Propositions pour le diagnostic biologique des thrombopénies induites par l'héparine (TIH)

Rédacteurs : Dorothée FAILLE, Caroline VAYNE, Anne BAUTERS, Emmanuel DE MAISTRE, Olivier FEUGEAS, Yves GRUEL, Christine MOUTON, Brigitte TARDY, Nadine AJZENBERG, Claire POUPLARD

Relecteurs :

42 questions et 115 propositions utiles pour le diagnostic biologique de TIH :

Table des matières

INTRODUCTION 5

A. PRE-ANALYTIQUE 6

1. Chez quels patients doit-on effectuer des tests biologiques à la recherche d'une TIH ? 6

2. Quelles variables pré-analytiques liées à l'échantillon du patient faut-il maitriser pour la réalisation des tests diagnostiques d'une TIH ? 7

a. Echantillon du patient 7

b. Conditions d'acheminement et de conservation des échantillons 9

c. Interférence des traitements anticoagulants et antiplaquettaires 10

B. TESTS IMMUNOLOGIQUES 12

1. Généralités 12
a. Définition et classification des tests immunologiques 12
b. Notions de sensibilité/spécificité/valeurs prédictives positive et négative 13
2. Matrice : faut-il utiliser du sérum ou plasma ? Quelles sont les interférences ? 14
3. Quels sont les éléments de criticité des tests immunologiques ? 15
4. Quels contrôles de qualité pour les tests immunologiques ? 15
a. Contrôle interne de qualité (CIQ) 15
b. Evaluation externe de qualité (EEQ) 16
5. Quels tests immunologiques doit-on réaliser en pratique ? 17
a. IgG spécifiques ou IgG, A, M ? 17
b. Quelle place pour le test de neutralisation à l'héparine ? 18
c. Peut-on se contenter d'un test de dépistage rapide (qualitatif/semi quantitatif) ? 18
6. Interprétation des résultats 19
a. Faut-il appliquer les seuils de positivité du fournisseur ? 19
b. Faut-il interpréter le titre apparent d'anticorps mesuré avec un test immunologique ? 20
c. Quel seuil appliquer pour les patients post- circulation extra-corporelle (CEC) ou sous ECMO (*extracorporeal membrane oxygenation*) ? 21
7. Doit-on s'assurer de la disparition des anticorps anti-FP4/H à distance de la phase aigüe ? 23
C. Tests fonctionnels 24
1. Quels sont les tests d'activation plaquettaire aujourd'hui disponibles ? 24
2. Quelles variables pré-analytiques liées au donneur de plaquettes faut-il maîtriser lors de la réalisation de ces tests 25
a. Doit-on sélectionner les donneurs ? Si oui, comment ? 25
b. Faut-il tester systématiquement les plaquettes de plusieurs donneurs ? Si oui, Combien ? 27
c. Quel délai entre le prélèvement du donneur et la réalisation des tests ? 28
3. Quels sont les points méthodologiques critiques à maîtriser ? 28
a. Quel délai entre la suspicion de TIH et la réalisation d'un test fonctionnel ? 28
b. Quelles concentrations d'héparine doivent être testées ? 29

c. Quelles indications à tester d'autres molécules hépariniques ou de structure proche (énoxaparine ou autre HBPM ou danaparoïde sodique) ? 31

d. Le test doit-il être réalisé sur du plasma ou du sérum ? Les échantillons doivent ils êtres chauffés à 56°C ? 32

e. Quelle place pour les échantillons-contrôles : CIQ et EEQ ? 33

4. Quelles sont les performances comparées des différents tests d'activation plaquettaire ? 35

a. Quelle place pour les tests sensibilisés par ajout de F4P : pour quels patients ? Quelles concentrations de F4P ? Quelle origine du F4P ? 35

b. Les tests sur plaquettes autologues : est-ce utile ? applicable en pratique ? 37

c. Les tests sur plaquettes lavées : sont-ils réservés aux centres experts ? 37

5. Quelle méthodologie adopter pour la réalisation des tests d'activation plaquettaire réalisés en plaquettes lavées (tests HIPA et SRA) ? 40

a. Tests de libération de sérotonine radiomarquée (SRA) 40

b. Tests d'activation des plaquettes induite à l'héparine (HIPA) 42

6. Quelle méthodologie adopter pour la réalisation des tests d'activation plaquettaire réalisés en PRP (tests d'agrégation plaquettaire, cytométrie en flux) ? 44

a. Tests d'agrégation plaquettaire (TAP) 44

b. Tests de cytométrie en flux (CMF) 48

7. Quelle méthodologie adopter pour la réalisation des tests d'activation plaquettaire réalisés sur sang total ? 50

a. Heparin Induced Multi Electrode Aggregometry (HIMEA) 50

D. Stratégie diagnostique 53

1. Quelle stratégie diagnostique adopter hors chirurgie cardiaque/ECMO ? 53

a. Algorithmes décisionnels 53

b. Quelle attitude adopter chez un patient avec des résultats de tests immunologiques et d'activation plaquettaire discordants ? 54

c. Quelles sont les bonnes pratiques d'utilisation du test rapide qualitatif (SticExpert®) dans cette stratégie diagnostique ? 56

d. Quelles sont les bonnes pratiques d'utilisation des tests immunologiques semi-quantitatifs dans cette stratégie diagnostique ? 57

2. Quelle stratégie diagnostique adopter chez un patient après circulation extra-corporelle ou sous ECMO ? 58

a. Recommandations générales 58

b. Description 59

INTRODUCTION

La Thrombopénie Induite à l'Héparine (TIH) est une complication rare mais potentiellement grave du traitement par l'héparine et ses dérivés. Son diagnostic repose à la fois sur des critères cliniques et biologiques. L'objectif de ce document est de fournir aux biologistes des recommandations de bonne pratique sur la réalisation des tests biologiques contribuant au diagnostic de la TIH ainsi que sur leur interprétation.

A. PRE-ANALYTIQUE

1. Chez quels patients doit-on effectuer des tests biologiques à la recherche d'une TIH ?

Propositions

- La probabilité clinique de la TIH doit être évaluée avant la prescription de tests biologiques.
- La réalisation d'un test biologique à la recherche d'une TIH est recommandée en cas de probabilité clinique intermédiaire ou élevée.
- La réalisation d'un test biologique à la recherche d'une TIH n'est pas recommandée en cas de probabilité clinique faible de TIH sauf en cas de doute sur la fiabilité des renseignements cliniques obtenus.
- En cas de probabilité clinique faible et de décision du biologiste de ne pas réaliser de test, cette démarche doit être tracée dans le dossier du patient.

Rationnel

Une thrombopénie ou une baisse de la numération plaquettaire (NP) est fréquemment observée chez un patient traité par héparine alors qu'il ne s'agit d'une TIH que dans de très rares cas. Le risque de TIH n'est pas identique chez tous les patients et trois niveaux de risque ont été définis (Gruel et al. 2020).

Le **score des 4Ts** (*Thrombocytopenia*, *Timing*, *Thrombosis*, *oThers cause of thrombocytopenia*) a largement été validé et son utilisation est recommandée par la Société Américaine d'Hématologie (Linkins et al. 2012; Cuker et al. 2018; Gruel et al. 2020) (***Tableau Supplémentaire 1 « Score des 4Ts »***). Le score des 4Ts permet de définir 3 niveaux de risque de TIH. Un score faible (0-3 points) permet d'exclure la TIH avec une valeur prédictive négative (VPN) de 99,8% et rend inutile la réalisation de tests biologiques. A l'inverse, des scores intermédiaires ou élevés ont une faible valeur prédictive positive et doivent motiver la prescription de tests biologiques pour confirmer la TIH (Nagler et al. 2016; Pishko and Cuker 2021).

La réalisation du score des 4Ts est difficile pour certaines catégories de patients. Il convient de prendre le temps de remplir les items avec des données objectives (chronologie du traitement par héparine et des numérations plaquettaires (NP)), en particulier en cas de transfert du patient d'un établissement à un autre.

Chez les patients ayant subi une **chirurgie cardiaque avec circulation extra-corporelle (CEC)**, le score 4Ts ne doit pas être utilisé. Il est préférable, et plus efficace, d'analyser le profil d'évolution de la NP après la CEC (Lillo-Le Louët et al. 2004; Pouplard et al. 2005). Ainsi, un profil d'évolution de la NP « biphasique » est équivalent à un risque élevé de TIH. Ce profil correspond à une correction, même partielle, de la NP post-opératoire, suivie d'une diminution brutale et retardée de celle-ci. Certains patients présentent en post-CEC une absence de correction de la NP après le 5ème jour post-opératoire. Ce profil dit « monophasique » indique une probabilité intermédiaire de TIH.

Dans le contexte d'une **ECMO (*extracorporeal membrane oxygenation*)**, le score des 4Ts est également difficile à appliquer en raison de la survenue fréquente d'une thrombopénie précoce dès la pose de l'ECMO. La thrombose du circuit ou de filtres ou une consommation du fibrinogène plasmatique doit faire rechercher une TIH d'autant plus si la NP reste basse (Vayne et al. 2019a).

Le **HEP score** (*HIT Expert Probability*) (Cuker et al. 2010), plus récent, a montré une plus grande spécificité que le score des 4Ts en soins intensifs, mais il est plus complexe à utiliser et nécessite une validation à une plus grande échelle (Pishko and Cuker 2021).

Un autre score de prédiction d'une TIH a récemment été proposé en France par le groupe TIH du Groupe Français d'étude sur l'Hémostase et la Thrombose (GFHT, devenu Société Française de Thrombose et d'Hémostase SFTH en 2023) et intègre 7 critères : traitement par héparine non fractionnée (HNF), traitement à dose curative, suspicion de TIH dans un délai de 5 à 21 jours après introduction d'héparine, chute de la NP > 40 % dans un délai de 6 jours, chirurgie cardiaque avec CEC, traumatisme majeur, évènement thrombotique artériel ou veineux (Tardy-Poncet et al. 2021a). L'utilisation pratique de ce score et ses performances n'ont pas encore été évaluées par une étude indépendante.

2. Quelles variables pré-analytiques liées à l'échantillon du patient faut-il maitriser pour la réalisation des tests diagnostiques d'une TIH ?

a. Echantillon du patient

Propositions

- Les tests diagnostiques peuvent être réalisés sur plasma citraté ou sur sérum mais ne peuvent pas être réalisés sur CTAD (citrate, théophylline, adénosine et dipyrimadole).
- Il est recommandé de réaliser les prélèvements à la phase aigüe de la suspicion de TIH.

- Il est recommandé de réaliser les prélèvements en quantité suffisante en prévision des tests fonctionnels (3 mL de plasma ou sérum).

Rationnel

La TIH est une pathologie immune principalement liée à la présence d'anticorps d'isotype IgG dirigés contre des complexes formés par le facteur 4 plaquettaire et l'héparine (anti-F4P/H). Classiquement, les anticorps anti-F4P/H disparaissent progressivement après l'arrêt du traitement par héparine. Ainsi, la durée médiane de persistance des anticorps après un épisode de TIH varie selon le test réalisé : 50 jours si les anticorps sont recherchés par un test fonctionnel et 85 jours si le test réalisé est un test immunologique (Warkentin and Kelton 2001).

L'analyse de la littérature rapporte une utilisation indifférente de plasma (citrate de sodium) ou de sérum et ceci quelle que soit la méthode utilisée (***Tableau supplémentaire 2 « Caractéristiques des tests immunologiques »)***. Pour les tests fonctionnels, l'échantillon est le plus souvent chauffé à 56°C pendant au moins 30 minutes afin de détruire les éventuelles traces de thrombine qui risquent d'induire une activation plaquettaire non spécifique de l'héparine (**cf § C.3.d***et* ***Tableau 1 « Matrice et pré-chauffage de l'échantillon dans les tests fonctionnels »***). Les tests fonctionnels ne peuvent pas être réalisés sur plasma prélevé sur CTAD en raison de la présence d'inhibiteurs plaquettaires.

Tableau 1. Matrice et pré-chauffage de l'échantillon dans les tests fonctionnels.

Test fonctionnel	Références	Matrice	Chauffage à 56°C	Durée
SRA	(Sheridan et al. 1986)	Plasma ou sérum	Oui	30 minutes
	(Warkentin et al. 2015a)	Plasma ou sérum	Oui	30 minutes
	(Chong et al. 1993)	Plasma ou sérum	Oui	30 minutes
	(Morel-Kopp et al. 2012)	Plasma ou sérum	Oui	45 minutes
	(Galea et al. 2013)	Sérum	Oui	60 minutes
HIPA	(Greinacher et al. 1991)	Sérum	Oui	45 minutes
	(Eichler et al. 1999)	Sérum	Oui	30 minutes
	(Gonthier et al. 2021)	Plasma	Oui	30 minutes
	(Poley and Mempel 2001)	Sérum	Non	ND
TAP	(Greinacher et al. 1994)	Sérum	Non	ND
	(Chong et al. 1993)	Plasma ou sérum	Oui	30 minutes
	(Pouplard et al. 1999a)	Plasma	Non	ND
	(Galea et al. 2013)	Plasma	Non	ND

	(Brodard et al. 2020)	Plasma	Non	ND
Cytométrie en flux	(Tomer 1997)	Plasma	Non	ND
	(Poley and Mempel 2001)	Plasma	Non	ND
	(Garritsen et al. 2014)	Sérum	Non	ND
	(Mullier et al. 2014)	Sérum	Non	ND
	(Maličev et al. 2016)	Sérum	Non	ND
	(Maeda et al. 2017)	Plasma ou sérum	Oui	30 minutes
	(Cipok et al. 2019)	Plasma ou sérum	Non	ND
	(Althaus et al. 2019)	Sérum	Oui	30 minutes
HIMEA	(Morel-Kopp et al. 2016)	Plasma ou sérum	Non	ND
	(Galea et al. 2013)	Plasma	Non	ND
	(Minet et al. 2014)	Plasma ou sérum	Non	ND
	(Jin et al. 2019)	Sérum	Non	ND

HIMEA, *Heparin Induced Multi-Electrode Aggregometry*; HIPA, *Heparin Induced Platelet Aggregation*; ND, non déterminé ; SRA, *Serotonin Release Assay* ; TAP, Test d'Agrégation Plaquettaire.

b. Conditions d'acheminement et de conservation des échantillons

Propositions

- Il est possible d'acheminer le plasma ou le sérum vers le laboratoire en charge des examens à température ambiante, les anticorps étant très stables dans cette condition.

- Le plasma ou sérum doit être décanté et aliquoté en plusieurs fractions afin de limiter le nombre de cycles de congélation/décongélation lors de la réalisation des tests

- Dans l'attente de la réalisation des tests diagnostiques, les échantillons de plasma ou de sérum doivent être conservés à une température inférieure ou égale à -20°C.

Rationnel

Les tests diagnostiques de la TIH sont basés sur la détection d'immunoglobulines anti-F4P/H présentes dans le plasma ou le sérum du patient. Selon l'organisation mondiale de la santé (WHO), les IgG sont stables 4 mois entre 20 et 25°C, 8 mois entre +4 et +8°C et 8 mois à -20°C (World Health Organization. 2002). Les échantillons de plasma ou de sérum peuvent être acheminés à température ambiante vers le laboratoire qui effectuera les tests. Enfin, des travaux ont montré une stabilité des immunoglobulines pendant 3 ans si elles sont conservées à -80°C (Michaut et al. 2014).

Les cycles de congélation/décongélation favorisent la formation d'agrégats des immunoglobulines (Horn et al. 2019) qui peuvent être responsables d'une activation médiée par FcγRIIA mais non dépendante de l'héparine (Arman and Krauel 2015). Il est donc conseillé d'aliquoter les échantillons du patient afin de limiter le nombre de cycles de congélation/décongélation.

c. Interférence des traitements anticoagulants et antiplaquettaires

Propositions

- Il est proposé, si le prélèvement est réalisé alors que le patient est encore sous héparine, de mesurer l'activité anti-Xa afin d'aider à l'interprétation des tests fonctionnels.

- Il est proposé de réaliser les prélèvements, dans la mesure du possible, avant tout traitement par danaparoïde, compte-tenu de sa potentielle interférence avec les tests fonctionnels.

Rationnel

Lors de la réalisation des tests fonctionnels, l'échantillon du patient est dilué du ½ jusqu'au $^1/_{6^{ème}}$ selon les méthodes utilisées (Pouplard et al. 2022). L'interférence analytique des traitements antithrombotiques pourra donc être plus ou moins importante.

La présence d'héparine dans le prélèvement peut impacter sa concentration finale dans le test, avec un risque de réaction positive dans la condition sans héparine. Des travaux ont montré que le traitement des échantillons par l'héparinase peut augmenter la spécificité du test fonctionnel (Pötzsch et al. 1996) mais ne permet pas toujours d'abolir l'activation plaquettaire observée à la condition sans héparine (Prechel et al. 2005). Des travaux plus récents ont montré qu'une activation plaquettaire peut être observée chez certains patients en l'absence d'héparine et que de tels profils étaient en faveur d'une pathogénicité plus forte des anticorps (Rollin et al. 2022).

Une attention particulière doit être portée aux patients traités par danaparoïde sodique. En effet, ce traitement, à la différence du fondaparinux ou de l'argatroban, interfère sur la formation des complexes immuns et pourrait inhiber les tests d'activation plaquettaire (Krauel et al. 2008).

L'adénosine diphosphate (ADP) et son récepteur P2Y12 jouent un rôle majeur dans l'activation et l'agrégation des plaquettes induites par les anticorps anti-F4P/H, en favorisant l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps de TIH (Polgár et al. 1998). Il a été montré que la

présence de ticagrelor dans le prélèvement, un inhibiteur réversible du récepteur P2Y12, peut inhiber les tests fonctionnels de la TIH (Eekels et al. 2020).

Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que les médicaments anti-GPIIbIIIa inhibent l'agrégation plaquettaire induite par les anticorps anti-F4P/H sans inhiber totalement la libération du contenu des granules denses (Polgár et al. 1998). Enfin, l'inhibition du récepteur au thromboxane ne modifie pas l'activation plaquettaire induite par les anticorps anti-F4P/H (Polgár et al. 1998). La connaissance des propriétés pharmacocinétiques des antiplaquettaires est nécessaire lors de la validation des tests fonctionnels (***Tableau 2 « Traitements antiplaquettaires : demi-vie d'élimination et interférence avec les tests fonctionnels »***)

Tableau 2. Traitements antiplaquettaires : demi-vie d'élimination et interférence avec les tests fonctionnels.

	Eptifibatide **Tirofiban**	**Clopidogrel** **Prasugrel**	**Ticagrelor**	**Cangrelor**	**Aspirine/AINS**
Demi-vie d'élimination	2,5h 1,5h	6 à 8,5h	6 à 9h* Métabolite actif 8,5 à 12,5h	3 à 6 min	15 min De < 6h à > 12h
Interférence sur les tests fonctionnels	Oui	Oui	Oui	Non du fait de la demi-vie	Non

*présence prolongée du fait de sa réversibilité et de son métabolite actif

B. TESTS IMMUNOLOGIQUES

1. Généralités

Les tests immunologiques sont utilisés en première ligne pour le diagnostic des TIH puisqu'ils permettent de dépister rapidement la présence d'anticorps anti-F4P/H. Dans ce but, l'utilisation de tests immunologiques présentant une excellente sensibilité (>95 %) est indispensable. En pratique, le recours à des scores de probabilité clinique (score 4Ts) ainsi qu'à des tests immunologiques permet d'exclure la TIH dans de nombreux cas, permettant d'éviter ainsi des traitements médicamenteux inutiles, potentiellement iatrogènes et coûteux (Cuker et al. 2012, 2018).

Le manque de spécificité des tests immunologiques, lié au fait qu'ils détectent les anticorps anti-F4P/H indépendamment de leur capacité à activer les plaquettes, implique le recours à de tests fonctionnels, qui évaluent le caractère activateur des anticorps anti-F4P/H détectés.

Il existe de nombreux tests immunologiques commerciaux qui diffèrent selon leur caractère qualitatif ou semi quantitatif, automatisé ou non, ainsi que selon leur principe, réactifs, seuil de positivité ou mode de détection. Ces éléments sont autant de facteurs de variabilité qui expliquent les différences de performance des tests immunologiques (Nagler et al. 2016; Sun et al. 2016).

a. Définition et classification des tests immunologiques

Le ***Tableau Supplémentaire 2*** regroupe les différents tests immunologiques actuellement commercialisés en France et leurs principales caractéristiques techniques.

Tests rapides

Ce sont des tests accessibles à tous les laboratoires de biologie, pouvant être réalisés de façon unitaire, avec un rendu de résultat en **moins d'une heure.** Les tests rapides de dépistage des anticorps anti F4P/H sont **qualitatifs** (LFIA) ou **semi-quantitatifs** (unités arbitraires ou UA). Le principe des tests qualitatifs repose soit sur l'immunochromatographie sur membrane (*lateral-flow immunoassay,* LFIA, SticExpert®), celui des tests rapides semi-quantitatifs repose soit sur la chimiluminescence (*chemiluminescent immunoassay*, CLIA, AcuStar®) ou l'immunoturbidimétrie (*latex immunoassay*, LIA, HemosIL®). Les tests rapides de dépistage doivent être associés à la réalisation d'un score de probabilité clinique. Ils sont utilisés uniquement dans un contexte de suspicion de TIH à la phase aigüe.

Tests ELISA

La recherche et le dosage semi-quantitatif des anticorps anti-F4P/H sont réalisés sur plaque de microtitration 96 puits sécables, avec un rendu de résultats en **3 à 4 heures**. Ces plaques sont sensibilisées par des complexes F4P/H ou F4P/PVS (polyvinylsulfonate) immobilisés au fond des puits. Un des tests comporte du F4P apporté par un lysat plaquettaire sous forme liquide. La révélation est effectuée par un immuno-conjugué couplé à une enzyme capable de cliver un substrat en dérivé coloré. La lecture nécessite un lecteur de plaque et le résultat est exprimé en **absorbance ou densité optique (DO)**. En fonction du test, l'immunoconjugué est dirigé spécifiquement contre les IgG humaines (IgG spécifique) ou est capable de détecter l'ensemble des immunoglobulines IgG/A/M (polyspécifique).

b. Notions de sensibilité/spécificité/valeurs prédictives positive et négative

Le ***Tableau Supplémentaire 3*** regroupe les différents tests immunologiques actuellement commercialisés en France et leurs performances décrites dans la littérature.

Pour un test de dépistage, il est attendu une excellente sensibilité et valeur prédictive négative, souvent au détriment de la spécificité. Deux grandes méta-analyses ont étudié les performances des tests immunologiques, et notamment des tests rapides, pour la détection des anticorps de TIH (Nagler et al. 2016; Sun et al. 2016). L'étude de Sun rapporte une excellente sensibilité des tests rapides (96 à 100 %) mais une spécificité très variable (68 à 94 %). Ces résultats sont confirmés par une méta-analyse qui a également étudié l'impact des seuils de positivité (bas, intermédiaire, élevé) sur les performances des tests. La plupart des études ayant évalué les performances des tests immunologiques présentent des limites méthodologiques qui doivent être soulignées (Nagler et al. 2016). Tout d'abord ces études ont été réalisées par des centres experts pour le diagnostic des TIH. De plus, le critère établi pour définir une TIH n'est pas identique dans les études et les effectifs utilisés ainsi que la proportion de TIH confirmées sont très variables. Certaines situations cliniques comme la chirurgie cardiaque avec CEC et l'assistance circulatoire de type ECMO sont associées à une immunisation contre le F4P modifié chez 30 à 50 % des patients, et donc à une moindre spécificité des tests immunologiques (Pouplard et al. 2005; Vayne et al. 2019a), mais peu d'études tiennent compte de ce type de population dans leur évaluation (Van Hoecke and Devreese 2012; Leroux et al. 2014).

Bien que la connaissance de la sensibilité et de la spécificité de chaque test soit essentielle, en pratique clinique, il est également nécessaire de savoir comment le résultat d'un test immunologique prédit la maladie. A ce titre, les valeurs prédictives positives et négatives

(VPP/VPN) sont souvent utilisées, ce qui n'est pas adapté pour une pathologie rare comme la TIH (Deeks and Altman 2004).

2. Matrice : faut-il utiliser du sérum ou plasma ? Quelles sont les interférences ?

Propositions

- Les tests immunologiques peuvent être réalisés sur plasma ou sur sérum.
- Lors de la réalisation de tests immunologiques, il est recommandé de tenir compte des potentielles interférences analytiques décrites dans les notices fournisseur pouvant fausser l'interprétation des résultats.
- Il n'est pas recommandé de diluer l'échantillon au-delà de ce qui est recommandé par le fournisseur, si le résultat de la première mesure est supérieur au seuil maximal de quantification.

Rationnel

Comme illustré dans le ***Tableau Supplémentaire 2 « Caractéristiques des tests immunologiques »*** (colonne « Nature de l'échantillon »), les tests immunologiques recherchant les anticorps anti-F4P/H peuvent aussi bien être effectués sur plasma (citraté) ou sur sérum. Certains tests tiennent compte du facteur de dilution au 1/10ème apporté en plasma. Ces tests peuvent également être effectués indépendamment de la présence d'héparine dans le prélèvement. Les potentielles interférences analytiques liées aux propriétés de l'échantillon et fournies dans les notices fournisseur sont listées pour chaque test dans le ***Tableau Supplémentaires 2 « Caractéristiques des tests immunologiques »*** (colonne « Interférences analytiques »).

En raison d'une pré-dilution de l'échantillon très importante dans les tests ELISA, les interférences sont négligeables.

Compte-tenu du caractère semi-quantitatif des tests immunologiques, certains auteurs proposent une pré-dilution supplémentaire de l'échantillon du patient pour obtenir une valeur quantifiable en cas de résultat supérieur au seuil de détection ou pour obtenir un titre d'anticorps. Cette démarche s'avère inutile en raison de la non-linéarité des valeurs de résultats obtenues (Warkentin et al. 2015b).

3. Quels sont les éléments de criticité des tests immunologiques ?

Propositions

- Lors de la réalisation de tests immunologiques de type ELISA il est recommandé de :
    - Maitriser la température de la pièce dans laquelle le test est effectué ainsi que les durées d'incubation des réactifs, notamment du substrat.
    - Réaliser la mesure en duplicat pour chaque échantillon de patient afin de s'affranchir de toute erreur liée au caractère manuel de la technique.
- L'interprétation des tests rapides qualitatifs (LFIA) à lecture visuelle doit être réalisée, si possible, par deux observateurs.
- Un doute sur la positivité d'un test rapide qualitatif (LFIA) à lecture visuelle doit amener à considérer le test par défaut positif et à réaliser un test semi-quantitatif.
- En cas de probabilité élevée de TIH, il n'est pas recommandé de réaliser un test rapide qualitatif (LFIA), le diagnostic ne pouvant être exclu si le résultat est négatif.

Rationnel

Les notices fournisseurs des tests ELISA pour la détection des anticorps anti-F4P/H soulignent l'importance du contrôle de la température de la pièce, du respect des temps d'incubation, notamment lors des étapes finales (dépôt du substrat) pour obtenir des résultats fiables. Il est nécessaire de réaliser les tests en duplicate pour sécuriser le rendu du résultat. Le seul test rapide qualitatif actuellement disponible en France (LFIA) possède une lecture visuelle, ce qui est source d'erreur et de discordances de résultats. Une étude multicentrique a montré que les tests rapides qualitatifs présentaient un nombre plus élevé de faux-négatifs que les tests rapides semi-quantitatifs et ELISA, ce qui remet en question leur utilisation comme tests d'exclusion (Liederman et al. 2019). Dans ce contexte, ce test rapide doit être utilisé avec précaution. En cas de probabilité élevée de TIH, un résultat négatif ne permet pas d'exclure le diagnostic de TIH (Leroux et al. 2014).

4. Quels contrôles de qualité pour les tests immunologiques ?

a. Contrôle interne de qualité (CIQ)

Propositions

- Pour le test qualitatif par LFIA, chaque lot réceptionné doit être vérifié au moins une fois à l'aide des CIQ fournis.

- Lors de la réalisation d'un test immunologique semi-quantitatif, il est recommandé d'utiliser le ou les contrôles internes de qualité inclus dans le kit du fournisseur et de ne valider les résultats de la série que si les valeurs obtenues pour le(s) CIQ sont conformes.

Rationnel

Comme indiqué précédemment, de nombreuses variables sont susceptibles d'interférer avec les résultats des tests immunologiques (voir partie « éléments de criticité »). Le passage du ou des CIQ inclus(s) dans le kit lors de la réalisation d'un test immunologique semi-quantitatif permet de s'assurer du bon fonctionnement du système analytique. Les niveaux de CIQ fournisseurs sont souvent dans des valeurs extrêmes, peu adaptées à la zone critique du cut-off fournisseur ou du cut-off d'interprétation clinique.

Concernant le test rapide qualitatif (LFIA), les CIQ (positif et négatif) fournis permettent de vérifier la conformité du lot à réception et peuvent être une aide dans la formation des utilisateurs.

b. Evaluation externe de qualité (EEQ)

Proposition

- Pour tout test immunologique de détection des anticorps anti-F4P/H, il est recommandé de participer à un programme d'évaluation externe de la qualité pour s'assurer de la comparabilité des résultats obtenus avec ses groupes de pairs.

Rationnel

Il existe plusieurs systèmes d'évaluation externe de la qualité concernant les tests immunologiques dédiés à la recherche d'anticorps anti-F4P/H.

ECAT (*External quality Control of diagnostic Assays and Tests*)

L'ECAT utilise un anticorps chimérique de type IgG anti-F4P/H (Kizlik-Masson et al. 2017). Les résultats des EEQ ECAT montrent une importante variabilité des résultats pour un même test d'un centre à l'autre. Sur 3 exercices récents (6 contrôles), le coefficient de variation (CV) des méthodes ELISA varie de 12 % à 25 % pour les DO élevées > 2 ; de 12 % à 30 % pour les DO modérées entre 1 et 2 et de 30 à 60 % pour les DO faibles < 0,2. Sur ces mêmes exercices, le CLIA montre des CV de 12,8 à 20 % pour des UA entre 3 et 11 et le LIA des CV de 20 à 25 %

quel que soit le niveau. Bien que les CV de ces EEQ soient considérés comme acceptables, la fourchette min-max lors de ces évaluations montre une grande dispersion des valeurs. L'expression des résultats par un ratio DO/cut-off ne minore pas la dispersion des résultats.

Dans une étude publiée à partir des résultats de l'ECAT obtenus entre 2014 et 2017, les auteurs montrent que les tests rapides semi-quantitatifs et les ELISA classent > 95 % des échantillons de manière concordante mais avec des CV importants (35 à 50 %) pour les DO positives (Liederman et al. 2019).

Probioqual

Probioqual a proposé en 2022 un EEQ pour les tests immunologiques en utilisant du plasma normal citraté d'origine humaine surchargé en anticorps monoclonal chimérique anti-FP4 (Kizlik-Masson et al. 2017). Avec les tests ELISA (16 % des participants), les 3 campagnes EEQ rapportent 100 % de réponses conformes, que l'échantillon fourni soit négatif, faiblement ou fortement positif. Concernant les résultats rapportés avec les tests rapides (LFIA dans 56 % des cas), une réponse conforme est rapportée dans 90 % des cas, quel que soit l'échantillon testé.

Etude inter-laboratoire

Une étude multicentrique internationale avec 6 centres participants a montré sur 7 échantillons que les méthodes ELISA ont une très bonne concordance qualitative (97,6 %), avec une faible différence de DO d'un centre à l'autre (Eekels et al. 2019)

Il n'existe pas à ce jour d'EEQ associant les tests immunologiques et les tests fonctionnels.

5. Quels tests immunologiques doit-on réaliser en pratique ?

a. IgG spécifiques ou IgG, A, M ?

Proposition

- Il recommandé d'utiliser préférentiellement des tests immunologiques détectant spécifiquement les anticorps anti-F4P/H d'isotype IgG. Ces tests présentent une meilleure spécificité que les tests détectant toutes les classes d'immunoglobulines.

Rationnel

Des systèmes de détection IgG spécifiques des anticorps anti F4P/H ont été développés puisque la grande majorité des anticorps pathogènes sont d'isotype IgG. L'ensemble des études réalisées montre très clairement que le dépistage spécifique des IgG permet d'augmenter la spécificité du diagnostic de TIH, au prix d'une légère perte de sensibilité (Warkentin et al. 2005; Cuker and Ortel 2009; Nagler et al. 2016; Husseinzadeh et al. 2017).

b. Quelle place pour le test de neutralisation à l'héparine ?

Proposition

- Il n'est pas recommandé d'ajouter une étape de neutralisation en présence de fortes concentrations d'héparine lors de la réalisation d'un test ELISA. Seuls les tests fonctionnels permettent d'affirmer la pathogénicité des anticorps anti-F4P/H détectés.

Rationnel

Le test de neutralisation à l'héparine effectué au cours des tests immunologiques dédiés à la recherche d'anticorps anti-F4P/H a été proposé par certains industriels comme une étape de confirmation du diagnostic de TIH. Cette étape, consiste à ajouter de fortes concentrations d'héparine (100 UI/mL) dans le puits réactionnel. Une réduction de la DO d'au moins 50 % par rapport à la condition sans ajout d'héparine serait en faveur de la présence d'anticorps anti-F4P/H héparine-dépendants (Whitlatch et al. 2010). Cette étape s'est avérée peu efficace pour augmenter la spécificité des tests ELISA, avec des faux négatifs, mais aussi la persistance de faux positifs, notamment en cas de DO élevée (Bakchoul et al. 2011), par exemple après chirurgie cardiaque, situation associée à une séroconversion chez près de 50 % des patients (Warkentin and Sheppard 2006; Selleng et al. 2011).

c. Peut-on se contenter d'un test de dépistage rapide (qualitatif/semi quantitatif) ?

Propositions

- Les tests rapides immunologiques, s'ils sont négatifs, excluent une TIH uniquement chez les patients dont la probabilité clinique est intermédiaire.

- En cas de probabilité clinique élevée, le diagnostic ne peut être exclu sur un test rapide qualitatif (LFIA) ou semi-quantitatif (CLIA ou LIA) négatif. Il est recommandé de réévaluer la probabilité clinique et de faire un test ELISA et un test fonctionnel.

Rationnel

Une limite majeure des tests ELISA est leur non disponibilité en période de garde et leur délai de réalisation (en moyenne 3 à 4h). C'est pourquoi certains laboratoires réalisent les ELISA en série, laissant le clinicien prendre en charge la suspicion de TIH dans un contexte d'urgence, sans aide de la biologie (Cuker 2014).

En cas de probabilité clinique faible ou intermédiaire de TIH, les tests rapides permettent d'exclure une TIH avec une bonne VPN (Sun et al. 2016), ce qui évite la surexposition des patients à des anticoagulants non hépariniques, plus coûteux et dont le risque iatrogène est avéré.

Cependant, la probabilité post-test des tests rapides n'est pas suffisante pour permettre l'exclusion d'une TIH en cas de probabilité clinique élevée et de test négatif (Sun et al. 2016). Plusieurs études ont montré que les tests rapides, qu'ils soient qualitatifs ou semi-quantitatifs, étaient associés à une probabilité post-test de TIH non-acceptable : 2,6 % avec le SticExpert® (Leroux et al. 2014) et 1,8 à 9,9 % avec HemosIL® AcuStar IgG selon les études (Warkentin et al. 2018; Jousselme et al. 2021).

6. Interprétation des résultats

a. Faut-il appliquer les seuils de positivité du fournisseur ?

Propositions

- Il est recommandé d'utiliser le seuil fournisseur pour les tests immunologiques afin de garantir une sensibilité optimale.
- Il n'est pas recommandé d'augmenter le seuil de positivité des tests immunologiques.
- Les résultats faiblement positifs en ELISA doivent être interprétés en fonction du contexte clinique.

Rationnel

Tous les tests immunologiques quantitatifs utilisés pour le dépistage des TIH possèdent un seuil de positivité donné par l'industriel correspondant au seuil analytique (ou cut-off). Le faible seuil de positivité de ces tests explique en partie leur manque de spécificité. Ce seuil est déterminé en utilisant des prélèvements de sujets sains non-préalablement exposés à l'héparine, alors que les tests sont réalisés chez des patients exposés à l'héparine (Warkentin et al. 2008).

Concernant les tests ELISA, il a été montré dans plusieurs travaux que la probabilité clinique de TIH était corrélée aux absorbances mesurées. Dans ce contexte, un seuil clinique, plus élevé que le seuil analytique, est souvent redéfini localement pour guider l'interprétation du résultat en tenant compte de la probabilité post-test de TIH (Cuker 2014; Nagler et al. 2016). Il est important de souligner que l'augmentation de cette valeur seuil (seuil clinique) permet de gagner en spécificité, mais au prix d'une baisse de sensibilité, avec un risque de faux négatifs (Warkentin et al. 2008; Nagler et al. 2016; Bankova et al. 2017; Favaloro 2018). En ce sens, l'utilisation d'un seuil de positivité bas est recommandée par l'*American Society of Haematology* (ASH) (Cuker et al. 2018).
A défaut d'augmenter le seuil de positivité, il a été proposé d'établir des fourchettes de positivité (DO ou UA) permettant de stratifier la probabilité de TIH (Warkentin et al. 2008; Cuker 2014; Nagler et al. 2016; Bankova et al. 2017) (voir chapitre « Interprétation des résultats »).

b. Faut-il interpréter le titre apparent d'anticorps mesuré avec un test immunologique ?

Tests rapides semi-quantitatifs (LIA ou CLIA)

Proposition

- En raison d'un manque de données disponibles pour le test LIA, il n'est pas recommandé à ce jour d'interpréter la valeur chiffrée du résultat obtenu pour évaluer la probabilité de TIH.

- Il est proposé d'effectuer un test fonctionnel en cas de test immunologique semi-quantitatif positif.

- En dehors d'un contexte de CEC, un résultat de CLIA supérieur à 10 UA/ml est très en faveur d'une TIH. Il est envisageable de s'affranchir de la réalisation d'un test fonctionnel pour confirmer la TIH.

Rationnel

Contrairement aux tests ELISA, les autres tests rapides immunologiques semi-quantitatifs (LIA et CLIA) n'ont pas fait l'objet d'un nombre suffisant d'études permettant de démontrer une corrélation entre la valeur chiffrée obtenue et la probabilité de TIH (Nagler and Cuker 2017). Cette remarque s'applique tout particulièrement au test LIA pour lequel très peu d'études sont rapportées dans la littérature.

Néanmoins, plusieurs études ont montré qu'un résultat > 10 UA/mL pour le CLIA IgG était hautement prédictif du diagnostic de TIH, avec un test fonctionnel systématiquement positif

(Favaloro et al. 2018; Jousselme et al. 2021). Afin d'aider à l'interprétation de ce test, trois seuils de positivité ont été suggérés : UA compris entre 1 à 2,8 positif faible, UA compris entre 2,8 à 9,4 positif intermédiaire et UA supérieur à 9,4 positif fort (Bankova et al. 2017).

Tests ELISA

Propositions

- Il est proposé de toujours rendre un résultat de test ELISA en incluant la valeur de DO et une interprétation du résultat.
- Pour aider à l'interprétation d'un test ELISA, il est utile d'y intégrer la probabilité clinique de TIH.
- Il est proposé d'effectuer un test fonctionnel en cas de test immunologique positif.
- En dehors d'un contexte de CEC, un résultat de DO supérieur à 2 obtenu en ELISA est très en faveur d'une TIH. Il est envisageable de s'affranchir de la réalisation d'un test fonctionnel pour confirmer la TIH.

Rationnel

Pour tous les tests ELISA, la DO est directement corrélée avec la probabilité de TIH (Greinacher 2009; Selleng et al. 2011; Cuker 2014; Ritchie et al. 2017; Samuelson Bannow et al. 2021). Il est donc pertinent d'interpréter la DO obtenue en l'intégrant au contexte clinique à l'aide d'une approche Bayésienne (probabilité faible, intermédiaire ou élevée). De plus, une DO élevée est positivement corrélée avec le risque de thrombose (Zwicker et al. 2004).

Compte-tenu de ces éléments, il est parfois suggéré d'établir un seuil de positivité clinique (plus élevé que le seuil fournisseur) pour interpréter les résultats des tests immunologiques et guider l'attitude thérapeutique en urgence. A ce titre, un seuil de DO > 0,65 en ELISA IgG Immucor GTI® permettrait d'avoir une sensibilité de 97,1 % et une spécificité de 92,4 %. Ces résultats ne sont pas systématiquement transposables à d'autres ELISA selon une étude allemande (Bakchoul et al. 2009).

c. Quel seuil appliquer pour les patients post- circulation extra-corporelle (CEC) ou sous ECMO (*extracorporeal membrane oxygenation*) ?

Propositions

- Il est suggéré qu'un binôme clinicien/hémostasien évalue conjointement la pertinence de la prescription d'une recherche de TIH en post-CEC ou au cours d'une ECMO.

- Le score des 4Ts ne doit pas être utilisé dans ce contexte, il est recommandé d'évaluer la pertinence de la prescription selon la cinétique de la numération plaquettaire en post-opératoire (non-remontée à J5 de l'intervention (risque modéré de TIH) ou remontée à J5 puis cassure de la courbe dans les jours qui suivent (risque élevé de TIH)).

- En raison du manque de données disponibles, il n'est pas recommandé de modifier le seuil de positivité des tests immunologiques.

- Il est recommandé, pour tout test immunologique positif, d'effectuer un test fonctionnel.

Rationnel

Après une chirurgie cardiaque avec CEC, jusqu'à 50 % des patients développent des anticorps anti-F4P/H sans présenter de thrombopénie ou signes cliniques de TIH (Pouplard et al. 1999b; Warkentin et al. 2000), mettant en défaut les seuils de positivité des tests immunologiques de type ELISA. Le même constat est effectué chez les patients bénéficiant d'une assistance circulatoire de type ECMO, avec un pourcentage de séroconversion estimé aux alentours de 30 % (Vayne et al. 2019b).
En post-CEC, il a été montré que l'évolution de la numération plaquettaire (NP) dans les jours qui suivent la chirurgie était hautement prédictive de la survenue d'une TIH, avec deux profils anormaux identifiés : l'un caractérisé par une diminution de la NP après une correction préalable (risque élevé de TIH), et l'autre correspondant à une NP basse persistante dans les 5-6 jours suivant la CEC (risque modéré de TIH) (Pouplard et al. 2005).
Comme dans d'autres contextes cliniques, plusieurs études proposent d'augmenter le seuil de positivité des tests ELISA mais ces données n'ont pas été validées à grande échelle et sur plusieurs trousses. A titre d'exemple, un seuil de 2,29 (ELISA GTI Immucor® polyspécifique) a été proposé en post-CEC comme hautement prédictif d'une TIH, car au-delà de ce seuil tous les échantillons avaient un SRA positif (Warkentin et al. 2008). Dans un contexte d'ECMO, un seuil plus faible de 1,5 (ELISA GTI Immucor® IgG) a été proposé, mais sur un effectif trop faible pour conclure définitivement sur la pertinence de ce seuil (3 cas de TIH sur 57 patients étudiés) (Vayne et al. 2019b). Une augmentation du seuil de positivité de l'ELISA (GTI Immucor®) à 1,0 permettrait, chez les patients sous ECMO, d'obtenir une VPN de 95 % et une spécificité de 89 % (Kataria et al. 2020).

7. Doit-on s'assurer de la disparition des anticorps anti-FP4/H à distance de la phase aigüe ?

Propositions

- Lorsqu'un diagnostic de TIH a été confirmé, la disparition des anticorps anti-F4P/H doit être vérifiée avant tout geste invasif nécessitant l'administration d'héparine.

- Il est proposé de remettre au patient une carte reprenant les résultats des différents tests biologiques effectués ainsi que les coordonnées du centre ayant pris en charge le diagnostic biologique la TIH.

Rationnel

Les anticorps anti-F4P/H développés au cours des TIH sont transitoires. Dans les 3 mois qui suivent le diagnostic, ces anticorps sont indétectables en test fonctionnel chez plus de 80 % des patients et en test immunologique chez 50 % des patients (Warkentin and Kelton 2001). Bien qu'une récidive de TIH ne soit pas systématique en cas de ré-exposition à l'héparine, il est admis qu'une ré-introduction chez un patient présentant encore des anticorps anti-F4P/H en circulation expose le patient à un risque non-acceptable de récidive (Warkentin et al. 2017a).

De ce fait, une nouvelle recherche d'anticorps anti-F4P/H à l'aide d'un test immunologique semi-quantitatif, et d'un test fonctionnel en cas de positivité du premier test, doit être réalisée avant tout geste invasif nécessitant l'administration, même ponctuelle, d'héparine. Une recherche peut également être réalisée 3 à 6 mois après le diagnostic, au décours d'une consultation de suivi, permettant d'évaluer l'état clinique du patient, de lui expliquer la pathologie et de lui remettre, si possible, une carte d'urgence à porter sur soi notifiant l'antécédent de TIH.

C. Tests fonctionnels

1. Quels sont les tests d'activation plaquettaire aujourd'hui disponibles ?

Les tests d'activation plaquettaire sont utilisés pour détecter les anticorps pathogènes et permettent de confirmer le diagnostic de TIH. Tous reposent sur la mise en évidence d'une activation des plaquettes de sujets sains en présence du plasma ou du sérum du patient et d'héparine à concentration thérapeutique. Chaque test est défini par le marqueur d'activation plaquettaire étudié, son mode de détection et le milieu réactionnel utilisé (***Figure 1***).

Plusieurs tests fonctionnels reposent sur l'étude de l'**agrégation plaquettaire**, détectée :

- par **transmission lumineuse** en utilisant du Plasma Riche en Plaquettes (PRP) (Test d'Agrégation Plaquettaire ou TAP) ou des plaquettes lavées (Fratantoni et al. 1975; Chong et al. 1993),

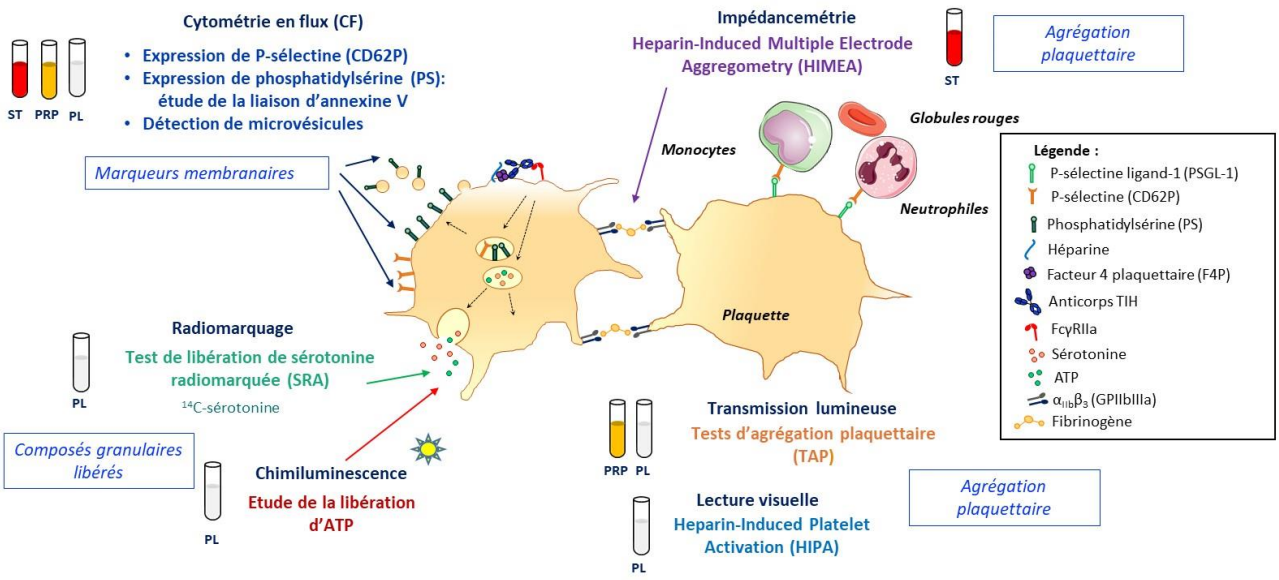
- à l'**œil nu** si le test est réalisé sur microplaque avec des plaquettes lavées (*Heparin Induced Platelet Aggregation* ou HIPA) (Greinacher et al. 1991),

- par **impédancemétrie**, si le test est réalisé sur sang total (*Heparin Induced Multi-Electrode Aggregometry* ou HIMEA) (Morel-Kopp et al. 2010).

D'autres tests d'activation plaquettaire reposent sur la mise en évidence de **modifications d'expression des protéines et des phospholipides membranaires** en **cytométrie en flux** (CMF). Les marqueurs les plus couramment utilisés sont la **P-sélectine (CD62P)** (Vitale et al. 2001) et la **phosphatidylsérine (PS)** marquée par l'Annexine V (AnxV) (Tomer 1997). La libération de vésicules extracellulaires ou microvésicules plaquettaires peut également être quantifiée par CMF sur des critères de taille, d'expression de la PS et de la GPIIb/IIIa (Mullier et al. 2010) ou de la GPIb (Lee et al. 1996).

L'évaluation de la **libération du contenu des granules plaquettaires** au cours de l'activation des plaquettes est également utilisée dans deux autres tests fonctionnels : le test de **libération de sérotonine radiomarquée** (SRA, *Serotonin Release Assay*) (Sheridan et al. 1986) et le test de **libération d'ATP** (ATP release) (Stewart et al. 1995) tous deux réalisés sur plaquettes lavées.

Figure 1 : Résumé des tests fonctionnels évaluant l'activation plaquettaire lors de la TIH. *PL, plaquettes lavées ; PRP, plasma riche en plaquettes ; ST, sang total.*



2. Quelles variables pré-analytiques liées au donneur de plaquettes faut-il maîtriser lors de la réalisation de ces tests

    a. Doit-on sélectionner les donneurs ? Si oui, comment ?

Propositions

Afin de pallier les variabilités inter- et intra-individuelles de réponse des plaquettes aux anticorps de TIH :

- Il est proposé de sélectionner, si possible, des donneurs de plaquettes « bons répondeurs ».

- La sélection d'un donneur « bon répondeur » peut être réalisée avec un échantillon de patient TIH ou en utilisant l'anticorps monoclonal 5B9 commercialisé et qui peut être testé à une concentration comprise entre 100 et 200 µg/mL.

- Il est nécessaire de s'assurer que le donneur n'a pris aucun médicament impactant les fonctions plaquettaires au cours de la semaine précédant le prélèvement.

Rationnel

En préambule, il est nécessaire de souligner qu'en France le prélèvement de sujets « témoins » est encadré par l'article L.1221-4 du code de la santé publique (CSP) : « ***Le sang, ses composants et leurs dérivés peuvent être*** *distribués et* ***utilisés à des fins*** *de recherche,* ***de contrôle des examens de biologie médicale*** *ou de* ***contrôle des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro****, à l'exclusion de toute administration à l'homme, avant l'obtention des résultats des examens biologiques et des tests de dépistage prévus au premier alinéa* » (CSP).

Toutefois, l'article L.1221-3 précise que « *le prélèvement ne peut être fait qu'avec le* ***consentement du donneur*** *par un médecin ou sous sa direction et sa responsabilité* »

La variabilité de réponse des plaquettes de sujets sains aux anticorps de TIH est décrite dans de nombreux travaux (Warkentin et al. 1992; Chong et al. 1993). Les interférences acquises les mieux connues sont le tabac et les médicaments (antiagrégants plaquettaires, anti-inflammatoires non stéroïdiens, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine…) (Cattaneo et al. 2013; Minet et al. 2017). Il est ainsi recommandé de tester les plaquettes de plusieurs donneurs et/ou de sélectionner les donneurs « bon répondeurs » aux anticorps de TIH. Cette variabilité de réponse n'est expliquée ni par le phénotype ABO, ni par le nombre de récepteurs FcγRIIA à la surface des plaquettes (Warkentin et al. 1992), mais le polymorphisme H/R en position 131 de FcγRIIA semble impacter la réponse plaquettaire. Ainsi il est montré que les plaquettes H/H 131 sont moins réactives et l'utilisation de plaquettes des sujets R/R 131 pourrait permettre d'améliorer les performances des tests réalisés en milieu plasmatique (Rollin et al. 2015).

Les recommandations émises pour les tests évaluant les fonctions plaquettaires dans le cadre de l'exploration des thrombopathies (Cattaneo et al. 2013) peuvent être appliquées pour les tests fonctionnels de TIH. Les plaquettes doivent être collectées à partir de donneurs sains après une courte période de repos, à distance de toute consommation de tabac (> 30 minutes), de caféine (> 2 heures), d'alcool et de tout médicament susceptible d'interférer avec la réactivité plaquettaire : AINS (> 3 jours), aspirine (> 10 jours), inhibiteurs de recapture de la sérotonine (Harrison et al. 2011). Dans tous les cas, un inventaire de tout traitement pris par le donneur au cours de la semaine précédant le test doit être envisagé en cas de non réponse des plaquettes témoins (Christie and Clinical and Laboratory Standards Institute 2008).

Dans la mesure où le laboratoire a la possibilité de connaître l'origine de ses donneurs et de les sélectionner, plusieurs outils ont été proposés avec leurs avantages et leurs inconvénients. L'utilisation d'un anticorps monoclonal murin anti-CD9 qui active le FcγRIIa et induit une activation plaquettaire FcγRIIa-dépendante a été proposée (Morel-Kopp et al. 2016). Cependant l'anticorps utilisé (ALB6) est une IgG1 murine qui possède une faible affinité pour l'isoforme H/H 131 (Bruhns and Jönsson 2015). Certains auteurs proposent d'utiliser le plasma ou le sérum dilué d'un échantillon de TIH avec une DO très élevée afin d'obtenir un échantillon faiblement positif permettant de sélectionner un bon répondeur (Warkentin et al. 2015a). Il est en effet montré que certains échantillons de TIH avec une DO très élevée sont capables d'activer les plaquettes issues de nombreux donneurs non sélectionnés et de tels échantillons, s'ils sont testés purs, ne permettent pas de sélectionner les bons répondeurs (Warkentin et al. 2015a).

L'anticorps monoclonal anti-F4P/H 5B9 possède un fragment Fc humain et mime parfaitement les effets cellulaires des anticorps de TIH. Il a été validé par une étude multicentrique

supportée par les sous-comités de l'ISTH et réalisée sur un grand nombre de tests fonctionnels. L'anticorps 5B9 est aujourd'hui un bon outil pour sélectionner des donneurs lorsqu'il est utilisé à une concentration comprise entre 100 et 200 µg/mL (Pouplard et al. 2022).

Il est important de préciser qu'il est nécessaire de tester un contrôle positif et un contrôle négatif dans chaque série (***cf § C.3.e.***).

b. Faut-il tester systématiquement les plaquettes de plusieurs donneurs ? Si oui, Combien ?

Propositions

- Sauf cas particulier, il est nécessaire de tester les plaquettes d'au moins deux donneurs différents.
- Un test d'activation plaquettaire positif sur un seul donneur peut suffire à confirmer le diagnostic de TIH sous réserve de la conformité des contrôles internes, d'un test immunologique positif et d'une probabilité clinique intermédiaire ou élevée de TIH.
- En cas de test fonctionnel négatif et de probabilité élevée de TIH et/ou de fort titre d'anticorps détecté par un test immunologique, il est recommandé de tester l'échantillon sur au moins 3 donneurs avant de conclure que le test fonctionnel est négatif ou d'avoir recours à un autre test fonctionnel plus sensible (SRA, HIPA).

Rationnel

Il n'y a actuellement aucun consensus sur le nombre de donneurs à tester : le nombre de donneurs utilisés pour réaliser les tests fonctionnels varie de 1 à 5 selon les études et selon les méthodes (***Tableau 3 « Nombre de donneurs de plaquettes testés selon les tests fonctionnels »***).

L'impact du polymorphisme FcγRIIA sur la réponse plaquettaire aux anticorps de TIH a été clairement démontré lorsque les plaquettes sont activées en milieu plasmatique (Rollin et al. 2015). Ainsi des plaquettes H/H 131 testées en matrice plasmatique peuvent ne pas répondre aux anticorps de TIH alors qu'après lavage de celles-ci, une réponse adéquate est observée. L'utilisation de 3 à 5 donneurs différents permet de s'affranchir de la variabilité de réponse des plaquettes d'un donneur à l'autre. Certains auteurs préconisent de conclure un test positif (HIPA et TAP) si le résultat est positif avec au moins deux donneurs de plaquettes (Greinacher et al. 1994). Il peut être difficile d'obtenir des plaquettes de plusieurs donneurs différents le même jour, aussi les donneurs peuvent être testés sur des jours différents.

Tableau 3. Nombre de donneurs de plaquettes testés selon les tests fonctionnels.

Test fonctionnel	Références	Nombre de donneurs testés
SRA	(Vayne et al. 2017)	Donneur sélectionné et contrôle sur un autre donneur sélectionné en cas de doute
HIPA	(Greinacher et al. 1991)	4 donneurs non sélectionnés
TAP	(Pouplard et al. 1997)	5 donneurs non sélectionnés
CMF	(Padmanabhan et al. 2015a)	Pool de 2 ou 3 donneurs de groupe O

CMF, cytométrie en flux ; HIPA, *Heparin Induced Platelet Aggregation*; SRA, *Serotonin Release Assay* ; TAP, Test d'Agrégation Plaquettaire.

c. Quel délai entre le prélèvement du donneur et la réalisation des tests ?

Proposition

- Les tests fonctionnels doivent être réalisés dans un délai de moins de 4 heures après le prélèvement du donneur.

Rationnel

L'étude des fonctions plaquettaires est un examen particulièrement sensible aux paramètres pré-analytiques (qualité du prélèvement, délai entre le prélèvement et la réalisation de l'analyse, conditions d'acheminement et préparation de l'échantillon). Après le prélèvement sanguin, les plaquettes ont une durée de vie limitée estimée à 4 heures maximum en PRP (Cattaneo et al. 2013) et comprise entre 5 et 8h en plaquettes lavées (Cazenave et al. 1983).

3. Quels sont les points méthodologiques critiques à maîtriser ?

a. Quel délai entre la suspicion de TIH et la réalisation d'un test fonctionnel ?

Propositions

- Les tests fonctionnels doivent être faits sur un prélèvement réalisé le plus précocement possible par rapport à la suspicion clinique de TIH, idéalement sur le même prélèvement que celui utilisé pour le test immunologique.

Rationnel

La TIH est une pathologie auto immune et, classiquement, les anticorps anti F4P/H disparaissent après l'arrêt du traitement par héparine. Ainsi, la durée médiane de persistance des anticorps après un épisode de TIH varie selon le test réalisé : 50 jours si les anticorps sont recherchés en SRA et 85 jours par un test immunologique (Warkentin and Kelton 2001). Ce phénomène explique pourquoi il est important de tester les patients ayant une suspicion de TIH à la phase aiguë ou peu après la correction de la numération plaquettaire. Une attention particulière doit être portée aux patients prélevés alors qu'ils sont traités par danaparoïde sodium. En effet, ce traitement, à la différence du fondaparinux ou de l'argatroban, interfère avec la formation des complexes immuns (F4P-heparine-IgG) et induire des résultats faussement négatifs dans les tests d'activation plaquettaire (Krauel et al. 2008).

b. Quelles concentrations d'héparine doivent être testées ?

Propositions

- Deux concentrations faibles d'héparine comprises entre 0,1 et 1 UI/mL doivent systématiquement être testées.

- Si le test d'activation plaquettaire est positif aux faibles concentrations d'héparine :

    - Une forte concentration d'héparine doit systématiquement être testée :
        - comprise entre 10 et 100 UI/mL lorsque les tests sont effectués sur PRP ou plaquettes lavées.
        - comprise entre 200 et 500 UI/mL si le test est réalisé sur sang total.

    - Une condition sans héparine peut être réalisée car une activation des plaquettes sans héparine peut être associée à une plus forte pathogénicité des anticorps et par conséquent à un tableau clinique plus sévère.

Rationnel

La réalisation d'un test fonctionnel nécessite de tester l'héparine à une faible et à une forte concentration. La faible concentration correspond à une concentration thérapeutique d'héparine et permet de reproduire *in vitro* l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH. La forte concentration d'héparine est supra thérapeutique ; elle induit une dissociation des complexes héparine/F4P et ne permet plus l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH. Le caractère héparine-dépendant de l'activation plaquettaire doit être vérifié à l'aide de cette forte concentration d'héparine afin d'affirmer la spécificité du résultat. En effet, des tests fonctionnels faussement positifs ont été mis en évidence chez les patients septiques (Chong and Castaldi 1986; Pouplard et al. 1999a).

L'héparine non fractionnée est le plus souvent utilisée à des concentrations qui varient de 0,1 à 1 UI/mL selon les tests et les auteurs (Price et al. 2007) (***Tableau 4 « Concentrations finales d'héparine utilisées selon le test fonctionnel et la matrice utilisés. »***). Dans un grand nombre de cas, deux faibles concentrations d'héparine sont utilisées permettant d'augmenter la sensibilité du test. En effet, selon les échantillons de TIH ou les fractions d'anticorps testés (car la réponse immune est polyclonale), le pic d'activation plaquettaire peut être obtenu avec des concentrations d'héparine différentes mais toujours comprises entre 0,1 et 1 UI/mL d'héparine (Sheridan et al. 1986; Amiral et al. 2000). De plus, la concentration optimale d'héparine peut varier d'un donneur de plaquettes à l'autre en raison des variations de densité de F4P à la surface des plaquettes (Rauova et al. 2006).

En théorie, la présence de protéines liant l'héparine dans le plasma pourrait expliquer que les tests réalisés sur le PRP ou sur sang total utilisent des concentrations plus élevées d'héparine pour dissocier les complexes héparine/F4P alors que les tests réalisés sur plaquettes lavées utilisent des concentrations supra-thérapeutiques d'héparine plus faibles. Malgré l'importante variabilité des concentrations d'héparine utilisées selon les auteurs et les tests, les concentrations d'héparine supra-thérapeutiques utilisées sur sang total sont plus élevées comparativement aux tests effectués sur PRP ou plaquettes lavées : respectivement 200 et 500 UI/mL versus 10 à 100 UI/mL.

Tableau 4. Concentrations finales d'héparine utilisées selon le test fonctionnel et la matrice utilisés.

Test fonctionnel	**Références**	**Concentrations finales d'héparine testées**
SRA (Plaquettes lavées)		
	(Vayne et al. 2017)	0 – 0,1 – 0,5 – 10 UI/mL
	(Nazi et al. 2015)	0,1 – 0,3 – 100 UI/mL
	(Warkentin et al. 2015a)	0 – 0,1 – 0,3 - 100 UI/mL
	(Sheridan et al. 1986)	0 – 0,1– 100 UI/mL
HIPA (Plaquettes lavées)		
	(Greinacher et al. 1991)	0 – 0, 2 – 100 UI/mL
	(Poley and Mempel 2001)	0,1 – 0,3 – 100 UI/mL
	(Gonthier et al. 2021)	0 – 0,2 – 0,5 – 50 UI/mL
TAP (PRP)		
	(Chong et al. 1993)	0,1 – 0,5 – 1 – 100 UI/mL
	(Pouplard et al. 1999a)	0 – 0,1 – 1 – 10 UI/mL
	(Brodard et al. 2020)	0,5 – 100 UI/mL
CMF		
CMF (PRP) Emosis®	(Cipok et al. 2019)	0,3 – 100 UI/mL

	(Tomer 1997)	0,1 – 0,3 – 100 UI/mL
CMF (PRP) HIT Alert®	(Garritsen et al. 2014)	0,1 – 0,3 – 100 UI/mL
CMF (PRP)	(Poley and Mempel 2001)	0,1 – 0,3 – 200 UI/mL
	(Maličev et al. 2016)	0,2 – 200 UI/mL
CMF (plaquettes lavées)	(Maeda et al. 2017)	0 – 0,1 – 100 UI/mL
CMF (Sang Total)	(Mullier et al. 2014)	1 – 500 UI/mL
HIMEA (Sang Total)		
	(Morel-Kopp et al. 2016)	1 – 200 UI/mL

CMF, cytométrie en flux ; HIMEA, *Heparin Induced Multi-Electrode Aggregometry*; HIPA, *Heparin Induced Platelet Aggregation*; PRP, Plasma Riche en Plaquettes ; SRA, *Serotonin Release Assay* ; TAP, Test d'Agrégation Plaquettaire.

Comme indiqué dans le Tableau 4, seulement certains auteurs testent une condition sans héparine.

Plusieurs travaux ont montré que certains plasmas ou sérums induisaient une activation plaquettaire en l'absence d'héparine mais que cette activation était toujours inhibée par une forte concentration d'héparine (Socher et al. 2008; Warkentin et al. 2015a; Rollin et al. 2022). L'activation plaquettaire observée en l'absence d'héparine n'est pas toujours due à la présence d'héparine résiduelle, mais parfois à une fraction d'IgG anti F4P/H (Socher et al. 2008) et ce profil d'activation plaquettaire peut être observé dans des cas de TIH plus sévères, ou ayant un délai de survenue très rapide, ou encore après un traitement par fondaparinux (Warkentin et al. 2015a). Ces anticorps peuvent également être responsables de TIH dites auto-immunes survenant en l'absence de traitement par héparine (Greinacher et al. 2017).

Plus récemment, il a été montré qu'une activation plaquettaire en SRA sans héparine avec des titres élevés d'IgG anti-F4P/H est associée à un risque accru de thrombose (Rollin et al. 2022). De plus, des anticorps IgG dirigés contre le F4P natif sont retrouvés chez certains patients atteints de TIH et pourraient contribuer à une thrombopénie plus sévère et persistante.

c. Quelles indications à tester d'autres molécules hépariniques ou de structure proche (énoxaparine ou autre HBPM ou danaparoïde sodique) ?

Proposition

- La recherche d'une réactivité croisée *in vitro* avec un autre glycosaminoglycane (GAG) n'est pas recommandée car il n'existe pas de corrélation avec une réaction croisée *in vivo*.

Rationnel

L'existence d'une réactivité croisée des anticorps de TIH avec les héparines de bas poids moléculaire (HBPM) est connue depuis longtemps (Leroy et al. 1985). Des observations comparables ont été rapportées avec le danaparoïde sodique qui, comme les HBPM, est un glycosaminoglycane (GAG) d'origine naturel (Pouplard et al. 1997; Baumgärtel et al. 2000; Tardy-Poncet et al. 2009). Le taux de réactivité croisée est cependant plus faible avec le danaparoïde sodique comparé aux HBPM (7 % vs 85 %) (Vun et al. 1996). Comme pour les HBPM, la réactivité croisée observée *in vitro* avec le danaparoïde sodique n'est pas systématiquement associée à une réactivité croisée *in vivo* (Magnani and Gallus 2006).

d. Le test doit-il être réalisé sur du plasma ou du sérum ? Les échantillons doivent ils êtres chauffés à 56°C ?

Propositions

- Les tests fonctionnels peuvent être réalisés indifféremment en utilisant du plasma ou du sérum.
- Pour tous les tests fonctionnels, il est recommandé de chauffer le plasma ou le sérum à 56°C pendant 30 minutes à 1 heure, puis de centrifuger.

Rationnel

L'analyse de la littérature rapporte une utilisation indifférente de plasma ou de sérum et ceci quelle que soit la méthode utilisée (***Tableau 1 « Matrice et pré-chauffage de l'échantillon dans les tests fonctionnels »***).

Certains auteurs précisent que l'échantillon doit être préalablement chauffé à 56°C pendant une durée allant de 30 minutes à 1 heure afin d'éliminer des traces résiduelles de thrombine qui peuvent contaminer le sérum, dans une moindre proportion le plasma, et entrainer une activation plaquettaire responsable de tests fonctionnels faussement positifs. Cette étape de chauffage est fréquemment mentionnée pour les tests réalisés en plaquettes lavées (SRA ou HIPA) mais semble moins nécessaire lorsque les tests sont réalisés en PRP.

Un chauffage plus intense (63°C pendant 20 min) conduit à l'apparition d'immuns complexes activateurs des plaquettes (Warkentin et al. 2015a; Sono-Koree et al. 2016) et est donc à proscrire. Après chauffage, une centrifugation (8 000 à 12 000 g pendant 5 à 10 min) permet d'éliminer la fibrine et les protéines précipitées.

e. Quelle place pour les échantillons-contrôles : CIQ et EEQ ?

Propositions

- Même si les donneurs sont sélectionnés, il est nécessaire de vérifier la fonctionnalité des plaquettes des donneurs lors de chaque série.
- Un CIQ doit systématiquement être réalisé lors de chaque série de test.
- En l'absence de CIQ commercialisé, un échantillon d'un patient TIH connu peut être utilisé comme contrôle positif.
- L'utilisation d'un agoniste plaquettaire indépendant de la voie FcγRIIA ne peut pas constituer un CIQ pour évaluer la réactivité des plaquettes témoin vis-à-vis des anticorps associés à la TIH.
- En l'absence d'EEQ commercialisé, il est suggéré de participer à un programme d'échange inter-laboratoires (minimum 1 fois par an).
- Lors de la réalisation par le laboratoire d'un programme d'échange inter-laboratoires à partir d'échantillons de patients :
    - Il n'est pas conseillé de mélanger les échantillons de différents patients.
    - Le nombre de cycles de congélation/décongélation des échantillons doit être limité afin d'éviter la formation d'agrégats d'IgG.
    - Il est conseillé de choisir des échantillons prélevés au plus proche de la phase aigüe afin de conserver l'effet activateur maximal de l'anticorps.
    - Il est conseillé de ne pas choisir des échantillons de patients traités par immunoglobulines intraveineuses (IgIV).

Rationnel

Que les donneurs soient sélectionnés ou non, il est nécessaire de valider la fonctionnalité des plaquettes lors de chaque série de test. La réactivité des plaquettes des donneurs est parfois vérifiée en utilisant les agonistes plaquettaires tels que le collagène, l'ADP, l'acide arachidonique ou le peptide activateur du récepteur à la thrombine (TRAP), mais ces agonistes n'explorent pas la voie du FcγRIIA (***Tableau 5 « Agonistes utilisés pour valider la fonctionnalité des plaquettes dans les tests fonctionnels »***). Il est préférable de valider à la fois le système analytique et la fonctionnalité des plaquettes en utilisant un échantillon de patient TIH connu ou l'anticorps 5B9 (***cf § C.2.a. Doit-on sélectionner les donneurs ? Si oui, comment ?***).

Tableau 5. Agonistes utilisés pour valider la fonctionnalité des plaquettes dans les tests fonctionnels.

Test fonctionnel	Références	Agoniste
HIPA	(Greinacher et al. 1991)	Collagène 4 µg/mL
TAP	(Chong et al. 1981) (Minet et al. 2013)	ADP 5 µM, collagène 20 pg/mL ADP 5 µM, collagène 40 – 190 µg/mL, AA 0,5 mg/mL
CMF (PRP)	(Tardy-Poncet et al. 2021b)	TRAP 100 µg/mL
HIMEA	(Minet et al. 2014)	ADP 6,5 µM, collagène 3,2 µg/mL, AA 0,5 mM, TRAP-6 32 µM

AA, acide arachidonique ; ADP, adénosine diphosphate ; TRAP-6, peptide activateur du récepteur à la thrombine 6 ; CMF, cytométrie en flux ; HIMEA, *Heparin Induced Multi-Electrode Aggregometry Method* ; HIPA, *Heparin Induced Platelet Aggregation Assay* ; PRP, plasma riche en plaquettes ; TAP, Test d'Agrégation Plaquettaire.

Le CIQ permet de valider le système analytique et donc d'assurer de la fiabilité des résultats. L'EEQ permet de comparer les résultats entre les laboratoires avec un échantillon de référence externe aux laboratoires. A ce jour, un EEQ utilisant l'anticorps 5B9 a été proposé.

Les CIQ, comme les EEQ, doivent se comporter comme un échantillon de patient et induire une activation plaquettaire en présence de faibles concentrations d'héparine, s'ils sont positifs. Cette activation doit être inhibée par la forte concentration d'héparine.

Une enquête nord-américaine réalisée auprès de 14 laboratoires réalisant les tests fonctionnels de diagnostic de TIH montre que 100 % des laboratoires utilisent un échantillon de TIH comme CIQ positif (Price et al. 2007). Celui-ci est utilisé dilué au non. Un CIQ négatif est également testé dans 93 % des cas et celui-ci peut être l'échantillon d'un sujet sain ou d'un échantillon TIH négatif connu (patient traité par héparine sans anticorps anti F4P/H). Lors de l'étude internationale multicentrique réalisée avec l'anticorps 5B9, un échantillon de TIH dilué ou non avait été utilisé comme CIQ dans 9 cas sur 15 alors que le TRAP ou le collagène avaient été utilisés dans 3 cas. Aucun CIQ n'est réalisé dans 3 cas (Pouplard et al. 2022).

Une seule étude réalisée par des laboratoires experts, rapporte l'expérience d'un EEQ effectué à l'échelon international (Allemagne, Canada, Australie) en utilisant des sérums de patients ayant une TIH et un pool de sérum de sujets sains de groupe AB (Eekels et al. 2019). Alors que les résultats de cet EEQ étaient conformes dans 97,6 % des cas pour les tests immunologiques, les résultats des tests fonctionnels (SRA, HIPA) étaient beaucoup moins bons, avec une concordance globale sur les échantillons patients de 70 % et des résultats discordants en l'absence d'héparine mais également sur les échantillons positifs et négatifs. Une activation plaquettaire a même été observée par 4 laboratoires avec l'échantillon du contrôle négatif.

Les auteurs recommandent de ne pas mélanger le sérum de plusieurs sujets, ce qui pourrait favoriser la formation d'agrégats d'IgG ou de complexes immuns. Une autre explication potentielle de ces discordances entre les tests fonctionnels pourrait être le nombre de cycles de congélation-décongélation effectués sur les échantillons de sérum qui pourrait modifier les résultats. Ces résultats interrogent également sur la façon dont les tests fonctionnels sont réalisés.

Enfin, un traitement des patients par IgIV peut également être à l'origine de faux négatifs avec les tests fonctionnels par compétition avec les anticorps de TIH lors de la liaison aux récepteurs FcγRIIA (Padmanabhan et al. 2017; Jones et al. 2018; Reilly-Stitt et al. 2022).

4. Quelles sont les performances comparées des différents tests d'activation plaquettaire ?

Il est relativement difficile de comparer les performances des différents tests en termes de sensibilité et de spécificité car le design des études et les critères de définition de la TIH ne sont pas toujours comparables. A ce jour, les deux méthodes considérées comme étant des méthodes de référence sont le SRA et le HIPA, même si peu d'études rapportent les performances du HIPA. Une étude montre une meilleure sensibilité du HIPA comparé au SRA, mais avec une moins bonne spécificité (agglutination passive des plaquettes sans libération du contenu des granules denses) (Selleng et al. 2015). Plus récemment un travail français multicentrique sur 55 échantillons a montré une concordance de 83,8 % entre ces deux tests (Gonthier et al. 2021). Au cours du programme d'EEQ mentionné précédemment et restreint à un faible de nombre de centres (n=7) et dont seulement 1 centre a réalisé le SRA, les auteurs rapportent que le SRA était positif pour seulement deux des cinq échantillons contenant des anticorps anti-F4P/H, tandis que le HIPA était positif avec quatre de ces mêmes échantillons (Eekels et al. 2019). Plus récemment, une étude multicentrique internationale réalisée avec l'anticorps 5B9 dans 11 centres différents - chaque centre devant tester 10 donneurs de plaquettes - a montré une très bonne sensibilité des tests SRA, HIPA et HIMEA. La sensibilité des tests en CMF et en TAP était très variable selon les centres, soulignant le manque de standardisation de ces méthodes (Pouplard et al. 2022).

a. Quelle place pour les tests sensibilisés par ajout de F4P : pour quels patients ? Quelles concentrations de F4P ? Quelle origine du F4P ?

Propositions

- Un test fonctionnel avec ajout de F4P peut augmenter la sensibilité des tests réalisés sur plaquettes lavées.

- Le test fonctionnel sensibilisé (avec ajout de F4P) doit être réalisé dans les mêmes conditions que le test conventionnel.

- Ces tests sensibilisés sont réservés dans l'état actuel des connaissances aux patients ayant une forte probabilité de TIH avec un test immunologique positif (DO > 1) mais dont le test d'activation plaquettaire en plaquettes lavées est négatif (cf ***Algorithme n°2***).

Rationnel

Le rapport stœchiométrique héparine/F4P est d'une importance majeure lors de l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH. Les concentrations d'héparine dans le milieu réactionnel sont maitrisées lors de la réalisation du test, alors que les concentrations de FP4 à la surface des plaquettes, bien que critiques, sont probablement très variables d'un sujet à l'autre et selon le protocole de lavage des plaquettes.

En 2015, Nazi et al. montrent pour la première fois que l'ajout de F4P dans le milieu de réaction des plaquettes lavées augmente la sensibilité du SRA, concluant que ce test sensibilisé détecte des anticorps cliniquement non pertinents, mais dont l'augmentation du titre pourrait induire une TIH (Nazi et al. 2015). En 2017, Vayne et al. montrent également que le SRA sensibilisé par le F4P permet de détecter des anticorps pathogènes non mis en évidence par un test SRA classique (Vayne et al. 2017). Cependant, l'ajout de F4P modifie le profil d'activation plaquettaire : une activation plaquettaire sans héparine peut être observée, mais totalement inhibée en présence de forte concentration d'héparine. Ces deux travaux montrent que les échantillons positifs uniquement en SRA+F4P ont des DO plus faibles en ELISA que ceux positifs en SRA classique.

L'ajout de F4P a également été étudié en CMF, par mesure l'expression de la P-sélectine. Dans ce test, l'effet de la faible concentration d'héparine n'est plus étudié mais l'inhibition de l'activation plaquettaire avec une forte concentration d'héparine est recherchée (Padmanabhan et al. 2015a).

A ce jour, les tests sensibilisés par le F4P sont peu standardisés et réalisés uniquement par des centres experts. L'origine et les concentrations du F4P sont variables d'une équipe à l'autre (**Tableau 6 « Concentration et source de F4P utilisés dans les tests fonctionnels »**). De plus, ces tests sensibilisés sont très couteux.

Tableau 6. Concentration et source de F4P utilisés dans les tests fonctionnels.

Test fonctionnel	Références	Concentration et source de F4P

SRA	(Vayne et al. 2017)	10 µg/mL, Hyphen BioMed
SRA	(Nazi et al. 2015)	12,5 à 50 µg/mL, source inconnue
SRA	(Padmanabhan et al. 2015b)	100 µg/mL, F4P humain
CMF (plaquettes lavées)	(Padmanabhan et al. 2015a)	62,5 µg/mL, F4P humain
CMF (plaquettes lavées)	(Padmanabhan et al. 2016)	37,5 µg/mL, F4P humain

CMF, cytométrie en flux ; F4P, facteur 4 plaquettaire ; SRA, *Serotonin Release Assay*.

b. Les tests sur plaquettes autologues : est-ce utile ? applicable en pratique ?

En pratique courante, les tests fonctionnels sont réalisés avec des plaquettes de sujets sains, puisque le patient est thrombopénique. L'utilisation des plaquettes du patient permettrait pourtant de s'affranchir de la nécessité des sujets témoins et le test refléterait mieux les conditions *in vivo* (Chong et al. 1993).

Les tests fonctionnels peuvent être réalisés sur les plaquettes du patient après normalisation de sa numération. En effet, l'augmentation du nombre de récepteurs FcRII à la surface des plaquettes de patients atteints de TIH persiste bien au-delà de 2 semaines après le retrait de l'héparine et la normalisation de la NP et rend même les plaquettes autologues plus réactives aux sérums de patients atteints de TIH. Une grande vigilance doit être apportée aux traitements reçus par le patient pouvant interférer sur les tests fonctionnels comme vu dans le chapitre (***cf § 2.c. Interférence des traitements anticoagulants et antiplaquettaires***).

c. Les tests sur plaquettes lavées : sont-ils réservés aux centres experts ?

Propositions

- Le lavage des plaquettes est une méthode délicate qui doit être réalisée par un personnel expérimenté.
- Les étapes de remise en suspension doivent être douces.
- Le nombre important de protocoles disponibles nécessite que l'état d'activation des plaquettes après lavage soit vérifié lors de la mise au point de la méthode.

Rationnel

Les protocoles de lavage des plaquettes dans la littérature sont très variables. En effet, selon le protocole princeps, les plaquettes lavées sont fonctionnelles à condition qu'il y ait du

calcium dans le tampon plaquettaire, une source d'énergie métabolique, et que l'accumulation d'ADP dans l'environnement plaquettaire ait été neutralisée. Aussi, l'apyrase est largement utilisée, puisqu'elle dégrade l'ADP dans l'environnement cellulaire (Mustard et al. 1972). Cependant, d'autres équipes utilisent la prostaglandine PGE_1 qui se lie au récepteur plaquettaire de la prostacycline. La PGE_1 augmente l'activité de l'adénylyl cyclase, les concentrations d'adénosine monophosphate (AMP) cyclique et inhibe ainsi l'activation plaquettaire (**Tableau 7**).

Les autres détails techniques importants sont les suivants :

- Le tampon Tyrode est largement utilisé
- L'hirudine peut être ajoutée au tampon Tyrode (test HIPA)
- L'anticoagulant sur lequel est effectué le prélèvement est l'ACD (acide citrique, citrate, dextrose)

Tableau 7. Détail des méthodes de préparation de plaquettes lavées.

Test fonctionnel	**Références**	**Détails techniques : prélèvement, tampon, inhibiteur**
SRA	(Vayne et al. 2017)	Prélèvement sur ACD + PGE_1 Tampon de lavage : Tyrode modifié pH 6,5 + PGE_1 Tampon de réaction : Tampon Tyrode pH 7,35 + albumine
SRA	(Sheridan et al. 1986) (Nazi et al. 2015)	Prélèvement sur ACD Tampon de lavage : tampon Tyrode sans calcium ni albumine Tampon de réaction : tampon Tyrode sans albumine
SRA	(Padmanabhan et al. 2016)	Prélèvement sur citrate + PGE_1 Tampon de réaction : PBS-albumine (1 %) pH 7,2
HIPA	(Greinacher et al. 1991)	Prélèvement sur citrate + ACD 11,1 % en PRP Tampon de lavage : tampon Tyrode + albumine 3,5 g/L + hirudine 0,5 UI/mL, pH 6,4 Tampon de réaction : tampon Tyrode + calcium 3 mM + magnésium 1 mM, pH 7,4
HIPA	(Greinacher et al. 1994)	Prélèvement sur ACD + ACD 11,1 % + apyrase 5 UI/mL en PRP Tampon de lavage : tampon Tyrode + albumine + hirudine 0,5 UI/mL + apyrase 2,5 UI/mL, pH 6,4

		Tampon de réaction : tampon Tyrode + calcium 3 mM + magnésium 18 mM, pH 7,4
HIPA	(Eichler et al. 1999)	Prélèvement sur ACD puis ACD 11,1 % + apyrase 5 UI/mL en PRP Tampon de lavage : tampon Tyrode + hirudine 1 UI/mL + apyrase 2,5 UI/mL, pH 6,3 Tampon de réaction : tampon Tyrode + $NaHCO_3$ 0,1 g/L + NaH_2PO_4 0,05 g/L + albumine 3,5 g/L + glucose 0,1 % + calcium 196 mM + magnésium 212 mM, pH 7,2
HIPA	(Gonthier et al. 2021)	Prélèvement sur ACD puis ACD 10 % + apyrase 0,3 UI/mL + PGE1 0,1 µM en PRP Tampon de lavage : NaCl 103 mM, acide citrique 36 mM, glucose 5 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, albumine 3,5 g/L + apyrase 0,3 UI/mL + PGE_1 0,1 µM, pH 6,5 Tampon de réaction : NaCl 137 mM, Hepes 5 mM, glucose 5,5 mM, KCl 1 mM, $MgCl_2$ 2 mM, NaH_2PO_4 0,3 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, $CaCl_2$ 2 mM, albumine 3 g/L, pH 7,2

ACD, *acid citrate dextrose* ; HIPA, *Heparin Induced Platelet Aggregation Assay* ; PBS, *phosphate buffer saline* ; PGE_1, prostaglandine E_1 ; PRP, plasma riche en plaquettes ; SRA, *Serotonin Release Assay*.

5. Quelle méthodologie adopter pour la réalisation des tests d'activation plaquettaire de référence réalisés en plaquettes lavées (tests HIPA et SRA) ?

a. Tests de libération de sérotonine radiomarquée (SRA)

Propositions

- Le SRA ne peut être mis en place que dans un laboratoire ayant un agrément pour l'utilisation de radioéléments.
- Deux faibles concentrations d'héparine doivent systématiquement être testées (concentrations finales comprises entre 0,1 et 1 UI/mL d'HNF), ainsi qu'une forte concentration (≥ 10 UI/mL).
- Il est pertinent de tester une condition sans héparine afin de détecter des anticorps particulièrement pathogènes (titres élevés et/ou spécificité anti-F4P).
- Un plasma/sérum d'un patient TIH positif ou un anticorps de TIH doit être utilisé comme contrôle positif. Un échantillon négatif (ou plasma/sérum de sujet sain) doit être utilisé comme contrôle négatif.
- Un SRA est considéré positif si une activation plaquettaire > 20 % est observée en présence d'au moins l'une des 2 « faibles » concentrations d'héparine testées, avec une inhibition de plus de 50 % de l'activation maximale en présence de la forte concentration d'héparine.

Principe et performance

La sérotonine est un constituant physiologique des granules denses des plaquettes, et la mesure du pourcentage de libération de la sérotonine peut être utilisée pour quantifier l'activation plaquettaire induite par les anticorps de TIH présents dans le sérum ou le plasma du patient. La méthode a été décrite pour la première fois par Sheridan en 1986 (Sheridan et al. 1986).

Ce test est réalisé par un nombre limité de centres car il nécessite l'utilisation de plaquettes lavées comme pour le test HIPA, mais surtout la manipulation de radioéléments (carbone 14) soumis à une législation très stricte et dont l'utilisation est extrêmement coûteuse. Pour cette raison, il a été proposé d'évaluer la libération de sérotonine par chromatographie liquide à haute performance (Koch et al. 2002; Sono-Koree et al. 2016; Chan et al. 2019), ou plus récemment, par spectrométrie de masse (Minet et al. 2018).

Aujourd'hui, le SRA et le HIPA sont les deux tests considérés comme les tests de référence pour le diagnostic de la TIH (Cuker et al. 2018).

Il est cependant important de noter qu'il n'existe pas de test de référence pour l'évaluation des performances du SRA, ce dernier étant considéré comme le plus sensible et spécifique. Le SRA présente de fait une excellente spécificité (90 à 100 %) et une bonne sensibilité (88 à 95 %) (Tardy et al. 2020).

Une étude sur la variabilité des résultats du SRA liée aux donneurs de plaquettes a montré la possibilité de résultats faussement négatifs en présence de faibles concentrations d'anticorps de TIH et de plaquettes de donneurs peu réactives (Warkentin et al. 1992). La sensibilité du SRA dans sa version standard a par la suite été remise en question par deux groupes indépendants (Nazi et al. 2015; Vayne et al. 2017) qui proposent de sensibiliser le test par l'ajout de F4P exogène humain dans le milieu réactionnel. En effet, la quantité de F4P à la surface des plaquettes est un paramètre critique pour la détection des anticorps de TIH (Rauova et al. 2006) et les lavages plaquettaires réalisés au cours du SRA pourraient contribuer à réduire la densité de cette chimiokine à la surface des plaquettes. Il est donc proposé, en cas de résultat douteux ou négatif en SRA standard, de refaire le test en ajoutant du P4P humain (10 µg/mL) aux plaquettes lavées afin de potentialiser la détection de plus faibles titres d'anticorps pathogènes (***cf § C.4.a. Quelle place pour les tests sensibilisés par ajout de F4P***).

Réalisation du SRA

Le SRA nécessite dans un premier temps l'incubation pendant 45 minutes à 37°C de plaquettes issues de donneur (PRP) avec de la sérotonine radiomarquée au C^{14} (5-hydroxy-^{14}Ctryptamine, 50 mCi par µL de PRP). Les plaquettes sont ensuite lavées (***cf § C.4.c. Les tests sur plaquettes lavées : sont-ils réservés aux centres experts*** ?) et incubées (numération ajustée à 300 G/L) pendant 1 heure à température ambiante en présence du plasma ou du sérum du patient préalablement chauffé (30 min à 56°C) et de différentes concentrations d'héparine. Cette étape peut être réalisée en plaque ELISA ou en micro godets. Les volumes réactionnels préconisés sont : 75 µL de plaquettes, 20 µL de plasma ou sérum et 5 µL d'héparine non fractionnée (2 concentrations comprises entre 0,1 et 1 UI/mL, et une forte concentration entre 10 et 100 UI/mL). La réaction est stoppée après ajout d'une solution de PBS EDTA 0,5 % (250 µL). La plaque ELISA ou les godets sont ensuite centrifugés 5 min à 1500 g pour sédimenter les plaquettes au fond des puits/tubes ; le surnageant (250 µL) est ensuite déposé dans du liquide de scintillation (2 mL). La radioactivité (RA) de chaque tube est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur β à scintillation. Lors de chaque série, du triton 0,5 % X100 est ajouté à un puit/godet ne contenant que des plaquettes radiomarquées afin d'évaluer la radioactivité maximale (RA Max) de la série. Un puit/godet ou l'échantillon de patient est remplacé par du tampon sera également réalisé afin d'obtenir le bruit de fond de la série (RA BF).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de libération de sérotonine pour chaque point, calculé de la façon suivante : % = [(RA Ech Patient – RA BF)/(RA max – RA BF)]X100.

Contrôles et interprétation des résultats

Le test SRA est positif si une libération de sérotonine ≥ 20 % est objectivée en présence de faibles concentrations d'héparine et si une inhibition de plus de 50 % de l'activation maximale est mesurée en présence de la forte concentration d'héparine.

Une forte activation plaquettaire (> 50 % de libération de sérotonine) est observée dans les cas typiques en présence d'au moins une faible concentration d'héparine (Warkentin et al. 2008). Une activation plaquettaire en l'absence d'héparine peut aussi être observée en SRA comme avec d'autres tests fonctionnels de TIH (***cf § C.3.b. Quelles concentrations d'héparine doivent être testées ?***), pouvant suggérer une plus forte pathogénicité des anticorps de TIH.

La procédure de lavage des plaquettes peut varier d'un laboratoire à l'autre, ce qui explique partiellement pourquoi certains exigent un seuil de 50 % pour considérer le résultat du test comme positif et d'autres un seuil de 20 % (Sheridan et al. 1986; Pouplard et al. 1999a; Warkentin et al. 2015a).

Un contrôle négatif ainsi qu'un échantillon de TIH bien caractérisé constituent les deux contrôles qui doivent systématiquement être testés. Le passage d'un échantillon faiblement positif est également recommandé afin d'évaluer la variabilité de réponse des plaquettes du donneur testé, celle-ci pouvant être due aussi à des facteurs techniques (Warkentin et al. 2015a) (***cf § C.2.a. Doit-on sélectionner les donneurs ? Si oui, comment ?***).

b. Tests d'activation des plaquettes induite à l'héparine (HIPA)

Propositions

- Le test HIPA est un test à lecture visuelle, ce qui implique une lecture par deux observateurs.
- Deux faibles concentrations d'héparine doivent systématiquement être testées (concentrations finales comprises entre 0,1 et 1 UI/mL d'HNF), ainsi qu'une forte concentration (50 ou 100 UI/mL).
- Il est pertinent de tester une condition sans héparine afin de détecter des anticorps particulièrement pathogènes (titres élevés et/ou spécificité particulière pour le F4P).

- Un plasma/sérum d'un patient TIH positif ou un anticorps de TIH doit être utilisé comme contrôle positif. Un échantillon négatif (ou plasma/sérum de sujet sain) doit être utilisé comme contrôle négatif.

- Un test HIPA est considéré positif si une agrégation plaquettaire est observée en présence d'une faible concentration d'héparine, et inhibée en présence d'une forte concentration d'héparine ; ceci sur les plaquettes d'au moins 2 donneurs.

- Un test HIPA est considéré négatif si aucune agrégation plaquettaire n'est observée en présence d'une faible concentration d'héparine, ceci sur les plaquettes d'au moins 3 donneurs, quel que soit le degré de suspicion clinique.

Principe et performance

Le test HIPA est basé sur l'évaluation visuelle de l'agrégation plaquettaire dans des plaques 96 puits, sous agitation afin que les plaquettes restent en suspension dans le milieu réactionnel (plaquettes du donneur, sérum ou plasma du patient et héparine) (Greinacher et al. 1991, 1994; Eichler et al. 1999). Les puits sont examinés visuellement par rapport à une source de lumière indirecte à intervalles de 5 minutes. Un changement d'apparence du mélange réactionnel de la turbidité (plaquettes non agrégées) à la transparence (plaquettes agrégées) est considéré comme un résultat positif.

Comparé au SRA, le test HIPA montre des performances très similaires (Greinacher et al. 1991; Gonthier et al. 2021) mais demande moins de temps et surtout ne nécessite pas la manipulation de substances radioactives.

A l'instar de ce qui est fait en SRA et afin de sensibiliser le test, il est possible d'ajouter du F4P humain (10 µg/mL) aux plaquettes lavées afin de potentialiser la détection d'anticorps pathogènes lorsque leur titre est plus faible (***cf § C.4.a. Quelle place pour les tests sensibilisés par ajout de F4P***). L'ajout de F4P exogène dans le test HIPA ne doit pas être systématique, mais réservé aux patients ayant des taux intermédiaires d'IgG anti-F4P/H (DO entre 1 et 2 en ELISA), une forte suspicion clinique de TIH et des résultats négatifs en HIPA conventionnel.

Réalisation du HIPA

Le HIPA nécessite une étape de lavage des plaquettes en présence d'hirudine et d'apyrase ou d'apyrase et de PGE_1 (***cf § C.4.c. Les tests sur plaquettes lavées : sont-ils réservés aux centres experts*** ?). Les plaquettes sont ensuite incubées (numération ajustée entre 300 et 400 G/L en tampon de réaction) pendant 45 minutes à 37°C en présence de sérum ou de plasma citraté préalablement chauffé (30 à 45 minutes min à 56°C) et d'héparine à plusieurs concentrations (0,2 et 100 UI/mL dans le test princeps (Greinacher et al. 1991) ; 0,2 – 0, 5 et 50 UI/mL dans la méthode adaptée (Gonthier et al. 2021)). L'incubation peut être effectuée dans des plaques ELISA (puits à fond plat ou à fond rond) en présence d'une bille magnétique (de type bille pour

coagulomètre) et d'une agitation magnétique à 1000 rpm ou mécanique sur un agitateur pour plaque. Les volumes réactionnels préconisés sont : 75 µL de plaquettes, 20 µL de plasma ou sérum et 10 µL d'héparine. La lecture peut être effectuée toutes les 5 minutes ou à un temps final de 25 minutes. Plus l'échantillon active les plaquettes, plus le temps nécessaire est court.

Contrôles et interprétation des résultats

Le test HIPA est considéré positif en cas d'éclaircissement du milieu réactionnel visible en présence de faibles concentrations d'héparine mais pas en présence de la forte concentration, sur au moins 2 donneurs de plaquettes différents.

Le test HIPA est considéré négatif en l'absence visible de variation de la turbidimétrie en présence de faibles concentrations d'héparine, sur au moins 3 donneurs de plaquettes.

Une activation plaquettaire en l'absence d'héparine peut aussi être observée en HIPA comme avec d'autres tests fonctionnels de TIH (***cf § C.3.b. Quelles concentrations d'héparine doivent être testées ?***), pouvant suggérer une plus forte pathogénicité des anticorps de TIH.

Un contrôle négatif (tampon de réaction ou échantillon issu de contrôles sains ou de patients sous héparine sans thrombopénie) ainsi qu'un échantillon de TIH bien caractérisé constituent les deux contrôles qui doivent systématiquement être testés. L'utilisation d'un échantillon faiblement positif pour lequel une diminution de la turbidimétrie est observée à 25 minutes est également recommandée afin de considérer la variabilité de réponse des plaquettes du donneur (Eichler et al. 1999; Warkentin et al. 2015a) (***cf § C.2.a. Doit-on sélectionner les donneurs ? Si oui, comment ?***).

La lecture du test HIPA étant visuelle, elle doit être réalisée par 2 observateurs indépendants et formés à cette étape de lecture et d'interprétation des résultats.

6. Quelle méthodologie adopter pour la réalisation des tests d'activation plaquettaire réalisés en PRP (tests d'agrégation plaquettaire, cytométrie en flux) ?

a. Tests d'agrégation plaquettaire (TAP)

Propositions

- Deux concentrations faibles d'héparine doivent systématiquement être testées (concentrations finales comprises entre 0,5 et 1 UI/mL d'HNF), ainsi qu'une forte concentration (50 ou 100 UI/mL).

- Un plasma/sérum TIH positif connu ou un anticorps de TIH doit être utilisé comme contrôle positif si l'échantillon testé est négatif.

- L'aspect sigmoïde de la courbe d'agrégation est indispensable pour considérer une agrégation positive.

- Un TAP est considéré comme étant positif si une agrégation est observée en présence d'une faible concentration d'héparine avec au moins 1 donneur. Une inhibition de l'agrégation en présence d'une forte concentration d'héparine doit être aussi observée.

- Un échantillon négatif (ou plasma/sérum de sujet sain) doit être utilisé comme contrôle négatif si le test est positif.

- Il est préférable de réaliser le TAP sur le PRP d'au moins 3 donneurs avec une durée d'acquisition d'au moins 20 minutes avant de conclure à un résultat négatif.

Principe et performance

Le principe du TAP repose sur l'incubation du **plasma** ou du **sérum** du patient préalablement **chauffé 30 min à 56°C** avec les plaquettes témoins en présence d'héparine. L'activation plaquettaire par les IgG anti-FP4/héparine du patient est médiée par les récepteurs FcγRIIa à la surface des plaquettes.

La formation des agrégats plaquettaires entraine une diminution de la turbidité objectivée par l'augmentation de la transmission lumineuse au travers de la suspension plaquettaire.

Parmi les tests fonctionnels, les tests d'agrégation plaquettaire sont les plus utilisés, du fait de la présence d'agrégomètres dédiés à l'exploration des fonctions plaquettaires dans les laboratoires d'hémostase spécialisée. La performance des TAP est satisfaisante à condition de bien sélectionner les plaquettes témoins et d'effectuer les contrôles appropriés : sensibilité de 69 à 91 % et spécificité de 77 à 100 % selon les études (***Tableau Supplémentaire 4 : Caractéristiques et performances du TAP***). Ces variations de performances selon les études peuvent être expliquées par l'utilisation de tests de référence différents et un nombre de cas de TIH positives très variable.

Réalisation des tests d'agrégation

La plupart des propositions pour l'accréditation des examens réalisés en agrégométrie optique pour l'exploration des fonctions plaquettaires peuvent être appliquées pour le TAP (Stepanian et al. 2023).

Les explorations sont effectuées à l'aide d'un agrégomètre thermostaté à 37°C, sous agitation constante (autour de 1100 rpm). La préparation du PRP doit être effectuée selon les **recommandations de l'ISTH** (Cattaneo et al. 2013). La numération plaquettaire du PRP témoin doit être vérifiée et doit être comprise entre 300 et 600 G/L. **Il n'est pas recommandé d'ajuster les plaquettes du PRP témoin.**

Selon les automates et les auteurs les volumes réactionnels totaux varient entre 200 et 500 µL et les dilutions finales du plasma testé varient du demi au tiers. L'héparine est ajoutée sous un petit volume, le plus souvent compris entre 10 et 30 µL. La **numération plaquettaire finale** (après mélange du PRP témoin et du PPP patient) doit être au minimum de 150 G/L.

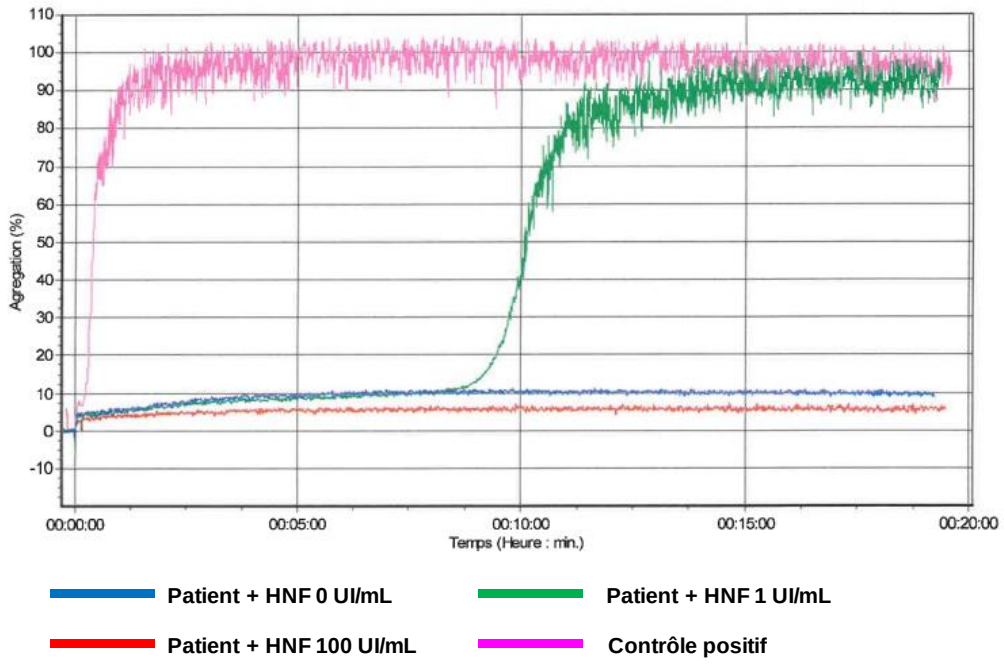
Au préalable, pour chacun des PRP témoins, il convient d'effectuer le réglage de l'agrégomètre

- du point 100 % d'agrégation = PPP témoin + PPP patient
- du point 0 % d'agrégation = PRP témoin + PPP patient

Les tests d'agrégation sont ensuite effectués en présence d'**héparine non fractionnée à 2 concentrations comprises entre 0,5 et 1 UI/mL** (concentration finale).

Une réponse positive est définie par la présence d'une nette cassure de la courbe, avec le plus souvent une agrégation maximale > 50 % (Brodard et al. 2020). **L'aspect sigmoïde de la courbe est caractéristique d'une réponse positive (*Figure 2*).** Le délai de l'agrégation est variable et le temps de lecture doit être maintenu durant **15 à 20 minutes** avant de conclure à une réponse négative.

Figure 2 : Exemples de courbes obtenues avec le test d'agrégation plaquettaire (TAP).



Contrôles et interprétation des résultats

Pour valider les résultats du TAP, les échantillons de patients doivent être testés simultanément aux échantillons de contrôle (Tableau 8).

Vérification de la réactivité des plaquettes témoins :

La réactivité des plaquettes témoin doit être vérifiée avec le plasma d'un patient TIH positif, même si les témoins sont déjà connus comme étant de bons répondeurs aux anticorps associés à la TIH. Si le patient testé est positif, il peut servir de contrôle interne positif de la série.

Si le test est négatif, un complément d'exploration doit être envisagé :

- avec les plaquettes de 2 autres témoins sains,
- éventuellement sur un nouveau prélèvement du patient et/ou des conditions analytiques différentes (proportions différentes PRP témoin / PPP patient)

A ce stade, un test en plaquettes lavées (de type SRA ou HIPA) peut être demandé à un centre expert.

En cas d'agrégation positive en présence des faibles concentrations d'héparine avec au moins 1 des témoins il est nécessaire :

- de compléter le test en présence d'une **forte concentration d'héparine (100 UI/mL)** qui doit inhiber l'activation plaquettaire. En effet, la forte concentration d'héparine dissocie les complexes F4P/héparine (Chong et al. 1993; Minet et al. 2017). Il est important de tester en parallèle la concentration d'héparine qui donne la plus forte agrégation afin de vérifier la persistance de la bonne réactivité des plaquettes témoin. **Si une agrégation plaquettaire est observée avec l'HNF à 100 UI/mL, le test n'est pas interprétable en raison d'une agrégation plaquettaire non dépendante de l'héparine.**

- d'étudier la réponse en l'absence héparine (ajout de **sérum physiologique** au mélange (PPP patient + PRP témoin). Une réponse positive en l'absence d'ajout *in vitro* d'héparine peut être expliquée :
    - par la présence de thrombine, activateur plaquettaire (normalement inactivée par le chauffage préalable du plasma à 56°C pendant 30 minutes) (Chong et al. 1993) ;
    - par la présence résiduelle d'héparine dans le plasma du patient ;
    - par des anticorps fortement activateurs plaquettaires, même en l'absence d'héparine (Greinacher et al. 2017).

  En cas de réponse positive en l'absence d'héparine, le diagnostic de TIH reste possible si la réponse à l'HNF 100 UI/mL est négative.

- de confirmer ce résultat en utilisant les plaquettes d'un autre donneur

Tableau 8. Interprétation du test d'agrégation plaquettaire (TAP) selon les résultats obtenus avec les différentes concentrations d'héparine, sous réserve de contrôles conformes.

HNF 2 faibles concentrations finales entre 0,1 et 1 UI/mL	HNF 1 forte concentration finale 100 UI/mL	Pas d'HNF (NaCl 0,9 %)	Interprétation du test
-	-	-	Test négatif
+	-	-	Test positif
+	-	+	Anticorps de TIH fortement activateur ou présence d'héparine résiduelle dans l'échantillon
+	+	+ ou -	Test non interprétable à controler sur un nouveau donneur ou par un autre test fonctionnel .

HNF, héparine non fractionnée ; TIH, thrombopénie induite par l'héparine.

b. Tests de cytométrie en flux (CMF)

Propositions

- Deux faibles concentrations d'héparine doivent systématiquement être testées (concentrations finales comprises entre 0,1 et 1 UI/mL d'HNF), ainsi qu'une forte concentration de 100 UI/mL.

- Il est pertinent de tester une condition sans héparine afin de détecter des anticorps particulièrement pathogènes (titres élevés et/ou spécificité particulière pour le F4P).

- Un plasma/sérum d'un patient TIH positif connu ou un anticorps de TIH doit être utilisé comme contrôle positif. Un échantillon négatif (ou plasma/sérum de sujet sain) doit être utilisé comme contrôle négatif.

- Un test est considéré comme négatif si aucune activation plaquettaire n'est observée avec les plaquettes d'au moins 3 donneurs différents.

- Un test est considéré positif si une activation plaquettaire est observée en présence d'une faible concentration d'héparine et une absence d'activation en présence de la forte concentration d'héparine, sur les plaquettes d'au moins 2 donneurs.

Principe et performances

La CMF évalue, comme les autres tests fonctionnels, la capacité du plasma (ou du sérum) d'un patient à activer, en présence d'héparine, les plaquettes d'un témoin révélant ainsi la présence d'anticorps héparine-dépendants. La CMF mesure soit la surexpression des phosphatidylsérines par fixation de l'annexine V, soit l'expression de la P-sélectine, présente dans les granules α, qui vient s'exposer à la surface de la membrane plaquettaire lors de leur activation (**Tableau Supplémentaire 5 : Caractéristiques et performances des tests de CMF utilisés dans le diagnostic de TIH**). Parallèlement aux marqueurs d'activation plaquettaire, les plaquettes sont marquées avec un anticorps anti-CD41 dirigé contre la GPIIb plaquettaire.

Les performances des tests en CMF qui utilisent la fixation de l'annexine V varient, en termes de sensibilité et spécificité, respectivement de 88 à 95 % et de 96 à 100 %. Concernant les tests basés sur la mesure de l'expression de la P-sélectine, leur sensibilité varie de 82 à 90 % et leur spécificité de 83 à 95 %. Comme pour les tests d'agrégation plaquettaire, les différences de performances décrites dans la littérature peuvent être expliquées par l'utilisation de tests de référence différents et d'un nombre de cas de TIH très variable.

Dans une étude française réalisée sur 288 plasmas (131 TIH positives et 157 TIH négatives), la sensibilité du test basé sur l'étude de la P-sélectine était de 88 % et la spécificité de 95 %, ce qui est comparable aux performances du SRA réalisé parallèlement avec une sensibilité de 88 % et une spécificité de 97 %. Sur la base de cette étude, un test a été temporairement commercialisé sous le nom de Emo-test HIT Confirm® (Emosis. Illkirch-Graffenstaden, France), puis ensuite retiré du marché :l'évaluation de ce test sur 164 suspicions de TIH (dont 33 TIH positives) avait montré de moins bonnes performances, avec une sensibilité de 69 % et une spécificité de 75 % (Althaus et al. 2019).

Un autre test en CMF, qui évalue l'expression des phosphatidylsérines est également commercialisé (HIT Alert™ Kit, IQ Products, Groninge, The Netherlands) mais a été peu évalué.

Réalisation des tests

Les tests en CMF sont majoritairement réalisés sur du PRP qui doit être préparé selon les recommandations de l'ISTH (Cattaneo et al. 2013). Deux équipes ont publié un test en CMF sur sang total (Lee et al. 1996; Mullier et al. 2014) et une équipe propose un test utilisant des plaquettes lavées (Samuelson Bannow et al. 2021). L'analyse est faite sur 10 000 à 100 000 évènements selon les méthodes. La numération plaquettaire du PRP n'est pas mentionnée, car elle n'est pas un paramètre critique en cytométrie. Les volumes de PRP utilisés sont faibles et varient entre 10 et 70 µL. La plupart des protocoles utilise 1 ou 2 faibles concentrations finales d'héparine comprises entre 0,1 et 1 UI/mL et une forte concentration de 100 UI/mL.

L'analyse en CMF nécessite un premier fenêtrage sur les plaquettes (CD41+) puis un second fenêtrage sur le marqueur d'activation en s'affranchissant des débris cellulaires.

Contrôles et interprétation des résultats

Un contrôle positif d'activation des plaquettes est utilisé dans la plupart des études. Il s'agit très souvent d'un ionophore calcique lorsque le marquage à l'annexine V est utilisé, ou du TRAP si le test mesure l'expression de la P-sélectine.

Comme pour les autres tests fonctionnels, la réactivité plaquettaire aux anticorps héparine-dépendants doit être évaluée en présence d'un plasma connu TIH positif. Un test ne peut être conclu comme étant négatif qu'après avoir évalué la réponse d'au moins 3 PRP issus de donneurs différents.

L'absence d'activation spontanée des plaquettes doit être vérifiée sur un mélange PRP témoin et PPP témoin en présence d'une solution tampon.

Concernant l'interprétation des résultats, la majorité des équipes ont défini un pourcentage d'activation plaquettaire minimal à atteindre en présence de faibles concentrations d'héparine auquel s'ajoute un critère d'inhibition à la forte concentration d'héparine. Il est recommandé que chaque laboratoire définisse ses seuils.

7. Quelle méthodologie adopter pour la réalisation des tests d'activation plaquettaire réalisés sur sang total ?

a. Heparin Induced Multi Electrode Aggregometry (HIMEA)

Propositions

- Le sang total doit être laissé 30 minutes au repos avant utilisation.
- Le milieu réactionnel doit contenir une solution saline.
- Une concentration finale d'héparine de 1 UI/mL ainsi qu'une forte concentration de 200 UI/mL doivent systématiquement être testées.
- Un plasma/sérum d'un patient TIH positif ou un anticorps de TIH doivent être utilisés comme contrôle positif. Un échantillon négatif (ou plasma/sérum de sujet sain) doit être utilisé comme contrôle négatif.
- Il n'existe actuellement aucune recommandation sur le nombre de donneurs minimum à tester.

Principe et performances

Le test HIMEA ne peut être réalisé que dans un laboratoire possédant un Multiplate®, automate permettant l'étude de l'agrégation plaquettaire sur sang total par impédancemétrie. Il utilise des cuvettes qui possèdent deux jeux d'électrodes entre lesquelles passe un courant électrique qui sera modifié lorsque les plaquettes agrègent sur les électrodes.

Le sang total d'un donneur est déposé dans une cuvette et placé sous agitation continue à l'aide d'un barreau magnétique qui permet le maintien des plaquettes en suspension. Après ajout d'héparine à différentes concentrations et de l'échantillon du patient, les plaquettes si elles agrègent, adhèrent sur les électrodes augmentant ainsi la résistance électrique. La modification du signal est traduite par une courbe d'impédance d'allure sigmoïdale similaire aux courbes d'agrégation plaquettaire du TAP. L'aire sous la courbe (AUC) est mesurée par l'automate.

Ce test présente l'avantage d'être réalisé sur sang total et Morel-Kopp *et al*. ont rapporté une amélioration des performances de l'HIMEA par rapport au test d'agrégation plaquettaire pour le diagnostic des TIH, avec des résultats comparables à ceux du SRA (Morel-Kopp et al. 2012). Des résultats similaires ont été publiés par Jing Jin *et al* avec une sensibilité de 85 % et une spécificité de 98 % de l'HIMEA et non différentes de celles du SRA (Jin et al. 2019). Il est à noter que dans cette étude, les mêmes donneurs ont été utilisés pour évaluer le test HIMEA et le SRA.

Réalisation du HIMEA

Le fabricant du Multiplate® préconise l'utilisation d'un sang prélevé sur hirudine (concentration finale de 25 µg/mL) et cette recommandation a été reprise en 2016 par le sous-comité de l'ISTH. L'hirudine permet de maintenir les concentrations physiologiques en ions calcium et magnésium (Tóth et al. 2006) et limite l'agrégation spontanée des plaquettes par inhibition de la thrombine. Deux études réalisées en 2012 et 2019 avec du sang prélevé sur citrate ont également permis de valider l'utilisation de cet anticoagulant (Galea et al. 2013; Jin et al. 2019).

Le sang du donneur doit être laissé au repos pendant 30 minutes avant d'être incubé avec l'échantillon du patient et l'héparine.

Les différentes méthodologies rapportées dans la littérature sont synthétisées dans le tableau supplémentaire 6. La dilution de l'héparine en solution saline et/ou l'apport d'une solution saline dans le milieu réactionnel constitue un point méthodologique important dans la mesure ou les ions sont nécessaires au passage du courant électrique entre les électrodes.

Toutes les expériences doivent être réalisées dans les 3 à 4 heures suivant le prélèvement et les changements d'impédance sont enregistrés pendant 15 à 30 minutes selon les auteurs. Les résultats sont exprimés sous forme d'aire sous la courbe (AUC) en utilisant des unités arbitraires.

Un temps de lecture variable sera à l'origine d'AUC différents, raison pour laquelle il appartient à chaque laboratoire de définir ses propres seuils.

Contrôles et interprétation des résultats

Selon les recommandations de l'ISTH (Morel-Kopp et al. 2016), les résultats sont considérés comme positifs s'ils remplissent tous les critères suivants :

1/ une courbe d'allure parabolique (courbes rouge et bleue générées par chaque jeu d'électrodes, voir Figure 3))

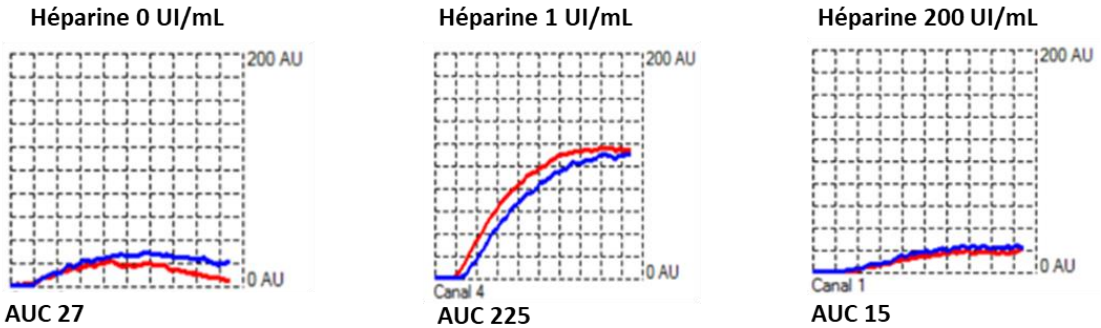
2/ AUC (1 UI/mL d'HNF) > 30 AU ; ce seuil doit être défini dans chaque centre (sur la base des mesures effectuées sur 20 témoins sains et des patients non hospitalisés).

3/ AUC (200 UI/mL) < 50 % de l'AUC (1 UI/mL).

4/ AUC < 30 AU sans héparine (seuil à définir dans chaque centre). Attention, la présence d'anticorps de TIH hautement pathogènes ou d'héparine dans l'échantillon peut être responsable d'une AUC > 30 AU.

Il est important de redéfinir ces seuils lors de la mise au point de ce test car ils varient de façon importante selon les publications.

Figure 3 : Exemples de courbes obtenues avec le *Heparin Induced Multi Electrode Aggregometry* (HIMEA).



AU, unité d'aire sous la courbe ; AUC, aire sous la courbe.

D. Stratégie diagnostique

1. Quelle stratégie diagnostique adopter hors chirurgie cardiaque/ECMO ?

a. Algorithmes décisionnels

La stratégie diagnostique recommandée en dehors de tout contexte de chirurgie cardiaque ou d'oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) est résumée dans l'***Algorithme n°1***.

Propositions

- Avant de rechercher la présence d'anticorps anti-F4P/H, il est recommandé d'évaluer la probabilité clinique de TIH (score 4T ou autre).

- En cas de **probabilité clinique faible**, il est recommandé de :
    - Ne pas rechercher d'anticorps anti-F4P/H, sauf en cas de doute sur la fiabilité des renseignements cliniques obtenus. Le diagnostic de TIH est exclu, le traitement par héparine peut être poursuivi.
    - Réévaluer la probabilité clinique en cas de nouvel évènement clinique et/ou d'aggravation de la thrombopénie. Une vigilance particulière est recommandée dans un contexte de réanimation où les performances du score 4T sont moins bonnes.
- En cas de **probabilité clinique intermédiaire**, il est recommandé de réaliser la recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif (ELISA, CLIA ou LIA ou qualitatif (LFIA). Si le test est disponible dans la journée et :
    - Si celui-ci est négatif, le diagnostic de TIH est exclu ; le traitement par héparine peut être poursuivi.
    - Si celui-ci est positif, le diagnostic de TIH est probable ; il est alors recommandé de :
        - Evaluer les fonctions rénale et hépatique afin de décider de l'anticoagulant substitutif le plus adapté.
        - Congeler les prélèvements destinés au diagnostic biologique de la TIH avant la mise en route du traitement alternatif.
        - Réaliser une recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif (ELISA, CLIA ou LIA si le test initial était un test qualitatif (LFIA)
        - Réaliser un test fonctionnel si le résultat du test semi-quantitatif est positif.

- En cas de **probabilité clinique intermédiaire** et si le test immunologique n'est pas disponible dans la journée il est recommandé de :
    - Evaluer les fonctions rénale et hépatique afin de décider de la thérapeutique substitutive la plus adaptée.
    - Congeler les prélèvements destinés au diagnostic biologique de la TIH avant la mise en route du traitement alternatif.
    - Ne pas attendre les résultats de la recherche d'anticorps anti-F4P/H pour remplacer de traitement par héparine par un traitement anticoagulant alternatif.
    - Réaliser une recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif
    - Réaliser un test fonctionnel si le résultat du test semi-quantitatif est positif.

- En cas de **probabilité clinique forte**, il est recommandé de :
    - Evaluer les fonctions rénale et hépatique afin de décider de la thérapeutique substitutive la plus adaptée.
    - Congeler les prélèvements destinés au diagnostic biologique de la TIH avant la mise en route du traitement anticoagulant alternatif.
    - Ne pas attendre les résultats de la recherche d'anticorps anti-F4P/H pour remplacer de traitement par héparine par un traitement anticoagulant alternatif.
    - Réaliser une recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif et par un test fonctionnel.

- Si le test immunologique semi-quantitatif et le test fonctionnel sont positifs, le diagnostic de TIH est confirmé.

- Si le test immunologique semi-quantitatif et le test fonctionnel sont négatifs, il est nécessaire de réévaluer la probabilité clinique et/ou de refaire le test immunologique semi-quantitatif sur un nouveau prélèvement. Si celui-ci est toujours négatif, le diagnostic de TIH est exclu et le traitement par héparine peut être repris.

b. Quelle attitude adopter chez un patient avec des résultats de tests immunologiques et d'activation plaquettaire discordants ?

En cas de discordance entre le test immunologique et le test fonctionnel, suivre *l'**Algorithme n°2***.

- Si seul le test semi-quantitatif est positif (ELISA ou CLIA), le seuil de positivité guidera la conduite à tenir :

- En cas de résultat **positif faible** proche du seuil de positivité, le diagnostic de TIH est peu probable.
- En cas de résultats **positif intermédiaire** (ELISA DO entre 1 et 2 ou CLIA entre 2 et 10 UA), le diagnostic de TIH ne peut pas être affirmé. Il est proposé de ré-évaluer la probabilité clinique, de réaliser de nouveau le test fonctionnel en faisant varier les conditions analytiques (cf ***§ C.6.a.***). Si un doute persiste, il est recommandé de contacter un centre expert, pour réaliser un autre type de test fonctionnel ou un test fonctionnel sensibilisé avec du F4P.
- En cas de résultat **positif fort** (ELISA DO > 2 ou CLIA > 10 UA), le diagnostic de TIH est très probable. Pour le confirmer, il est proposé de réévaluer la probabilité clinique, de réaliser de nouveau le test fonctionnel en faisant varier les conditions analytiques (cf ***§ C.6.a.***). Si un doute persiste, il est recommandé de contacter un centre expert, pour réaliser un autre type de test fonctionnel ou un test fonctionnel sensibilisé avec du F4P.

- Si seul le test fonctionnel est positif, il est proposé de réaliser un autre test immunologique semi-quantitatif, ELISA de préférence
  - Si le test semi quantitatif est positif (quelle que soit la valeur), le diagnostic de TIH est confirmé.
  - Si le test semi quantitatif est négatif, le diagnostic de TIH ne peut être exclu. Pour confirmer le diagnostic, il est proposé de réévaluer la probabilité clinique et de réaliser de nouveau le test fonctionnel. Si un doute persiste contacter un centre expert, pour réaliser un autre type de test fonctionnel.

- Dans tous les cas où les tests biologiques sont discordants, une discussion pluridisciplinaire est recommandée afin de définir le niveau de probabilité du diagnostic de TIH et la prise en charge thérapeutique la plus adaptée.

Rationnel

Cas d'un test immunologique positif et d'un test fonctionnel négatif

En raison de la faible spécificité des tests immunologiques détectant les anticorps anti-F4P/H, un résultat positif doit être confirmé par un test fonctionnel d'activation plaquettaire, réalisé de préférence avec des plaquettes lavées, pour une meilleure sensibilité (Greinacher 2015).

Si ce test fonctionnel est négatif, le diagnostic de TIH est éliminé dans la majeure partie des cas. Cependant si la probabilité clinique est élevée, il est utile de répéter le test fonctionnel avec un nouveau donneur et éventuellement avec une autre méthode. Des discordances ont ainsi été montrées entre le HIPA et le SRA (Eekels et al. 2019).

De plus, en cas de forte positivité du test semi-quantitatif, le diagnostic de TIH peut être retenu dans certains cas (Warkentin et al. 2017b; Raschke et al. 2017).

Il est également proposé de réaliser un test fonctionnel sensibilisé avec le F4P (cf ***§ C.4.a. Quelle place pour les tests sensibilisés par ajout de F4P : pour quels patients ? Quelles concentrations de F4P ? Quelle origine du F4P ?***), cette procédure permettant parfois de mettre en évidence des anticorps pathogènes non détectés par un test classique (Nazi et al. 2015; Vayne et al. 2017).

Cas d'un test immunologique négatif et d'un test fonctionnel positif

Si la recherche d'anticorps anti-F4P par un test immunologique est négative et que le test fonctionnel est positif, il est nécessaire, dans un premier temps, de vérifier si le test immunologique a été effectué en respectant la procédure, et de demander la réalisation d'un autre test immunologique. Un test rapide négatif devra systématiquement être contrôlé par un test ELISA. En effet la VPN des tests immunologiques, et plus particulièrement des tests rapides, est excellente mais n'est pas de 100 % (Leroux et al. 2014; Jousselme et al. 2021).

Si le premier test immunologique est un ELISA, le résultat devra être contrôlé sur un prélèvement ultérieur et éventuellement avec une trousse qui utilise une cible antigénique différente (complexes F4P/H, F4P/PVS, lysat plaquettaire/H).

L'existence d'anticorps anti-IL8 et anti-NAP2 a été rapportée dans ce type de situations, mais leur pathogénicité n'est toujours pas démontrée (Amiral et al. 1996; Trossaërt et al. 1998; Regnault et al. 2003). L'absence de test ELISA disponible pour rechercher ces anticorps est un problème majeur.

Quoi qu'il en soit, si une forte suspicion clinique existe, même en l'absence de test ELISA positif, il est nécessaire d'envisager le diagnostic de TIH et de traiter le patient en conséquence.

c. Quelles sont les bonnes pratiques d'utilisation du test rapide qualitatif (LFIA) dans cette stratégie diagnostique ?

Cf § B.5.c.

Propositions

- Un test rapide qualitatif (LFIA) négatif permet d'exclure en urgence le diagnostic de TIH uniquement si la probabilité clinique est intermédiaire.

- En cas de doute sur la probabilité clinique (exemple : patients de réanimation) un test immunologique semi-quantitatif doit être réalisé.

- Devant une forte probabilité de TIH, il n'est pas recommandé de réaliser un test rapide qualitatif (LFIA) en raison du risque non négligeable de faux négatif dans ce contexte clinique. Si le test qualitatif est tout de même réalisé et est négatif, la TIH ne peut être exclue.

- Dans aucun cas, le test rapide qualitatif (LFIA) positif ne permet de confirmer le diagnostic de TIH. Il est recommandé de compléter l'exploration biologique par un test immunologique semi-quantitatif et par un test fonctionnel (si le test semi-quantitatif est positif).

d. Quelles sont les bonnes pratiques d'utilisation des tests immunologiques semi-quantitatifs dans cette stratégie diagnostique ?

Propositions

- Un test semi-quantitatif négatif permet d'exclure le diagnostic de TIH uniquement si la probabilité clinique est intermédiaire.

- En cas de probabilité clinique forte, un test semi-quantitatif négatif seul ne permet pas d'exclure une TIH. Il est recommandé de compléter l'exploration biologique par un test fonctionnel.

- En cas de probabilité élevée de TIH et dans l'impossibilité de réaliser un test fonctionnel dans l'immédiat, le diagnostic de TIH est très probable si le résultat du test semi-quantitatif est fortement positif (DO > 2 pour un ELISA anti-F4P/H IgG spécifique ou > 10 UA en CLIA). Un test fonctionnel est toutefois recommandé dans tous les cas pour confirmer le diagnostic.

Rationnel

Les tests immunologiques rapides sont de deux types : qualitatifs (immunochromatographie latérale sur membrane, LFIA) ou semi-quantitatifs (chimiluminescence – CLIA – et immunoturbidimétrie, LIA). Ces tests ont été validés pour leur bonne sensibilité et permettent, s'ils sont négatifs et en cas de probabilité faible ou intermédiaire, d'exclure le diagnostic de TIH en 30 à 60 minutes après l'arrivée du prélèvement au laboratoire. Combinés avec le score de probabilité clinique, ils sont donc d'excellents outils pour exclure rapidement une TIH **en cas de probabilité intermédiaire**. Néanmoins, leur spécificité n'est pas suffisante

et, en cas de positivité, ils doivent toujours être associés à un test fonctionnel en fonction de la probabilité clinique (cf ***Algorithmes n° 1, 2 et 3***) (Althaus et al. 2013; Leroux et al. 2014; Nagler and Cuker 2017; Warkentin et al. 2018; Jousselme et al. 2021).

Les deux tests immunologiques rapides semi-quantitatifs disponibles à ce jour sont automatisés. L'un d'eux, réalisé sur l'automate ACL TOP® repose sur une méthode d'immunoturbidimétrie avec compétition entre les anticorps de TIH du patient et un anticorps modèle de TIH (KKO) fixé sur des particules de latex (HemosIL® HIT Ab)(méthode LIA). Ce test manque de spécificité car il détecte toutes les classes d'anticorps anti-F4P/H. L'autre test rapide semi-quantitatif basé sur une méthode de chimiluminescence, a été développé sur l'automate AcuStar (HemosIL® AcuStar HIT)(méthode CLIA). Point important : aucune corrélation linéaire n'a été mise en évidence entre l'amplitude du signal de chimiluminescence et le risque de TIH, mais un signal supérieur à 10 U/mL semble très prédictif du diagnostic de TIH (Favaloro et al. 2018; Jousselme et al. 2021).

Ces nouveaux tests automatisés offrent plusieurs avantages comparativement aux tests ELISA : un délai d'obtention des résultats plus court et une réalisation unitaire, deux caractéristiques importantes pour un diagnostic d'urgence. Cependant, des automates dédiés sont nécessaires à leur réalisation et un test fonctionnel est a priori indispensable pour confirmer le diagnostic de TIH. Néanmoins, il a été montré récemment qu'en combinant les résultats obtenus en chimiluminescence et en immunofiltration sur gel (mais ce dernier test n'est plus commercialisé) (Marchetti et al. 2020) ou en immunoturbidimétrie (Warkentin et al. 2020), le diagnostic de TIH peut être affirmé avec une très forte probabilité lorsque les deux tests sont clairement positifs (LIA et CLIA > 5 U/mL).

Il est important de souligner qu'aucun test immunologique ne possède une sensibilité de 100 %, et notamment les tests rapides (cf ***Tableau Supplémentaire 3 : Performances des tests immunologiques***). Il est donc important de garder à l'esprit que, devant une forte suspicion de TIH (score 4T > 6) et un test rapide négatif (semi-quantitatif voire qualitatif), il convient de remplacer le traitement par héparine et de réaliser un test fonctionnel. Si le résultat du test fonctionnel est positif, un test immunologique semi-quantitatif de type ELISA IgG spécifique doit également être réalisé.

2. Quelle stratégie diagnostique adopter chez un patient après circulation extra-corporelle ou sous ECMO ?

a. Recommandations générales

- Il est recommandé de rechercher des anticorps IgG anti-F4P/H après CEC ou dans le contexte d'une assistance de type ECMO, en cas de chute de la numération

plaquettaire après une remontée préalable (courbe biphasique), ou si une thrombopénie persiste au-delà de J5 après la CEC ou la pose d'ECMO.

- Il est recommandé de rechercher des anticorps IgG anti-F4P/H après CEC ou dans le contexte d'une assistance de type ECMO en cas de thrombose, quelle que soit l'évolution de la numération plaquettaire.

- Sous ECMO, il est proposé de rechercher systématiquement des anticorps IgG anti-FP4 en cas de thrombose inexpliquée et/ou de signes de dysfonctionnement du circuit (« caillotage » avec dépôt de fibrine en excès dans le circuit).

- En raison de l'incidence élevée des anticorps anti F4P non pathogènes après CEC ou pose d'ECMO, un test fonctionnel est nécessaire pour confirmer un diagnostic de TIH.

- Dans ce contexte spécifique et en l'absence de données de la littérature, l'utilisation du test rapide qualitatif (LFIA) n'est pas recommandée.

b. Description

La stratégie diagnostique recommandée en contexte de CEC ou d'ECMO est résumée dans l'***Algorithme n°3*.**

Propositions

- En cas de **thrombose** ou en cas d'absence de **correction de la NP au-delà de J5 après CEC** ou de **majoration de la thrombopénie au-delà de J5 après l'ECMO**, il est recommandé de réaliser la recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif. Si le résultat est obtenu dans la journée et
    - Si celui-ci est négatif, le diagnostic de TIH peut être exclu ; le traitement par héparine peut être poursuivi.
    - Si celui-ci est positif, le diagnostic de TIH est probable ; il est alors recommandé de :
        - Evaluer le risque de saignement, les fonctions rénale et hépatique afin de décider de la thérapeutique substitutive.
        - Réaliser un test fonctionnel.
            - En cas de discordance entre les deux tests, suivre l'***Algorithme n°2 et § D.1.d.***
            - Si le test immunologique semi-quantitatif et le test fonctionnel sont positifs, le diagnostic de TIH est confirmé.

- En cas de **thrombose** isolée ou en cas d'absence de **correction de la NP au-delà de J5 après CEC** ou de **majoration de la thrombopénie au-delà de J5 après l'ECMO**, et si le test immunologique semi-quantitatif n'est pas disponible dans la journée, il est recommandé de :
    - Congeler les prélèvements destinés au diagnostic biologique de la TIH avant la mise en route du traitement alternatif.
    - Ne pas attendre les résultats de la recherche d'anticorps anti-F4P/H pour remplacer le traitement par héparine par un traitement anticoagulant alternatif.
    - réaliser la recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif.
        - Si celui-ci est négatif, le diagnostic de TIH peut être exclu ; le traitement par héparine peut être poursuivi.
        - Si celui-ci est positif, le diagnostic de TIH est probable ; il est alors recommandé de réaliser un test fonctionnel.

- En cas d'**allure biphasique de la cinétique plaquettaire après CEC**, il est recommandé de :
    - Congeler les prélèvements destinés au diagnostic biologique de la TIH avant la mise en route du traitement alternatif.
    - Ne pas attendre les résultats de la recherche d'anticorps anti-F4P/H pour remplacer le traitement par héparine par un traitement anticoagulant alternatif.
    - Evaluer le risque de saignement, les fonctions rénale et hépatique afin de décider de la thérapeutique substitutive.
    - Réaliser une recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique semi-quantitatif et par un test fonctionnel.
        - Si le test immunologique semi-quantitatif et le test fonctionnel sont négatifs, il est nécessaire de réévaluer la probabilité clinique et/ou de refaire le test immunologique semi-quantitatif sur un nouveau prélèvement. Si celui-ci est toujours négatif, le diagnostic de TIH est exclu et le traitement par héparine peut être repris.
        - En cas de discordance entre les deux tests, suivre l'***Algorithme n°2 et § D.1.d.***
        - Si le test immunologique semi-quantitatif et le test fonctionnel sont positifs, le diagnostic de TIH est confirmé.

Rationnel

Contexte de CEC

La TIH est une complication fréquente de la chirurgie cardiaque (1 à 3 %) en raison des fortes concentrations d'héparine administrée durant la CEC, laquelle induit par ailleurs une forte activation plaquettaire avec libération intravasculaire de grandes quantités de F4P (Pouplard et al. 1999b; Warkentin and Greinacher 2003). Une thrombopénie au décours d'une CEC peut avoir de nombreuses origines, notamment l'hémodilution péri-opératoire et une consommation des plaquettes dans le circuit extracorporel. La thrombopénie est alors précoce, avant le 4ème jour post-opératoire (J4) et se corrige spontanément. Dans tous les cas, une autre cause de thrombopénie, sepsis, coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), autre médicament, doit être recherchée.

Dans ce contexte, le score des 4T est difficilement applicable. D'autres tests existent mais n'ont pas été validés, en particulier le score proposé par le groupe de travail GFHT-HIT (Tardy-Poncet et al. 2021a) et l'HEP score (Cuker et al. 2010; Pishko et al. 2018). La cinétique plaquettaire est donc la plus évocatrice. Classiquement, une majoration de la thrombopénie à J5 après une CEC ou une nouvelle chute de la numération plaquettaire (Pouplard et al. 2005) doit faire suspecter une TIH. De plus, l'apparition d'une thrombose veineuse ou artérielle, ou d'une thrombose de valve cardiaque, associée à une non correction de la numération des plaquettes est évocatrice d'une TIH. Une étude récente montre que si le patient a reçu un traitement prolongé par héparine dans les 10 jours précédant la CEC, la TIH peut survenir plus précocement dès J4 (Warkentin et al. 2022).

En raison de la prévalence importante des anticorps anti F4P non pathogènes après chirurgie cardiaque, il est admis qu'une DO < 1 associée à un test d'activation plaquettaire négatif peut exclure une TIH dans ce contexte (Selleng et al. 2011). De plus, une corrélation entre le titre d'anticorps IgG anti-F4P/H, reflété par la DO mesurée en ELISA et la probabilité post-test de TIH a été démontrée (Warkentin et al. 2008). Ainsi, la DO mesurée a une meilleure spécificité si elle est élevée (> 2) et un test immunologique semi-quantitatif de type ELISA est donc préférable. Toutefois, la présence d'anticorps anti-F4P/H ne permet pas à elle seule de confirmer le diagnostic de TIH qui devra donc être confirmé par des tests fonctionnels (Pouplard et al. 2005).

Si la recherche d'anticorps anti-F4P/H par un test immunologique est négative et que le test fonctionnel est positif, il est possible de rechercher des anticorps d'une spécificité autre que le F4P comme le sulfate de protamine dans un contexte de chirurgie cardiaque. Dans ces cas, la thrombopénie peut être précoce après l'injection de sulfate de protamine au décours de la chirurgie cardiaque (Pouplard et al. 2013; Bakchoul et al. 2016).

Contexte d'ECMO

Dans un contexte d'ECMO, la suspicion de TIH est souvent compliquée par le fait que le circuit d'ECMO peut entrainer lui-même une thrombopénie par consommation des plaquettes. De plus, les patients sont souvent septiques avec des complications thrombotiques ou hémorragiques d'origine multifactorielle.

Dans une grande étude française portant sur 5797 patients sous ECMO veino-artérielle (VA), il a été montré que la première cause de thrombopénie au décours de l'ECMO est médicamenteuse, avec de nombreuses molécules impliquées, y compris l'héparine (Kimmoun et al. 2018). D'autres études, sur un nombre plus limité de patients sous ECMO, rapportent le développement d'IgG anti-F4P/H chez près de 30 % des patients et une TIH chez seulement 3 % d'entre eux (Laverdure et al. 2016; Vayne et al. 2019b; Lubnow et al. 2022).

Dans ce contexte particulier, le score des 4T est difficilement applicable et la présence d'anticorps anti-FP4/héparine ne permet pas à elle seule de confirmer le diagnostic de TIH qui devra donc être confirmé par des tests fonctionnels (Laverdure et al. 2016).

Une thrombose du circuit d'ECMO ou la présence anormale de fibrine doit faire suspecter une TIH.

Sous ECMO et après CEC, des anticorps spécifiques IgG anti-F4P/H doivent préférentiellement être recherchés plutôt que les IgG, IgA et IgM anti-FP4 ; ces deux dernières classes étant peu ou non pathogènes et donc non spécifiques d'une TIH (Juhl et al. 2006; Greinacher et al. 2007; Selleng and Selleng 2016).

Dans tous les cas, une autre cause de thrombopénie doit être recherchée et en particulier la responsabilité d'un autre médicament (anti-infectieux, inhibiteur de la pompe à protons par exemple).

Références

Althaus K, Hron G, Strobel U, et al (2013) Evaluation of automated immunoassays in the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia. Thromb Res 131:e85-90. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.01.005

Althaus K, Pelzl L, Hidiatov O, et al (2019) Evaluation of a flow cytometer-based functional assay using platelet-rich plasma in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Res 180:55–61. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.05.016

Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, et al (1996) Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. Blood 88:410–416

Amiral J, Pouplard C, Vissac AM, et al (2000) Affinity purification of heparin-dependent antibodies to platelet factor 4 developed in heparin-induced thrombocytopenia: biological characteristics and effects on platelet activation. Br J Haematol 109:336–341. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02034.x

Arman M, Krauel K (2015) Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis. J Thromb Haemost JTH 13:893–908. https://doi.org/10.1111/jth.12905

Bakchoul T, Giptner A, Bein G, et al (2011) Performance characteristics of two commercially available IgG-specific immunoassays in the assessment of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Thromb Res 127:345–348. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2010.12.001

Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, et al (2009) Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 7:1260–1265. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03465.x

Bakchoul T, Jouni R, Warkentin TE (2016) Protamine (heparin)-induced thrombocytopenia: a review of the serological and clinical features associated with anti-protamine/heparin antibodies. J Thromb Haemost JTH 14:1685–1695. https://doi.org/10.1111/jth.13405

Bankova A, Andres Y, Horn MP, et al (2017) Rapid immunoassays for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: Comparison of diagnostic accuracy, reproducibility, and costs in clinical practice. PloS One 12:e0178289. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178289

Baumgärtel MW, Eichler P, Glöckner WM, et al (2000) Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): in vitro and in vivo cross-reactivity to danaparoid sodium and successful treatment with recombinant hirudin (lepirudin). Eur J Haematol 65:148–149. https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2000.9l225.x

Berroëta C, Crespin M, Bouabdallah K, et al (2016) Diagnostic Performance of a New Rapid Lateral Flow Immunoassay in Patients Suspected of Heparin-Induced Thrombocytopenia and Its Clinical Consequences. Semin Thromb Hemost 42:69–74. https://doi.org/10.1055/s-0035-1564840

Brodard J, Alberio L, Angelillo-Scherrer A, Nagler M (2020) Accuracy of heparin-induced platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Res 185:27–30. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2019.11.004

Bruhns P, Jönsson F (2015) Mouse and human FcR effector functions. Immunol Rev 268:25–51. https://doi.org/10.1111/imr.12350

Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al (2013) Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. J Thromb Haemost JTH. https://doi.org/10.1111/jth.12231

Cazenave JP, Hemmendinger S, Beretz A, et al (1983) [Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]. Ann Biol Clin (Paris) 41:167–179

Chan SL, Yi X, Wysocki E, et al (2019) Development of a Nonradioactive Platelet Serotonin Uptake and Release Assay by Micro-Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Using Minimal Blood Volume. Am J Clin Pathol 152:718–724. https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz094

Chong BH, Burgess J, Ismail F (1993) The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost 69:344–350

Chong BH, Castaldi PA (1986) Platelet proaggregating effect of heparin: possible mechanism for non-immune heparin-associated thrombocytopenia. Aust N Z J Med 16:715–716. https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.1986.tb00023.x

Chong BH, Grace CS, Rozenberg MC (1981) Heparin-induced thrombocytopenia: effect of heparin platelet antibody on platelets. Br J Haematol 49:531–540. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1981.tb07261.x

Christie DJ, Clinical and Laboratory Standards Institute (eds) (2008) Platelet function testing by aggregometry: approved guideline. CLSI, Wayne, PA

Cipok M, Tomer A, Elalamy I, et al (2019) Pathogenic heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis (HIT) antibodies determined by rapid functional flow cytometry. Eur J Haematol 103:225–233. https://doi.org/10.1111/ejh.13277

Cuker A (2014) Clinical and laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: an integrated approach. Semin Thromb Hemost 40:106–114. https://doi.org/10.1055/s-0033-1363461

Cuker A, Arepally G, Crowther MA, et al (2010) The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. J Thromb Haemost JTH 8:2642–2650. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.04059.x

Cuker A, Arepally GM, Chong BH, et al (2018) American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. Blood Adv 2:3360–3392. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018024489

Cuker A, Gimotty PA, Crowther MA, Warkentin TE (2012) Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. Blood 120:4160–4167. https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-443051

Cuker A, Ortel TL (2009) ASH evidence-based guidelines: is the IgG-specific anti-PF4/heparin ELISA superior to the polyspecific ELISA in the laboratory diagnosis of HIT? Hematol Am Soc Hematol Educ Program 250–252. https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.250

Deeks JJ, Altman DG (2004) Diagnostic tests 4: likelihood ratios. BMJ 329:168–169. https://doi.org/10.1136/bmj.329.7458.168

Eekels JJM, Althaus K, Bakchoul T, et al (2019) An international external quality assessment for laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 17:525–531. https://doi.org/10.1111/jth.14383

Eekels JJM, Pachler C, Krause N, et al (2020) Ticagrelor causes false-negative functional tests for heparin-induced thrombocytopenia. Blood 135:875–878. https://doi.org/10.1182/blood.2019003582

Eichler P, Budde U, Haas S, et al (1999) 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 81:625–629

Favaloro EJ (2018) Laboratory tests for identification or exclusion of heparin induced thrombocytopenia: HIT or miss? Am J Hematol 93:308–314. https://doi.org/10.1002/ajh.24979

Favaloro EJ, McCaughan G, Mohammed S, et al (2018) HIT or miss? A comprehensive contemporary investigation of laboratory tests for heparin induced thrombocytopenia. Pathology (Phila) 50:426–436. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.11.089

Fratantoni JC, Pollet R, Gralnick HR (1975) Heparin-induced thrombocytopenia: confirmation of diagnosis with in vitro methods. Blood 45:395–401

Galea V, Khaterchi A, Robert F, et al (2013) Heparin-induced multiple electrode aggregometry is a promising and useful functional tool for heparin-induced thrombocytopenia diagnosis: confirmation in a prospective study. Platelets 24:441–447. https://doi.org/10.3109/09537104.2012.724736

Garritsen HS, Probst-Kepper M, Legath N, et al (2014) High sensitivity and specificity of a new functional flow cytometry assay for clinically significant heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Int J Lab Hematol 36:135–143. https://doi.org/10.1111/ijlh.12136

Gonthier M-C, Gendron N, Eloy P, et al (2021) Heparin-induced Thrombocytopenia Diagnosis: A Retrospective Study Comparing Heparin-induced Platelet Activation Test to 14 C-serotonin Release Assay. TH Open Companion J Thromb Haemost 5:e507–e512. https://doi.org/10.1055/a-1653-5065

Greinacher A (2009) Heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 7 Suppl 1:9–12. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03385.x

Greinacher A (2015) CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia. N Engl J Med 373:252–261. https://doi.org/10.1056/NEJMcp1411910

Greinacher A, Amiral J, Dummel V, et al (1994) Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. Transfusion (Paris) 34:381–385. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1994.34594249047.x

Greinacher A, Juhl D, Strobel U, et al (2007) 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 JTH 5:1666–1673. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02617.x

Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C (1991) A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. Thromb Haemost 66:734–736

Greinacher A, Selleng K, Warkentin TE (2017) Autoimmune heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 15:2099–2114. https://doi.org/10.1111/jth.13813

Gruel Y, De Maistre E, Pouplard C, et al (2020) Diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia. Anaesth Crit Care Pain Med 39:291–310. https://doi.org/10.1016/j.accpm.2020.03.012

Harrison P, Mackie I, Mumford A, et al (2011) Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. Br J Haematol 155:30–44. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08793.x

Horn J, Jena S, Aksan A, Friess W (2019) Freeze/thaw of IGG solutions. Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV 134:185–189. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.12.001

Husseinzadeh HD, Gimotty PA, Pishko AM, et al (2017) Diagnostic accuracy of IgG-specific versus polyspecific enzyme-linked immunoassays in heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. J Thromb Haemost JTH 15:1203–1212. https://doi.org/10.1111/jth.13692

Jin J, Baker SA, Hall ET, et al (2019) Implementation of Whole-Blood Impedance Aggregometry for Heparin-Induced Thrombocytopenia Functional Assay and Case Discussion. Am J Clin Pathol 152:50–58. https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz013

Jones CG, Pechauer SM, Curtis BR, et al (2018) Normal plasma IgG inhibits HIT antibody-mediated platelet activation: implications for therapeutic plasma exchange. Blood 131:703–706. https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-803031

Jourdy Y, Nougier C, Rugeri L, et al (2015) Prospective evaluation of automatized PF4/heparin immunoassays HemosIL HIT-ab (PF4-H) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Int J Lab Hematol 37:244–252. https://doi.org/10.1111/ijlh.12275

Jousselme E, Guéry E-A, Nougier C, et al (2021) Prospective evaluation of two specific IgG immunoassays (HemosIL® AcuStar HIT-IgG and HAT45G®) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: A Bayesian approach. Int J Lab Hematol 43:468–476. https://doi.org/10.1111/ijlh.13404

Juhl D, Eichler P, Lubenow N, et al (2006) Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia. Eur J Haematol 76:420–426. https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2005.00621.x

Kataria V, Moore L, Harrison S, et al (2020) Evaluation of Serotonin Release Assay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Optical Density Thresholds for Heparin-Induced Thrombocytopenia in

Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation. Crit Care Med 48:e82–e86. https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004090

Kimmoun A, Oulehri W, Sonneville R, et al (2018) Prevalence and outcome of heparin-induced thrombocytopenia diagnosed under veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation: a retrospective nationwide study. Intensive Care Med 44:1460–1469. https://doi.org/10.1007/s00134-018-5346-y

Kizlik-Masson C, Vayne C, McKenzie SE, et al (2017) 5B9, a monoclonal antiplatelet factor 4/heparin IgG with a human Fc fragment that mimics heparin-induced thrombocytopenia antibodies. J Thromb Haemost JTH 15:2065–2075. https://doi.org/10.1111/jth.13786

Koch S, Harenberg J, Odel M, et al (2002) Development of a high-pressure liquid chromatography method for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Am J Clin Pathol 117:900–904. https://doi.org/10.1309/4XUM-4M9U-G3D3-5JKF

Krauel K, Fürll B, Warkentin TE, et al (2008) Heparin-induced thrombocytopenia--therapeutic concentrations of danaparoid, unlike fondaparinux and direct thrombin inhibitors, inhibit formation of platelet factor 4-heparin complexes. J Thromb Haemost JTH 6:2160–2167. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03171.x

Laverdure F, Louvain-Quintard V, Kortchinsky T, et al (2016) PF4-heparin antibodies during ECMO: incidence, course, and outcomes. Intensive Care Med 42:1082–1083. https://doi.org/10.1007/s00134-016-4262-2

Lee DH, Warkentin TE, Denomme GA, et al (1996) A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. Br J Haematol 95:724–731. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1944.x

Leroux D, Hezard N, Lebreton A, et al (2014) Prospective evaluation of a rapid nanoparticle-based lateral flow immunoassay (STic Expert(®) HIT) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Br J Haematol 166:774–782. https://doi.org/10.1111/bjh.12939

Leroy J, Leclerc MH, Delahousse B, et al (1985) Treatment of heparin-associated thrombocytopenia and thrombosis with low molecular weight heparin (CY 216). Semin Thromb Hemost 11:326–329. https://doi.org/10.1055/s-2007-1004387

Liederman Z, Van Cott EM, Smock K, et al (2019) Heparin-induced thrombocytopenia: An international assessment of the quality of laboratory testing. J Thromb Haemost JTH 17:2123–2130. https://doi.org/10.1111/jth.14611

Lillo-Le Louët A, Boutouyrie P, Alhenc-Gelas M, et al (2004) Diagnostic score for heparin-induced thrombocytopenia after cardiopulmonary bypass. J Thromb Haemost JTH 2:1882–1888. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00949.x

Linkins L-A, Dans AL, Moores LK, et al (2012) Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest 141:e495S-e530S. https://doi.org/10.1378/chest.11-2303

Lubnow M, Berger J, Schneckenpointner R, et al (2022) Prevalence and outcomes of patients developing heparin-induced thrombocytopenia during extracorporeal membrane oxygenation. PloS One 17:e0272577. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272577

Maeda T, Nakagawa K, Murata K, et al (2017) Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. Thromb Haemost 117:127–138. https://doi.org/10.1160/TH16-06-0482

Magnani H, Gallus A (2006) Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): A report of 1,478 clinical outcomes of patients treated with danaparoid (Orgaran) from 1982 to mid-2004. Thromb Haemost 95:967–981. https://doi.org/10.1160/TH05-07-0489

Maličev E, Kozak M, Rožman P (2016) Evaluation of a flow cytometric assay for the confirmation of heparin-induced thrombocytopenia. Int J Lab Hematol 38:240–245. https://doi.org/10.1111/ijlh.12475

Marchetti M, Barelli S, Zermatten MG, et al (2020) Rapid and accurate Bayesian diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Blood 135:1171–1184. https://doi.org/10.1182/blood.2019002845

Michaut L, Laurent N, Kentsch K, et al (2014) Stability of anti-immunotherapeutic antibodies in frozen human serum samples. Bioanalysis 6:1395–1407. https://doi.org/10.4155/bio.14.97

Minet V, Bailly N, Douxfils J, et al (2013) Assessment of the performances of AcuStar HIT and the combination with heparin-induced multiple electrode aggregometry: a retrospective study. Thromb Res 132:352–359. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.06.004

Minet V, Baudar J, Bailly N, et al (2014) Rapid exclusion of the diagnosis of immune HIT by AcuStar HIT and heparin-induced multiple electrode aggregometry. Thromb Res 133:1074–1078. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.01.014

Minet V, Dogné J-M, Mullier F (2017) Functional Assays in the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Review. Mol Basel Switz 22:617. https://doi.org/10.3390/molecules22040617

Minet V, Evrard J, Vancraeynest C, et al (2018) Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of serotonin and thromboxane B2 from activated platelets. Int J Lab Hematol 40:663–671. https://doi.org/10.1111/ijlh.12901

Morel-Kopp M-C, Aboud M, Tan CW, et al (2010) Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Thromb Res 125:e234-239. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2009.12.001

Morel-Kopp M-C, Aboud M, Tan CW, et al (2011) Heparin-induced thrombocytopenia: evaluation of IgG and IgGAM ELISA assays. Int J Lab Hematol 33:245–250. https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2010.01276.x

Morel-Kopp M-C, Mullier F, Gkalea V, et al (2016) Heparin-induced multi-electrode aggregometry method for heparin-induced thrombocytopenia testing: communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost JTH 14:2548–2552. https://doi.org/10.1111/jth.13516

Morel-Kopp M-C, Tan CW, Brighton TA, et al (2012) Validation of whole blood impedance aggregometry as a new diagnostic tool for HIT: results of a large Australian study. Thromb Haemost 107:575–583. https://doi.org/10.1160/TH11-09-0631

Mullier F, Bailly N, Cornet Y, et al (2010) Contribution of platelet microparticles generation assay to the diagnosis of type II heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost 103:1277–1281. https://doi.org/10.1160/TH09-10-0711

Mullier F, Minet V, Bailly N, et al (2014) Platelet microparticle generation assay: a valuable test for immune heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. Thromb Res 133:1068–1073. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.12.009

Mustard JF, Perry DW, Ardlie NG, Packham MA (1972) Preparation of suspensions of washed platelets from humans. Br J Haematol 22:193–204. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1972.tb08800.x

Nagler M, Bachmann LM, ten Cate H, ten Cate-Hoek A (2016) Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. Blood 127:546–557. https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-661215

Nagler M, Cuker A (2017) Profile of Instrumentation Laboratory's HemosIL® AcuStar HIT-Ab(PF4-H) assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Expert Rev Mol Diagn 17:419–426. https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1304213

Nazi I, Arnold DM, Warkentin TE, et al (2015) Distinguishing between anti-platelet factor 4/heparin antibodies that can and cannot cause heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 13:1900–1907. https://doi.org/10.1111/jth.13066

Padmanabhan A, Jones CG, Bougie DW, et al (2015a) A modified PF4-dependent, CD62p expression assay selectively detects serotonin-releasing antibodies in patients suspected of HIT. Thromb Haemost 114:1322–1323. https://doi.org/10.1160/TH15-02-0175

Padmanabhan A, Jones CG, Bougie DW, et al (2015b) Heparin-independent, PF4-dependent binding of HIT antibodies to platelets: implications for HIT pathogenesis. Blood 125:155–161. https://doi.org/10.1182/blood-2014-06-580894

Padmanabhan A, Jones CG, Curtis BR, et al (2016) A Novel PF4-Dependent Platelet Activation Assay Identifies Patients Likely to Have Heparin-Induced Thrombocytopenia/Thrombosis. Chest 150:506–515. https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.02.641

Padmanabhan A, Jones CG, Pechauer SM, et al (2017) IVIg for Treatment of Severe Refractory Heparin-Induced Thrombocytopenia. Chest 152:478–485. https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.03.050

Pishko AM, Cuker A (2021) Diagnosing heparin-induced thrombocytopenia: The need for accuracy and speed. Int J Lab Hematol 43 Suppl 1:96–102. https://doi.org/10.1111/ijlh.13564

Pishko AM, Fardin S, Lefler DS, et al (2018) Prospective comparison of the HEP score and 4Ts score for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Blood Adv 2:3155–3162. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023077

Poley S, Mempel W (2001) Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test:

Flow cytometric testing of HIT. Eur J Haematol 66:253–262. https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2001.066004253.x

Polgár J, Eichler P, Greinacher A, Clemetson KJ (1998) Adenosine diphosphate (ADP) and ADP receptor play a major role in platelet activation/aggregation induced by sera from heparin-induced thrombocytopenia patients. Blood 91:549–554

Pötzsch B, Keller M, Madlener K, Müller-Berghaus G (1996) The use of heparinase improves the specificity of crossreactivity testing in heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost 76:1121

Pouplard C, Amiral J, Borg JY, et al (1999a) Decision analysis for use of platelet aggregation test, carbon 14-serotonin release assay, and heparin-platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Am J Clin Pathol 111:700–706. https://doi.org/10.1093/ajcp/111.5.700

Pouplard C, Amiral J, Borg JY, et al (1997) Differences in specificity of heparin-dependent antibodies developed in heparin-induced thrombocytopenia and consequences on cross-reactivity with danaparoid sodium. Br J Haematol 99:273–280. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.4183225.x

Pouplard C, Gueret P, Fouassier M, et al (2007) Prospective evaluation of the “4Ts” score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 5:1373–1379. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02524.x

Pouplard C, Leroux D, Regina S, et al (2010) Effectiveness of a new immunoassay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and improved specificity when detecting IgG antibodies. Thromb Haemost 103:145–150. https://doi.org/10.1160/TH09-04-0253

Pouplard C, Leroux D, Rollin J, et al (2013) Incidence of antibodies to protamine sulfate/heparin complexes incardiac surgery patients and impact on platelet activation and clinical outcome. Thromb Haemost 109:1141–1147. https://doi.org/10.1160/TH12-11-0844

Pouplard C, May MA, Iochmann S, et al (1999b) Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin : clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. Circulation 99:2530–2536. https://doi.org/10.1161/01.cir.99.19.2530

Pouplard C, May MA, Regina S, et al (2005) Changes in platelet count after cardiac surgery can effectively predict the development of pathogenic heparin-dependent antibodies. Br J Haematol 128:837–841. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05381.x

Pouplard C, Rollin J, Vayne C, et al (2022) Multicentre evaluation of 5B9, a monoclonal anti-PF4/heparin IgG mimicking human HIT antibodies, as an internal quality control in HIT functional assays: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Immunology. J Thromb Haemost JTH 20:252–259. https://doi.org/10.1111/jth.15560

Prechel MM, McDonald MK, Jeske WP, et al (2005) Activation of platelets by heparin-induced thrombocytopenia antibodies in the serotonin release assay is not dependent on the presence of heparin. J Thromb Haemost JTH 3:2168–2175. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01560.x

Price EA, Hayward CPM, Moffat KA, et al (2007) Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia is inconsistent in North America: a survey of North American specialized coagulation laboratories. Thromb Haemost 98:1357–1361. https://doi.org/10.1160/th07-06-0401

Raschke RA, Gallo T, Curry SC, et al (2017) Clinical effectiveness of a Bayesian algorithm for the diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 15:1640–1645. https://doi.org/10.1111/jth.13758

Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, et al (2006) Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. Blood 107:2346–2353. https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3122

Refaai MA, Conley G, Ortel TL, Francis JL (2019) Evaluation of a rapid and automated heparin-induced thrombocytopenia immunoassay. Int J Lab Hematol 41:478–484. https://doi.org/10.1111/ijlh.13029

Regnault V, de Maistre E, Carteaux J-P, et al (2003) Platelet activation induced by human antibodies to interleukin-8. Blood 101:1419–1421. https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0620

Reilly-Stitt C, Jennings I, Kitchen S, et al (2022) Anti-PF4 testing for vaccine-induced immune thrombocytopenia and thrombosis (VITT): Results from a NEQAS, ECAT and SSC collaborative exercise in 385 centers worldwide. J Thromb Haemost JTH 20:1875–1879. https://doi.org/10.1111/jth.15766

Ritchie BM, Connors JM, Sylvester KW (2017) Comparison of an IgG-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Cutoff of 0.4 Versus 0.8 and 1.0 Optical Density Units for Heparin-Induced Thrombocytopenia. Clin Appl Thromb Off J Int Acad Clin Appl Thromb 23:282–286. https://doi.org/10.1177/1076029615606532

Rollin J, Charuel N, Gruel Y, et al (2022) Variable serotonin release assay pattern and specificity of PF4-specific antibodies in HIT, and clinical relevance. J Thromb Haemost JTH 20:2646–2655. https://doi.org/10.1111/jth.15848

Rollin J, Pouplard C, Sung HC, et al (2015) Increased risk of thrombosis in FcγRIIA 131RR patients with HIT due to defective control of platelet activation by plasma IgG2. Blood 125:2397–2404. https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-594515

Sachs UJ, von Hesberg J, Santoso S, et al (2011) Evaluation of a new nanoparticle-based lateral-flow immunoassay for the exclusion of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). Thromb Haemost 106:1197–1202. https://doi.org/10.1160/th-11-06-0390

Samuelson Bannow B, Warad DM, Jones CG, et al (2021) A prospective, blinded study of a PF4-dependent assay for HIT diagnosis. Blood 137:1082–1089. https://doi.org/10.1182/blood.2020008195

Selleng S, Schreier N, Wollert H-G, Greinacher A (2011) The diagnostic value of the anti-PF4/heparin immunoassay high-dose heparin confirmatory test in cardiac surgery patients. Anesth Analg 112:774–776. https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e31820b5f39

Selleng S, Selleng K (2016) Heparin-induced thrombocytopenia in cardiac surgery and critically ill patients. Thromb Haemost 116:843–851. https://doi.org/10.1160/TH16-03-0230

Selleng S, Selleng K, Friesecke S, et al (2015) Prevalence and clinical implications of anti-PF4/heparin antibodies in intensive care patients: a prospective observational study. J Thromb Thrombolysis 39:60–67. https://doi.org/10.1007/s11239-014-1105-2

Sheridan D, Carter C, Kelton JG (1986) A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. Blood 67:27–30

Socher I, Kroll H, Jorks S, et al (2008) Heparin-independent activation of platelets by heparin-induced thrombocytopenia antibodies: a common occurrence. J Thromb Haemost JTH 6:197–200. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02815.x

Sono-Koree NK, Crist RA, Frank EL, et al (2016) A high-performance liquid chromatography method for the serotonin release assay is equivalent to the radioactive method. Int J Lab Hematol 38:72–80. https://doi.org/10.1111/ijlh.12442

Stepanian A, Fischer F, Flaujac C, et al (2023) Light transmission aggregometry for platelet function testing: summary of recommendations and proposals for test accreditation. Rev Francoph Hémostase Thromb 5:157–86

Stewart MW, Etches WS, Boshkov LK, Gordon PA (1995) Heparin-induced thrombocytopenia: an improved method of detection based on lumi-aggregometry. Br J Haematol 91:173–177. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05265.x

Sun L, Gimotty PA, Lakshmanan S, Cuker A (2016) Diagnostic accuracy of rapid immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia. A systematic review and meta-analysis. Thromb Haemost 115:1044–1055. https://doi.org/10.1160/TH15-06-0523

Tardy B, Lecompte T, Mullier F, et al (2020) Detection of Platelet-Activating Antibodies Associated with Heparin-Induced Thrombocytopenia. J Clin Med 9:1226. https://doi.org/10.3390/jcm9041226

Tardy-Poncet B, de Maistre E, Pouplard C, et al (2021a) Heparin-induced thrombocytopenia: Construction of a pretest diagnostic score derived from the analysis of a prospective multinational database, with internal validation. J Thromb Haemost JTH 19:1959–1972. https://doi.org/10.1111/jth.15344

Tardy-Poncet B, Montmartin A, Piot M, et al (2021b) Functional Flow Cytometric Assay for Reliable and Convenient Heparin-Induced Thrombocytopenia Diagnosis in Daily Practice. Biomedicines 9:332. https://doi.org/10.3390/biomedicines9040332

Tardy-Poncet B, Wolf M, Lasne D, et al (2009) Danaparoid cross-reactivity with heparin-induced thrombocytopenia antibodies: report of 12 cases. Intensive Care Med 35:1449–1453. https://doi.org/10.1007/s00134-009-1464-x

Tomer A (1997) A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Br J Haematol 98:648–656. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.2613077.x

Tóth O, Calatzis A, Penz S, et al (2006) Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. Thromb Haemost 96:781–788

Trossaërt M, Gaillard A, Commin PL, et al (1998) High incidence of anti-heparin/platelet factor 4 antibodies after cardiopulmonary bypass surgery. Br J Haematol 101:653–655. https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00750.x

Van Hoecke F, Devreese K (2012) Evaluation of two new automated chemiluminescent assays (HemosIL® AcuStar HIT-IgG and HemosIL® AcuStar HIT-Ab) for the detection of heparin-induced antibodies in the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Int J Lab Hematol 34:410–416. https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2012.01413.x

Vayne C, Guéry E-A, Charuel N, et al (2020) Evaluation of functional assays for the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia using 5B9, a monoclonal IgG that mimics human antibodies. J Thromb Haemost JTH 18:968–975. https://doi.org/10.1111/jth.14749

Vayne C, Guery E-A, Kizlik-Masson C, et al (2017) Beneficial effect of exogenous platelet factor 4 for detecting pathogenic heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Br J Haematol 179:811–819. https://doi.org/10.1111/bjh.14955

Vayne C, May M-A, Bourguignon T, et al (2019a) Frequency and Clinical Impact of Platelet Factor 4-Specific Antibodies in Patients Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation. Thromb Haemost 119:1138–1146. https://doi.org/10.1055/s-0039-1688827

Vayne C, May M-A, Bourguignon T, et al (2019b) Frequency and Clinical Impact of Platelet Factor 4-Specific Antibodies in Patients Undergoing Extracorporeal Membrane Oxygenation. Thromb Haemost 119:1138–1146. https://doi.org/10.1055/s-0039-1688827

Vitale M, Tazzari P, Ricci F, et al (2001) Comparison between different laboratory tests for the detection and prevention of heparin-induced thrombocytopenia. Cytometry 46:290–295. https://doi.org/10.1002/cyto.1170

Vun CM, Evans S, Chong BH (1996) Cross-reactivity study of low molecular weight heparins and heparinoid in heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Res 81:525–532. https://doi.org/10.1016/0049-3848(96)00027-8

Warkentin TE, Arnold DM, Nazi I, Kelton JG (2015a) The platelet serotonin-release assay. Am J Hematol 90:564–572. https://doi.org/10.1002/ajh.24006

Warkentin TE, Greinacher A (2003) Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery. Ann Thorac Surg 76:638–648. https://doi.org/10.1016/s0003-4975(03)00756-2

Warkentin TE, Hayward CP, Smith CA, et al (1992) Determinants of donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. J Lab Clin Med 120:371–379

Warkentin TE, Kelton JG (2001) Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. N Engl J Med 344:1286–1292. https://doi.org/10.1056/NEJM200104263441704

Warkentin TE, Pai M, Linkins L-A (2017a) Direct oral anticoagulants for treatment of HIT: update of Hamilton experience and literature review. Blood 130:1104–1113. https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-778993

Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, et al (2000) Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. Blood 96:1703–1708

Warkentin TE, Sheppard J-AI, Chu FV, et al (2015b) Plasma exchange to remove HIT antibodies: dissociation between enzyme-immunoassay and platelet activation test reactivities. Blood 125:195–198. https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-590844

Warkentin TE, Sheppard J-AI, Linkins L-A, et al (2018) High sensitivity and specificity of an automated IgG-specific chemiluminescence immunoassay for diagnosis of HIT. Blood 132:1345–1349. https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-847483

Warkentin TE, Sheppard J-AI, Linkins L-A, et al (2017b) Performance characteristics of an automated latex immunoturbidimetric assay [HemosIL® HIT-Ab(PF4-H)] for the diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Res 153:108–117. https://doi.org/10.1016/j.thromres.2017.03.010

Warkentin TE, Sheppard J-AI, Moore JC, et al (2005) Laboratory testing for the antibodies that cause heparin-induced thrombocytopenia: how much class do we need? J Lab Clin Med 146:341–346. https://doi.org/10.1016/j.lab.2005.08.003

Warkentin TE, Sheppard J-AI, Smith JW, et al (2020) Combination of two complementary automated rapid assays for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT). J Thromb Haemost JTH 18:1435–1446. https://doi.org/10.1111/jth.14794

Warkentin TE, Sheppard J-AI, Whitlock RP (2022) Temporal presentations of heparin-induced thrombocytopenia following cardiac surgery: A single-center, retrospective cohort study. J Thromb Haemost JTH 20:2601–2616. https://doi.org/10.1111/jth.15826

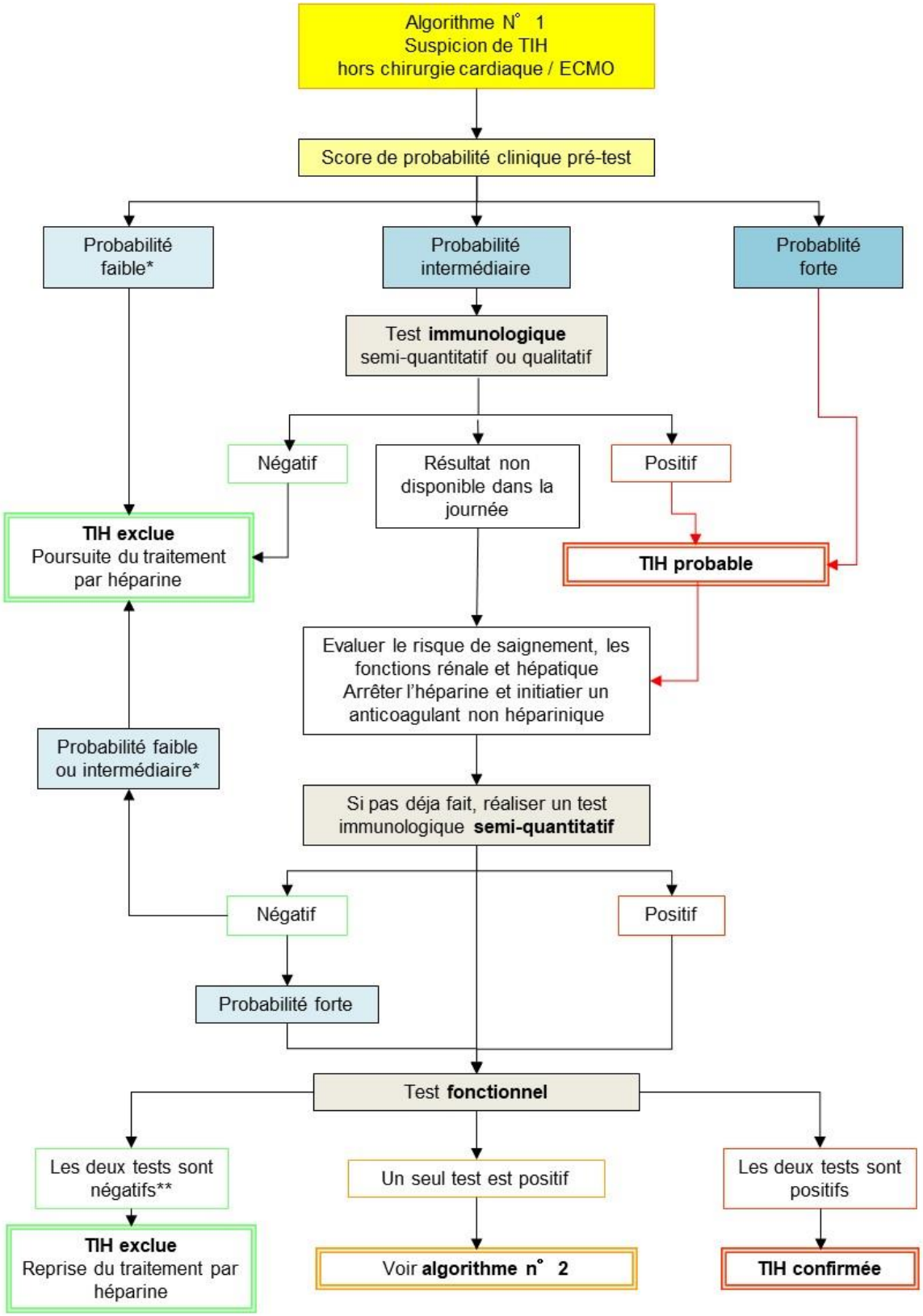
Warkentin TE, Sheppard JI (2006) No significant improvement in diagnostic specificity of an anti-PF4/polyanion immunoassay with use of high heparin confirmatory procedure. J Thromb Haemost JTH 4:281–282. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01698.x

Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, et al (2008) Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. J Thromb Haemost JTH 6:1304–1312. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03025.x

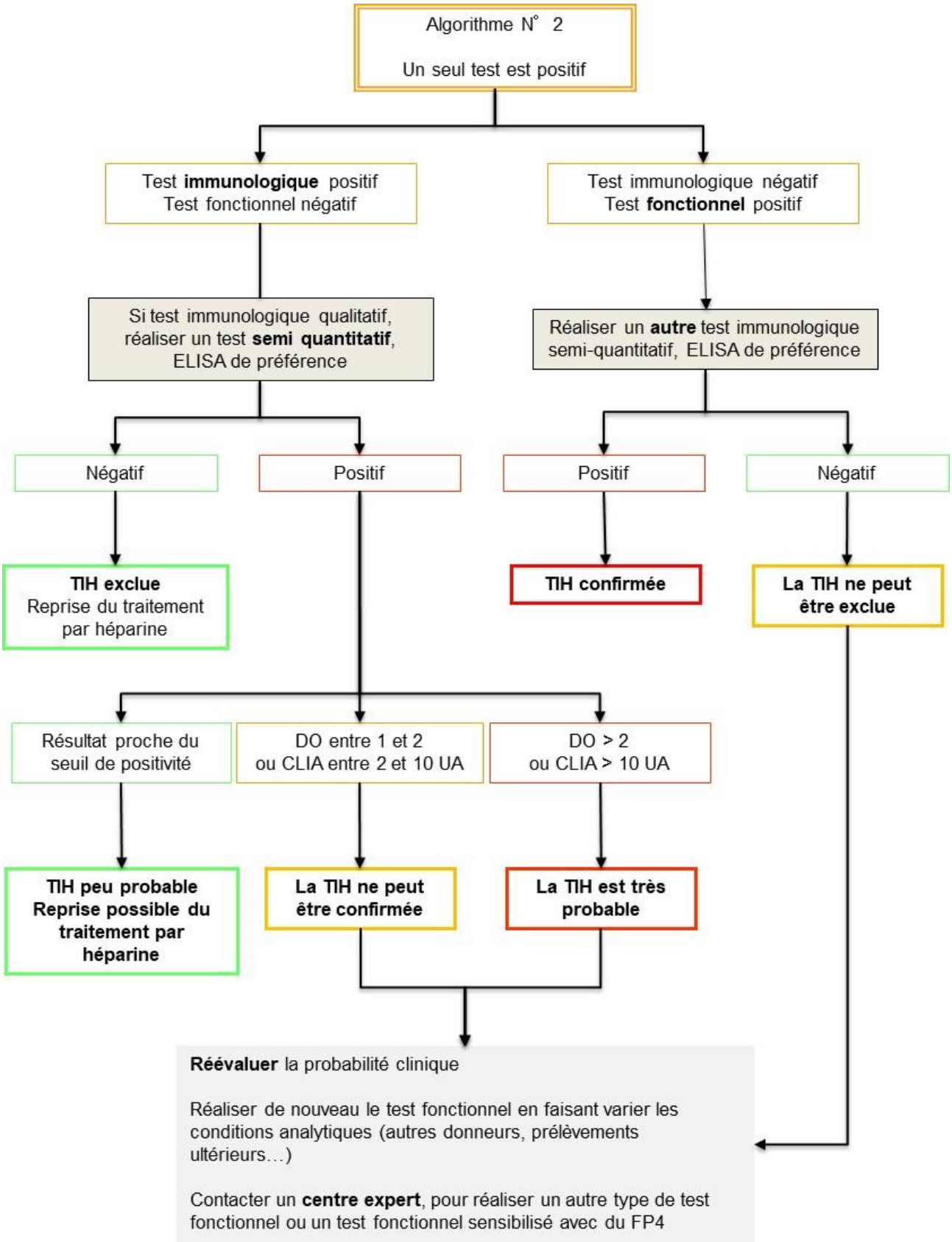
Whitlatch NL, Kong DF, Metjian AD, et al (2010) Validation of the high-dose heparin confirmatory step for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Blood 116:1761–1766. https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-262659

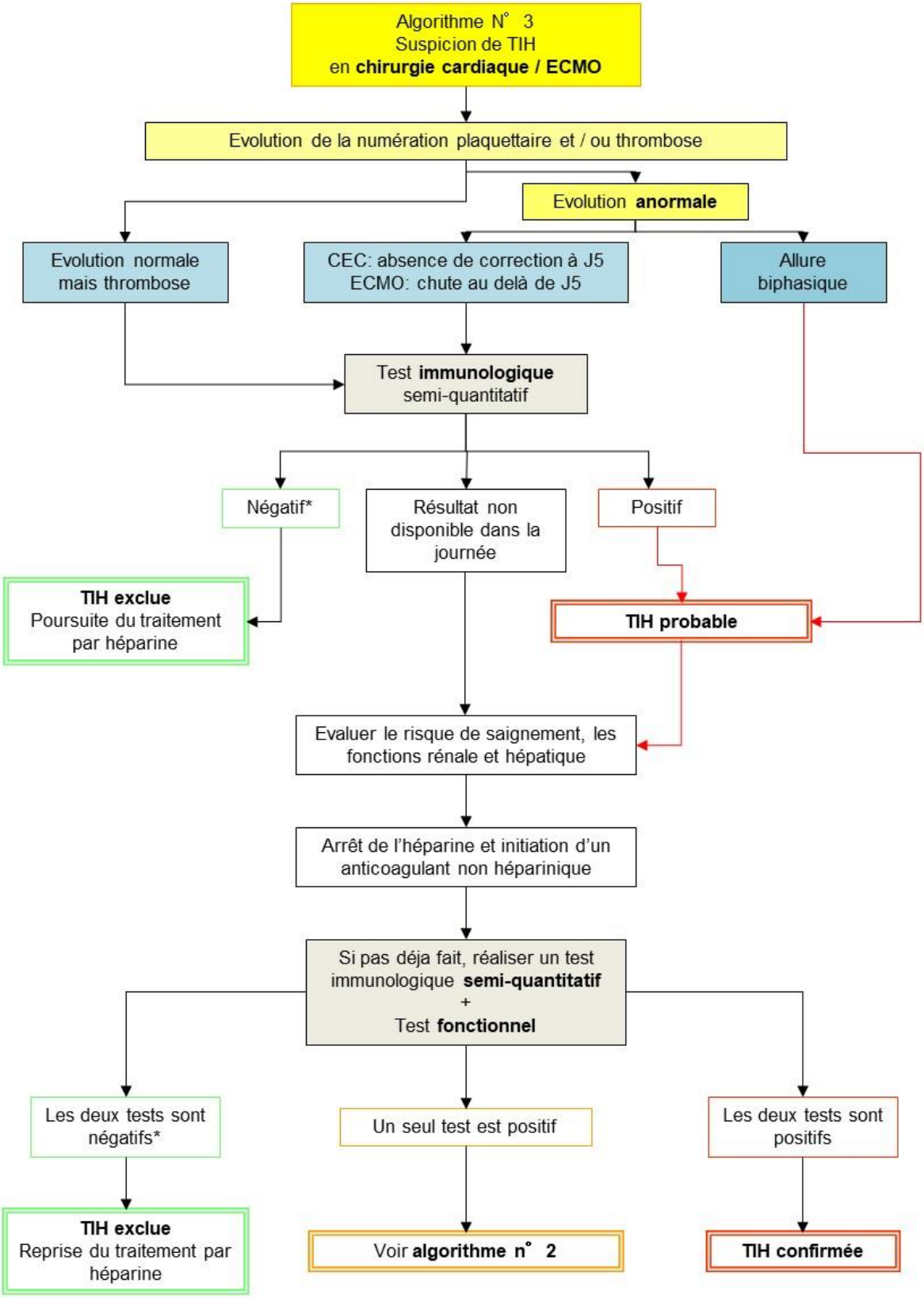
World Health Organization. (2002) Diagnostic Imaging and Laboratory Technology. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. WHO/DIL/LAB/99.1 rev.2

Zwicker JI, Uhl L, Huang W-Y, et al (2004) Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost JTH 2:2133–2137. https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.01039.x



* réévaluer la probabilité en cas de nouvel événement clinique ou biologique
** réévaluer la probabilité clinique et/ou refaire le test immunologique semi-quantitatif sur un prélèvement ultérieur


Algorithme N° 2
Un seul test est positif
Test **immunologique** positif
Test fonctionnel négatif
Test immunologique négatif
Test **fonctionnel** positif
Si test immunologique qualitatif, réaliser un test **semi quantitatif**, ELISA de préférence
Réaliser un **autre** test immunologique semi-quantitatif, ELISA de préférence
Négatif
Positif
Positif
Négatif
TIH exclue
Reprise du traitement par héparine
TIH confirmée
La TIH ne peut être exclue
Résultat proche du seuil de positivité
DO entre 1 et 2
ou CLIA entre 2 et 10 UA
DO > 2
ou CLIA > 10 UA
TIH peu probable
Reprise possible du traitement par héparine
La TIH ne peut être confirmée
La TIH est très probable
Réévaluer la probabilité clinique
Réaliser de nouveau le test fonctionnel en faisant varier les conditions analytiques (autres donneurs, prélèvements ultérieurs…)
Contacter un **centre expert**, pour réaliser un autre type de test fonctionnel ou un test fonctionnel sensibilisé avec du FP4



* réévaluer la probabilité clinique et/ou refaire un test immunologique semi-quantitatif

Tableau Supplémentaire 1. Score des 4Ts.

	2	**1**	**0**
Thrombopénie	Diminution de plus de 50 % de la NP et nadir des plaquettes ≥ 20 G/L Sans chirurgie dans les 3 jours précédents	Diminution de 30 à 50 % ou Plaquettes entre 10 et 19 G/L ou Diminution de plus de 50% de la NP avec chirurgie récente (3 derniers jours)	Diminution de moins de 30 % de la NP ou Nadir des plaquettes < 10 G/L
Délai de survenue de la thrombopénie (Timing)	Chute de la NP (ou thrombose) 5 à 10 jours après le début de l'héparine ou dans un délai de 24 heures si héparinothérapie récente (5 à 30 jours)	Chute de la NP après plus de 10 jours d'héparine ou dans un délai de 24 heures si héparinothérapie semi-récente (de 31 à 100 jours)	Thrombopénie survenant avant 4 jours de traitement sans héparinothérapie dans les 100 derniers jours
Thromboses et autres complications	Nouvelle thrombose veineuse ou artérielle (confirmée) ou nécrose cutanée ou réaction systémique après injection d'héparine non-fractionnée ou hémorragie des surrénales	Extension ou récidive d'une thrombose préexistante ou suspicion d'une nouvelle thrombose en attente de confirmation ou érythème cutané après injection d'héparine	Aucun évènement
AuTres causes de thrombopénie	Aucune autre	Autre cause possible : - Sepsis sans confirmation microbiologique - Thrombopénie associée à une ventilation mécanique - Autre	Autre cause probable : - Chirurgie dans les 72 heures - Infection confirmée - Chimio- ou radiothérapie dans les 20 derniers jours - Coagulation intravasculaire disséminée due à une autre cause - Purpura post-transfusionnel - Plaquettes < 20 G/L et médicament(s) thrombopéniant(s)
NP : numération plaquettaire			

Tableau Supplémentaire 2. Caractéristiques des tests immunologiques.

Type de test	Nom	Fabricant	Principe	Cible antigénique	Ig détectées	Rendu du résultat	Équipement	Seuil de positivité analytique (fournisseur)	Contrôle interne de qualité	Interférences analytiques	Nature échantillon
Test immunologique rapide	STicExpert®	Diagnostica Stago	Immuno-chromatographie sur membrane (LFIA, *lateral-flow immunoassay*)	F4P/ polyanion	IgG	Qualitatif	/	Ligne de test de même couleur ou plus foncée que la ligne de la fiche évaluation	Ligne témoin : contrôle fonctionnel de migration	Pas d'interférence HIL	Sérum ou plasma
	HemosIL AcuStar HIT-Ab®	Werfen	Immuno-chimiluminescence (CLIA, *chemiluminescent immunoassay*)	F4P/ PVS	IgG/A/M	Semi-quantitatif (Unités arbitraires)	ACL Acustar	Fixe : 1 U/mL Plasma témoins n=150 0,07-1,01 (IC 95 %) Plasma héparine sans TIH n=91 0,04-2,27 (IC 95 %)	2 niveaux de contrôle : haut et bas	Interférences si : Hb > 500 mg/dL Bili > 180 mg/L TG > 1250 mg/L HNF > 1 UI/mL FR > 800 UI/mL Pas d'interférence avec aPL	Sérum ou plasma
	HemosIL AcuStar HIT-IgG®				IgG			Fixe : 1 U/mL Plasma témoins n=150 0,03-0,39 (IC 95 %) Plasma héparine sans TIH n=91 0,04-1,34 (IC 95 %)			
	HemosIL HIT-Ab®		Immunoturbidimétrie Méthode compétitive d'agglutination de particules de latex recouvertes d'un Ac monoclonal de souris		IgG/A/M	Semi-quantitatif (Unités arbitraires)	ACL TOP	Fixe : 1 UA/mL Plasma témoins n=131 0-0,6 (IC 95 %)	2 niveaux de contrôle : haut (3 fois le cut off) et bas (< au cut off)	Interférence si : Hb > 495 mg/dL Bili > 18 mg/dL TG > 375 mg/dL FR > 1000 UI/mL HAMA > 1µg/mL	Sérum ou plasma

			anti-FP4/H (KKO) (LIA, *latex immunoassay*)					Plasma héparine sans TIH n=51 0-1,2 (IC 95 %)		Pas d'interférences avec SAPL 1 aire ou 2ndaire	
Test immunologique de type ELISA	X-HAT13®, X-HAT45®	Immucor, LifeCodes	ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)	F4P/ PVS	IgG/A/M	Semi-quantitatif (Unité en DO duplicate)	Lecteur ELISA	Fixe : 0,4 Sérum témoins n=120 (IC 95 %)	2 niveaux de contrôle : positif fort et négatif	La présence de CI ou d'Ig agrégées peut entraîner des faux positifs	Sérum ou plasma
	X-HAT13G®, X-HAT45G®				IgG				2 niveaux de contrôle : positif fort et négatif	Pas d'interférence avec les auto-Ac anti-plaquettes, anti-HLA	
	Zymutest HIA IgGAM®	Hyphen-Biomed		Lysat plaquettaire/ héparine	IgG/A/M			Fixe : > 0,5	2 niveaux de contrôle : positif (Ac chimérique anti-F4P polyclonaux IgG/A/M ou IgG humaines) et négatif (plasmas normaux) Valeurs attendues variables d'un lot à l'autre mais toujours Pos ≥ 1 Neg ≤ 0,3 (IgG/A/M) ou ≤ 0,25 (IgG)	HNF > 1 UI/mL Température de la pièce (20 ± 1° C) La présence d'une inflammation, d'une infection, de CI circulants, d'une gammapathie ou d'une MAI peut induire des réactions faiblement positives	Sérum ou plasma
	Zymutest HIA IgG®				IgG			Pos : > 0,5 Faible Pos : 0,3 < X ≤ 0,5 Neg : ≤ 0,3 Cut-off ajustable selon T° pièce Positivité : > X % (référence X marqué sur papillon kit)			Plasma, sérum, ou tout autre liquide biologique pouvant contenir les anticorps
	Asserachrom® HPIA-IgG	Diagnostica Stago		F4P/Héparine	IgG			Variable Redéfini pour chaque coffret grâce à « IgG référence » : plasma humain lyophilisé contenant des IgG réagissant avec les complexes FP4/H	2 niveaux de contrôle : positif (plasma humain lyophilisé contenant des IgG réagissant avec les complexes F4P/H) et négatif (plasma humain lyophilisé)	HNF/HBPM > 2,5 UI/mL (dissociation des complexes F4P/H) MAI : un résultat positif chez un patient connu avec une MAI doit être analysé avec précaution	Plasma ou sérum Dilution plasma : 1/101ème Dilution sérum : 1/121ème

								Positivité : > X % (référence X marqué sur papillon kit)			

Ac : anticorps, aPL : antiphospholipides, Bili : bilirubine, CI : complexes immuns, DO : densité optique, F4P : facteur 4 plaquettaire, FR : facteur rhumatoïde, HAMA : anticorps humains anti-souris, Hb : hémoglobine, HBPM : héparine de bas poids moléculaire, HIL : hémolyse/ictère/lactescence, HNF : héparine non-fractionnée, Ig : immunoglobuline, MAI : maladie auto-immune, Neg : négatif, Pos : positif, PVS : polyvinylsulfonate, SAPL : syndrome des antiphospholipides, SD : standard deviation, TG : triglycérides

Tableau Supplémentaire 3. Performances des tests immunologiques.

Type de test	Nom	Fabricant	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPN/VPP (%)	Critères diagnostiques de confirmation de la TIH	Test fonctionnel utilisé	Effectif	Références	Performances selon méta-analyses (%) (Sun et al. 2015) (Nagler et al. 2017)
Tests immunologiques rapides	STicExpert® Milenia QuickLine HIT®	Diagnostica Stago Milenia Biotec	100	93	100/54	4Ts ≥ 4 + HIPA pos	HIPA	452	(Sachs et al. 2011)	Se : 97 Spe : 91 VPP : 66 VPN : 100
			95	92	98/75	4Ts ≥ 4 + remontée de la NP après arrêt de l'héparine + SRA pos	SRA	90	(Berroëta et al. 2016)	
			97,5 (plasma) 100 (sérum)	83,4 (plasma) 82,2 (sérum)	99,6/44,4 (plasma) 100/43,7 (sérum)	4Ts ≥ 4 + ELISA IgG pos + SRA pos	SRA	334	(Leroux et al. 2014)	
	HemosIL AcuStar HIT-Ab®	Werfen	98,1	82,1	99,7/41,8	HIPA pos (manque de données cliniques)	HIPA	128 (52 TIH)	(Althaus et al. 2013)	Se : 95 Spe : 94 VPP : 42 VPN : 100
	HemosIL AcuStar HIT-IgG®		96,2	96,5	99,5/78,1	HIPA pos (manque de données cliniques)	HIPA	128 (52 TIH)	(Althaus et al. 2013)	Se : 97 Spe : 82 VPP : 71 VPN : 99
			88,1	85,2	/	SRA pos pour le calcul des performances	SRA	103	(Favaloro et al. 2018)	
			97	98,5	99,8/82,1	4Ts ≥ 4 ou revue de cas si faible + EIA polyspécifique pos + SRA pos	SRA	509 (33 TIH)	(Warkentin et al. 2018)	
	HemosIL HIT-Ab®		100	75,6	100/45,5	HIPA pos (manque de données cliniques)	HIPA	128 (52 TIH)	(Althaus et al. 2013)	/
			/	/	87/79	4T ELISA SRA mais SRA pos pour le calcul des performances	SRA	537 (91 TIH)	(Refaai et al. 2019)	

			97,4	94	55,6/99,7 1 faux négatif	ELISA IgG pos + SRA pos (cut-off: 50 %)	SRA	429 (31 TIH)	(Warkentin et al. 2017)	
			100	91,2	10/52,9	Algorithme ISTH 4Ts ≥ 4 + ELISA pos + test fonctionnel pos	HIPA ou SRA	120 (9 TIH)	(Jourdy et al. 2015)	
Tests immunologiques de type ELISA	X-HAT13®, X-HAT45®	Immucor, LifeCodes	100	85,3	100/39,1	Cliniques selon les critères de l'ACCP	TAP SRA HIMEA	104 (9 TIH)	(Minet et al. 2013)	
			100	81,7	100/38,6	4Ts, ELISA, SRA mais que SRA pos pour le calcul des performances	SRA	213 (22 TIH)	(Pouplard et al. 2007)	
			100	80,8	100/28	4Ts ≥ 4 + HIPA pos	HIPA	500 (35 TIH)	(Bakchoul et al. 2009)	
	X-HAT13G®, X-HAT45G®		100	95,9	/	4Ts ELISA SRA mais que SRA pour le calcul des performances	SRA	107 (11 TIH)	(Morel-Kopp et al. 2011)	Se : 99,6 Spe : 89,9
			100	89,2	100/43	4Ts ≥ 4 + HIPA pos	HIPA	452	(Sachs et al. 2011)	
	Zymutest HIA IgGAM®	Hyphen-Biomed	100	87,5	/	4Ts ELISA SRA mais que SRA pour le calcul des performances	SRA	107 (11 TIH)	(Morel-Kopp et al. 2011)	Se : 99,5 Spe : 77,6
			97,5	77	/	ELISA + SRA pos (SRA pour le calcul des performances)	SRA	101 (40)	(Pouplard et al. 2010)	
	Zymutest HIA IgG®		100	95,9	/	4Ts ELISA SRA mais que SRA pour le calcul des performances	SRA	107 (11 TIH)	(Morel-Kopp et al. 2011)	Se : 99,2 Spe : 85,8

			96,2	95,7	/	2 experts tenant compte de : 4Ts, EIA, HIPA, évolution clinique et biologique	HIPA	687	(Marchetti et al. 2020)	
			100	92,3	100/56,2	Algorithme ISTH 4Ts ≥ 4 + ELISA pos + test fonctionnel pos	HIPA ou SRA	120 (9 TIH)	(Jourdy et al. 2015)	
	Asserachrom ® HPIA-IgG	Diagnostica Stago								Se : 72 Spe : 93,8 (données fournisseur)

4Ts : score des 4Ts, ACCP : *American College of Chest Physicians*, EIA : *enzyme immunoassay*, ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*, HIMEA : *heparin-induced multiple electrode aggregometry*, HIPA : *heparin-induced platelet activation*, Neg : négatif, Pos : positif, Se : sensibilité, Spe : spécificité, SRA : *serotonin release assay*, TAP : tests d'agrégation plaquettaire, TIH : thrombopénie induite par l'héparine, VPN : valeur prédictive négative, VPP : valeur prédictive positive

Tableau Supplémentaire 4. Caractéristiques et performances du test d'agrégation plaquettaire (TAP)

Références	**Population étudiée**	**Test comparateur**	**Matrice** **Témoins / Donneurs de plaquettes**	**Tests d'agrégation plaquettaire**			**Autres commentaires**
				Héparines testées **Conditions analytiques**	**Agrégomètre, agonistes, durée, seuil**	**Performances**	
(Chong et al. 1993)	23 sujets sains et 17 TIH+	SRA	Plasma ou sérum Chauffage (56°C 30 minutes)	HNF 0.1, 0.5, 1.0 et 100 UI/mL 340 µL PRP + 150 µL PPP + 10 µL hep	Chronolog Test collagène 15 minutes Pos > 25 %	Dg TIH Se : 39 à 81 % Spe : 90 %	SRA : Se : 65 à 94 % Spe : 90 %
(Greinacher et al. 1994)	209 suspicions	ELISA anti-FP4/H	Plasma ≥ 2 témoins	HNF 0.2 et 100 UI/mL et HBPM 120 µL PRP + 75 µL PPP + 10 µL hep	Labor Pos > 25 %	NA	ELISA : 33 % pos TAP : 11.5 % pos HIPA : 33,5 % pos
(Pouplard et al. 1999)	100 suspicions (44 TIH+)	SRA	Plasma	HNF 0.1 et 1 UI/mL 135 µL PRP + 90 µL PPP + 25 µL hep	Biodata Test collagène 15 minutes Pos > 20 %	Dg TIH Se : 91 % Spe : 77 %	SRA : Se : 88 % Spe : 100 %
(Morel-Kopp et al. 2010)	97 suspicions (15 ELISA anti-FP4/H+)	HIMEA	Plasma citrate 3.2% Témoins féminins Arg/Arg131	HNF 0,5 et 100 UI/mL 340 µL PRP + 150 µL PPP + 10 µL hep	Chronolog 20 minutes UAC	NA	10 TAP+/12 HIMEA+ 9 SRA+ / 11 HIMEA+
(Galea te al. 2013)	200 suspicions	HIMEA	ND	HNF 1,0 et 100 UI/mL	Soderel 15 minutes	Dg TIH/SRA+ Se : 76 %	HIMEA Se : 81 %

				170 µL PRP + 100 µL PPP + 30 µL hep	Pos > 25 %	Spe : 96 %	Spe : 99 %
(Minet et al. 2013)	106 suspicions (9 TIH+)	HIMEA	Plasma	HNF 0.5, 1.0, 10 et 500 UI/mL	PACKS-5 Helena Test coll, ADP, AA Pos > 20 %	Dg TIH Se : 100 % Spe : 90,5 %	HIMEA Se : 100 % Spe : 97,5 %
(Brodard et al. 2020)	122 suspicions (39 TIH+)	HIPA	Plasma, sérum 4 donneurs	HNF 0,5 et 100 UI/mL HBPM 0,5 UI/mL	APACT 4004 15 minutes Pos > 50 % (2/4)	Dg TIH/HIPA+ Se : 69 % Spe : 100 %	Prévalence 32 %

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*, HIMEA : *heparin-induced multiple electrode aggregometry*, HIPA : *heparin-induced platelet activation*, ND : non déterminé, Neg : négatif, Pos : positif, PPP : plasma pauvre en plaquettes, PRP : plasma riche en plaquettes, Se : sensibilité, Spe : spécificité, SRA : *serotonin release assay*, TAP : tests d'agrégation plaquettaire, TIH : thrombopénie induite par l'héparine, VPN : valeur prédictive négative, VPP : valeur prédictive positive.

Tableau Supplémentaire 5. Caractéristiques et performances des tests de CMF utilisés dans le diagnostic de TIH

Etude	Méthodologie (Volume initial de PRP, C° finale d'héparine, seuil d'activation…)	Critères de positivité du test	Patients étudiés	Critère pour le diagnostic de TIH n patients TIH+	Performances du test	Comparaison
(Tomer et al. 1997)	PRP (70µL) Hep 0,1 - 0,3 et 100 UI/mL Seuil d'activation : Calcium ionorphore	Liaison à l'annexine V ≥ 6,6 % avec [faible C° d'hep] et inhibition avec [forte C° d'hep] Zone grise de 6 à 6,6 % Nombre de donneurs de plaquettes non mentionné	25 patients avec suspicion clinique de TIH	Diagnostic clinique et SRA + 19 TIH +	Se : 95 % Spe : 100 %	SRA
(Poley et al. 2001)	PRP (70 µL) Hep 0,1 - 0,3 et 200 UI/mL Seuil d'activation : ADP	Liaison à l'annexine V ≥ 11 % avec [faible C° d'hep] et inhibition avec [forte C° d'hep] Plaquettes poolées	248 patients avec suspicion clinique de TIH	Diagnostic clinique et HIPA +; 17 TIH +	Se : 95 % Spe : 96 %	HIPA (4 donneurs)
(Garritsen et al. 2014)	PRP (35 µL) Hep 0,1 - 0,3 et 100 UI/mL Agitation lente 15 rpm	Liaison à l'annexine V (HIT Alert®) ≥ 7,6 % avec [faible C° d'hep] et inhibition > 50 % avec [forte C° d'hep] Un donneur de plaquettes sélectionné	346 patients avec suspicion clinique de TIH	Diagnostic clinique 17 TIH +	Se : 88,2 % Spe : 99,1 %	Diagnostic clinique
					Coef agrément 52,7 %	ELISA
					Coef agrément 23,2 %	PaGIA
(Mullier et al. 2014)	Sang total (165 µL) Hep 1 et 500 UI/mL	Microparticules plaquettaires (PMP) Ratio PMP annexine V+ [faible C° d'hep] / [forte C° d'hep] Un seul donneur groupe O	53 patients avec suspicion clinique de TIH	Diagnostic clinique 9 TIH +	Se : 88,9 % Spe : 100 %	NA
(Malicev et al. 2016)	PRP (13,4 µL) Hep 2 et 200 UI/mL	> 10 % de plaquettes CD62P+ avec [faible C° d'hep] et inhibition > 50% avec [forte C° d'hep] Deux donneurs de plaquettes	41 patients avec suspicion clinique de TIH et ELISA IgG +	Diagnostic clinique et HIPA + 14 TIH +	Se : 82 % Spe : 83 %	NA
(Maeda et al. 2017)	Plaquettes lavées (75 µL) Hep 0, 0,1 et 100 UI/mLet HBPM 0,3 UI/mL	PMP CD42b+ Ratio PMP/évènements totaux > 10% avec [faible C° d'hep] et < 10% avec [forte C° d'hep] Deux donneurs de plaquettes sélectionnés	401 patients avec suspicion clinique de TIH	Score 4T ≥ 4, et FCM + 102 TIH +		NA
(Cipok et al. 2019)	PRP (10 mL) Hep 0,3 et 100 UI/mL Seuil d'activation : TRAP	Expression de P-sélectine x 2 celle du témoin Un seul donneur de plaquettes	650 patients avec suspicion clinique de TIH 63 patients avec SRA	SRA +; 21 TIH +	Se : 90,5 % Spe : 95,2 %	NA
(Althaus et al. 2019)	PRP (10 mL) Hep 0,3 et 100 UI/mL Seuil d'activation : TRAP	Expression P-selectin (Emo-test HIT®). HEPLA > 13,0 % Zone grise 9,6-13 % Un seul donneur de plaquettes non sélectionné	164 patients avec suspicion clinique de TIH et IgG EIA +	HIPA +; 33 TIH +	Se : 69,7 % Spe : 75,4 %	NA

(Samuelson Bannow et al. 2021)	Plaquettes lavées Groupe O PF4 37,5 mg/mL Hep 100 UI/mL Max d'activation : TRAP	% activation = [(MFI échantillon-MFI sérum Normal) / (MFI TRAP - MFI sérum Normal)] x 100 Test positif : % activation > 35 % et inhibition > 50 % avec 100 UI/mL d'hep	409 patients avec suspicion clinique de TIH Test ELISA et Score 4Ts	TIH + si DO $\geq$ 1 et score $\geq$ 6 ou DO $\geq$ 2 et score $\geq$ 4	Spe : 94 % 0,87-1,0 (95 % IC) Se : 0,88 0,78-0,98 (95 % IC)	SRA Spe : 0,91 0,82-1,0 (95 % IC) Se : 0,86 0,77-0,96 (95 % IC)

C° : concentration, IC : intervalle de confiance, hep : héparine, EIA : *enzyme immunoassay*, ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*, HIPA : *heparin-induced platelet activation*, MFI : moyenne d'intensité de fluorescence, NA : non applicable, PRP : plasma riche en plaquettes, Se : sensibilité, Spe : spécificité, SRA : *serotonin release assay*, TIH : thrombopénie induite par l'héparine, TRAP : *Thrombin receptor-activating peptide*.

Tableau Supplémentaire 6. Méthodologies proposées dans la littérature pour la réalisation du test HIMEA

Références	**Vol Sang Total (A) en µL**	**Vol sol saline (B) en µL**	**Vol échantillon patient (C) en µL**	**Incubation**	**Volume héparine (D) en µL**	**HNF UI/mL (C° finale)**	**Temps d'enregistrement**	**Seuils AUC**
(Morel Kopp et al. 2016)	300	100	200	A+B+C 1 minute Puis D	20	1 – 200	15 minutes	> 30 UA avec HNF < 30 UA sans héparine
(Gkalea et al. 2019)	340	/	200	A + C 1 minute Puis D	40	1-100	15 minutes	> 267 UA avec HNF 1 IU/mL > 20 % UA avec solution saline Inhibition > 50 % avec forte C° héparine
(Minet et al. 2013)	150	300	150	A + B + C 3 minutes Puis D	50 d'HNF (Leo)	1 – 10 - 385	30 minutes	> 276 UA avec HNF 1 IU/mL > 183 UA avec HNF 10 IU/mL Inhibition > 80 % avec forte C° héparine Contrôle négatif < 100 UA
(Jing Jin et al. 2019)	300	/	150	A + D 2 minutes	150	0,5 - 100	15 minutes	> 50 UA avec faible C° héparine Inhibition > 50 % avec forte C° héparine
(Vayne et al. 2020)	300	/	150	A + D 6 minutes Puis C	150	0-0,5-1-200	15 minutes	> 82 UA avec faible C° héparine Inhibition > 50 % avec forte C° héparine
C° : concentration, HIMEA : *heparin-induced multiple electrode aggregometry*, UA : unité arbitraire.								

Références tableaux supplémentaires

(Sachs et al. 2011)
(Berroëta et al. 2016)
(Refaai et al. 2019)
(Jourdy et al. 2015)
(Pouplard et al. 2007)
(Morel-Kopp et al. 2011)
(Pouplard et al. 2010)
(Vayne et al. 2020)