacientů s projevujícími se klinickými symptomy připomínajícími HIT. Pro kvantifikaci klinických příznaků a určení pravděpodobnosti HIT byly vytvořeny různé klinické skórovací systémy, např. skóre „4Ts“ [10]. Algoritmů diagnostiky HIT vycházejících ze „4Ts“ je popsáno několik. Postup dle Greinachera [11] je v současné době považován za nejsenzitivnější a nejspecifičtější. U pacientů s nízkým skóre (0–3) je přítomnost HIT protilátek nepravděpodobná, tudíž by ani neměli být laboratorně testováni. Pacienti se středním (4–5) a vysokým (6–8) skóre mají větší pravděpodobnost pozitivity testů k záchytu HIT protilátek, a proto jsou laboratorně testováni. Pozitivní prediktivní hodnota závisí na hodnotě skóre a na zkušenostech lékaře s jeho používáním. Další diagnostický postup dle Pouplarda et al. [12] doporučuje kromě určení skóre „4Ts“ také rychlý screeningový imunologický test u všech pacientů s podezřením na HIT, bez ohledu na hodnotu skóre.

HIT protilátky se vyskytují přechodně a vymizí během několika týdnů po akutní HIT. Pozitivita funkčních testů je zpravidla omezená na dobu tzv. akutní HIT, což je doba, kdy trvá trombocytopenie. Ve fázi subakutní HIT, po úpravě trombocytopenie, trvá pozitivita imunologických testů, ale pozitivita funkčních testů mizí. Pozitivita imunologických testů vymizí u většiny pacientů přibližně po 100 dnech od diagnostiky HIT [13].

Laboratorní testy k diagnostice HIT rozdělujeme do dvou skupin, a to na imunologické a funkční. Imunologické (antigenní) testy slouží k detekci protilátek namířených proti komplexu PF4/heparin a jsou založeny na vazbě protilátek na hlavní HIT antigen, kterým je PF4 vázaný na polyanion. Funkční testy jsou založeny na vlastnosti protilátek aktivovat v přítomnosti heparinu dárcovské krevní destičky. Podle současných doporučení odborných společností by měla laboratorní diagnostika začít detekcí HIT protilátek imunologickým testem s vysokou senzitivitou. V případě pozitivity imunologického testu by mělo následovat provedení funkčního testu, který prokáže, že se jedná o protilátky, které v přítomnosti heparinu aktivují zdravé dárcovské krevní destičky [14].

Právě kombinace klinické diagnostiky spolu s vysoce senzitivním imunologickým testem a funkčním testem s vysokou specificitou vede ke správné diagnostice HIT (obr. 1).

Cílem tohoto článku je vytvořit stručný přehled laboratorních testů k diagnostice HIT dostupných v ČR.

IMUNOLOGICKÉ (ANTIGENNÍ) TESTY

Imunologické testy jsou založené na detekci vazby HIT protilátek na komplex PF4/heparin nebo PF4/polyanion. HIT protilátky jsou dostatečně stabilní v séru i plazmě při –70 °C, což umožňuje vyšetřování v sériích např. technikou ELISA. Avšak vzhledem k potřebě co nejrychleji získaných výsledků se v laboratorní diagnostice HIT stále častěji využívají rychlé (screeningové) imunologické testy, které umožňují testování „na vyžádání“ po jednom pacientovi a které mohou poskytnout výsledky do 1 hod od odběru krve [15].

Na tomto principu fungují také všechny v současné době dostupné

screeningové testy. Jejich hlavní výhodou je jednoduché a velice rychlé provedení. Výsledek je znám během několika minut, což je pro diagnostiku HIT velmi důležité. Stejně jako všechny ostatní imunologické testy vykazují i screeningové testy poměrně vysoké procento falešně pozitivních výsledků. Měly by však mít co nejvyšší negativní prediktivní hodnotu. Obecně pro všechny imunologické testy platí, že jimi získaný pozitivní výsledek by vždy měl být potvrzen testem funkčním [14].

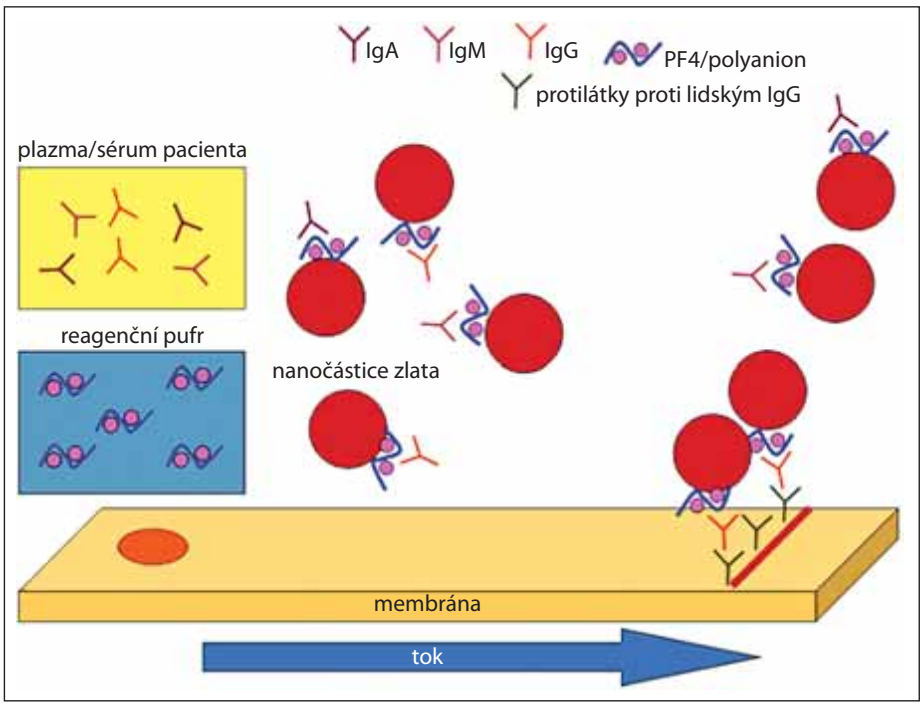
V ČR se v současné době používají dva typy screeningových testů, které jsou přímo uzpůsobené k vyšetřování pacientů „po jednom", jejichž provedení nevyžaduje prakticky žádné speciální laboratorní vybavení a jejichž doba analýzy trvá pouhých několik minut. Jedná se o *Lateral Flow Immunoassay* (LFIA) a o *Particle Gel Immunofiltration Assay* (PaGIA). Dříve tu byl dostupný ještě test na principu *Particle Immunofiltration Assay* [16], ten však do ČR není již několik let distribuován.

Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

Jedná se o rychlý screeningový test na principu laterálního toku k vyloučení HIT během pouhých 10 min. Slouží k detekci HIT protilátek třídy IgG namířených proti komplexu PF4/polyanion. Součástí soupravy je speciální cartridge, jejímž základem je testovací proužek tvořený nitrocelulózovou membránou, a lahvička s reagencií opatřená kapátkem. Dále už je k provedení potřeba pouze pipeta pro nanesení 5 µl vyšetřované citrátové plazmy nebo séra [17].

Test používá reagenční pufr obsahující komplexy PF4/polyanion vázané na biotin, speciální membránu, která obsahuje nanočástice zlata potažené protilátkou proti biotinu, a kozí protilátku namířenou proti lidskému IgG, zakotvenou na membráně v místě testovací linie [17].

Po napipetování 5 µl vyšetřované plazmy nebo séra a přidání dvou kapek reagenčního pufru dojde k migraci směsi přes nitrocelulózovou membránu testovací jednotky, přičemž se HIT protilátky



Obr. 2. Princip STic Expert HIT (Stago); upraveno dle [18].

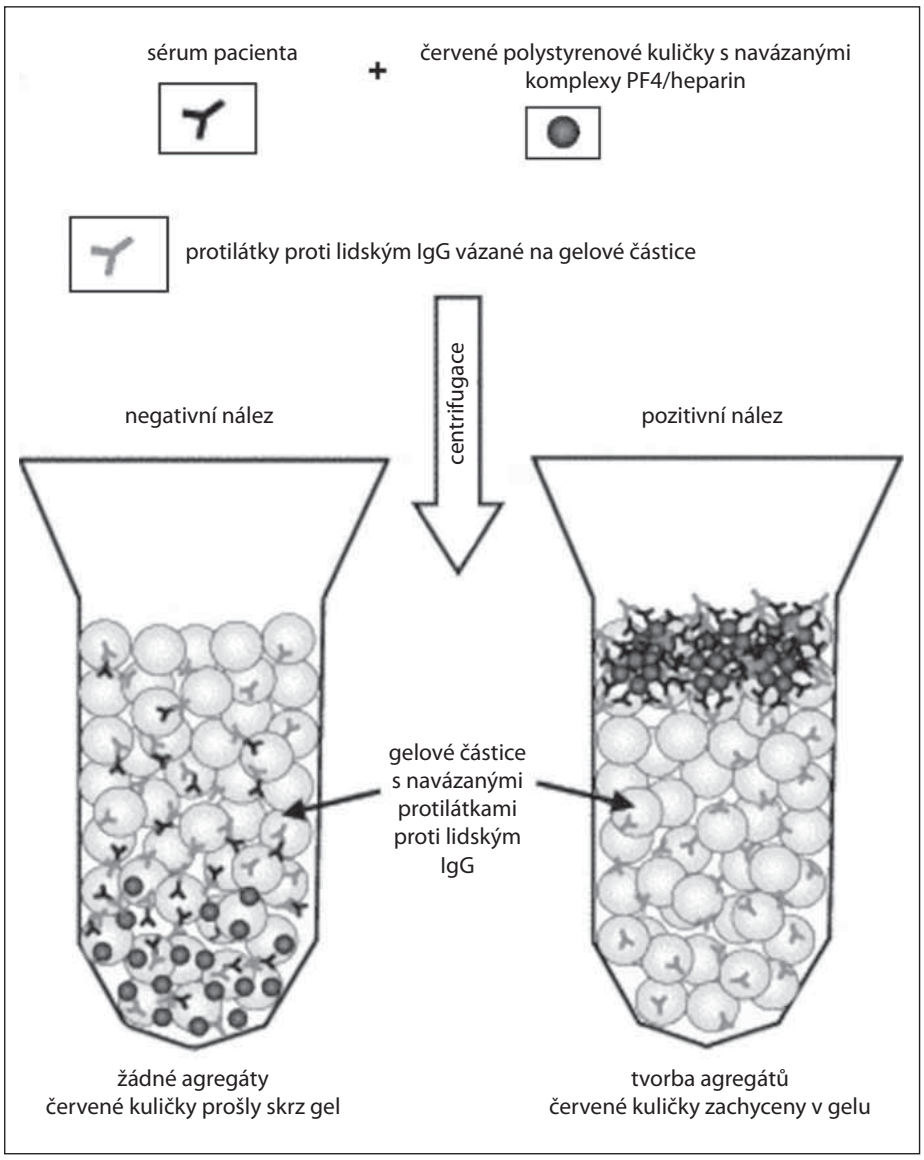
vážou na biotinylované komplexy PF4/polyanion a na nanočástice zlata nesoucí protilátky proti biotinu. Když tekutina projde přes testovací linii (Line-T), imobilizované kozí protilátky specifické pro Fc doménu lidského IgG zachytí komplexy obsahující IgG anti-PF4 protilátky. Tím dojde k vizualizaci pozitivních výsledků (zbarvení proužku T). Protilátky třídy IgA nebo IgM a nevyvázané částice zlata dále migrují přes membránu a jsou specifickými protilátkami zachyceny kontrolním proužkem C (Line-C). Kontrolní proužek C musí být z důvodu ověření migrace vždy viditelný. Výsledek je negativní, pokud čára v místě line-T není viditelná, nebo je světlejší než na papírové referenční kartě. O pozitivní výsledek se jedná v případě, že je proužek T zbarvený stejně nebo intenzivněji než na referenční kartě. Důležité je, aby byl nejasný výsledek vždy považován za pozitivní a byl dále dovyšetřen funkčním testem. Primárním cílem tohoto testu je HIT vyloučit [17].

K hlavním výhodám tohoto testu patří jednoduchost a rychlost provedení, bez potřeby speciálního vybavení laboratoře. Nevýhodou je v některých případech vizuální hodnocení výsledků, zejména porovnávání intenzity zbarvení

Obr. 3. STic Expert HIT (Stago) – pozitivní nález [vlastní zpracování].

proužku T s papírovou referenční kartou. Dalším občasným problémem je nehomogenita ve zbarvení proužku T, kdy je jeho část zbarvena podstatně intenzivněji než zbylý kousek. Z našich mnohaletých zkušeností a provedení stovek vyšetření tímto testem můžeme potvrdit senzitivitu 99 %. V odborné literatuře je publikováno několik srovnávacích studií, zabývajících se senzitivitou a specificitou LFIA vůči metodě Heparin-Induced Platelet Activation (HIPA). Senzitivita se pohybuje mezi 97,5–100 % a specificita mezi 82,3–93,1 % [17,19].

V ČR je dostupný STic Expert HIT od firmy Diagnostica Stago (obr. 2, 3). Výrobce již několik let avizuje dodání čtečky (*reader*) k odečtu výsledků, ta však stále není k dispozici.



Obr. 4. Princip ID-heparin/PF4 PaGIA (Diamed SA); upraveno dle [24].

Particle Gel Immunofitration Assay (PaGIA)

Jedná se o techniku sloupcové aglutinace, která využívá vazby komplexu PF4/heparin na červené polystyrenové kuličky. Po přidání pacientova séra či citrátové plazmy se protilátky proti komplexu PF4/heparin vážou na kuličky potažené antigenem a aglutinují je. Aglutinace je dále zvýrazněna pomocí protilátky proti lidské IgG v gelovém sloupci. Při následné centrifugaci aglutinované červené kuličky (indikující přítomnost protilátek proti komplexu PF4/heparin) neprocházejí sephacrylovým gelem a vytvářejí červené zbarvení v horní části gelu, zatímco neaglutinující kuličky (indikující nepřítomnost protilátek) procházejí skrz gel a tvoří červené zbarvení na dně kolonky [20].

Testovací souprava obsahuje pozitivní a negativní kontrolu. Sériovým ředěním pacientského séra je umožněno semikvantitativní posouzení titru protilátek. Slabá aglutinace nebývá spojována s klinicky relevantní HIT. Test nedokáže rozlišit IgG, IgA a IgM protilátky [21].

Výhodou tohoto screeningového testu je rychlost a jednoduchost provedení a také možnost semikvantitativního stanovení titru protilátek. Jistou nevýhodou je potřeba centrifugy na gelové karty, která je sice běžným vybavením laboratoří na transfuzních odděleních, avšak v čistě hematologických laboratořích využití nemá. Mnohem podstatnějším problémem, popsaným v literatuře, je nízká senzitivita některých šarží, která vede až k falešné negativitě výsledků a nemusí být odhalena ani použitím komerční kontroly. V některých případech je to také nejednoznačný výsledek, kdy je patrná aglutinace v gelu kolony, ale současně také přítomnost nenavázaných červených kuliček na dně kolony [22].

V odborné literatuře je publikováno několik srovnávacích studií, zabývajících se senzitivitou a specificitou PaGIA vůči metodě Serotonin release assay (SRA). Senzitivita se pohybuje mezi 95,5–100 % a specificita mezi 91,4–93,7 % [19,24].

V ČR je dostupný ID-heparin/PF4 PaGIA od firmy Diamed SA (obr. 4) [24]. Výroba však byla v prosinci 2021 ukončena. K dispozici je tak už pouze poslední šarže.

Další imunologické testy již neřadíme mezi tradiční screeningové testy. Doba analýzy je u některých z nich řádově několik minut, jiné trvají hodiny. Všechny však vyžadují speciální laboratorní vybavení, které je pro jejich provedení nezbytné.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Tato skupina antigenních testů opět detekuje protilátky na základě jejich vazby na komplexy PF4/polyanion. Podle způsobu provedení můžeme ELISA techniky rozdělit na tzv. solid-phase ELISA a fluid-phase ELISA. V současné době se využívají nejčastěji ELISA techniky na pevné fázi, zejména tzv. sendvičové, které komerčně vyrábí řada výrobců, např. Diagnostica Stago, Hyphen BioMed, Immucor GTI Diagnostic, Inc. a další. Soupravy jednotlivých firem se liší použitým polyaniontem (heparin, polyvinylsulfonát, heparin vázaný na protamin), zdrojem PF4 (rekombinantní, krevní destičky, destičkový lyzát) a počtem či typy tříd protilátek, které zachytávají (IgG specifické, polyspecifické IgA, IgM, IgG) [25].

ELISA techniky mají ve srovnání s funkčními testy využívajícími promyté

Tab. 1. Komerčně dostupné ELISA soupravy pro diagnostiku HIT [vlastní zpracování].

Výrobce	Zdroj PF4	Polyanion	Název soupravy	Třída/y detekovaných protilátek
Diagnostica Stago	rekombinantní	heparin	Asserachrom HPIA	IgG/A/M
Hyphen BioMed	destičkový lyzát	heparin vázaný na protamin	Zymutest HIA IgGAM	IgG/A/M
			Zymutest HIA IgG	IgG
			Zymutest HIA IgG	IgA
			Zymutest HIA IgG	IgM
Immucor GTI Diagnostic, Inc.	krevní destičky	polyvinylsulfonát (PVS)	PF4 Enhanced	IgG/A/M
			PF4 IgG	IgG

dárcovské destičky relativně nízkou specificitu, stejně jako ostatní imunologické testy [26]. Naopak senzitivita, tzn. schopnost zachytit klinicky relevantní HIT protilátky, se blíží 100 % [1,10]. Z literatury je však patrné, že se senzitivita i specificita komerčně dostupných souprav od různých výrobců značně liší. Z publikovaných srovnávacích studií zabývajících se senzitivitou a specificitou ELISA souprav vůči metodě HIPA je patrné, že se senzitivita pohybuje mezi 97,1–100 % a specificita mezi 80,9–94,4 % [19].

Dosáhnout vyšší specificity bez významného snížení senzitivity je možné použitím IgG specifických technik [27–29]. Zvýšit specificitu lze také provedením testu za podmínek vysoké koncentrace heparinu [30, 31]. Při této „konfirmační proceduře" je vyšetření zopakováno v prostředí heparinu o koncentraci 100 U/ml, která rozruší antigenní komplexy PF4/heparin, čímž je reaktivita obvykle inhibována. Zvýšení specificity není v tomto případě nějak významné, neboť vysoká koncentrace heparinu obvykle inhibuje patogenní, ale i nepatogenní HIT protilátky. Z praxe je navíc známo poměrně málo případů pozitivních vzorků, které nejsou inhibovány vysokou koncentrací heparinu [32].

Pravděpodobnost, že pozitivní výsledek ELISA testu ukazuje na přítomnost patologických HIT protilátek aktivujících krevní destičky, přímo souvisí s mírou pozitivity výsledku, tzn. s naměřenou hodnotou absorbance [10]. Čím vyšší je hodnota naměřené absorbance, tím vyšší je pravděpodobnost pozitivity funkčních testů, tzn. průkazu HIT protilátek schopných aktivovat krevní destičky. Souvislost mezi hodnotou naměřené absorbace a pozitivitou funkčních testů byla zaznamenána při testování několika souprav ELISA [33]. Vyšší hodnota absorbance ELISA testů koreluje také s vyšším výskytem trombózy [34,35].

Laboratorní vyšetření HIT protilátek pomocí komerčně dostupných souprav ELISA spočívá v zachycení stanovované protilátky na dno mikrotitrační destičky přes komplex PF4/polyanion. Na destičku se aplikuje *blank*, pozitivní a negativní kontrola a naředěná citrátová plazma či sérum pacienta. Zpravidla se používá několik ředění vyšetřovaného materiálu. Po inkubaci a odmytí balastu následuje vazba konjugátu, protilátky značené enzymem. Po druhé inkubaci a promytí následuje přidání substrátu. Ten je štěpen enzymem za vzniku barevného zbarvení, reakce se zastaví přídavkem minerální kyseliny a poté se měří absorbance (nejčastěji při 450 nm). Naměřená hodnota blanku se odečte od absorbancí naměřených v ostatních jamkách. Získaný výsledek se porovnává s *cut-off* hodnotou. Soupravy bývají navržené tak, aby se daly použít k vyšetření pouze jednoho pacienta samostatně. Mikrotitrační destička je rozdělena na jednotlivé řady (stripy) po osmi jamkách a jednotlivé reagencie jsou v soupravě v dostatečném počtu lahviček. [36]

K výhodám patří kromě výše zmíněné vysoké citlivosti metody také její dobrá dostupnost (tab. 1). Komerční soupravy mají CE značku a v současné době se běžně prodávají ve variantě s jednou řadou jamek (tzv. monostrip). Mezi nezbytné vybavení laboratoře k provedení testu patří čtečka ELISA (*reader*), která však bývá běžným vybavením větších hematologických pracovišť. Hlavní nevýhodou je nízká diagnostická specificita, zvláště když se získá pouze slabě pozitivní výsledek. Vyšší specificity však lze dosáhnout jednak použitím IgG specifických technik, jednak přidáním vysoké koncentrace heparinu do reakční směsi. Nevýhodou ELISA testů je relativně dlouhá doba analýzy, obvykle 3–4 hod, což je dáno poměrně dlouhými inkubacemi [36].

Latex Immunoturbidimetric Assay (LIA)

Tento automatizovaný test, který se vyšetřuje na automatických koagulometrech imunoturbidimetrickým principem, vyvinula společnost Instrumentation Laboratory (IL). Jedná se o tzv. funkcionalizovaný imunotest, který detekuje HIT protilátky v citrátové plazmě na základě jejich schopnosti inhibovat aglutinaci latexových nanočástic potažených monoklonální protilátkou (podobnou HIT protilátkám) po přidání komplexů PF4/polyvinylsulfonát (PVS). Pokud se jedná o negativní vzorek, kdy nejsou HIT protilátky přítomny, dojde k aglutinaci latexových částic přes komplexy PF4/PVS. Naopak v přítomnosti HIT protilátek dochází na základě jejich koncen-

trace ve vzorku k vyvazování na komplex PF4/PVS a tím k inhibování aglutinace latexových částic. Test je schopen detekovat protilátky tříd IgG, IgA a/nebo IgM [37].

V odborné literatuře je publikováno několik srovnávacích studií zabývajících se senzitivitou a specificitou LIA vůči metodě HIPA. Senzitivita se pohybuje mezi 97,4–100 % a specificita mezi 84,3–94,0 % [14,19,37].

Velkou výhodou této techniky je rychlost vyšetření – výsledek je dostupný do 20 min od vložení vyšetřované plazmy do přístroje. Díky použití standardizovaných přístrojů a standardizovaných reagencií zaručuje dosažení srovnatelných výsledků v různých laboratořích. Reagencie jsou tekuté a připravené k použití, čímž se výrazně zkracuje doba od přijetí požadavku na vyšetření laboratoří do vydání výsledku a minimalizuje se riziko chyby [37].

Nevýhodou metody je omezená stabilita reagencií po jejich otevření a s tím související prodražení vyšetření z důvodu nespotřebování reagencií do vypršení jejich stability.

Chemiluminiscenční imunoanalýza (CLIA)

Jedná se o rychlý, plně automatizovaný chemiluminiscenční test vyvinutý společností Instrumentation Laboratory (IL) prováděný na přístroji BIO-FLASH®. Princip spočívá v detekci HIT protilátek navázaných na magnetické částice potažené komplexem PF4/polyvinylsulfonát. Po inkubaci, magnetické separaci a následném promývacím kroku je přidán tzv. tracer, obsahující isoluminolem značenou antihumánní IgG protilátku, která se váže na HIT protilátky zachycené na magnetických částicích. Po druhé inkubaci, magnetické separaci a promytí se přidají činidla, která způsobí chemiluminiscenci. Přístroj pak změří emitované světlo, které je přímo úměrné koncentraci stanovovaných HIT protilátek [38].

V odborné literatuře je publikováno několik srovnávacích studií, zabývajících se senzitivitou a specificitou CLIA vůči metodě SRA. Senzitivita se pohybuje mezi 97,0–100 % a specificita mezi 95,2–98,5 % [19,39].

Výhodou této metody je plná automatizace, dlouhá stabilita reagenční cartridge v přístroji a rychlost získání výsledku – doba analýzy je přibližně 30 min od vložení vzorku citrátové plazmy či séra do přístroje. Jedná se tedy o metodu vhodnou pro testování HIT „na vyžádání" v režimu 24/7 [38].

I přes dlouhou stabilitu reagencií v přístroji se na spoustě pracovišť nepodaří veškerý obsah do konce stability využít, což vyšetření významně prodraží. Další nevýhodou je značně omezené využití přístroje BIO-FLASH® v hematologické laboratoři.

FUNKČNÍ TESTY

Funkční testy detekují HIT protilátkami zprostředkovanou aktivaci krevních destiček zdravých dárců v přítomnosti heparinu. Tato aktivace je zprostředkována destičkovými receptory FcγRIIa, a to pouze protilátkami třídy IgG. Na rozdíl od antigenních testů detekují funkční testy také protilátky proti jiným vzácným antigenním komplexům, jako jsou Interleukin-8 (IL-8)/heparin nebo Neutrophil activating peptide 2 (NAP-2)/heparin. Zvýšení senzitivity lze dosáhnout použitím promytých dárcovských krevních destiček [38].

Optická agregometrie

Citrátová plazma bohatá na destičky (PRP) od zdravých dárců, sérum pacienta a heparin jsou inkubovány za stálého míchání v měřicí kyvetě optického agregometru (nefelometru). HIT protilátky způsobují po časové prodlevě cca 5–10 min od přidání heparinu o koncentraci 0,5–1,0 IU/ml agregaci dárcovských krevních destiček. Agregace destiček se sleduje po dobu 15 min [38].

Zcela zásadním krokem celé analýzy je výběr a příprava vhodných dárcovských krevních destiček. Dárce destiček nesmí v posledních 10 dnech před odběrem užívat žádnou medikaci ovlivňující funkci krevních destiček. Citlivost krevních destiček různých dárců k HIT protilátkám se liší, proto je vhodné používat destičky od dárců s ověřenou citlivostí vůči HIT protilátkám. Zdrojem destiček je PRP, připravená centrifugací plné krve při 120× g po dobu 20 min při laboratorní teplotě bez použití brzdy. Počet destiček v PRP je upraven na hodnoty 3×10^8/ml pomocí vlastní plazmy chudé na destičky (PPP) [38].

Za účelem zvýšení specificity metody je možné použít tepelnou inaktivaci vyšetřovaného séra při 56 °C po dobu 30 min. Tím dojde k výrazné eliminaci efektu zbytkového trombinu a aktivovaných složek komplementu, které by jinak mohly falešně aktivovat dárcovské krevní destičky [38].

K ověření funkčnosti destiček se jako negativní kontrola testu používá pufr, jako pozitivní kontrola kolagen. Ideální je použít jako pozitivní kontrolu archivované pacientské sérum s již dříve ověřenou pozitivitou HIT protilátek schopných aktivovat krevní destičky. Krevní destičky normálně po přidání heparinu neagregují. Pokud má pacient HIT protilátky, dojde k agregaci destiček během 15 min po přidání heparinu. Zkřížená reaktivita HIT protilátek s heparinoidem je hodnocena s použitím danaparoidu místo heparinu [40].

Velkou nevýhodou této metody pro diagnostiku HIT je její relativně nízká senzitivita a obtížná standardizace. Srovnávací studií na 77 pacientských vzorcích vyšetřených metodou optické agregometrie bylo dosaženo senzitivity 39–81 % v závislosti na reaktivitě dárcovských krevních destiček a specificity 90 % vůči SRA [40]. Další studie na 200 vzorcích dosáhla senzitivity 76 % a specificity 96 % vůči SRA [41]. Z těchto důvodů by neměly být agregační testy využívající PRP prováděny za účelem vyloučení přítomnosti HIT protilátek [38].

Heparin-Induced Multiple Electrode Aggregometry (HIMEA)

Jedná se o metodu impedanční agregometrie, která hodnotí agregaci krevních destiček v plné krvi zdravého dárce v přítomnosti séra nebo citrátové plazmy pa-

cienta a v přítomnosti heparinu ve dvou koncentracích, nízké (0,25–1,0 IU/ml) a vysoké (50–100 IU/ml). Metoda se provádí na přístroji Multiplate® [14].

Stejně jako u optické agregometrie dochází v případě přítomnosti HIT protilátek a heparinu o nízké koncentraci k agregaci dárcovských krevních destiček. Naopak vysoká koncentrace heparinu reakci inhibuje. Hodnotí se plocha pod křivkou (*area under the curve* – AUC). Doba analýzy je 15 min. Software analyzátoru Multiplate® obsahuje speciální aplikaci pro vyšetření HIT – HIMEA [41].

V porovnání s optickou agregometrií dosahuje impedanční agregometrie dle většiny studií vyšší senzitivity i specificity [42,43]. Srovnávací studií na 200 pacientských vzorcích vyšetřených metodou impedanční agregometrie bylo dosaženo senzitivity 81 % a specificity 99 % vůči SRA [41]. Další studie na 70 vzorcích dosáhla senzitivity 85,7 % a specificity 98,4 % vůči SRA [44].

Velkou výhodou HIMEA je použití plné dárcovské krve, díky čemuž odpadá příprava PRP. Výhodou je také používání hirudinu jako protisrážlivého činidla v odběrových zkumavkách, jenž spolehlivě inhibuje veškerý zbytkový trombin ve vzorku. Výběr vhodných dárcovských destiček je i v případě impedanční agregometrie klíčový. Opět je nutné vyloučit zkříženou reaktivitu a samovolnou agregaci dárcovských destiček v přítomnosti heparinu [43].

Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie lze sledovat přítomnost markerů aktivace dárcovských krevních destiček (PRP) v přítomnosti pacientova séra a heparinu. Existuje celá řada home-made metod, založených na detekci různých markerů aktivace dárcovských krevních destiček. Jedním z využívaných markerů je destičkový P-Selektin, na jehož stanovení je založena metoda s názvem *Platelet P-Selectin Expression Assay* (PEA). V rámci provedené klinické studie, která analyzovala 91 pacientských sér, došli autoři k závěru, že je PEA k detekci destičky aktivujících protilátek senzitivnější než SRA [45].

Kromě zmíněných home-made metod je na trhu dostupná komerční souprava HIT*Alert*™ Kit od firmy IQ Products. Identifikace krevních destiček zde probíhá na základě znaku CD41. Aktivované destičky jsou detekovány pomocí annexinu V, který rozpozná fosfatidylserin na jejich povrchu [46].

Srovnávací studií na 37 pacientských vzorcích vyšetřených metodou průtokové cytometrie s použitím této soupravy bylo dosaženo senzitivity 81 % a specificity 100 % vůči SRA [46].

Jedná se o jednoduchou metodu, která nevyžaduje promyté dárcovské krevní destičky. Doba analýzy je 110 min. Výhodou je snadná standardizovatelnost metody při použití soupravy HIT*Alert*™ Kit. Souprava také detekuje protilátky namířené proti vzácným komplexům IL-8/heparin a NAP-2/heparin. Jistou nevýhodou je omezená dostupnost průtokové cytometrie v hematologických laboratořích a potřeba vhodných čerstvých dárcovských krevních destiček v době analýzy [46].

Heparin-Induced Platelet Activation Test (HIPA)

Test heparinem vyvolané aktivace krevních destiček (HIPA) patří do skupiny testů využívajících promyté dárcovské krevní destičky resuspendované v Tyrodově pufru s fyziologickými koncentracemi vápenatých a hořečnatých iontů. Sérum pacienta musí být tepelně inaktivováno, aby se zabránilo aktivaci krevních destiček trombinem a komplementem. Promyté destičky a sérum pacienta jsou následně inkubovány s heparinem o různých koncentracích na mikrotitrační destičce. Sérum obsahující HIT protilátky vyvolá aktivaci krevních destiček při nízké koncentraci heparinu (0,1–0,3 IU/ml), nikoli však při jeho vysoké koncentraci (100 IU/ml). Reakce není blokována hirudinem, naopak je blokována v přítomnosti monoklonální protilátky blokující FcγRIIa receptory krevních destiček. V současné době dosahují HIPA a SRA nejlepšího poměru senzitivity (~ 95 %) a specificity (> 99 %) a jsou považovány za konfirmační testy v diagnostice HIT protilátek. Jsou ale technicky i časově velice náročné [47,48].

K dosažení vysoké specificity testu je nezbytné zajistit několik dílčích kroků:

a) použít destičky od 4 dárců;
b) použít slabě a silně HIT pozitivní séra;
c) prokázat, že vysoká koncentrace heparinu (100 IU/ml) inhibuje reaktivitu HIT séra;
d) prokázat, že je reaktivita HIT séra inhibována monoklonální protilátkou blokující FcγRIIa receptor krevních destiček [49,50].

Inkubace dárcovských krevních destiček a séra pacienta se provádí v jamkách mikrotitrační destičky. V každé jamce jsou 2 nerezové kuličky, které jsou rozpohybovány magnetickým míchadlem. Jamky jsou vizuálně odečítány každých 5 min proti nepřímému zdroji světla, přičemž se hodnotí změna vzhledu reakční směsi z kalné (žádná agregace) na průhlednou (došlo k agregaci). Pokud nastala agregace při terapeutické koncentraci heparinu (0,2 IU/ml) a při vysoké koncentraci heparinu (100 IU/ml) došlo k její inhibici, jedná se o pozitivní výsledek. Vzorek je považován za pozitivní, jsou-li získány pozitivní výsledky s destičkami alespoň 2 ze 4 dárců. Čím vyšší je reaktivita protilátek, tím rychleji dojde k agregaci dárcovských destiček. Je nutné vyloučení nespecifických reakcí – tj. situací, kdy dojde k aktivaci destiček od všech 4 dárců v přítomnosti nízké i vysoké koncentrace heparinu. Vysoká koncentrace heparinu inhibuje aktivaci destiček způsobenou protilátkami třídy IgG, ale nikoli aktivaci způsobenou cirkulujícími imunokomplexy. Nespecifické aktivaci destiček způsobené cirkulujícími imunokomplexy je možné zabránit přídavkem monoklonální protilátky blokující Fc receptor krevních destiček, která inhibuje aktivaci trombocytů způsobenou HIT IgG protilátkami. K vyloučení zkřížené reaktivity se místo heparinu používá heparinoid danaparoid [49].

Tab. 2. Přehled metod pro laboratorní diagnostiku HIT [vlastní zpracování].

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody
LFIA	Průkaz protilátek proti komplexu PF4/polyanion technikou laterálního toku na pevné fázi	Rychlost analýzy (10 min) Jednoduché provedení bez přístrojového vybavení Vysoká senzitivita IgG specificita	Vizuální hodnocení výsledků Občas nejednoznačné výsledky Občas nehomogenita ve zbarvení proužku
PAGIA	Průkaz protilátek proti komplexu PF4/heparin technikou sloupcové aglutinace v gelu	Rychlost analýzy (20 min) Jednoduchost provedení Možnost semikvantitativního stanovení titru protilátek	Potřeba centrifugy na gelové karty Občas nízká senzitivita Občas nejednoznačný výsledek
ELISA	Průkaz protilátek proti komplexu PF4/polyanion vazbou na pevnou fázi	Vysoká senzitivita Dobrá dostupnost Některé jsou IgG specifické	Nízká specificita Dlouhá doba analýzy (3–4 hod)
LIA	Průkaz protilátek proti komplexu PF4/polyvinylsulfonát imunoturbidimetricky	Rychlost analýzy (20 min) Tekuté reagencie Na automatickém koagulometru Relativně vysoká specificita	Omezená stabilita reagencií po otevření
CLIA	Průkaz protilátek proti komplexu PF4/polyvinylsulfonát pomocí chemiluminiscence	Vysoká senzitivita Vysoká specificita Plná automatizace Dlouhá stabilita reagenční cartridge v přístroji Rychlost analýzy (30 min)	Omezená stabilita cartridge v přístroji Omezené využití přístroje BIO-FLASH® v hematologické laboratoři
Optická agregometrie	Průkaz agregace dárcovských krevních destiček v přítomnosti HIT protilátek a heparinu metodou optické agregometrie	Dobrá dostupnost Relativně vysoká specificita Jednoduché provedení Rychlost analýzy (15 min)	Nízká senzitivita Pracný výběr a zpracování vhodných dárcovských destiček Obtížná standardizace
HIMEA	Průkaz agregace dárcovských krevních destiček v přítomnosti HIT protilátek a heparinu metodou impedanční agregometrie	Použití plné krve (dárcovské) Relativně vysoká senzitivita i specificita Rychlost analýzy (15 min)	Obtížný výběr vhodných dárcovských destiček
Průtoková cytometrie	Průkaz markerů aktivace dárcovských destiček v přítomnosti HIT protilátek a heparinu průtokovou cytometrií	Vysoká specificita Vysoká senzitivita Standardizovatelnost metody při použití soupravy HIT*Alert*™ Kit Doba analýzy cca 110 min	Omezená dostupnost průtokové cytometrie v hematologické laboratoři Obtížný výběr vhodných dárcovských krevních destiček
HIPA	Heparinem indukovaná aktivace promytých dárcovských krevních destiček v přítomnosti HIT protilátek a heparinu v mikrotitrační destičce vizuálně	Vysoká senzitivita Vysoká specificita	Pracná a časově náročná metoda (výběr vhodného dárce destiček, příprava, promytí destiček) Vizuální odečet Špatná dostupnost Dlouhá doba odezvy
SRA	Průkaz serotoninu uvolněného z promytých dárcovských krevních destiček po jejich aktivaci v přítomnosti HIT protilátek a heparinu pomocí HPLC	Zlatý standard v diagnostice HIT Vysoká senzitivita Vysoká specificita	Pracná a časově náročná metoda (výběr vhodného dárce destiček, příprava, promytí destiček) Špatná dostupnost Dlouhá doba odezvy

Mezi nejnáročnější a zároveň nejdůležitější kroky HIPA testu patří výběr, příprava a promytí dárcovských krevních destiček a volba vhodných kontrol. Samozřejmě také příprava pacientského séra, které musí být inaktivováno při 56 °C po dobu 30 min. Samotné vyšetření musí být provedeno s destičkami od 4 dárců, vše ideálně v dubletu. Z praxe je bohužel známo, že zdaleka ne všechny dárcovské trombocyty jsou vhodné pro provedení HIPA testu, neboť některé z neznámého důvodu dostatečně nereagují na přítomnost HIT protilátek. Správný výběr dárcovských trombocytů tak je pro provedení testu zásadní. K ověření funkčnosti krevních destiček se jako negativní kontrola používá pufr, jako pozitivní kontrola roztok kolagenu [50].

Vyšetření v ČR provádí pouze Ústav hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) Praha, Oddělení biochemie, vždy současně s vyšetřením SRA.

Serotonin release assay (SRA)

Test uvolňování serotoninu (SRA) je považován za zlatý standard v diagnostice HIT, zejména z důvodu jeho vysoké senzitivity (~ 95 %) i specificity (> 99 %). Jedná se o další funkční test, který využívá promyté krevní destičky. Test detekuje množství serotoninu uvolněného z denzních granulí dárcovských krevních destiček během jejich aktivace HIT protilátkami. Destičky jsou nejprve radioaktivně značeny pomocí ^{14}C-serotoninu. Po inkubaci je měřeno množství radioaktivity v supernatantu, které je úměrně míře aktivace krevních destiček. Výsledek je vyjádřen jako procento uvolněného serotoninu z celkového množství serotoninu v krevních destičkách. Pozitivní výsledek je takový, kdy se uvolní > 20 % serotoninu při terapeutické koncentraci heparinu (0,1–0,3 IU/ml), zatímco při vysoké koncentraci heparinu (100 IU/ml) je aktivace destiček potlačena kvůli rozpadu imunokomplexů [48,51,52].

SRA se často vyšetřuje spolu s HIPA testem. Příprava dárcovských krevních destiček je totiž stejná. Poté je přidán ^{14}C-serotonin a probíhá inkubace při 37 °C po dobu 30 min. I další postup je velmi podobný HIPA testu, pouze s drobnými rozdíly, např. jamky mikrotitrační destičky nejsou promíchávány pomocí kovových kuliček, ale pomocí třepačky. Celé zpracování vzorku je velice pracné a časově náročné [53].

V ČR vyšetřuje SRA pouze ÚHKT Praha, Oddělení biochemie, a to jako speciální vyšetření s uváděnou dobou odezvy do 2 měsíců. Navíc se jedná o modifikaci původního testu, kdy se ke krevním destičkám nepřidává radioaktivně značený ^{14}C-serotonin. Serotonin uvolněný z dárcovských krevních destiček je stanoven pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Jako negativní kontrola se používá Tyrodový pufr, který se do reakce dává místo séra pacienta a slouží ke kontrole spontánního uvolňování serotoninu z krevních destiček. Jako pozitivní kontrola, která slouží ke zjištění maximálního množství uvolnitelného serotoninu, se používá peptid aktivující destičkový trombinový receptor (TRAP). V případě pozitivity vzorku musí být množství uvolněného serotoninu při nízké koncentraci heparinu > 35 % a současně při vysoké koncentraci heparinu < 15 % [54].

Další funkční testy používané k diagnostice HIT

Další techniky umožňující hodnocení aktivace krevních destiček zahrnují kvantifikaci mikropartikulí uvolněných z krevních destiček pomocí průtokové cytometrie [55], či kvantifikaci uvolněného serotoninu pomocí průtokové cytometrie [56]. Tyto metody se však k diagnostice HIT v ČR nepoužívají.

Kompletní přehled metod pro laboratorní diagnostiku HIT shrnuje tab. 2.

ZÁVĚR

V současné době máme k dispozici poměrně širokou paletu testů pro laboratorní diagnostiku HIT. Některé z nich jsou dostupné i v laboratořích malých nemocnic, jiné lze provádět pouze na specializovaných pracovištích. V každém případě je potřeba, aby laboratorní testy byly prováděny pouze u pacientů s projevujícími se klinickými symptomy připomínajícími HIT, tzn. po správné kvantifikaci klinických příznaků lékařem pomocí některého ze skórovacích systémů. U pacientů s nízkým skóre je přítomnost HIT protilátek nepravděpodobná, tudíž by ani neměli být testováni.

Pokud existuje podezření na HIT, měly by se nejdříve vyšetřovat testy imunologické, s vysokou senzitivitou, která se blíží 100 %. Kvůli relativně nízké specificitě mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky, nicméně jejich úkolem je zachytit přítomnost HIT protilátek v plazmě či séru pacienta. Za tímto účelem byly speciálně vyvinuty screeningové testy, které ke svému provedení nevyžadují žádné speciální laboratorní vybavení, a proto mohou být dostupné i v laboratořích malých nemocnic. Jsou také uzpůsobeny k vyšetřování vzorků pacientů „po jednom".

V případě pozitivity imunologických testů je nezbytné přítomnost HIT protilátek potvrdit funkčním testem, který prokáže schopnost protilátek z plazmy či séra pacienta aktivovat zdravé dárcovské krevní destičky za přítomnosti heparinu. Tyto testy mají vysokou specificitu. Dostupné jsou zpravidla pouze na velkých specializovaných pracovištích a k jejich provedení jsou nutné speciální laboratorní vybavení a zkušenosti laboratorního personálu. Některé funkční testy na HIT se vyšetřují pouze v sériích, a mají tedy delší dobu odezvy. Právě doba odezvy je pro správné zvládnutí HIT klíčová, klinik potřebuje výsledek co nejdříve. Záchyt pozitivní HIT je poměrně vzácný, o to důležitější je propracovaný systém laboratorní diagnostiky.

Literatura

1. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM and IgA classes. J Thromb Haemost. 2007;5:1666–1673.
2. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: A clinicopathologic syndrome. Thromb Haemost. 1999;82:439–447.
3. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, et al. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost. 1992;68:95–96.
4. Greinacher A, Potzsch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. Thromb Haemost. 1994;71:247–251.
5. Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, Gowthami MA, Douglas BC, Mortimer P. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. Blood. 2006;107:2346–2353.
6. Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: IgG-mediated platelet activation, platelet microparticle generation, and altered procoagulant /anticoagulant balance in the pathogenesis of thrombosis and venous limb gangrene complicating heparin-induced thrombocytopenia. Transfus Med Rev. 1996;10:249–258.
7. Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? Am J Hematol. 2007;82:1037–1043.
8. Warkentin TE. Clinical picture of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) and its differentiation from non-HIT thrombocytopenia. Thromb Haemost. 2016;116(5):813–822.

9. Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factor for thrombosis. Thromb Haemost. 2005;94:132–135.
10. 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;4:759–765.
11. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2009;7(1): 9–12.
12. Pouplard C, Gueret P, Fouassier M, et al. Prospective evaluation of the‚4Ts' score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2007;5:1373–1379.
13. Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. N Engl J Med. 2001;344:1286–1292.
14. Warkentin TE. Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Int J Lab Hematol. 2019;41(1):15–25.
15. Sun L, Gimotty PA, Lakshmanan S, Cuker A. Diagnostic accuracy of rapid immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia. A systematic review and meta-analysis. Thromb Haemost. 2016;115(5):1044–1055.
16. Warkentin TE, Sheppard JI, Raschke R, Greinacher A. Performance characteristics of a rapid assay for anti-PF4/heparin antibodies, the Particle Immuno Filtration Assay. J Thromb Haemost. 2007;5(11):2308-2310.
17. Sachs UJ, von Hesberg J, Santoso S, Bein G, Bakchoul T. Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Thromb Haemost. 2011;106:1197–1202.
18. https://www.labmate-online.com/news/laboratory-products/3/stago-uk-ltd/launch-of-rapid-hit-exclusion-test-in-the-uk/20306 (staženo 20.3.2022)
19. Nagler M, Bachmann LM, ten Cate H, ten Cate-Hoek A. Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. Blood. 2016;127(5):546–557.
20. Eichler P, Raschke R, Lubenow N, Meyer O, Schwind P, Greinacher A. The new ID-heparin/PF4 antibody test for rapid detection of heparin-induced antibodies in comparison with functional and antigenic assays. Br J Haematol. 2002;116:887–891.
21. Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P. Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). Lancet. 1999;354:1525–1526.
22. Schneiter S, Colucci G, Sulze I, Barizzi G, Lammle B, Alberio L. Variability of anti-PF4/heparin antibody results obtained by the rapid testing system ID-H/PF4-PaGIA. J Thromb Haemost. 2009;7:1649–1655.
23. Alhaliq AR, Joshua D, Kershaw G, Dunkley S. The Diamed assay has a poor positive predictive value for HIT in a tertiary hospital referral setting. Int J Lab Hematol. 2007;29(1):69–70.
24. Warkentin TE, Sheppard JI. Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Transfus Med Rev. 2006;20(4):259–272.
25. Vissac AM, Catala M, Amiral J. Incidence of the various heparin dependent antibody isotypes in a group of patients with heparin induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2007;5 Suppl:P-T-318.
26. Zwicker JI, Uhl L, Huang WY, Shaz BH, Bauer KA. Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2004;2:2133–2137.
27. Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Kelton JG. The use of well-characterized sera for the assessment of new diagnostic enzyme-immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2010;8:216–218.
28. Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Moore KM, Sigouin CS, Kelton JG. Laboratory testing for the antibodies that cause heparin-induced thrombocytopenia: how much class do we need? J Lab Clin Med. 2005;146(6):341–346.
29. Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJH. Prospective evaluation of immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2009;7:1260–1265.
30. Whitlatch NL, Perry SL, Ortel TL. Anti-heparin/platelet factor 4 antibody optical density values and the confirmatory procedure in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost. 2008;100:678–684.
31. 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;116:1761–1766.
32. Warkentin TE, Sheppard JI. No significant improvement in diagnostic specificity of an anti-PF4/polyanion immunoassay with use of high heparin confirmatory procedure. J Thromb Haemost. 2006;4:281–282.
33. Greinacher A, Ittermann T, Bagemuhl J, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: towards standardization of platelet factor 4/heparin antigen tests. J Thromb Haemost. 2010;8:2025–2031.
34. Altuntas F, Matevosyan K, Burner J, Shen YM, Sarode R. Higher optical density of an antigen assay predicts thrombosis in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Eur J Haematol. 2008;80:429–435.
35. Baroletti S, Hurwitz S, Conti NA, Fanikos J, Piazza G, Goldhaber SZ. Thrombosis in suspected heparin-induced thrombocytopenia occurs more often with high antibody levels. Am J Med. 2012;125:44–49.
36. Husseinzadeh HD, Gimotty PA, Pishko AM, Buckley M, Warkentin TE, Cuker A. Diagnostic accuracy of IgG-specific versus polyspecific enzyme-linked immunoassays in heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. J Thromb Haemost. 2017;15(6):1203–1212.
37. Warkentin TE, Sheppard JI, Linkins LA, Arnold DM, Nazy I. Performance characteristics of an automated latex immunoturbidimetric assay [HemosIL® HIT-Ab (PF4-H)] for the diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Res. 2017;153:108–117.
38. Warkentin TE, Greinacher A. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, eds. Heparin-induced thrombocytopenia. 5th edn. Boca Raton, Florida, CRC Press, 2013;272–314.
39. Warkentin TE, Sheppard JI, Linkins LA, Arnold DM, Nazy I. High sensitivity and specificity of an automated IgG-specific chemiluminescence immunoassay for diagnosis of HIT. Blood. 2018;132(12):1345–1349.
40. Chong BH, Burgess J, Ismail F. The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost. 1993;69:344–350.
41. Galea V, Khaterchi A, Robert F, Gerotziafas G, Hatmi M, Elalamy I. Heparin-induced multiple electrode aggregometry is a promising and useful functional tool for heparin-induced thrombocytopenia diagnosis: confirmation in a prospective study. Platelets. 2013;24(6): 441–447.
42. Favaloro EJ, McCaughan G, Mohammed S, et al. HIT or miss? A comprehensive contemporary investigation of laboratory tests for heparin-induced thrombocytopenia. Pathology. 2018;50(4):426–436.
43. Elalamy I, Galea V, Hatmi M, Gerotziafas GT. Heparin-induced multiple electrode aggregometry: a potential tool for improvement of heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. J Thromb Haemost. 2009;7:1932–1934.
44. Jin J, Baker SA, Hall ET, Gombar S, Bao A, Zehnder JL. Implementation of whole-blood impedance aggregometry for heparin-induced thrombocytopenia functional assay and case discussion. Am J Clin Pathol. 2019;152:50–58.
45. Padmanabhan A, Jones CG, Curtis BR, et al. A novel PF4-dependent platelet activation assay identifies patients likely to have heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. Chest. 2016;150(3):506–515.
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):365–370.
47. Eichler P, Budde U, Haas S, et al. First workshop for detection of heparin-induced antibodies: validation of the heparin-induced platelet-activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA. Thromb Haemost. 1999;81:625–629.
48. Tardy B, Lecompte T, Mullier F, Vayne C, Pouplard C. Detection of platelet-activating antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia. J Clin Med. 2020;9(4):1226.
49. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for dia-

gnosis heparin-associated thrombocytopenia. Thromb Haemost. 1991;66:734–736.
50. Warkentin TE, Hayward CP, Smith CA, Kelly PM, Kelton JG. Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. J Lab Clin Med. 1992;120: 371–379.
51. Sheridan D, Carter C, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. Blood. 1986;67:27–30.
52. Warkentin TE, Arnold DM, Nazi I, Kelton JG. The platelet serotonin-release assay. Am J Hematol. 2015;90(6):564–572.
53. Moore JC, Arnold DM, Warkentin TE, Warkentin AE, Kelton JG. An algorithm for resolving indeterminate test results in the platelet serotonin release assay for investigation of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2008;6:1595–1597.
54. Fouassier M, Bourgerette E, Libert F, Pouplard C, Marques-Verdier A. Determination of serotonin release from platelets by HPLC and ELISA in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: comparison with reference method by [14C]-serotonin release assay. J Thromb Haemost. 2006;4: 1136–1139.
55. Lee DP, Warkentin TE, Denomme GA, Hayward CPM, Kelton JG. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. Br J Haematol. 1996;95:724–731.
56. Gobbi G, Mirandola P, Tazzari PL, et al. Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets. Br J Haematol. 2003;121:892–896.

PODÍL AUTORŮ NA PŘÍPRAVĚ RUKOPISU

PS – sepsání rukopisu
IF, PD – revize rukopisu
Všichni autoři souhlasí s finální verzí rukopisu.

GRANTOVÁ PODPORA

Práce vznikla za podpory MZ ČR-RVO (FNHK, 00179906).

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Doručeno do redakce dne: 8. 4. 2022.
Přijato po recenzi dne: 20. 5. 2022.

RNDr. Petr Sadílek, Ph.D.
IV. interní hematologická klinika
FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: petr.sadilek@fnhk.cz