

Assoziation verschiedener Immunoassays, ELISA und ID-PaGIA, mit dem Heparin-induzierten Thrombozytenaktivierungstest bei Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Isabelle Moser, BMA 17-20 A

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Forschungsgruppe TAPE, Universitätsinstitut für Klinische Chemie, Universitätsspital Bern Inselspital

1. Zusammenfassung

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) bringt immer noch einige Probleme in der Diagnostik mit sich, da ein schnelles und zuverlässiges Diagnosestellungsverfahren noch nicht etabliert wurde. Um dieses Problem zu lösen, beschäftigt sich die prospektive, multizentrische Kohortenstudie «TORADI-HIT» mit einem Methodenvergleich in der HIT-Diagnostik. Das Ziel ist es, ein effektives Vorhersagemodell für die HIT zu entwickeln, damit das Verpassen oder eine Überdiagnose eingedämmt werden kann. Es wurde von 505 Proben der Partikel-Gel Immunoassay (ID-PaGIA) gemacht und die Resultate in einem Histogramm dargestellt. Diese Ergebnisse wurden mit den jeweiligen Resultaten des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) in ein X/Y-Koordinatensystem eingetragen und der Rangkorrelationskoeffizient (r) berechnet. Zusätzlich wurden die Resultate dieser beiden Messmethoden mit dem Heparin-induzierten Thrombozytenaktivierungstest (HIPA) abgeglichen und ein Scattergramm erstellt. Diese beiden Methoden wurden einander gegenübergestellt und je die epidemiologischen Kennzahlen ermittelt.

Im Histogramm konnte kein symmetrischer Kurvenverlauf festgestellt werden. Es wurde eine Korrelation von 0.4923 ermittelt. Es besteht eine bessere Assoziation zwischen der ELISA-Methode und dem HIPA als zur ID-PaGIA-Methode. Dies zeigt sich bei seiner Sensitivität von 96,96% und Spezifität von 86,86%. Der ID-PaGIA erkennt alle HIT-positiven Proben zuverlässig, was seine Sensitivität von 100% widerspiegelt. Jedoch zählt er 143 Proben als falsch HIT-positiv und trägt eine Spezifität von 70,13%. Eine alleinige Diagnosestellung der HIT ist durch den ID-PaGIA oder ELISA nicht möglich, weswegen sie als Bestätigungstests ungeeignet sind. Daher sollte zwingend der HIPA als Bestätigungstest erfolgen, um eine HIT zuverlässig zu diagnostizieren. In Zukunft sollte ein geeignetes und zuverlässiges Diagnosestellungsverfahren etabliert werden.

2. Einleitung

Die HIT ist eine unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung bei der intravenösen Gabe von unfraktioniertem Heparin oder niedermolekularem Heparin. Ein deutlicher Thrombozytenabfall geschieht normalerweise 5 bis 10 Tage nach Therapiebeginn. Dies geschieht durch die Entstehung von Antikörper gegen Heparin/PF4-Komplexe. Daraus resultiert, dass es zu einer lebensbedrohlichen thromboembolischen Komplikation kommen kann [1].

In der HIT-Diagnostik wird als erstes die Vortestwahrscheinlichkeit durch den 4Ts Score berechnet. Dies ist ein Punktesystem, welches jedoch eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit hat, da er von unterschiedlichen Ärztinnen und Ärzten durchgeführt wird [2].

Aus Sicht des Labors wird der ELISA, welcher nur in grösseren Labors und jeweils nur einmal pro Woche durchgeführt wird angeboten. Der HIPA gilt als Goldstandard, jedoch ist er sehr zeitintensiv und wird in der Schweiz nur am Universitätsspital Bern angeboten. Zudem werden immunologische Schnelltests, wie der ID-PaGIA, welcher ein Screening-Test ist und in seiner Reproduzierbarkeit ebenfalls eingeschränkt ist, da er visuell abgelesen wird, angeboten [3].

Daher beschäftigt sich die «TORADI-HIT» Studie mit dem Methodenvergleich in der HIT-Diagnostik. Das Ziel der prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie ist es, ein effektives Vorhersagemodell für die HIT zu entwickeln, damit das Verpassen oder eine Überdiagnose eingedämmt werden kann [4].

3. Ziel und Fragestellungen

Das Ziel ist die Beschreibung und Überprüfung der Assoziation der Messmethoden ELISA und ID-PaGIA mit dem Goldstandard HIPA bei Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf eine HIT.

Die dazu gestellten Fragen lauten:

1. Wie ist die Verteilung der ID-PaGIA-Messwerte bei einem Kollektiv von Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf eine HIT?
2. Wie korreliert diese Verteilung mit den Messwerten einer ELISA-Methode?
3. Wie ist der diagnostische Wert der ID-PaGIA-Methode im Vergleich mit der ELISA-Methode für die Diagnose einer HIT?

6. Diskussion

Fragestellung 1: Es liegt kein symmetrischer Kurvenverlauf vor, da die meisten Ergebnisse negativ sind oder einen niedrigen Titer aufweisen. Ein möglicher Grund dafür könnte die nicht stetige Verteilung der Ergebnisse sein.

Fragestellung 2: Die Korrelation zeigt nur einen mittelstarken Zusammenhang zwischen den beiden Messmethoden. Unter anderem konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen diesen zwei Variablen festgestellt werden. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass der ID-PaGIA ein semi-quantitatives Resultat und der ELISA ein quantitatives Resultat generiert.

Fragestellung 3: Der ID-PaGIA erkennt alle Proben, welche einen hohen Titer von oder über 1:32 haben zuverlässig als HIT-positiv. Im Bereich des niedrigen und intermediären Risikos einer HIT ist die ELISA-Methode aus Sicht des Scattergramms zuverlässiger. Die ELISA-Methode zählt im Bereich des niedrigen und intermediären Risikos rund 66% weniger Proben als falsch positiv als die ID-PaGIA-Methode. Es zeigt sich, dass eine bessere Assoziation zwischen ELISA und HIPA herrscht. Da der ELISA zuverlässigere Resultate in den Bereichen des intermediären und niedrigen Risikos generiert. Über das ganze Probenkollektiv gesehen hat die ELISA-Methode im Vergleich mit dem ID-PaGIA weniger falsch positive Ergebnisse generiert.

Fazit/Outlook Eine alleinige Diagnosestellung der HIT durch den ID-PaGIA oder ELISA ist nicht möglich. Es sollte zwingend ein Bestätigungstest wie der HIPA erfolgen, um eine HIT zuverlässig zu diagnostizieren. In Zukunft muss sich die Forschung mit einem Test beschäftigen, welcher zuverlässig, weitverbreitet und rund um die Uhr verfügbar ist.

4. Material, Methodik, Vorgehen

Es wurde dazu das ID-PaGIA Heparin/PF4 Antibody Testkit von BioRad verwendet. Es sind 3 ID-Karten, «ID-PaGIA Heparin/PF4 Antibody Test» Particles und eine negative und positive Kontrolle enthalten. Zudem wurde das ID-Diluent 2 von BioRad benötigt, damit die Titerstufen bestimmt werden konnten [5]. Es wurde ein Probenkollektiv von 505 Proben verwendet, welche von drei Studienzentren stammen.

ID-PaGIA: Immunoassay, welcher Aggregate bildet durch Antigen-Antikörper-Komplexe. Mithilfe einer Gelfiltrationsmatrix wird ein qualitatives Ergebnis generiert und durch die Titration ein semi-quantitatives [5].

ELISA: Immunoassay, Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, welche mit einem Konjugat und chromogenen Substrat sichtbar gemacht werden [6].

HIPA: Wird auf einer 96-Wellplatte mit gesunden Thrombozyten durchgeführt. In jeder Vertiefung befinden sich jeweils zwei magnetische Metallkügelchen, welche durch die Rotation eine allfällige Aktivierung der Thrombozyten durch vorhandenen HIT-Antikörper herbeiführen [7].

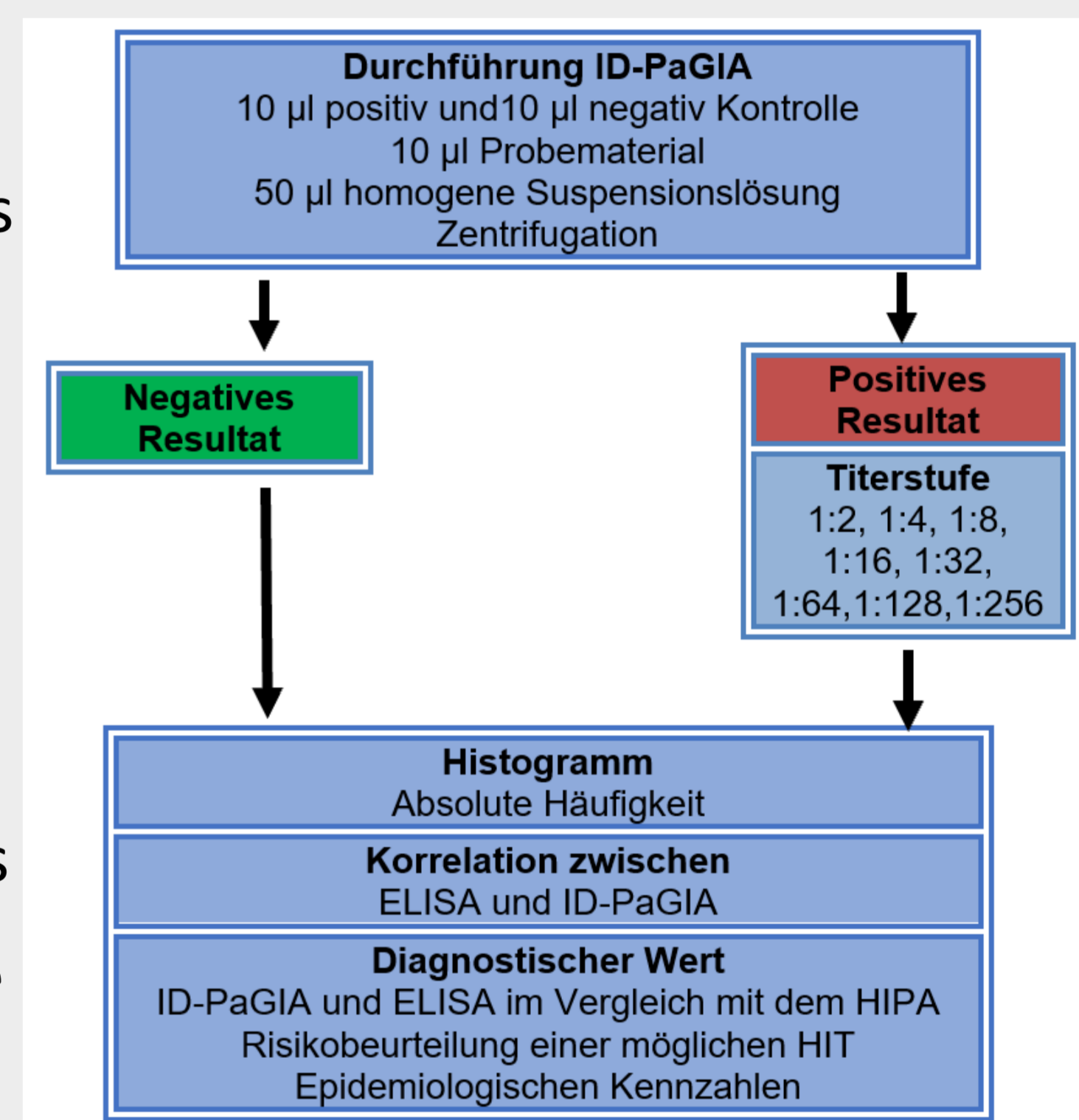


Abb. 4.1 Vorgehen in Form eines Flussdiagramms (Moser, 2020)

5. Ergebnisse/Resultate

Die Ergebnisse des Probenkollektivs sind nicht normal verteilt. Es wurde eine Korrelation von 0.4923 zwischen dem ID-PaGIA und ELISA ermittelt. Es besteht eine bessere Assoziation zwischen der ELISA-Methode und dem HIPA als zur ID-PaGIA-Methode, welches sich auch bei seiner Sensitivität von 96,96% und Spezifität von 86,86% zeigt. Der ID-PaGIA erkennt alle HIT-positiven Proben zuverlässig, was seine Sensitivität von 100% widerspiegelt. Jedoch zählt er auch 143 Proben als falsch HIT-positiv und trägt eine Spezifität von 70,13%.

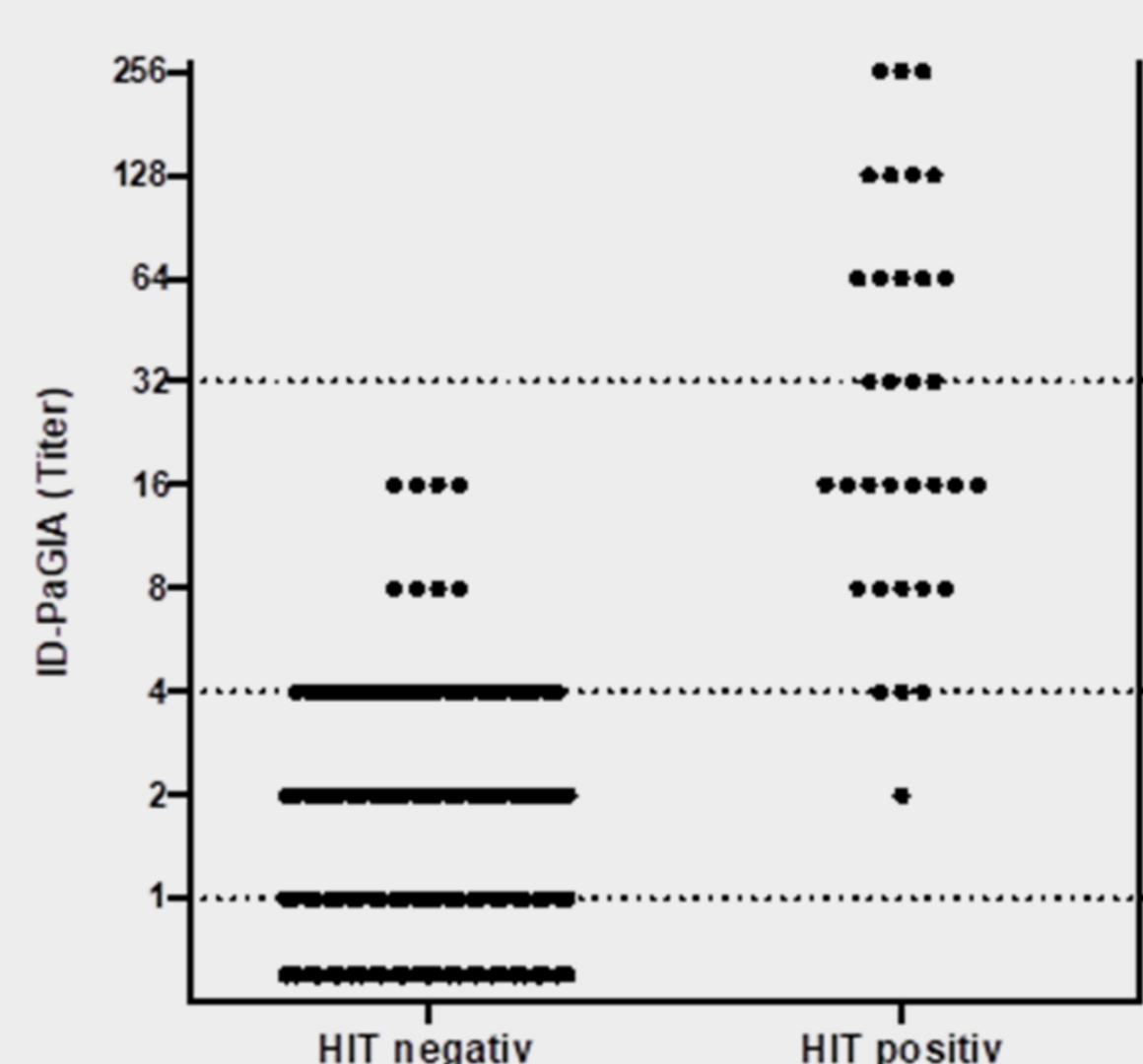


Abb. 5.1 Scattergramm: Verteilung der ID-PaGIA-Messwerte eingeteilt in HIT-negative und HIT-positive Ergebnisse und die Zuteilung des HIT-Risikos (Moser, 2020)

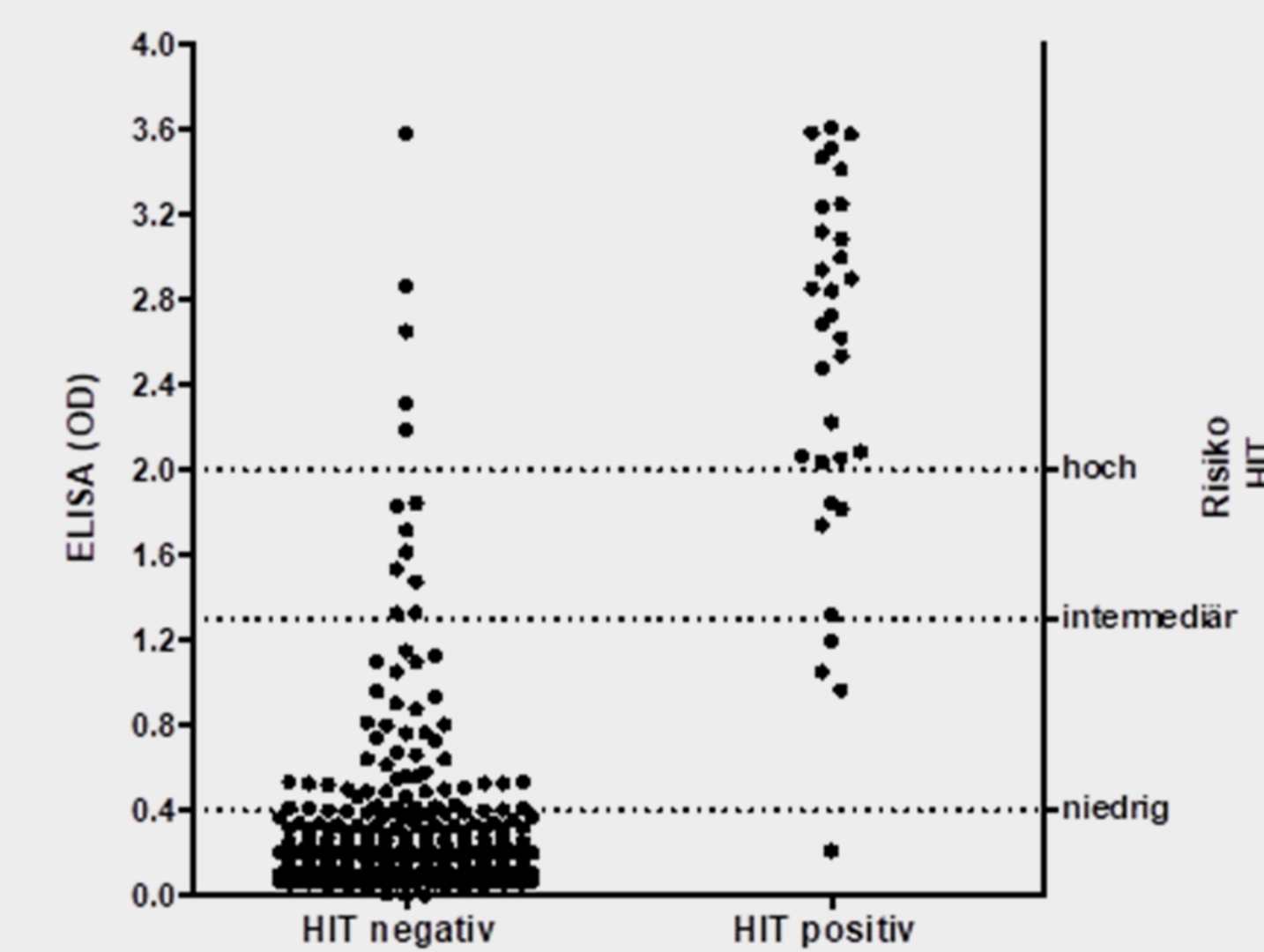


Abb. 5.2 Scattergramm: Verteilung der ELISA-Messwerte eingeteilt in HIT-negative und HIT-positive Ergebnisse und die Zuteilung des HIT-Risikos (Moser, 2020)

Referenzen

- [1] Bakchoul, T. & Greinacher, A. (2012). Recent advances in the diagnosis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *sage journals*, 3(4), 237-251. Abgerufen von <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2040620712443537> [2] Nagler, M., Fabbro, T. & Wuillemin, W. A. (2011). Prospective evaluation of the interobserver reliability of the 4Ts score in patients with suspected heparin-induced thrombocytopenia. *journal of thrombosis and haemostasis*, 10(1), 151-152. Abgerufen von <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1538-7836.2011.04552.x> [3] Nagler, M. & Bakchoul, T. (2016). Clinical and laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 116(5), 823-843. Abgerufen von <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27604316/> [4] Nagler, M. (2018). TORADIHIT: Towards precise and rapid diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: a prospective, multicentre cohort study. *International Society on Thrombosis and Haemostasis* Abgerufen von <https://www.isth.org/page/toradihit#back> [5] BioRad. (2014). ID-PaGIA Heparin/PF4 Antibody Test. *Packungsbeileger* [6] IMMUCOR. (2017). PF4 IgG Test. *Packungsbeileger* [7] Zentrum für Labormedizin, ZLM. Methodenvorschrift, HIPA, 2018

Abbildungen

- Abb. 4.1 Moser, I. (2020). *Vorgehen in Form eines Flussdiagramms*. Bern: Universitätsspital
 Abb. 5.1 Moser, I. (2020). *Scattergramm: Verteilung der ID-PaGIA-Messwerte eingeteilt in HIT-negative und HIT-positive Ergebnisse und die Zuteilung des HIT-Risikos*. Bern: Universitätsspital
 Abb. 5.2 Moser, I. (2020). *Scattergramm: Verteilung der ELISA-Messwerte eingeteilt in HIT-negative und HIT-positive Ergebnisse und die Zuteilung des HIT-Risikos*. Bern: Universitätsspital