



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιολόγηση και εφαρμογή στην καθημερινή πράξη της λειτουργικής μεθόδου διάγνωσης της θρομβοπενίας από ηπαρίνη ΗΙΜΕΑ (Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry)

POST GRADUATE THESIS

Evaluation and application in daily practice of the functional method of diagnosis of heparin thrombocytopenia – ΗΙΜΕΑ (Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry)

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ(ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Θωμάς Παππάς

Thomas Pappas

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Αναστάσιος Κριεμπάρδης

Anastasios Kriebardis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

**Evaluation and application in daily practice of the functional
method of diagnosis of heparin thrombocytopenia –
HIMEA (Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry)**

Thomas Pappas

Dml19010

Dml19010@uniwa.gr

FIRST SUPERVISOR

Anastasios Kriebardis

SECOND SUPERVISOR

Hara Georgatzakou

THIRD SUPERVISOR

Efstathia Papageorgiou

AIGALEO 2021

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία, είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Θωμάς Παππάς

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τους:

Κος Κριεμπάρδη Αναστάσιο, εισηγητή καθηγητή της διπλωματικής εργασίας για την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη.

Κα Γεωργιάτση Χαρά εισηγήτρια Β΄ της διπλωματικής εργασίας.

Κα Παπαγεωργίου Ευσταθία εισηγήτρια Γ΄ της διπλωματικής εργασίας.

Κα Γκαλέα Βασιλική, ιατρό Βιοπαθολόγο ειδικευθείσα στην αιμόσταση, επιτηρήτρια καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Ευχαριστώ για την επίβλεψη, την καθοδήγηση, την πολύτιμη βοήθεια και την εμπιστοσύνη. Αυτή η διπλωματική εργασία δεν θα είχε πραγματοποιηθεί χωρίς την επιμονή, την υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την πρώτη στιγμή μέχρι το τέλος.

Κα Ματσούκα Χάρης, ιατρό αιματολόγο και συντονίστρια διευθύντρια του αιματολογικού τμήματος Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα». Ευχαριστώ για την στήριξη από την πρώτη στιγμή.

Κα Μπαρμπαρούση Δέσποινα, ιατρό αιματολόγο του αιματολογικού τμήματος Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα».

Κα Παύλου Ευθυμία, τεχνολόγο. Ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθεια.

Το αιματολογικό τμήμα του Γ.Ν.Α «Ευαγγελισμός» για την πολύτιμη βοήθεια.

Όλους τους συναδέλφους και συνεργάτες του αιματολογικού τμήματος του Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα». Ιδιαίτερα την Δημητράκη Πλουμιστή, τεχνολόγο και Μώραλη Ευαγγέλια, τεχνολόγο. Ευχαριστώ για την στήριξη και την βοήθεια.

Τέλος, να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην σύντροφο μου για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή όλο αυτό το διάστημα.

Αφιέρωσεις

Στη σύντροφο μου Δήμητρα
και στους γονείς μου Φίλιππο και Βιτόρια

Περίληψη

Εισαγωγή: Η θρομβοπενία από ηπαρίνη HIT (Heparin-induced thrombocytopenia) αποτελεί μία σοβαρή και απειλητική για την ζωή επιπλοκή της θεραπείας με ηπαρίνη. Η HIT σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο φλεβικών και αρτηριακών θρομβώσεων και υψηλή θνητότητα, ιδίως αν καθυστερήσει η διάγνωση και η αντιμετώπιση της. Η εργαστηριακή διάγνωση της HIT γίνεται με ανοσολογικές δοκιμασίες που ανιχνεύουν τα αντισώματα έναντι PF4/ηπαρίνης και λειτουργικές δοκιμασίες των αιμοπεταλίων που αναγνωρίζουν τα παθογόνα αντισώματα, δηλαδή αυτά που σχετίζονται με τις κλινικές εκδηλώσεις HIT. Ο συνδυασμός ανοσολογικής και λειτουργικής δοκιμασίας των αιμοπεταλίων βελτιώνει σημαντικά την εργαστηριακή διάγνωση της HIT και ελαττώνει το πρόβλημα υπερδιάγνωσης της HIT που έχει βλαπτικές συνέπειες στον ασθενή. Το HIMEA είναι μία αξιόπιστη, εύκολη, γρήγορη και ημιαυτόματη μέθοδος συσσώρευσης αιμοπεταλίων που δεν απαιτεί ειδικό υλικοτεχνικό εξοπλισμό κατάλληλη και για έλεγχο ενός μόνο δείγματος. Η εφαρμογή του στα αιματολογικά εργαστήρια θα βελτιώσει σημαντικά την διάγνωση του HIT.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί και να τεθεί σε εφαρμογή η λειτουργική μέθοδος διάγνωσης της θρομβοπενίας από ηπαρίνη HIMEA (Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry), με το συσσωρόμετρο ολικού αίματος Multiplate (Multiplate analyzer Dynabyte, Munich, Germany) στην καθημερινή πράξη του Αιματολογικού εργαστηρίου Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα». Αυτό θα βοηθήσει στην πιο ακριβή εργαστηριακή διάγνωση του συνδρόμου και στην πιο σωστή αντιμετώπιση των ασθενών με HIT. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του HIMEA θα ελαττώσει σημαντικά το πρόβλημα υπερδιάγνωσης της HIT που έχει αρνητικές επιπτώσεις. Λαμβάνοντας επίσης το δεδομένο ότι ελάχιστα εργαστήρια Πανελλαδικώς διενεργούν λειτουργικές δοκιμασίες HIT η δυνατότητα εφαρμογής αυτής της μεθόδου στο Αιματολογικό εργαστήριο του Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα» κρίνεται σημαντική καθώς μπορεί να συνεισφέρει στην σωστή διάγνωση της HIT σε ένα πιο ευρύ φάσμα.

Μέθοδος: Υλικό της μελέτης αποτέλεσε πλάσμα και ορός 18 ασθενών που ελέγχθηκαν για HIT με ανοσολογική δοκιμασία στο αιματολογικό εργαστήριο του Γ.Ν.Α «Ευαγγελισμός» και στο τμήμα αιμόστασης του Γ.Ν.Α «Ιπποκράτειο». Τα δείγματα ήταν χαρακτηρισμένα ως θετικά (+) ή αρνητικά (-). 15 επιλέχθηκαν για έλεγχο με την λειτουργική δοκιμασία, τα υπόλοιπα κρίθηκαν ακατάλληλα προς εξέταση. Η λειτουργική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HIMEA και όλες οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στο Multiplate (Multiplate analyzer Dynabyte, Munich, Germany) σύμφωνα με το αναλυτικό πρωτόκολλο και τα κριτήρια που έχουν ορισθεί.

Το αίμα από υγιείς δότες που χρειάστηκε για την πραγματοποίηση της ανάλυσης ελήφθη από συναδέλφους εργαζόμενους του εργαστηρίου υστέρα από την συγκατάθεση τους. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Αιματολογικό τμήμα του Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα».

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματα στην συγκεκριμένη μελέτη θα παρουσιαστούν με την μορφή καμπύλης συσσώρευσης (AUC, AU*min) και ομαδοποιημένα σε τρεις ομάδες αποτελεσμάτων. α) Θετική (+) ανοσολογική μέθοδο και θετική (+) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων HIMEA. β) Αρνητική (-) ανοσολογική μέθοδο και αρνητική (-) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων HIMEA. γ) Θετική (+) ανοσολογική μέθοδο και αρνητική (-) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων HIMEA. Κάθε σειρά λειτουργικών δοκιμασιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους ίδιους δότες ολικού αίματος, ενώ στην αρχή κάθε διαδικασίας η σωστή λειτουργία του συσσωρόμετρου ολικού αίματος Multiplate ελέγχθηκε με γνωστό θετικό (+) δείγμα ως προς την υποψία HIT. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα τα οποία πληρούσαν όλα τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας. Κάποια από τα δείγματα λόγω μικρού αρχικού όγκου, αιμόλυσης και αδυναμίας επιβεβαίωσης της σωστής λήψης και συντήρησής τους δεν εξετάστηκαν.

Συμπεράσματα- Συζήτηση: Στην παρούσα έρευνα, αξιολογήθηκε η λειτουργική μέθοδος διάγνωσης της θρομβοπενίας από ηπαρίνη HIMEA και η εφαρμογή της στην καθημερινή πράξη στο αιματολογικό εργαστήριο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι παρά το γεγονός ότι το HIMEA, όπως και όλες οι λειτουργικές δοκιμασίες παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα εργαστήριο ρουτίνας. Στους περιορισμούς συμπεριλαμβάνονται η δυσκολία επιλογής του κατάλληλου δότη αιμοπεταλίων, η

αναγκαιότητα συστηματικού ελέγχου ενός δείγματος ασθενούς με επιβεβαιωμένο HIT πριν τον έλεγχο των ασθενών καθώς και το γεγονός πως η προαναλυτική φάση για την προετοιμασία του δείγματος απαιτεί μεγάλη προσοχή και σχολαστικότητα. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η HIMEA είναι ικανή να δώσει σημαντικές πληροφορίες καθώς όλα τα δείγματα με θετική ανοσολογική δοκιμασία δεν είχαν θετική HIMEA. Επιπλέον κανένα δείγμα με αρνητική ανοσολογική δοκιμασία δεν είχε θετική HIMEA. Η HIMEA είναι μία χρήσιμη και απλή λειτουργική δοκιμασία για την διάγνωση της HIT. Η παρούσα μελέτη επιβεβαίωσε την δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε ένα αιματολογικό εργαστήριο. Μετά το πέρας αυτής της μελέτης η HIMEA εφαρμόστηκε και εκτελείται στο αιματολογικό εργαστήριο του Γ.Ν.Α. « ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».

Abstract

Introduction: Heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is a potentially lethal adverse effect of heparin therapy. Accurate and rapid HIT laboratory diagnosis when HIT is suspected is crucial. The combination of an immunological assay with a functional test improves the accuracy of HIT, but functional assays are currently limited to a few laboratories. Multiplate analyzer (Dynabyte, Munich, Germany) is a practical, semi-automated and easy-to-perform platelet aggregation assay.

Purpose: The aim of this study is to validate and implement HIMEA (Heparin Induced Multiple Electrode Assay) into the clinical hematology laboratory of General hospital Alexandra. Incorporating HIMEA into the standard battery of laboratory tests will reduce HIT over-diagnosis.

Method-Result: Plasma or serum of patients suspected for HIT addressed to the hematology laboratories of General hospital Evangelismos and Ippokratio, were assessed by HIMEA. The blood donors who were chosen for the functional assays were not taking any medication interfering with hemostasis for at least 10 days before venipuncture. They were pre-screened with frozen sera well-characterized HIT positive patients and good responders to HIMEA were selected. In total, 15 out of 18 samples were tested and categorized as follows: a) Immunoassay positive/HIMEA positive, b) Immunoassay negative/HIMEA negative, c) Immunoassay positive/HIMEA negative. HIMEA can add important information to HIT testing since, as shown in this study, all samples which tested positive for HIT according to the immunoassay were not HIMEA positive.

Discussion: HIMEA is a reliable, easy to perform assay with excellent performance characteristics. Therefore, introducing HIMEA will improve the quality of HIT diagnosis which will be of great benefice for the patients. According to the results of this study, it is possible to implement HIMEA to everyday practice in the hematology laboratory. Following the results of this study HIMEA is performed in the clinical hematology laboratory of General hospital Alexandra.

Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση περί λογοκλοπής	4
Ευχαριστίες.....	5
Αφιερώσεις.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract	10
Συνομογραφίες	12
Πρόλογος	14
Κεφάλαιο 1	16
1.1 <i>Επιδημιολογία</i>	16
1.1.1 Συχνότητα του συνδρόμου HIT	18
1.1.2 Παράγοντες που σχετίζονται με την χορήγηση της ηπαρίνης	19
1.1.3 Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή	20
1.2 <i>Παθοφυσιολογία</i>	21
1.3 <i>Κλινική εικόνα</i>	28
1.4 <i>Διάγνωση</i>	31
1.4.1 Θρομβοπενία, θρόμβωση, χρονικά χαρακτηριστικά	31
1.4.2 Σκορ εκτίμησης κινδύνου HIT	33
1.4.3 Εργαστηριακές δοκιμασίες προσδιορισμού του HIT	35
1.4.3.1 Λειτουργικές δοκιμασίες	37
1.5 <i>Θεραπεία</i>	44
Κεφάλαιο 2	49
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	49
2.1. <i>Δείγματα</i>	49
2.2 <i>Συσσωρόμετρο ολικού αίματος – Multiplate</i>	49
2.3 <i>HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H)</i>	53
2.4 <i>Heparin-Induced Multiple Aggregometry, HIMEA</i>	53
2.4.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου	56
2.5 <i>Σκοπός και επιμέρους στόχοι</i>	57
Κεφάλαιο 3	58
3. <i>Αποτελέσματα</i>	58
Κεφάλαιο 4	74
<i>Συζήτηση – Συμπεράσματα</i>	74
Βιβλιογραφία	78

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
HIT	Heparin-induced thrombocytopenia	Θρομβοπενία Προκαλούμενη από Ηπαρίνη
PF4	Platelets Factor 4	Αιμοπεταλιακος Παραγοντας 4
HIPA	Heparin-Induced Platelet Activation	Δοκιμασία Συσσώρευσης Αιμοπεταλίων Επαγόμενη από την Ηπαρίνη
HIMEA	Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry	Η Μέθοδος Συσσώρευσης των Αιμοπεταλίων σε Ολικό Αίμα
ISTH	International Society of Thrombosis and Hemostasis	Παγκόσμια Εταιρεία Αιμόστασης και Θρόμβωσης
DVT	Deep Vein Thrombosis	Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση
UFH	Unfractionated Heparin	Μη Κλασματοποιημένη Ηπαρίνη
LMWH	Low Molecular Weight Heparin	Χαμηλού Μοριακού Βάρους Ηπαρίνη
CPB	Cardiopulmonary bypass	Καρδιοπνευμονική Παράκαμψη
GAGs	Glycosaminoglycan	Γλυκοζαμινογλυκάνες
TF	Tissue factor	Ιστικός Παράγοντα
NET	Neutrophil extracellular traps	Εξωκυτταρικές Παγίδες Ουδετερόφιλων
MPO	Myeloperoxidase	Μυελοπεροξειδάση
vWF	von Willebrand Factor	Παράγοντας von Willebrand
DIC	Disseminated intravascular coagulation	Διάχυτη Ενδαγγειακή Πήξη
INR	International normalized ratio	Διεθνής Ομαλοποιημένη Αναλογία
aPTT	Activated partial thromboplastin time	Ενεργοποιημένος χρόνος μερικής θρομβοπλαστίνης
4Ts	Thrombocytopenia, Timing of platelet count fall, Thrombosis or other sequelae, other causes for thrombocytopenia present	Χρόνος θεραπείας με ηπαρίνη, Επιπλοκές θρομβοπενίας και Θρόμβωσης και Αποκλεισμός άλλων αιτιών
HEP	HIT Expert Probability	Βαθμολογία Πιθανότητας Εμπειρογνομόνων
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
PMPs	Platelet microparticle	Μικροσωματίδιο Αιμοπεταλίων
C- SRA	C serotonin release essay	Δοκιμασία απελευθέρωσης C-σεροτονίνης

PRP	Platelet Rich Plasma	Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια
PAT	Platelet aggregation test	Δοκιμή Συσσώρευσης Αιμοπεταλίων
LTA	Late transmission aggregometry	Συσσώρευση καθυστερημένης μετάδοσης
TGA	Thrombin Generation Essay	Δοκιμασία δημιουργίας θρομβίνης
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση γέλης πολυακρυλαμίδιου δωδεκυλοθειικού νατρίου
DTIs	Direct thrombin inhibitors	Άμεσοι αναστολείς θρομβίνης
FDA	Food and drug administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
PCI	Percutaneous Coronary Intervention	Διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση
ACCP	American College of Clinical Pharmacy	Αμερικανικό Κολλέγιο Κλινικής Φαρμακευτικής
VKA	Vitamin K antagonist	Ανταγωνιστής της βιταμίνης Κ
DOAC	Direct oral anticoagulants	Απευθείας από του στόματος αντιπηκτικά
IVIG	Intravenous immunoglobulin	Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη
ASH	American Sociation of Hematology	Αμερικανική Αιματολογική Εταιρεία
aHIT	autoimmune Heparin-Induced Thrombocytopenia	αυτοάνοση θρομβοπενία προκαλούμενη από ηπαρίνη
MEA	multiple electrode aggregometry	Συσσώρευση πολλαπλών ηλεκτροδίων
AU	Aggregation units	Μονάδες Συσσώρευσης
AUC	Area under the aggregation curve	Περιοχή κάτω από την καμπύλη συσσώρευσης
PVS	Polyvinyl sulfat	Σουλφονικό πολυβινυλεστέρα
RLUs	Relative Light Units	Μονάδες σχετικού φωτός
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμική δοκιμή ανοσοπροσρόφησης
VITT	Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia	Σύνδρομο θρόμβωσης και θρομβοπενίας ανόσου αιτιολογίας επαγόμενο από το εμβόλιο έναντι του Covid-19

Πρόλογος

Η θρομβοπενία από ηπαρίνη HIT (Heparin-induced thrombocytopenia) αποτελεί μία σοβαρή και απειλητική για την ζωή επιπλοκή της θεραπείας με ηπαρίνη (Lee & Agerally, 2013). Πρόκειται για μία κλινικοεργαστηριακή οντότητα ανοσολογικής αρχής, που οφείλεται στην ανάπτυξη αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος ηπαρίνης και αιμοπεταλιακού παράγοντα 4 (PF4). Τα αντισώματα ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, το ενδοθήλιο και τα μονοκύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης και την θρομβοπενία από κατανάλωση. Η HIT σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο φλεβικών και αρτηριακών θρομβώσεων και υψηλή θνητότητα, ιδίως αν καθυστερήσει η διάγνωση και η αντιμετώπιση της. Η θεραπεία της συνίσταται στην άμεση διακοπή της ηπαρίνης και στην χορήγηση εναλλακτικής αντιπηκτικής αγωγής (Cuker, et al., 2018).

Η διάγνωση της HIT βασίζεται σε κλινικοεργαστηριακά κριτήρια και πρέπει πάντα να επιβεβαιώνεται με εξειδικευμένες εργαστηριακές μεθόδους (Cuker, et al., 2012). Διάφορες εργαστηριακές μέθοδοι είναι διαθέσιμες και διακρίνονται σε ανοσολογικές και λειτουργικές (Galea, et al., 2013). Οι ανοσολογικές ανιχνεύουν την παρουσία των αντισωμάτων έναντι του συμπλέγματος PF4/ ηπαρίνη στον ορό του ασθενούς. Οι λειτουργικές ελέγχουν την ικανότητα αυτών των αντισωμάτων να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια παρουσία ηπαρίνης.

Σήμερα συστήνεται ο συνδυασμός ανοσολογικής και λειτουργικής μεθόδου για πιο αξιόπιστη διάγνωση, καθώς οι ανοσολογικές μέθοδοι έχουν πολύ καλή ευαισθησία, αλλά χαμηλή ειδικότητα. Παρόλα αυτά, η πρακτική εφαρμογή των λειτουργικών μεθόδων παρουσιάζει ορισμένες δυσκολίες. Πρόκειται για μεθόδους χρονοβόρες, δύσκολες τεχνικά, που απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Επιπλέον, για την εφαρμογή τους είναι απαραίτητη η διαθεσιμότητα υγιών δοτών αίματος, καθώς και δειγμάτων ασθενών με επιβεβαιωμένο HIT. Η εξέταση απελευθέρωσης σεροτονίνης, που χρησιμοποιεί απομονωμένα αιμοπετάλια αποτελεί μέχρι και σήμερα την μέθοδο αναφοράς, αλλά συγκρίσιμα αποτελέσματα παρουσιάζει και Δοκιμασία Συσσώρευσης Αιμοπεταλίων Επαγόμενη από την Ηπαρίνη HIPA (Heparin-Induced Platelet Activation). Η μέθοδος συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε ολικό αίμα HIMEA (Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry), παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς είναι μια λειτουργική μέθοδος εύκολη στην χρήση, γρήγορη και αξιόπιστη. Η σύγκριση της με την εξέταση απελευθέρωσης σεροτονίνης σε προοπτικές μελέτες έδειξε άριστα

αποτελέσματα. Η χρήση της στην διάγνωση της HIT προτείνεται από την Παγκόσμια Εταιρεία Αιμόστασης και Θρόμβωσης (International Society of Thrombosis and Hemostasis, ISTH) (Gkalea, et al., 2019), (Morel-Kopp, et al., 2016).

Παρά τις πρακτικές δυσκολίες, η εργαστηριακή επιβεβαίωση της HIT πρέπει πάντα να γίνεται με λειτουργική μέθοδο, γιατί η υπερβολική διάγνωση της HIT έχει σημαντικές συνέπειες στον ασθενή. Η αδικαιολόγητη διακοπή της ηπαρίνης επί μη επιβεβαιωμένης υποψίας HIT αυξάνει τον θρομβωτικό κίνδυνο του ασθενούς. Επιπλέον, η χορήγηση εναλλακτικής αντιπηκτικής αγωγής εκθέτει τον ασθενή σε αυξημένο αιμορραγικό κίνδυνο (Bakchoul & Greinacher, 2012).

Επομένως, από τα σημερινά δεδομένα είναι φανερό ότι η διάγνωση της HIT παραμένει δύσκολη. Η ευρεία εφαρμογή των λειτουργικών μεθόδων θα συμβάλλει στην πιο σωστή διάγνωση της HIT.

Κεφάλαιο 1

1.1 Επιδημιολογία

Ο όρος HIT (Heparin-induced thrombocytopenia) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1969 από τον Ethan Netelson όταν θέλησε να περιγράψει την περίπτωση ενός άνδρα 78 ετών που ανέπτυξε σοβαρή θρομβοπενία μετά από χορήγηση ηπαρίνης για την θεραπεία πνευμονική εμβολής (Netelson, et al., 1969). Βέβαια, η θρομβοπενία μετά από θεραπεία με ηπαρίνη είχε αναφερθεί πολύ νωρίτερα, το 1942 σε ζώα και αργότερα σε ανθρώπους (Copley & Robb, 1942).

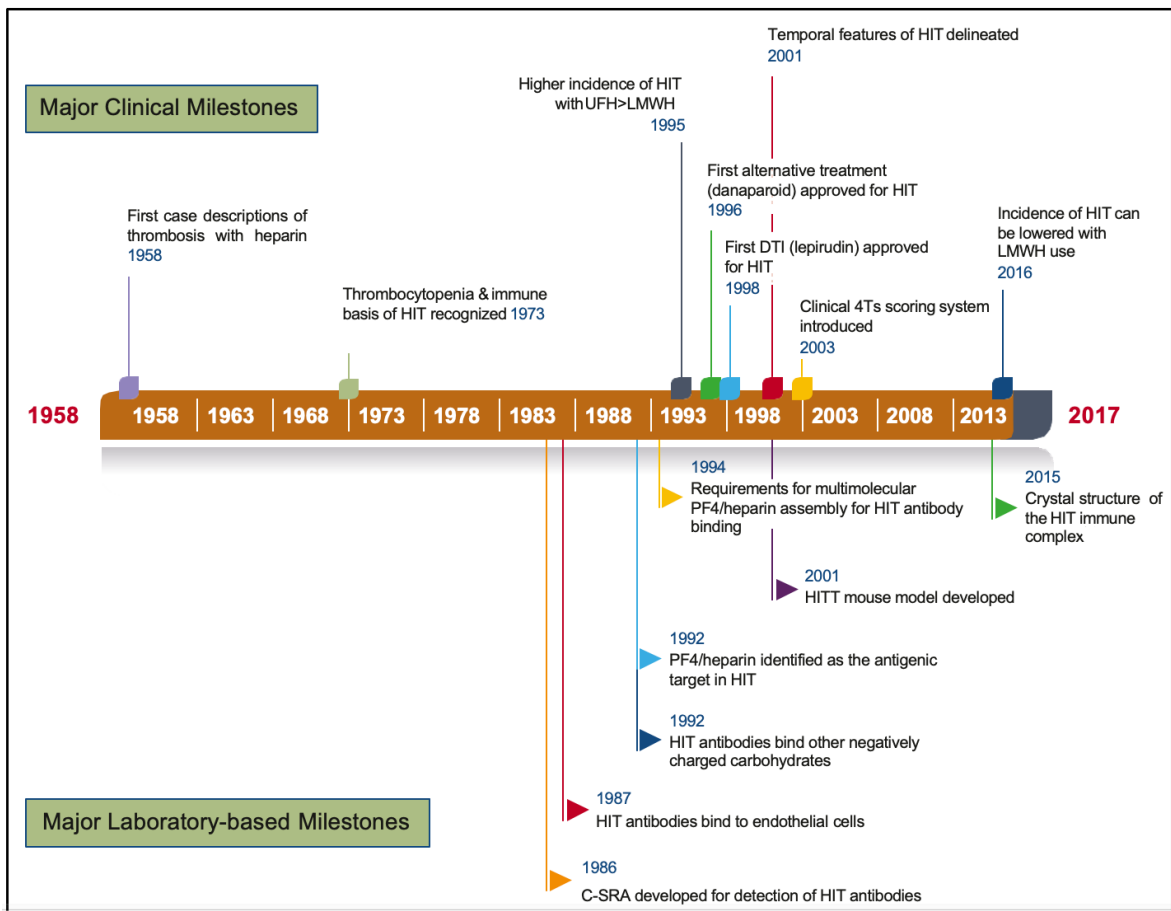
Την 1η Ιουνίου 1957, ο Rodger E. Weismann και Dr Richard W. Tobin, περιέγραψαν περιπτώσεις 10 ασθενών που εμφάνισαν αρτηριακή εμβολή κατά την διάρκεια συστηματικής θεραπείας με ηπαρίνη (Weismann & Tobin, 1958). Το πρώτο δημοσιευμένο περιστατικό αφορούσε μιας εμβολικής αιτιολογίας απόφραξη μηριαίας αρτηρίας σε μια 62χρονη γυναίκα που λάμβανε ηπαρίνη για την θεραπεία εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης DVT (deep vein thrombosis). Τρεις ημέρες μετά την επιτυχή εμβολεκτομή του μηριαίου, και ενώ συνέχιζε να λαμβάνει ηπαρίνη, ανέπτυξε οξεία αρτηριακή απόφραξη της αορτής που απαιτούσε εμβολεκτομή (Weismann & Tobin, 1958). Η μακροσκοπική και η ιστολογική εικόνα των θρόμβων αυτών των ασθενών παρουσίαζε κοινά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν θρόμβοι ωχροί που περιείχαν σπάνια ερυθρά αποτελούμενοι κυρίως από ινική, αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που η ηπαρίνη παρά την αντιπηκτική της δράση, μπορεί παραδόξως σε κάποιες περιπτώσεις να σχετίζεται με αρτηριακές εμβολές σχετιζόμενες με την αποκόλληση προϋπάρχοντος θρόμβου στην αορτή.

Πέντε χρόνια αργότερα η ομάδα με επικεφαλής τον Roberts B. περιέγραψε ακόμα έντεκα περιπτώσεις ασθενών με παρόμοια ευρήματα, ενώ υπέθεσε ότι αυτό το κλινικό σύνδρομο θα μπορούσε να είναι «το αποτέλεσμα ενός μηχανισμού αντιγόνου – αντισώματος» (Rosato, et al., 1967). Το 1973, οι Rhodes et al περιέγραψαν συνοπτικά τα κλινικά χαρακτηριστικά αυτής της νόσου σε 2 ασθενείς με HIT, σημειώνοντας τα εξής:

- (1) ταυτόχρονες εκδηλώσεις θρομβοπενίας και θρόμβωσης κατά τη διάρκεια της θεραπείας με ηπαρίνη,
- (2) αύξηση του αριθμού αιμοπεταλίων ύστερα από τη διακοπή

της θεραπείας με ηπαρίνη, (3) παρουσία εξαρτώμενου από την ηπαρίνη αντισώματος βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των δοκιμασιών συσσώρευσης αιμοπεταλίων, (4) υποτροπιάζουσα θρομβοπενία με την επαναχορήγηση ηπαρίνης κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της νόσου (Rhodes, et al., 1973).

Το 1992, αναγνωρίστηκε το υπεύθυνο αντιγόνο της HIT χάρη στις εργασίες του Amiral et al. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι ο αιμοπεταλιακός παράγοντας 4 (Platelet Factor 4 ,PF4) , ένα τετραμερές μέλος της υποοικογένειας CXC των χημειοκινών, σχηματίζει σύμπλοκο με την ηπαρίνη το οποίο στη συνέχεια συνδέεται με τα αντισώματα έναντι του νέου αυτού αντιγονικού συμπλόκου (Amiral, et al., 1992). Αυτή η ουσιαστική παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και από άλλες ομάδες. Μια χρονολογική σειρά ορισμένων από τις ορόσημες μελέτες, παρέχεται στην εικόνα ένα (Εικ.1).



Εικόνα 1. Χρονική εξέλιξη βασικών κλινικών και εργαστηριακών παρατηρήσεων στην HIT.

UFH: Unfractionated Heparin, Low: Molecular Weight Heparin, DTI: Direct thrombin inhibitors. (Arepally, 2017)

1.1.1 Συχνότητα του συνδρόμου HIT

Το σύνδρομο HIT είναι μια υπερπηκτική κατάσταση, η οποία συχνά προκαλεί σοβαρές και εκτεταμένες θρομβώσεις (τόσο φλεβικές όσο και αρτηριακές) που σχετίζονται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα (Chong & Isaacs, 2009). Οι θρομβωτικές επιπλοκές περιλαμβάνουν φλεβική ή/και αρτηριακή θρόμβωση των κάτω άκρων, γάγγραινα, απειλητική για τη ζωή πνευμονική εμβολή, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό, καθώς και θρομβώσεις σε άτυπες εντοπίσεις (αμφίπλευρο έμφραγμα επινεφρίδιων, θρόμβωση πυλαίας και μεσεντέριας φλέβας και θρόμβωση φλεβωδών κόλπων του εγκεφάλου) (Warkentin, 2016).

Η συνολική συχνότητα HIT σε ενήλικες που έλαβαν μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη UFH (Unfractionated Heparin) κυμαίνεται από 0,3 έως 5,0%, αν και η εκτίμηση της συχνότητας της νόσου είναι δυσχερής λόγω της δυσκολίας αναγνώρισης και διάγνωσης της νόσου (Krauel, et al., 2011). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης HIT εμπίπτουν στις εξής κατηγορίες: σε εκείνους που σχετίζονται με την χορήγηση της ηπαρίνης και σε εκείνους που σχετίζονται με τον ασθενή (βλ. Πιν.1).

Πίνακας 1. Συχνότητα εμφάνισης HIT ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών και τον τύπο ηπαρίνης

Συχνότητα εμφάνισης HIT ανάλογα με τον πληθυσμό των ασθενών και τον τύπο ηπαρίνης	
	Εμφάνιση HIT
Μετεγχειρητικοί ασθενείς με προφυλακτικές ή θεραπευτικές δόσεις	
• UFH	0,3-5%
• LMWH	0,05-0,5%
Ασθενείς που υποβάλλονται σε χρόνια αιμοκάθαρσης	<1%
Εγκυμοσύνη	<0,1%
Παιδιά	0,2-2,6%
ΜΕΘ- ICU (intensive care unit)	0,01-2,1%

1.1.2 Παράγοντες που σχετίζονται με την χορήγηση της ηπαρίνης

Ο τύπος της ηπαρίνης και η διάρκεια της θεραπείας με ηπαρίνη, φαίνεται να επηρεάζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης HIT. Συγκεκριμένα, η χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη LMWH (low molecular weight heparin) σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο HIT από την μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη UFH (unfractionated heparin) (Warkentin, et al., 1995). Σε μια μετα-ανάλυση μελετών, η επίπτωση του HIT ήταν 2,6% σε ασθενείς που έλαβαν UFH και 0,2% σε αυτούς που έλαβαν θεραπεία με LMWH (Martel, et al., 2005). Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξε, η μελέτη του Warkentin et al, που αναφέρει ότι ο κίνδυνος για την εμφάνιση HIT είναι πολύ πιο υψηλός σε ασθενείς που λαμβάνουν θρομβοπροφύλαξη με UFH σε σχέση με αυτούς που λαμβάνουν LMWH. Παρόλα αυτά, η συχνότητα της HIT φαίνεται να καθορίζεται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ φύλου, τύπου ηπαρίνης και τύπου ασθενούς. Συγκεκριμένα η διαφορά στην συχνότητα της HIT ανάλογα με τον τύπο της ηπαρίνης παρατηρείται στους χειρουργικούς ασθενείς (OR, 13.93 vs 1.75; P = .005) αλλά δεν επιβεβαιώνεται στους μη χειρουργικούς ασθενείς (OR, 9.22 vs 1.83; P = .020) (Warkentin, et al., 2006) (Martel, et al., 2005). Μεταξύ των παρασκευασμάτων UFH, η ηπαρίνη των πνευμόνων των βοοειδών προκαλεί υψηλότερη συχνότητα σχηματισμού αντισωμάτων αντι-PF4/ηπαρίνης και HIT από την ηπαρίνη που προέρχεται από τον εντερικό βλεννογόνο του χοίρου (Ansell, et al., 1980) (Francis, et al., 2003).

Η διάρκεια της έκθεσης στην ηπαρίνη επηρεάζει επίσης τον κίνδυνο HIT (Martel, et al., 2005). Σε μια μετα-ανάλυση 3.529 χειρουργικών ασθενών και ασθενών των θαλάμων που έλαβαν ηπαρίνη UFH για 6 ή περισσότερες συνεχόμενες ημέρες, η συνολική επίπτωση του HIT ήταν 2,6%. Αν και η συχνότητα του HIT σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιθρομβωτική θεραπεία με ηπαρίνη, για λιγότερο από έξι ημέρες δεν έχει μελετηθεί καλά, φαίνεται ότι είναι της τάξης του 0,2% (Smythe, et al., 2007).

Η χορηγούμενη δόση ηπαρίνης και ο τρόπος χορήγησης της σχετίζονται λιγότερο με την συχνότητα ανάπτυξης του συνδρόμου HIT. Ορισμένες μελέτες καταδεικνύουν μεγαλύτερη συχνότητα HIT σε ασθενείς που λαμβάνουν ενδοφλέβια θεραπευτική δόση από την υποδόρια προφυλακτική δόση UFH, αν και η ανομοιογένεια των μελετών ως προς την ένδειξη της θεραπείας με ηπαρίνη δεν καθιστά αυτό το συμπέρασμα ασφαλές (Lindhoff-Last, et al., 2002).

1.1.3 Παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή

Οι παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του φύλου και του πληθυσμού των ασθενών, είναι επίσης σημαντικοί (Warkentin, et al., 2006). Σε ανάλυση δεδομένων ασθενών που νοσηλεύτηκαν για θρομβοεμβολική νόσο, στο σύνολο 10 εκατομμυρίων εισαγωγών, η HIT ήταν εξαιρετικά σπάνια σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 40 ετών (Stein, et al., 2009).

Οι γυναίκες διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για την εμφάνιση του συνδρόμου HIT σε σχέση με τους άνδρες. (Warkentin, et al., 2006). Σε μια μεγάλη συστηματική ανασκόπηση, το γυναικείο φύλο συσχετίστηκε με σχετικό κίνδυνο HIT (Odds Ratio, OR) 2,37 (95% CI [95% CI], 1.37-4.09; P 0.0015) σε σχέση με το αντρικό φύλο. Η ίδια μελέτη κατέδειξε τριπλάσιο κίνδυνο μεταξύ των χειρουργικών ασθενών από ότι σε ασθενείς με οξεία παθολογική νόσος.

Οι χειρουργικοί ασθενείς διατρέχουν πολύ υψηλότερο κίνδυνο HIT σε σχέση με μη χειρουργικούς ασθενείς. Ο τύπος της χειρουργικής επέμβασης φαίνεται επίσης να είναι σημαντικός. Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση για καρδιοπνευμονική παράκαμψη CPB (Cardiopulmonary bypass) εμφανίζουν ποσοστό σχηματισμού αντισωμάτων αντι-PF4/ηπαρίνης που πλησιάζει το 50% έως την μετεγχειρητική ημέρα 5 (Konkle, et al., 2001) αλλά μόνο 2% έως 3% από αυτούς τους ασθενείς θα εμφανίσει HIT (Warkentin, et al., 2000) (Warkentin, et al., 2006). Αντίθετα, το σύνδρομο HIT εμφανίζεται περίπου στο 5% των ασθενών που λαμβάνουν θρομβοπροφύλαξη με UFH μετά από μεγάλη ορθοπεδική χειρουργική επέμβαση (Warkentin, et al., 2003), αν και η ορομετατροπή είναι πολύ λιγότερο συχνή.

Η βάση για τα διαφορετικά ποσοστά ορομετατροπής και HIT μεταξύ αυτών των δυο πληθυσμών είναι άγνωστη, αλλά μπορεί εν μέρει να σχετίζεται με διάφορες στην έκταση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της απελευθέρωσης PF4 σχετιζόμενη με τις αντίστοιχες χειρουργικές επεμβάσεις. Ο ρόλος της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στην HIT υποστηρίζεται περαιτέρω από μια τυχαίοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη θρομβοπροφύλαξης με ηπαρίνη σε ασθενείς με τραύμα, στην οποία παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επίπτωση ορομετατροπής και HIT σε άτομα με μείζον τραύμα σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν μικρής έκτασης τραύμα (Lubenow, et al., 2010). Η συχνότητα εμφάνισης HIT είναι μικρότερη από 1% σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χρόνια

αιμοκάθαρσης και λιγότερο από 0,1% στην εγκυμοσύνη (Lim, et al., 2015) (Hutchison & Dasgupta, 2007). Η συχνότητα εμφάνισης του συνδρόμου HIT στα παιδιά δεν διαφοροποιείται από εκείνη στους ενήλικες, ενώ μελέτες δείχνουν ότι τα ποσοστά εμφάνισης του συνδρόμου κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με εκείνα των ενηλίκων ή και χαμηλότερα (Schmugge, et al., 2002) (Newall, et al., 2003). Όσον αφορά την εμφάνιση του συνδρόμου HIT σε ασθενείς που νοσηλεύονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας ΜΕΘ τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η εμφάνιση του είναι αρκετά σπανία και κυμαίνεται από 0,01 – 2.1% (Crowther, et al., 2005).

Παρά την αυξανόμενη κατανόηση των παραγόντων κινδύνου, δεν μπορεί να προβλεφθεί ποια άτομα θα αναπτύξουν HIT. Επιδημιολογικές και μηχανιστικές μελέτες που στοχεύουν στον εντοπισμό νέων παραγόντων κινδύνου και βιοδεικτών είναι απαραίτητες για την επίτευξη αυτού του στόχου.

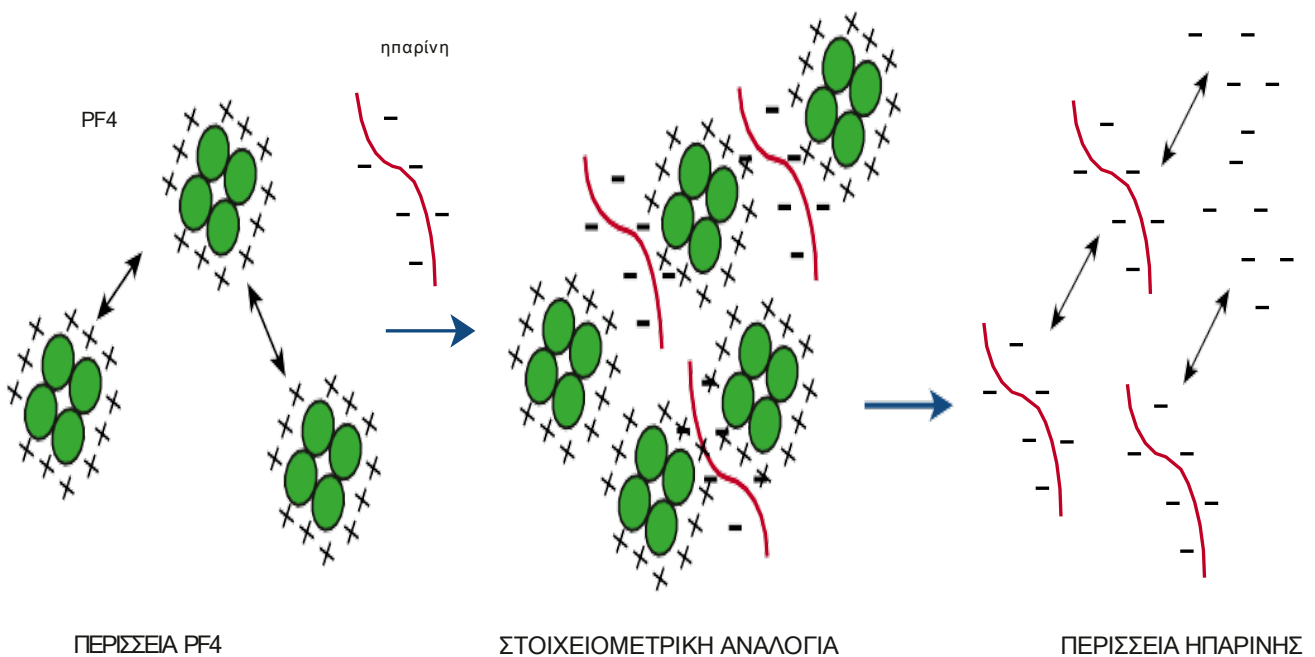
Πολυμορφισμοί του υποδοχέα των αιμοπεταλίων Fcγ2bR (Burgess, et al., 1995), Fcγ3R (Gruel, et al., 2004) και άλλων γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων των αιμοπεταλίων (Harris, et al., 2008) έχουν εμπλακεί στον κίνδυνο ανάπτυξης θρόμβωσης που σχετίζεται με HIT (Karnes, 2018). Άλλες κοινές θρομβοφιλίες συμπεριλαμβανομένων των Factor V Leiden R506Q, Factor II G20210A και MTHFR C677T δεν φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στον κίνδυνο θρόμβωσης μεταξύ των ασθενών με HIT (Carlsson, et al., 2003) (Karnes, 2018). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες του γονιδιώματος για να διευκρινιστούν οι γενετικές βάσεις και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθογένεση της νόσου.

1.2 Παθοφυσιολογία

Ο μηχανισμός του HIT είναι μοναδικός μεταξύ των θρομβοπενιών που προκαλούνται από φάρμακα, δεδομένου ότι είναι η μόνη περίπτωση που η θρομβοπενία είναι δευτεροπαθής εκδήλωση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το HIT προκαλείται από αντισώματα που αναγνωρίζουν σύμπλοκα PF4 και ηπαρίνης (Amiral, et al., 1992). Το PF4 είναι μια θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη των αιμοπεταλίων αποθηκευμένη στα α κοκκία των αιμοπεταλίων που απελευθερώνεται σε μεγάλες ποσότητες μετά την ενεργοποίησή τους (Zucker & Katz, 1991). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες GAGs (glycosaminoglycan) είναι φυσικά ηπαρινοειδή που επενδύουν στην επιφάνεια των

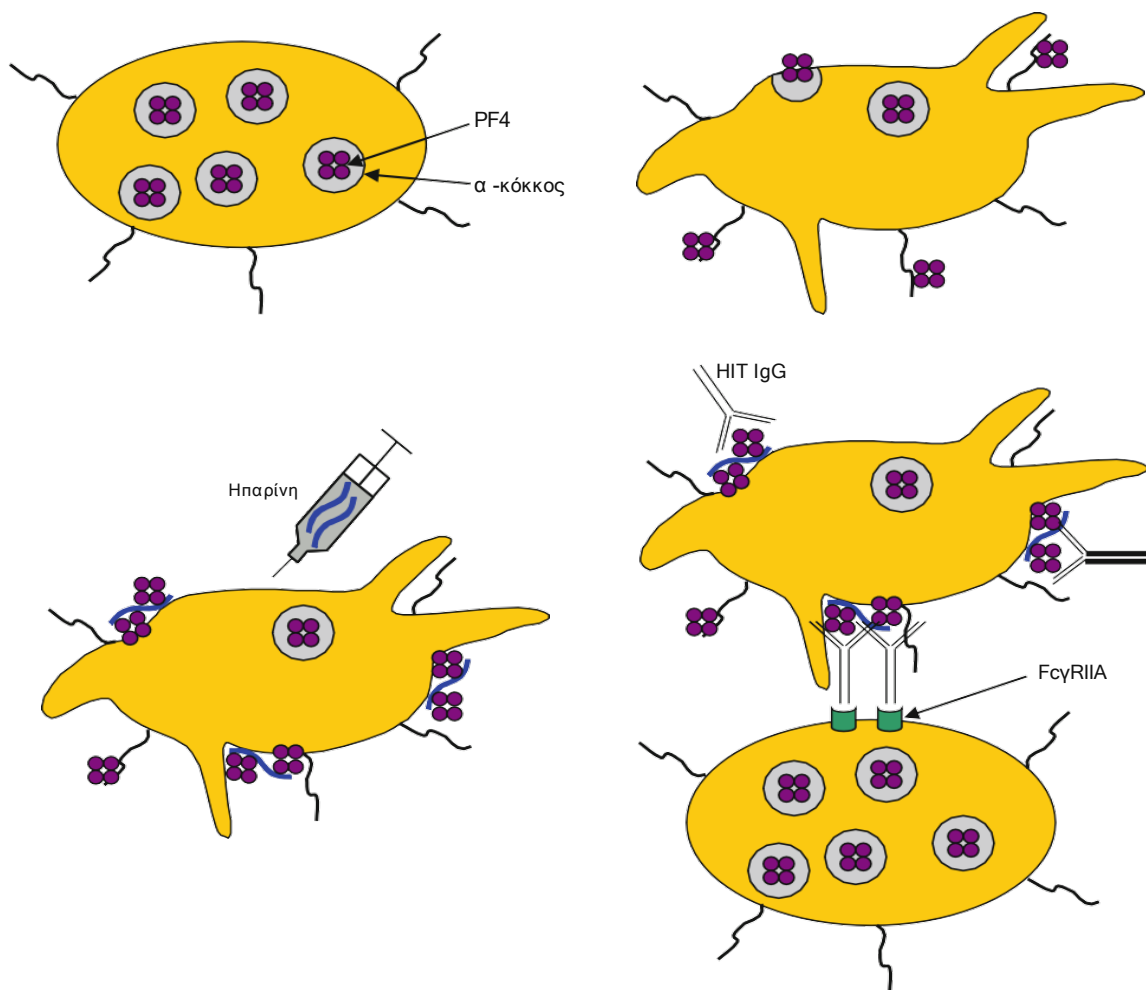
ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων. Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα θετικά φορτισμένα μόρια PF4 που απελευθερώνονται, σχηματίζουν τετραμερή και συνδέονται με τις GAGs στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Κατά την ηπαρινοθεραπεία, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια ηπαρίνης εκτοπίζουν τα GAGs από το σύμπλοκο PF4/GAGs και απελευθερώνουν PF4 στην κυκλοφορία. Στη συνέχεια τετραμερή PF4 και ηπαρίνη θα συνενωθούν και θα σχηματίσουν μεγάλο μεγέθους άνοσα σύμπλοκα. Οι αλληλεπιδράσεις PF4 και ηπαρίνης εξαρτώνται σημαντικά από το φορτίο και την αναλογία των δυο στοιχείων (Bock, et al., 1980).

Ο βέλτιστος σχηματισμός συμπλόκου PF4/ηπαρίνης συμβαίνει όταν οι δυο ενώσεις υπάρχουν σε στοιχειομετρική αναλογία που θα επιτρέψει την εξουδετέρωση των φορτίων (βλ.Εικ.2). Αλλαγή της αναλογίας PF4 και ηπαρίνης που οδηγεί σε περίσσεια του ενός ή του άλλου στοιχείου έχει σαν συνέπεια την διάσπαση του συμπλόκου (Rauona, et al., 2005).



Εικόνα. 2. Η παρουσία θετικά φορτισμένων τετραμερών PF4 και αρνητικά φορτισμένων αλυσίδων ηπαρίνης σε στοιχειομετρική αναλογία ευνοεί τον σχηματισμό του συμπλόκου PF4/ ηπαρίνης. Περίσσεια PF4 ή ηπαρίνης έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή της αναλογίας θετικών και αρνητικών φορτίων και την διάσπαση του συμπλόκου

Το μόριο PF4 όταν βρίσκεται σε σύμπλοκο με την ηπαρίνη υφίσταται μια δομική αλλαγή, αποτέλεσμα της οποίας είναι η έκθεση ενός νέου αντιγονικού επιτόπου και η παραγωγή αντισωμάτων έναντι αυτού (Amiral, et al., 1996) (Kreimann, et al., 2014). Η περιοχή Fab του IgG αντισώματος συνδέεται με αυτόν τον επίτοπο και το τμήμα Fc του IgG αντισώματος συνδέεται με τον υποδοχέα FcγRIIA των αιμοπεταλίων οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Δημιουργείται έτσι έναν φαύλος κύκλος ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, απελευθέρωσης PF4 και σχηματισμός νέων άνοσων συμπλόκων PF4/ηπαρίνης (βλ.Εικ.3) (Li, et al., 2002).



Εικόνα. 3. Παθοφυσιολογία του HIT. PF4 (Platelet Factor 4): Αιμοπεταλιακός παράγοντας 4.

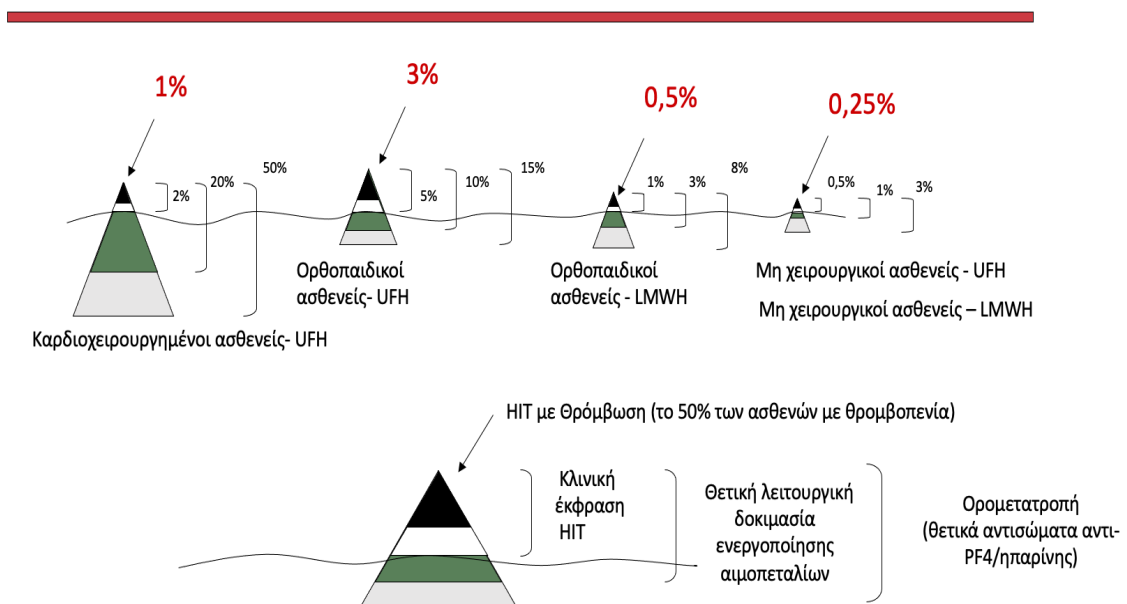
Μελέτες *in vitro* και *ex vivo* σε ασθενείς υπό ηπαρινοθεραπεία καταδεικνύουν σχεδόν αποκλειστική δέσμευση συμπλόκων PF4/ηπαρίνης στα Β κύτταρα. Η σύνδεση των Β-κυττάρων διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση του συμπλέγματος C3 από μεγάλα ανοσοσυμπλέγματα PF4/ηπαρίνης και επακόλουθη δέσμευση αντιγόνου με συμπλήρωμα σε Β κύτταρα μέσω του υποδοχέα συμπληρώματος 2/CD21. Καθώς η δέσμευση αντιγόνου επικαλυμμένου με συμπλήρωμα στο CD21 αυξάνει την ανοσογονικότητά του κατά 1000 έως 10.000 φορές, είναι πιθανό η άμεση ενεργοποίηση του συμπληρώματος από σύμπλοκα PF4/ηπαρίνης να συμβάλλει στην επακόλουθη παραγωγή αντισωμάτων (Khandelwal, et al., 2016). Η παραγωγή αντισωμάτων είναι πολυτυπική και μπορεί να αποτελείται από IgM, IgA και/ή IgG. Ωστόσο, μόνο αντισώματα αντι-PF4/ ηπαρίνης της τάξεως IgG φαίνεται να σχετίζονται με τις κλινικές εκδηλώσεις της HIT (Untch, et al., 2002).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ανοσολογική απάντηση στην HIT είναι ασυνήθης καθώς ακόμη και ασθενείς που λαμβάνουν ηπαρίνη για πρώτη φορά παράγουν αντι-PF4/ηπαρίνης IgG αντισώματα 4 ημέρες μετά την έναρξη της ηπαρινοθεραπείας. Αυτό σημαίνει προηγούμενη ανοσοποίηση των ασθενών με αντιγόνα διαφορετικά από την ηπαρίνη. Μία προτεινόμενη θεωρία που να εξηγεί αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με τον σχηματισμό αντισωμάτων έναντι συμπλόκων PF4/ βακτηρίων. Πράγματι, ο PF4 μπορεί να συνδεθεί με αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες των βακτηρίων σχηματίζοντας ένα αντιγονικό επίτοπο όμοιο με αυτόν του συμπλόκου PF4/ηπαρίνη. Το σύμπλοκο PF4/βακτηρίων επομένως μπορεί να αποτελεί το πρωτογενές ερέθισμα για την παραγωγή αντισωμάτων ικανών να αναγνωρίσουν και το σύμπλοκο PF4/ ηπαρίνης. Σε συμφωνία με αυτή την θεωρία είναι τα αποτελέσματα της μελέτης του Greinacher et al, σύμφωνα με την οποία η περιοδοντίτιδα, που αποτελεί μια από τις πιο συχνές εστίες λοίμωξης, προδιαθέτει στο σχηματισμό αντισωμάτων έναντι συμπλόκου PF4 και gram αρνητικών αναερόβιων βακτηρίων γεγονός που μπορεί να εξηγήσει την παρουσία φυσικών αντισωμάτων έναντι PF4/ ηπαρίνης και την πρόωμη εμφάνιση αντι- PF4/ ηπαρίνης της τάξεως του IgG (Greinacher, et al., 2011).

Όπως προαναφέρθηκε, ένα μικρό ποσοστό ασθενών που παρουσιάζουν ορομετατροπή, δηλαδή θετικοποίηση των αντισωμάτων αντι- PF4/ ηπαρίνη, θα αναπτύξουν κάποια κλινική εκδήλωση σχετιζόμενη με το HIT δηλαδή θρομβοπενία ή θρόμβωση. Η HIT ακολουθεί το μοντέλο του «παγόβουνου» που σημαίνει ότι ένα μέρος των ασθενών με θετικά αντισώματα IgG με την ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA θα

παρουσιάσουν με θετική λειτουργική δοκιμασία απελευθέρωσης σεροτονίνης και μόνο ένα μέρος εξ αυτών θα εμφανίσει HIT. Συγκεκριμένα, 30% των ασθενών με θετική δοκιμασία απελευθέρωσης σεροτονίνης θα εκδηλώσει πτώση των αιμοπεταλίων <150 G/l. Ο βαθμός στον οποίο το παγόβουνο προεξέχει πάνω από την υδάτινη γραμμή υποδηλώνει την πιθανότητα να εκδηλωθεί κλινικά η νόσος. Το μέγεθος του παγόβουνου εξαρτάται από το κλινικό υπόβαθρο του ασθενούς και είναι αντιπροσωπευτικό της συχνότητας ορομετατροπής. Στους ασθενείς μετά από καρδιοχειρουργική επέμβαση ο σχηματισμός αντισωμάτων αντι-PF4/ ηπαρίνης είναι πιο συχνός ενώ η συνολική συχνότητα της HIT είναι χαμηλός (Εικ.4). (Warkentin, 2006)

Μοντέλο παγόβουνου στην HIT



Εικόνα. 4. Μοντέλο παγόβουνου στην HIT. Το μοντέλο παγόβουνου απεικονίζει την συσχέτιση μεταξύ της κλινικής έκφρασης του HIT (θρομβοπενία με ή χωρίς θρόμβωση), τον τύπο της ηπαρίνης και το κλινικό υπόβαθρο του ασθενούς. Το ορατό τμήμα του παγόβουνου (το τμήμα πάνω από την υδάτινη γραμμή) αντιπροσωπεύει το ποσοστό των ασθενών που θα εκδηλώσουν κλινικά HIT με θρομβοπενία ή/και θρόμβωση. Το σύνολο του παγόβουνου αντιστοιχεί σε όλο το φάσμα των αντισωμάτων αντι-PF4/ηπαρίνης που δημιουργούνται. Μερικά από αυτά τα αντισώματα σχετίζονται με in vitro ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων όπως αυτή αποδεικνύεται με την λειτουργική δοκιμασία

απελευθέρωσης της σεροτονίνης. Ασθενείς που λαμβάνουν UFH κατά την διάρκεια εξωσωματικής κυκλοφορίας παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα ορομετατροπής σε σχέση τους ασθενείς που λαμβάνουν UFH μετά από ορθοπεδικό χειρουργείο. Αντιθέτως οι ορθοπεδικοί ασθενείς θα εκφράσουν κλινικά το HIT σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους καρδιοχειρουργημένους. Η LMWH έχει μικρότερη ανοσογονικότητα. UFH: μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη, LMWH: χαμηλού μοριακού βάρους ηπαρίνη

Εκτός από τον κεντρικό ρόλο των αιμοπεταλίων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα φαίνεται επίσης ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του HIT. Ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς που σχετίζονται με την υπερπηκτικότητα στην HIT είναι η παραγωγή μικροσωματιδίων με αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπιδικές επιφάνειες ως επακόλουθο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, τα αντισώματα της HIT μπορεί επίσης να συνδεθούν και με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να προκαλέσουν την έκφραση του ιστικού παράγοντα TF (tissue factor TF), μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελεί τον κύριο ενεργοποιητή του μηχανισμού της πήξης. Εκφράζονται επίσης μόρια προσκόλλησης με προθρομβωτικές ιδιότητες όπως η E-σελεκτίνη και ο παράγοντας von Willebrand (vWF) (Blank, et al., 2002). Ο TF μπορεί να εκφραστεί επίσης από μονοκύτταρα κατόπιν ενεργοποίησης τους από λιποπολυσακχαρίτες, κυτοκίνες ή ανοσοσυμπλέγματα καθώς και παρουσία ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων. (Rouplard, et al., 2001). Πρόσφατες μελέτες παρέχουν δεδομένα που δείχνουν ότι τα ουδετερόφιλα συμβάλουν στην υπερπηκτικότητα που παρατηρείται στο HIT καθώς το ανοσολογικό σύμπλεγμα PF4/ ηπαρίνης/ αντισώματος, μπορεί να τα ενεργοποιήσει άμεσα. Η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων έχει ως αποτέλεσμα την NETωση δηλαδή την απελευθέρωση εξωκυτταρικών παγίδων ουδετερόφιλων (neutrophil extracellular traps, NET) (Carestia, et al., 2016). Τα NET είναι δομές που περιέχουν DNA που απελευθερώνονται από ουδετερόφιλα και ενσωματώνουν ενδοκυτταρικούς παράγοντες, όπως ιστόνες, μυελοπεροξειδάση (MPO) και ελαστάση (Gollomp, et al., 2018). Κατέχουν κεντρικό ρόλο στις λοιμώξεις, στην άμυνα του ξενιστή αλλά και στη θρόμβωση (Borissoff, et al., 2013) (Rother, et al., 2017). Ευοδώνουν την παραγωγή θρομβίνης η οποία ενεργοποιεί τα αιμοπετάλια που με τη σειρά τους

προάγουν τον σχηματισμό NET (Gould, et al., 2014). Τα NET περιέχουν επίσης προθρομβωτικά μόρια, όπως TF, ισομεράση πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών, παράγοντα XII, von Willebrand Factor (vWF) και ινωδογόνο (Fuchs, et al., 2010).

Αν και η κατανόηση μας για την παθοφυσιολογία του HIT έχει αυξηθεί πάρα πολύ τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα θεμελιώδη ερωτήματα παραμένουν. Πρώτον, λίγα είναι γνωστά για τους προδιαθεσικούς παράγοντες που εκδήλωσης HIT. Η έκφραση του PF4 ποικίλει σε μεγάλο βαθμό και σύμφωνα με μια ενδιαφέρουσα υπόθεση άτομα με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης PF4 μπορεί να διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για HIT όταν εκτεθούν σε ηπαρίνη. Δεύτερον, ιδιαίτερα μετά από καρδιοπνευμονική παράκαμψη, πολλοί ασθενείς παράγουν μόρια IgG αντι-PF4/ηπαρίνης που δεν έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια ή να προκαλούν κλινική νόσο. Τα χαρακτηριστικά που διακρίνουν τα παθογόνα από τα μη παθογόνα αντισώματα παραμένουν αδιευκρίνιστα. (Warkentin, et al., 2008), (Cuker, 2011).

1.3 Κλινική εικόνα

Το σήμα κατατεθέν του HIT είναι η πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων που ξεκινά μεταξύ των ημερών 5 έως 10 ημέρες μετά την έναρξη της ηπαρίνης (η πρώτη ημέρα χρήσης ηπαρίνης θεωρείται η ημέρα 0) (Warkentin & Kelton, 2001). Η θρομβοπενία εκδηλώνεται σ' αυτό το τυπικό χρονικό διάστημα σε περίπου 70% των ασθενών με HIT. Η HIT μπορεί να παρουσιαστεί πρώιμα πριν τις 5 ημέρες όταν ένας ασθενής έχει ιστορικό πρόσφατης ηπαρίνοθεραπείας (εντός των τελευταίων 100 ημερών). Σ' αυτήν την περίπτωση HIT πρώιμης έναρξης, η επανέναρξη της θεραπείας με ηπαρίνη οδηγεί σε απότομη πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων σχετιζόμενη με προϋπάρχοντα κυκλοφορούντα αντισώματα αντι-PF4/ηπαρίνης και όχι με ταχεία παραγωγή αντισωμάτων στα πλαίσια μιας αναμνηστικής (ανοσολογικής απόκρισης) απάντησης (Warkentin, 2011).

Στους χειρουργικούς ασθενείς, το ποσοστό ελάττωσης του αριθμού των αιμοπεταλίων κατά την διάρκεια της ηπαρίνοθεραπείας υπολογίζεται με βάση τον μέγιστο αριθμό αιμοπεταλίων που παρατηρείται μετεγχειρητικά. Στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών με HIT παρατηρείται μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων κατά 50% σε σχέση με τα προ ηπαρίνοθεραπείας επίπεδα, αν και περίπου το 10% των περιπτώσεων παρουσιάζει μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων κατά 30-50% (Warkentin, 1998). Η θρομβοπενία δεν είναι απαραίτητο να είναι απόλυτη δηλαδή $<150 \times G/L$ αλλά λαμβάνεται υπόψιν και η σχετική θρομβοπενία. Ενδεικτικά, οι χειρουργικοί ασθενείς που παρουσιάζουν μετεγχειρητική θρομβοκυττάρωση μπορεί στη συνέχεια να υποστούν σημαντική σχετική μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων σε σχέση με την μέγιστη τιμή των αιμοπεταλίων μετεγχειρητικά χωρίς να παρουσιάσουν απόλυτη θρομβοπενία. (Warkentin, et al., 2003).

Σπανιότερα έχει αναφερθεί HIT μετά τη διακοπή της ηπαρίνης. Αυτό το φαινόμενο, που αναφέρεται ως HIT καθυστερημένης έναρξης, εμφανίζεται σε διάμεσο διάστημα 10-14 ημερών μετά τη διακοπή της ηπαρίνης και σχετίζεται με σημαντικά αυξημένους τίτλους αντισωμάτων αντι-PF4/ηπαρίνης ή Διάχυτη Ενδαγγειακή πήξη (ΔΕΠ) (Rice, et al., 2002) (Warkentin & Kelton, 2001). Μια πιθανή εξήγηση για την HIT καθυστερημένης έναρξης είναι η διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων έναντι

του συμπλόκου PF4/ηπαρίνης με το σύμπλοκο PF4/ενδογενών GAGs. Προκαλείται έτσι ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ακόμη και ελλείψει ηπαρίνης (Rauona, et al., 2006).

ΔΕΠ εμφανίζεται σε περίπου 5% έως 10% των ασθενών με HIT. Χαρακτηρίζεται από ελαττωμένο ινωδογόνο, παράταση του χρόνου προθρομβίνης και του ενεργοποιημένου χρόνου μερικής θρομβοπλαστίνης (Prothrombin Time, PT, activated partial thromboplastin time, aPTT), μειωμένα επίπεδα αντιθρομβίνης, αυξημένα επίπεδα D-Dimer και παρουσία σχιστοκυττάρων και θραυσμάτων ερυθρών στο επίχρισμα περιφερικού αίματος (Warkentin, 2003).

Ο αποκλεισμός άλλων αιτιολογιών θρομβοπενίας είναι πολύ σημαντικός. Συνήθεις αιτίες θρομβοπενίας είναι οι λοιμώξεις, τα φάρμακα και η ΔΕΠ σχετιζόμενη με υποκείμενο νόσημα. Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε καρδιοπνευμονική παράκαμψη (CPB) παρουσιάζουν μείωση του μέσου αριθμού αιμοπεταλίων περίπου 40% 72 ώρες μετά τη χειρουργική επέμβαση (Nader, et al., 1999). Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το γεγονός και την υψηλή συχνότητα σχηματισμού μη παθογόνων αντισωμάτων αντι-PF4/ηπαρίνης, η διάγνωση του HIT είναι συχνά ιδιαίτερα δύσκολη σε αυτόν τον πληθυσμό. Υποψία HIT πρέπει να τεθεί αν μετά από την άνοδο των αιμοπεταλίων ακολουθήσει εκ νέου πτώση μεταξύ 5ης και 14ης μετεγχειρητικής μέρας (διφασική καμπύλη) (Selleng, et al., 2010).

Η πιο συχνή επιπλοκή της νόσου είναι η θρόμβωση, η οποία μπορεί να είναι απειλητική για την ζωή. Σύμφωνα με πρόσφατες αναδρομικές μελέτες, το 20-64% των ασθενών με HIT θα παρουσιάσουν οξύ θρομβοεμβολικό επεισόδιο και 19-40% των ασθενών που θα τεθούν σε εναλλακτική της ηπαρίνης αντιπηκτική αγωγή θα εμφανίσουν επέκταση της θρόμβωσης ή νέα θρόμβωση. Οι ασθενείς που παρουσιάζουν μεμονωμένη θρομβοπενία χωρίς θρόμβωση έχουν 20- 50% κίνδυνο να αναπτύξουν θρόμβωση. Η αιμορραγία είναι σπάνια στο HIT, ακόμη και σε ασθενείς με σοβαρή θρομβοπενία (Greinacher, et al., 1999). Με βάση μια πρόσφατη μελέτη σε 310 ασθενείς με υποψία HIT το 35,7% των ασθενών με HIT που έλαβε αντιπηκτική αγωγή εναλλακτική της ηπαρίνης, εμφάνισε μείζον αιμορραγικό επεισόδιο (Pishko, et al., 2019).

Η εν των βάθει φλεβική θρόμβωση (ΕΦΘ) των κάτω άκρων και η πνευμονική εμβολή είναι οι συχνότερες εντοπίσεις θρόμβωσης σε ασθενείς με HIT (Nand, et al., 1997) (Hong, et al., 2003). Η φλεβική θρόμβωση φαίνεται να υπερισχύει της αρτηριακής θρόμβωσης και εμφανίζεται σε αναλογία 4:1. Ωστόσο, η αρτηριακή θρόμβωση φαίνεται να είναι πιο συχνή σε καρδιοχειρουργικούς και αγγειακούς ασθενείς (Warkentin, 2004). Η

ΕΦΘ των κάτω άκρων είναι η πιο συχνή εντόπιση φλεβικής θρόμβωσης στους ασθενείς με HIT και μπορεί να είναι αμφοτερόπλευρη. Ωστόσο, ΕΦΘ των άνω άκρων, μπορεί να παρουσιαστεί εάν υπάρχει κεντρικός φλεβικός καθετήρας ή μετά από τοποθέτηση βηματοδότη (Warkentin & Greinacher, 2003). Το αιμορραγικό έμφρακτο των επινεφριδίων είναι μια λιγότερο συχνή αλλά πολύ σοβαρή επιπλοκή. Οι ασθενείς με αμφοτερόπλευρο έμφρακτο επινεφριδίων μπορεί να παρουσιάσουν οξύ κοιλιακό άλγος, υπόταση, πυρετό και υπονατρίαζία. Αν δεν αντιμετωπιστούν άμεσα με χορήγηση κορτικοστεροειδών η θνητότητα είναι υψηλή. Μια επίσης σπάνια πιθανή επιπλοκή είναι η θρόμβωση των φλεβωδών κόλπων του του εγκεφάλου που μπορεί να εκδηλωθεί με εμμένουσα κεφαλαλγία και εστιακή νευρολογική σημειολογία (Warkentin, 2016).

Η αρτηριακή θρόμβωση σε ασθενείς με HIT περιλαμβάνει συχνότερα την ανιούσα αορτή και τις μεγάλες αρτηρίες των κάτω άκρων. Έχουν επίσης αναφερθεί επιπλοκές όπως ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, έμφραγμα του μυοκαρδίου, θρόμβωση μεσεντέριας, νεφρικής και σπονδυλικής αρτηρίας (Warkentin & Greinacher, 2003). Παράγοντες κινδύνου για αρτηριακή θρόμβωση αποτελούν η αθηροσκλήρωση, οι ενδοαγγειακοί καθετηριασμοί, και οι πρόσφατες αγγειοχειρουργικές επεμβάσεις (Warkentin, 2004).

Το HIT σχετίζεται και με άλλες επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της φλεβικής γάγγραινας των κάτω άκρων και της νέκρωση του δέρματος σχετιζόμενη με την χορήγηση βαρφαρίνης. Η γάγγραινα των άκρων σε ασθενείς με HIT εμφανίζεται ως επιπλοκή της DVT. Σ' αυτήν την περίπτωση, ο ασθενής μπορεί να παρουσιάζει εκτεταμένη θρόμβωση μεγάλων και μικρών φλέβων ενώ οι μεγάλοι αρτηριακοί κλάδοι δεν παρουσιάζουν απόφραξη και οι περιφερικές αρτηριακές σφύξεις είναι ψηλαφητές. Η νέκρωση του δέρματος μπορεί να εμφανιστεί όταν γίνεται έναρξη αντιπηκτικής αγωγής με αντιβιταμίνες K σε ασθενή με εμμένουσα υπερπηκτικότητα. Γι' αυτόν τον λόγο συστήνεται έναρξη αντιβιταμίνης K μετά την ομαλοποίηση του αριθμού των αιμοπεταλίων (>150 G/l) (Cuker, et al., 2018).

Σχετίζεται με την ελάττωση των φυσικών αναστολέων της πήξης, της πρωτεΐνης C και της πρωτεΐνης S της πρώτες μέρες της έναρξης θεραπείας με αντιβιταμίνες K σε ασθενή με προθρομβωτικό υπόβαθρο (Srinivasan, et al., 2004).

Δερματικές βλάβες στα σημεία ένεσης ηπαρίνης αντιπροσωπεύουν μια άλλη επιπλοκή του HIT. Αυτές οι βλάβες ποικίλλουν από ερυθρηματώδη οζίδια έως εκτεταμένη νέκρωση και μπορεί να προκληθούν είτε από UFH είτε από LMWH (Warkentin, 1999).

1.4 Διάγνωση

Η διάγνωση του HIT σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ηπαρινοθεραπεία σπανίως είναι μια εύκολη υπόθεση. Η κλινική διάγνωση της HIT βασίζεται στην χρονική συσχέτιση της θρομβοπενίας ή/και της θρόμβωσης με την θεραπεία με ηπαρίνη ενώ σημαντικό είναι να αποκλειστούν άλλες αιτίες θρομβοπενίας. Για να αξιολογηθεί η πιθανότητα HIT έχουν αναπτυχθεί συστήματα κλινικής βαθμολόγησης. Ο εργαστηριακός έλεγχος είναι σημαντικός για την επιβεβαίωση ή την απόρριψη της διάγνωσης της HIT.

1.4.1 Θρομβοπενία, θρόμβωση, χρονικά χαρακτηριστικά

Η κύρια εκδήλωση του HIT είναι η εμφάνιση θρομβοπενίας, η οποία εμφανίζεται στο 95% των ασθενών. Η θρομβοπενία μπορεί να εκδηλωθεί είτε ως απόλυτη πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων ($<150 \times 10^9/L$) είτε ως σχετική μείωση 30% έως 50% από τον αρχικό αριθμό αιμοπεταλίων (Greinacher, et al., 2005). Η απόλυτη θρομβοπενία στο HIT είναι συχνά μέτρια ($50-70 \times 10^9/L$) και τυπικά δεν σχετίζεται με αιμορραγικές επιπλοκές. Σοβαρή θρομβοπενία ($<20 \times 10^9/L$) μπορεί να εμφανιστεί ως εκδήλωση φλεγμονώδους θρομβωτικής νόσου και ΔΕΠ (Warkentin & Greinacher, 2016). Οι ασθενείς που εκδηλώνουν μεμονωμένη θρομβοπενία παραμένουν σε υψηλό κίνδυνο για επακόλουθη θρόμβωση (20% έως 50%) (Lewis, et al., 2003). Ασυνήθιστες παρουσιάσεις του HIT, όπως η νέκρωση του δέρματος που προκαλείται από ηπαρίνη, μπορεί να εμφανιστούν απουσία θρομβοπενίας (Bartholomew, 2005).

Η θρόμβωση είναι η πιο σοβαρή επιπλοκή του HIT και συμβάλλει στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα της νόσου. Στους περισσότερους ασθενείς, οι θρομβωτικές επιπλοκές εμφανίζονται ταυτόχρονα με θρομβοπενία (Greinacher, et al., 2005). Οι φλεβικές θρομβώσεις κυριαρχούν, ιδιαίτερα σε σημεία αγγειακής βλάβης από καθετήρες (Hong, et

al., 2003) . Άτυπες εκδηλώσεις του συνδρόμου, όπως αμφοτερόπλευρη αιμορραγία επινεφριδίων, φλεβική γάγγραινα των άκρων και νέκρωση του δέρματος θα πρέπει να προκαλέσουν υποψία HIT (Warkentin, et al., 2005).

Το πιο σημαντικό διαγνωστικό στοιχείο του HIT είναι η χρονική στιγμή των κλινικών εκδηλώσεων σε σχέση με τη θεραπεία με ηπαρίνη. Οι κλινικές εκδηλώσεις θρομβοπενίας ή και θρόμβωσης αναπτύσσονται 5 έως 14 ημέρες μετά την αρχική θεραπεία με ηπαρίνη και κατά μέσο όρο 2 ημέρες (εύρος 1-5 ημέρες) μετά την ανίχνευσή αντισωμάτων (Warkentin, et al., 2009). Σε ασθενείς με πρόσφατη έκθεση σε ηπαρίνη (έως 100 ημέρες), η θρομβοπενία εμφανίζεται απότομα εντός 24 ωρών από την επανέκθεση στο φάρμακο λόγω κυκλοφορούντων αντισωμάτων αντι-PF4/ηπαρίνης. Μια άλλη σπάνια κλινική παραλλαγή που ονομάζεται «HIT καθυστερημένης έναρξης» αναγνωρίζεται ημέρες έως εβδομάδες μετά τη διακοπή της ηπαρίνης. Η HIT καθυστερημένης έναρξης προκαλείται από διασταυρούμενη αντίδραση αντισωμάτων έναντι του συμπλόκου PF4/GAG που βρίσκονται στις επιφάνειες των κυττάρων και μπορούν να προκαλέσουν ενεργοποίηση αιμοπεταλίων παρουσία ηπαρίνης στις λειτουργικές δοκιμασίες των αιμοπεταλίων (Warkentin & Kelton, 2001). Στο 65% των ασθενών τα αιμοπετάλια επανέρχονται στο φυσιολογικό εύρος εντός μιας εβδομάδας από τη διακοπή της ηπαρίνης (Wallis, et al., 1999). Οι ανοσολογικές δοκιμασίες παραμένουν θετικές 85 έως 90 ημέρες μετά την διάγνωση και οι λειτουργικές δοκιμασίες των αιμοπεταλίων 50 ημέρες. Η ανοσολογικές δοκιμασίες μπορεί να παραμείνουν θετικές στο 35% των ασθενών έως και 1 έτος, με τον τίτλο των αντισωμάτων να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (Mattioli, et al., 2009)

1.4.2 Σκορ εκτίμησης κινδύνου HIT

Τα κλινικά σκορ μπορεί να βοηθήσουν τους κλινικούς ιατρούς στην διάγνωση της νόσου. Το σκορ εκτίμησης κινδύνου HIT 4T's (Thrombocytopenia, Timing of platelet count fall, Thrombosis or other sequelae, other causes for thrombocytopenia present), που αναπτύχθηκε από τον Warkentin είναι το απλούστερο και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σκορ εκτίμησης κινδύνου για το HIT (Linkins, et al., 2015). Τα 4 T αξιολογούν βασικά χαρακτηριστικά της νόσου που περιεγραφήκαν προηγουμένως (ημέρα εμφάνισης της θρομβοπενίας ή/και της θρόμβωσης σε σχέση με την ημέρα έναρξης της θεραπείας με ηπαρίνη και άλλες αιτίες θρόμβωσης) και εκτιμούν την πιθανότητα νόσου με βάση το τελικό σκορ (βλ. Πιν.2). Χαμηλός κίνδυνος: 0-3, ενδιάμεσος κίνδυνος: 4-5, υψηλός κίνδυνος: 6-8. Μια μετα-ανάλυση μελετών έδειξε ότι το έχει υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (0,998; 95% διάστημα εμπιστοσύνης, 0,97-1,0) και είναι πολύ χρήσιμο για τον αποκλεισμό της νόσου. (Cuker, et al., 2012). Τα σκορ συμβατά με ενδιάμεσο (4T's: 4-5) και υψηλό (4T's: 6-8) κίνδυνο HIT παρουσίαζαν χαμηλή ειδικότητα κυρίως λόγω της operator dependent αξιολόγησης. Μια πρόσφατη προοπτική μελέτη που αξιολόγησε το 4T's έδειξε ότι η έλλειψη εμπειρίας μπορεί να οδηγήσει σε ένα εσφαλμένα χαμηλό σκορ στο 2% των περιπτώσεων (Crowther, et al., 2014).

Πίνακας 2. Βαθμολογία 4T's

Πιθανότητα προ-δοκιμής θρομβοπενίας που προκαλείται από ηπαρίνη (HIT): βαθμολογία 4Ts			
Κατηγορία 4T	2 πόντους	1 πόντος	0 πόντους
Θρομβοπενία	Μειώνεται ο αριθμός αιμοπεταλίων >50% και το nadir των αιμοπεταλίων $\geq 20 \times 10^9/L$	Ο αριθμός των αιμοπεταλίων μειώνεται 30-50% ή τα αιμοπετάλια είναι $10-19 \times 10^9/L$	Ελάττωση του αριθμού των αιμοπεταλίων κατά <30% η nadir των αιμοπεταλίων $<10 \times 10^9/L$
Χρόνος πτώσης του αριθμού των αιμοπεταλίων	Ημέρες έναρξης της ηπαρίνης 5-10 ή πτώση των αιμοπεταλίων ≤ 1 ημέρα (προηγούμενη έκθεση σε ηπαρίνη εντός 30 ημερών.	Πτώση των αιμοπεταλίων 5-10 ημέρες μετά την έναρξη της ηπαρίνης αλλά όχι δεδομένα ασαφή ή πτώσης 10 ημέρα μετά ή ≤ 1 (προηγούμενη έκθεση σε ηπαρίνη πριν από 30-100 ημέρες.	Ο αριθμός των αιμοπεταλίων μειώνεται ≤ 4 ημέρες χωρίς πρόσφατη έκθεση.
Θρόμβωση ή άλλες συνέπειες	Νέα θρόμβωση (επιβεβαιωμένη), νέκρωση του δέρματος, οξεία συστηματική αναφυλακτική αντίδραση μετά από ενδοφλέβια χορήγηση UFH	Επέκταση ή υποτροπή θρόμβωσης, μη νεκρωτικές (ερυθηματώδεις) βλάβες του δέρματος στα σημεία της ένεσης. Μη τεκμηριωμένη απεικονιστικά κλινική υποψία θρόμβωσης.	Καμία
Άλλες αιτίες της θρομβοπενίας	Καμία προφανής	Δυνατόν	Σαφής

Χαμηλή πιθανότητα HIT: σκορ ≤ 3 . Ενδιάμεση πιθανότητα για HIT: σκορ 4-5. Υψηλή πιθανότητα για HIT: σκορ 6-8.

Προκειμένου να βελτιωθεί η διαγνωστική χρησιμότητα του κλινικού σκορ 4T's, αναπτύχθηκε πρόσφατα ένα πιο αναλυτικό σκορ, το σκορ HEP (HIT Expert Probability). Αυτό το σκορ περιέχει πιο πολλά διαγνωστικά κριτήρια, ιδιαίτερα όσον αφορά τις άλλες πιθανές αιτίες θρομβοπενίας. Σύμφωνα με μια μελέτη που αξιολόγησε την διαγνωστική ικανότητα του σκορ HEP σε ένα πληθυσμό ασθενών με υποψία HIT, παρουσίασε 100% ευαισθησία και 60% ειδικότητα. Επιπλέον, σε σύγκριση με το σκορ 4T's, το σκορ HEP έδειξε καλύτερη συσχέτιση με τα αποτελέσματα της ανοσολογικής δοκιμασίας και μεγαλύτερη ομοφωνία μεταξύ των ερευνητών (Cuker, et al., 2010).

Άλλα σκορ έχουν προταθεί από τον Messmore et al (Messmore, et al., 2011) αλλά και από τους Lillo-Le Louet et al, για την εκτίμηση κινδύνου HIT σε ασθενείς που υποβάλλονται σε καρδιοπνευμονική παράκαμψη (Louët, et al., 2004).

Η ακρίβεια των σκορ εξαρτάται από την συλλογή και την σωστή αξιολόγηση των κλινικών πληροφοριών και από την κλινική εμπειρία του χρήστη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η εκτίμηση του σκορ δεν είναι δυνατή λόγω μη διαθέσιμων, ελλειπών ή λανθασμένων δεδομένων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, το σκορ μπορεί να είναι ανακριβές όποτε εργαστηριακή διερεύνηση καθίσταται αναγκαία (Cuker, et al., 2012).

1.4.3 Εργαστηριακές δοκιμασίες προσδιορισμού του HIT

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες δοκιμασιών για την εργαστηριακή διάγνωση της HIT: οι ανοσολογικές δοκιμασίες που ανιχνεύουν τα αντισώματα PF4/ηπαρίνης, και οι λειτουργικές δοκιμασίες που μελετούν την εξαρτώμενη από την ηπαρίνη ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων (βλ. Πιν.3) (Lau, et al., 2017). Ωστόσο, όλες οι δοκιμασίες παρουσιάζουν αρκετούς περιορισμούς που σχετίζονται με την ευαισθησία, την ειδικότητα, την πολυπλοκότητα και την διαθεσιμότητα της μεθόδου (Favaloro, et al., 2017). Οι ανοσολογικές μέθοδοι ανιχνεύουν αντισώματα έναντι του συμπλόκου PF4/ηπαρίνης τα οποία περιλαμβάνουν παθογόνα αλλά και μη παθογόνα αντισώματα HIT. Μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: ποιοτικές και ποσοτικές δοκιμασίες, με τις ποιοτικές δοκιμασίες να σχετίζονται με χαμηλότερη ειδικότητα (Favaloro, 2018).

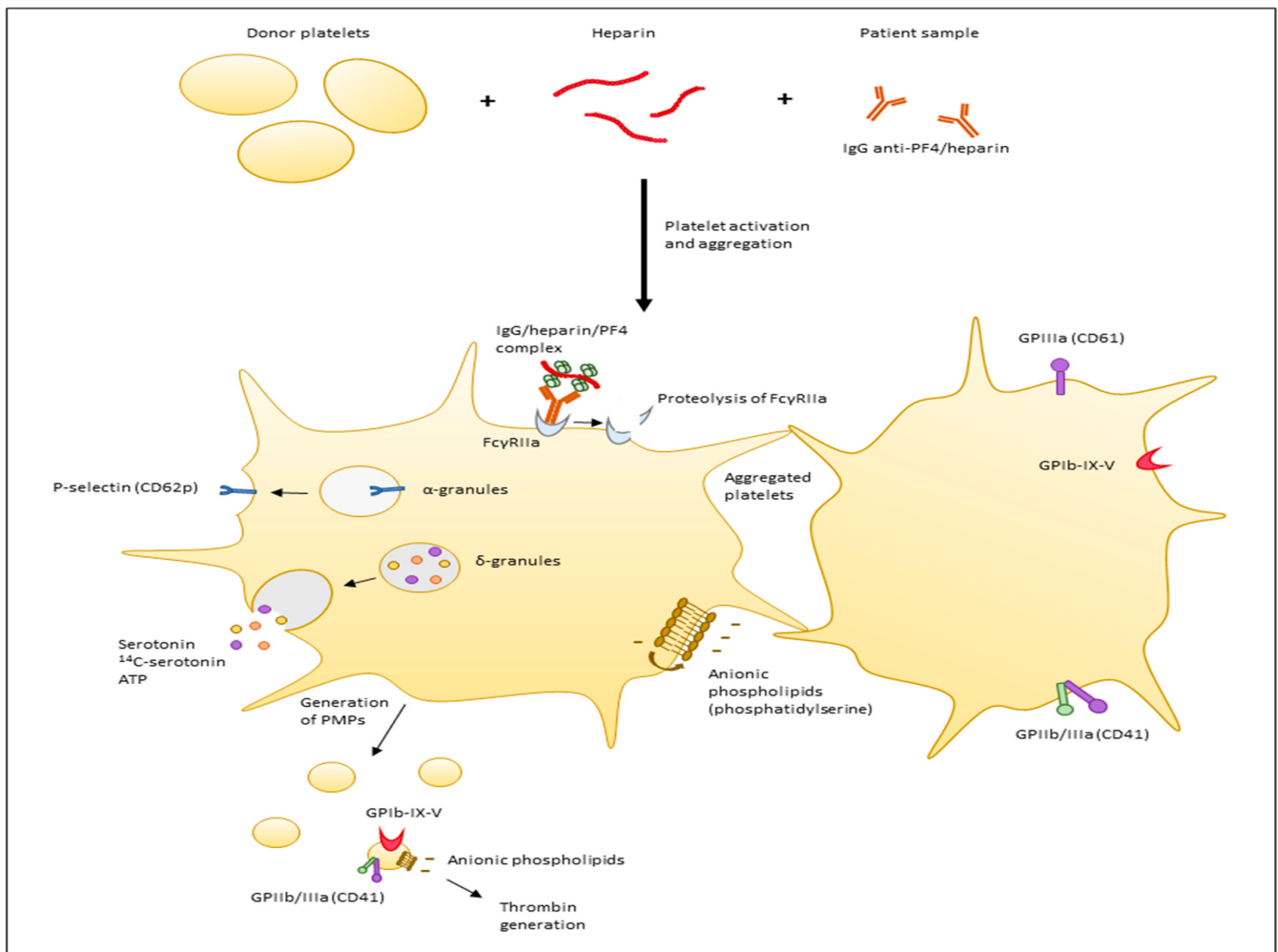
Πίνακας 3. Ανοσολογικές δοκιμασίες για τον προσδιορισμό του HIT.

Ανοσολογικές δοκιμασίες για την εργαστηριακή διάγνωση της HIT.				
Δοκιμασία	Αποτέλεσμα	Αρχή	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Ανοσοπροσδιορισμός με σωματίδια (Particle gel immunoassay)	Ποιοτικός	Δοκιμασία συγκόλλησης χρησιμοποιώντας έγχρωμα πολυστερινικά σωματίδια επικαλυμμένα με PF4/ηπαρίνη	Γρήγορο αποτέλεσμα	Απαιτεί συγκεκριμένη φυγόκεντρο. Το αποτέλεσμα αξιολογείται οπτικά. Δεν είναι ειδικό για IgG. Περιστασιακά ψευδώς αρνητικά. Χαμηλή θετική προγνωστική αξία (<50%)
Δοκιμή πλευρικής ροής (Lateral flow)	Ποιοτικός	Πλευρική ροή ειδική για IgG. Ποιοτική ανοσοχρωματογραφία	Γρήγορο αποτέλεσμα Πολύ ευαίσθητη	Το αποτέλεσμα αξιολογείται οπτικά. Κακή αναπαραγωγικότητα. Περιστασιακά ψευδώς αρνητικά. Χαμηλή θετική προγνωστική αξία (<50%).
Αυτόματη δοκιμασία με βάση σωματίδια λάτεξ (Automated latex-based assay)	Ποσοτικός	Συγκολλήσεις σωματιδίων λάτεξ	Γρήγορο αποτέλεσμα	Απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Δεν είναι ειδική για IgG. Ακριβή
Αυτοματοποιημένη δοκιμασία με βάση τη χημειοφωταύγεια (Automated chemiluminescence-based assay)	Ποσοτικός	Χημειοφωταύγεια	Γρήγορο αποτέλεσμα. Πολύ υψηλή αρνητική προγνωστική αξία.	Απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Ακριβή. Περιστασιακά ψευδώς αρνητικά.
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) Lifecodes PF4 IgG (Immucor GTI Diagnostics)	Ποσοτικός	ELISA, polyvinylsulfate-PF4 surface bound	Αναφορά οπτικής πυκνότητας και cut-off. Υψηλή αρνητική προγνωστική αξία. Μπορεί να επιβεβαιώσει το σύνδρομο χρησιμοποιώντας δοκιμασία με υψηλές συγκεντρώσεις ηπαρίνης	Απαιτείται αρκετός χρόνος για να δοθεί το αποτέλεσμα. Συνήθως δεν διατίθεται για έλεγχο ενός μόνο ασθενούς. Έλεγχος δειγμάτων κατά παρτίδες
Zymutest HIA IgG (Hyphen Biomed)	Ποσοτικός	ELISA, heparin bound and suspension platelet PF4	Αναφορά οπτικής πυκνότητας και cut-off Υψηλή αρνητική προγνωστική αξία. Μπορεί να επιβεβαιώσει το σύνδρομο χρησιμοποιώντας δοκιμασία με υψηλές συγκεντρώσεις ηπαρίνης	Απαιτείται αρκετός χρόνος για να δοθεί το αποτέλεσμα. Συνήθως δεν διατίθεται για έλεγχο ενός μόνο ασθενούς. Έλεγχος δειγμάτων κατά παρτίδες
Asserachrom HPIA - IgG (Stago)	Ποσοτικός	ELISA, PF4-heparin surface bound	Αναφορά οπτικής πυκνότητας και cut-off Υψηλή αρνητική προγνωστική αξία. Μπορεί να επιβεβαιώσει το σύνδρομο χρησιμοποιώντας δοκιμασία με υψηλές συγκεντρώσεις ηπαρίνης	Απαιτείται αρκετός χρόνος για να δοθεί το αποτέλεσμα. Συνήθως δεν διατίθεται για έλεγχο ενός μόνο ασθενούς. Έλεγχος δειγμάτων κατά παρτίδες

Οι ανοσολογικές δοκιμασίες που ανιχνεύουν επιλεκτικά αντισώματα της τάξης IgG έχουν υψηλή ειδικότητα, ενώ είναι απαραίτητο σε αυτές τις δοκιμασίες να αναφέρεται πάντα το όριο θετικότητας (cut-off) και όχι απλά εάν το αποτέλεσμα είναι θετικό ή αρνητικό (Greinacher, et al., 2010). Ένα αρνητικό αποτέλεσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον αποκλεισμό του HIT, αλλά ένα θετικό αποτέλεσμα δεν σημαίνει πάντα την παρουσία παθολογικών αντισωμάτων ειδικών για την HIT και δεν επιβεβαιώνει την διάγνωση (ψευδώς θετικά HIT). Η μέτρια ειδικότητα των διαθέσιμων ανοσολογικών δοκιμασιών σημαίνει ότι η υπερδιάγνωση είναι συχνή και μπορεί να οδηγήσει σε περιττές θεραπείες, αυξανόμενο κόστος νοσηλείας και κίνδυνο αιμορραγίας (Tan, et al., 2012).

1.4.3.1 Λειτουργικές δοκιμασίες

Στις λειτουργικές δοκιμασίες, τα αιμοπετάλια ενός υγιούς δότη επωάζονται με τον ορό ή το πλάσμα του ασθενούς παρουσίας ηπαρίνης. Εάν τα αντισώματα αντι-PF4/ηπαρίνης είναι παρόντα και εφόσον υπάρχει στοιχειομετρική αναλογία ηπαρίνης και PF4, το σύμπλοκο αντισώματα/ PF4/ ηπαρίνης θα δεσμευτεί στους υποδοχείς FcγRIIa των αιμοπεταλίων και θα προκαλέσει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων του δότη. Αυτή η *in vitro* ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων θα οδηγήσει σε απελευθέρωση της P-σελεκτίνης (CD62p) από τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, την απελευθέρωση σεροτονίνης και ATP από τα δ-κοκκία των αιμοπεταλίων, την παραγωγή μικροσωματιδίων των αιμοπεταλίων (Platelet microparticles, PMPs) με προπηκτική δράση, την έκφραση αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Επίσης, η γλυκοπρωτεΐνη GPIIb/ IIIa (CD41/CD61) και η GPIb-IX-V είναι δύο μεμβρανικοί υποδοχείς των αιμοπεταλίων που υφίστανται δομικές αλλαγές κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (βλ. Εικ.6) (Michelson, 2011).



Εικόνα 5. Αλλαγές αιμοπεταλίων που προκαλούνται από αντισώματα θρομβοπενίας HIT (Mine, et al., 2017).

❖ Δοκιμασία απελευθέρωσης σεροτονίνης.

Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από τα αντισώματα αντι-PF4/ ηπαρίνη, απελευθερώνουν σεροτονίνη από τα δ-κοκκία τα οποία αποθηκεύουν πρακτικά όλη την κυκλοφορούσα σεροτονίνη (Warkentin, et al., 2015) Η δοκιμασία απελευθέρωσης σεροτονίνης είναι η λειτουργική δοκιμασία αναφοράς για την διάγνωση της HIT (gold standard). Ανιχνεύει την επαγόμενη από τα αντισώματα της HIT ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων στον ορό ή το πλάσμα του ασθενούς. Η δοκιμασία απελευθέρωσης σεροτονίνης με την χρήση ραδιενεργού άνθρακα 14 πρωτοπεριγράφηκε για την διάγνωση της HIT από τον Sheridan et al, 14C- SRA (14C Serotonin Release Assay) (Sheridan, et al., 1986) . Για την εκτέλεση αυτής της ανάλυσης, το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP,

Platelet Rich Plasma) του υγιούς δότη επωάζεται με ραδιενεργό άνθρακα 14 (14C). Η ραδιοσημασμένη σεροτονίνη αποθηκεύεται στα δ-κοκκία των αιμοπεταλίων. Στη συνέχεια συλλέγονται πλυμένα αιμοπετάλια τα οποία επωάζονται με τον ορό ή το πλάσμα του ασθενούς και ηπαρίνη. Επί παρουσίας αντισωμάτων HIT θα απελευθερωθεί ραδιενεργός άνθρακας λόγω ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και θα καταμετρηθεί από μετρητή β ακτινοβολίας (Warkentin, et al., 2015).

❖ Απελευθέρωση ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης)

Τα δ-κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν μεγάλα αποθέματα ATP. Η απελευθέρωση ATP από τα αιμοπετάλια κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης τους προκαλούμενη από τα αντισώματα της HIT μπορεί να μετρηθεί με την μέθοδο της βιοφωταύγειας (Stewart, et al., 1995). Όταν το ATP συνδεθεί με την λουσιφερίνη παρουσία λουσιφεράσης θα ακολουθήσει η οξείδωση της λουσιφερίνης με αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός. Το φως που εκπέμπεται είναι ανάλογο με την ποσότητα του ATP που απελευθερώνεται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια.

❖ HIPA (Heparin-Induced Platelet Activation)

Η δοκιμασία HIPA (Heparin-Induced Platelet Activation) βασίζεται στον έλεγχο συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πηγάδια πλάκας ELISA (Greinacher, et al., 1994). Τα αιμοπετάλια του δότη, ο ορός του ασθενούς και η ηπαρίνη επωάζονται σε συνεχή ανάδευση. Το υπό εξέταση δείγμα εξετάζεται οπτικά για την ύπαρξη συσσώρευσης αιμοπεταλίων στον πυθμένα του πηγαδιού. Επί θετικού αποτελέσματος παρατηρείται επίσης διαύγαση του υποκείμενου πλάσματος (Warkentin & Greinacher, 2012).

❖ Οπτικό συσσωρόμετρο (Δοκιμασία θολοσιμετρικής συσσώρευσης αιμοπεταλίων)

Η επαγομένη από ηπαρίνη δοκιμή συσσώρευσης αιμοπεταλίων PAT (Platelet aggregation test) αξιολογεί την συσσώρευση αιμοπεταλίων χρησιμοποιώντας συμβατική μέτρηση μετάδοσης φωτός συσσωμάτωση LTA (Late transmission aggregometry). Η αρχή της μεθόδου είναι παρόμοια με αυτή της HIPA, με τη διαφορά ότι το τελικό σημείο συσσώρευσης αιμοπεταλίων δεν αξιολογείται οπτικά αλλά με τη χρήση ενός οπτικού συσσωματόμετρου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε μια κυψελίδα στους 37°C

μεταξύ μιας πηγής φωτός και ενός φωτοκύτταρου και η μετάδοση του φωτός καταγράφεται με την πάροδο του χρόνου. Η συσσώρευση ανιχνεύεται με αύξηση της μετάδοσης φωτός μέσω του εναιωρήματος αιμοπεταλίων (Fratantoni, et al., 1975).

❖ Συσσωρόμετρο ολικού αίματος, HIMEA

Το HIMEA (Heparin-induced multiple electrode aggregometry) είναι μια εύκολη στην εκτέλεση, εναλλακτική της LTA, δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων, που μπορεί να εφαρμοστεί σε περισσότερα εργαστήρια (Galea, et al., 2013). Το HIMEA ανιχνεύει αποτελεσματικά την επαγόμενη από την ηπαρίνη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Μέσα σε μία κυψελίδα, το ολικό αίμα του δότη επωάζεται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση με την βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων και μαγνητικού αναδευτήρα, με το πλάσμα ή τον ορό του ασθενούς παρουσία ηπαρίνης. Όταν ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια, προσκολλώνται σε δύο ζεύγη ηλεκτροδίων βυθισμένα στην κυψελίδα. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων προκαλεί διαφορά δυναμικού στα άκρα των ηλεκτροδίων (μέθοδος εμπέδησης) η οποία καταγράφεται σε συνάρτηση με τον χρόνο ως καμπύλη συσσώρευσης (Multiplate® analyzer, Dynabyte Medical, Munich, Germany).

Το 2014 η Platelet Immunology ISTH-SSC (International Society on Thrombosis and Haemostasis- Scientific and Standardization Committee) δημιούργησε και αξιολόγησε ένα κοινό πρωτόκολλο με την βοήθεια των ομάδων που μελετούν το HIMEA. Για το HIMEA όπως και για τις περισσότερες λειτουργικές δοκιμασίες απαιτείται πρόσφατα συλλεγμένο ολικό αίμα υγιούς δότη που θα επωαστεί με τον ορό ή το πλάσμα του ασθενούς παρουσία ηπαρίνης. Η επαγόμενη από την ηπαρίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων θα επιβεβαιώσει την ύπαρξη αντισωμάτων αντι-PF4/ ηπαρίνης. Επίσης, όπως σε όλες τις λειτουργικές δοκιμασίες, σημαντικό θέμα αποτελεί η καταλληλότητα του δότη καθώς υπάρχει σημαντική ετερογένεια στην απαντητικότητα των δοτών στα αντισώματα αντι-PF4/ ηπαρίνης. Χαμηλού τίτλου αντισώματα αντι-PF4/ ηπαρίνης μπορεί να μην ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια δότη με χαμηλή απαντητικότητα. (Morel-Kopp, et al., 2016).

❖ Μελέτη δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με κυτταρομετρία ροής

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, προκαλούνται μεταβολές στους μεμβρανικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων. Αυτές οι μεταβολές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ενεργοποίησης αιμοπεταλίων με την βοήθεια της κυτταρομετρία ροής. Η

κυτταρομετρία ροής είναι επίσης χρήσιμη για την ανίχνευση και άλλων δεικτών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων όπως η έκφραση των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων και της P-σελεκτίνης (Maličev, et al., 2016).

❖ **Απελευθέρωση Αιμοπεταλιακών Μικροσωματιδίων PMP**

Τα PMP μπορούν να ελεγχθούν με την κυτταρομετρία ροής. Τα αιμοπετάλια επωάζονται με ένα αντίσωμα έναντι στοιχείων των αιμοπεταλίων σημασμένο με φθορίζοντα μόρια όπως το αντι-CD41 (Minet, et al., 2015) ή αντι-GPIIb. Η Annexin-V μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να ανιχνεύσει τα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων (Kerényi, et al., 2016). Τα PMPs διακρίνονται από τα αιμοπετάλια με βάση το μέγεθος του και την έκφραση των διαφόρων αντιγόνων επιφανείας.

❖ **Δοκιμασία γένεσης θρομβίνης, TGA**

Η προθρομβωτική δράση των αντισωμάτων της HIT μπορεί να αξιολογηθεί με τη δοκιμασία γένεσης θρομβίνης TGA (thrombin generation assay) (Hemker, et al., 2002). Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια υγιούς δότη επωάζεται με το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια του ασθενούς παρουσία ηπαρίνης και ασβεστίου. Το φθορογόνο υπόστρωμα που προστίθεται στην συνέχεια υδrolύεται από την παραγόμενη θρομβίνη και ως αποτέλεσμα δημιουργείται ένα προϊόν που εκπέμπει φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού καταγράφεται σε συνάρτηση ως καμπύλη γένεσης θρομβίνης (Tardy-Poncet, et al., 2009).

1.4.4 Διαγνωστικός αλγόριθμος

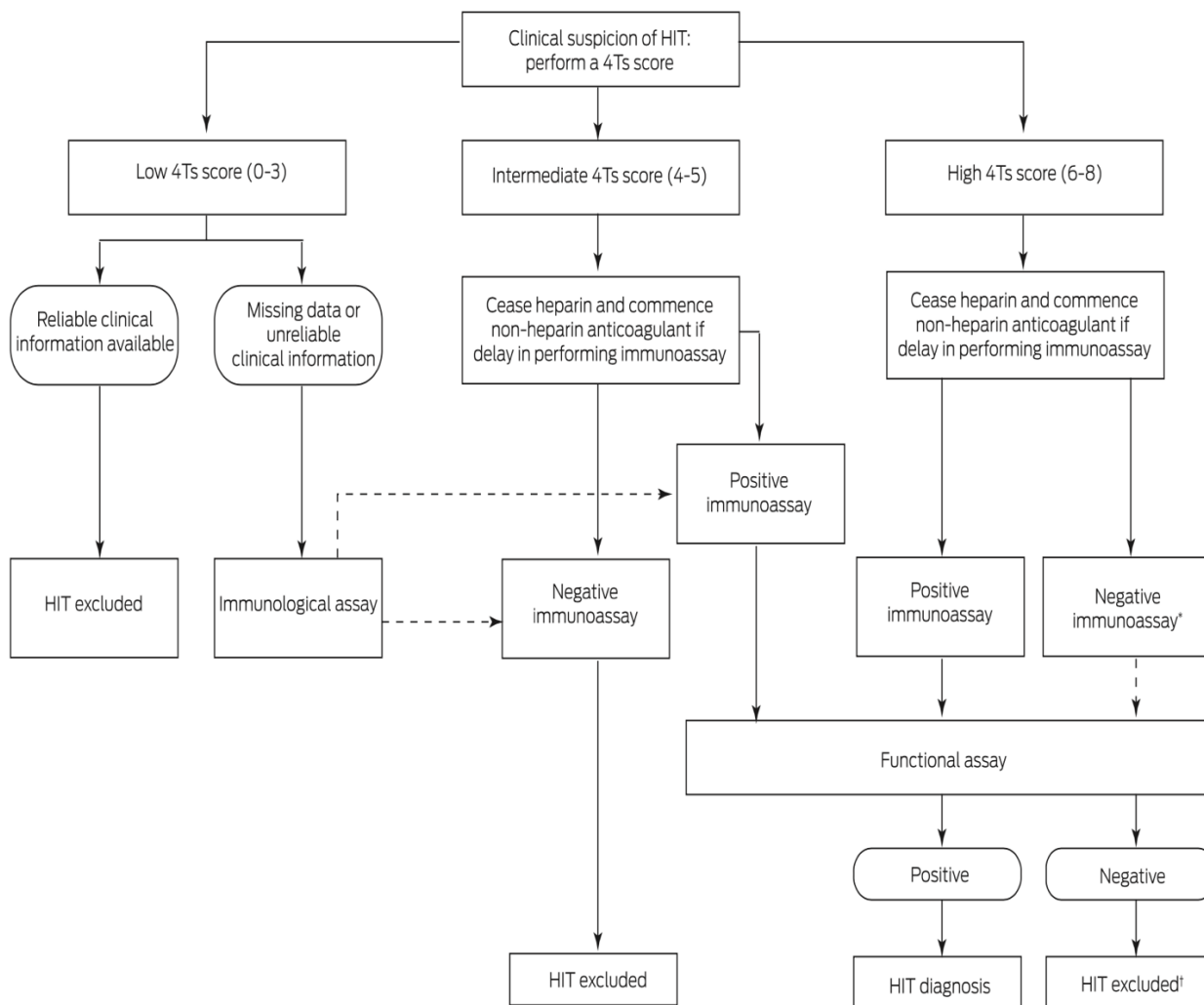
Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται ένας προτεινόμενος αλγόριθμος για την διάγνωση της HIT (βλ. Εικ. 7).

Χαμηλό σκορ 4T's (<3): εάν υπάρχουν αξιόπιστες κλινικές πληροφορίες, δεν χρειάζεται να πραγματοποιηθεί εργαστηριακός έλεγχος και το HIT μπορεί να αποκλειστεί (Cuker, et al., 2012). Ωστόσο, εάν λείπουν δεδομένα, τότε θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ανοσολογική δοκιμασία.

Ενδιάμεσο σκορ 4T's (4-5) : εάν το αποτέλεσμα της ανοσολογικής δοκιμασίας είναι θετικό, συνιστάται η αντιμετώπιση ως HIT έως ότου να είναι διαθέσιμα τα αποτελέσματα μιας λειτουργικής δοκιμασίας.

Υψηλό σκορ 4T's: εάν το αποτέλεσμα της ανοσολογικής δοκιμασίας είναι αρνητικό, μπορεί να αποκλειστεί η HIT και να συνεχιστεί η θεραπεία με ηπαρίνη και κλινικοεργαστηριακή επανεκτίμηση. Μπορεί επίσης να διενεργηθεί και λειτουργική δοκιμασία, επανάληψη του ανοσοπροσδιορισμού ή ανοσοπροσδιορισμός με μέθοδο υψηλότερης ευαισθησίας (ELISA).

Υψηλό σκορ 4T's: εάν το αποτέλεσμα της ανοσοδοκιμασίας είναι θετικό και το αποτέλεσμα της λειτουργικής δοκιμασίας είναι αρνητικό, συνιστάται ο έλεγχος του βαθμού θετικότητας του ανοσοπροσδιορισμού (π.χ. της οπτικής πυκνότητας της ELISA), και η ευαισθησία της λειτουργικής δοκιμασίας. Μπορεί επίσης να εξεταστεί το ενδεχόμενο επανάληψης. Εάν η κλινική υποψία για HIT παραμένει υψηλή και η κλινική κατάσταση του ασθενούς επιδεινώνεται, υπάρχει ανάγκη επανεκτίμησης της πιθανότητας HIT και νέου εργαστηριακού ελέγχου. Η αξία του σκορ 4T's έγκειται στο γεγονός ότι ένα χαμηλό σκορ μπορεί να αποκλείσει την HIT χωρίς να είναι απαραίτητος ο εργαστηριακός έλεγχος, ενώ ένα υψηλό σκορ 4T's θα πρέπει να οδηγήσει σε διακοπή της ηπαρίνης και έναρξη εναλλακτικής αντιπηκτικής αγωγής χωρίς να διαθέτουμε το αποτέλεσμα του ανοσοπροσδιορισμού. Υπενθυμίζεται ότι αν οι πληροφορίες για τον υπολογισμό του σκορ είναι ελλιπής, το αποτέλεσμα της ανοσολογικής δοκιμασίας είναι απαραίτητο.



Εικόνα 6. Διαγνωστικός αλγόριθμος για την ενσωμάτωση κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων του συνδρόμου HIT (Joseph, et al., 2019).

❖ Υπερδιάγνωση

Τα διαγνωστικά εργαλεία που διατίθενται για το HIT χρειάζονται βελτίωση. Γενικά, η υψηλή συχνότητα θρομβοπενίας σε ασθενείς που λαμβάνουν ηπαρίνη, η χαμηλή ειδικότητα των ανοσολογικών δοκιμασιών και η ανησυχία του θεράποντος ιατρού για μη διάγνωση της HIT, είναι παράγοντες που μπορούν να οδηγήσουν σε υπερδιάγνωση. Ως αποτέλεσμα, πολλοί ασθενείς χωρίς HIT υποβάλλονται σε εναλλακτική της ηπαρίνης

αντιπηκτική αγωγή γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο αιμορραγίας και το κόστος της νοσηλείας (Cuker, et al., 2010). Η βελτίωση της διάγνωσης με την βοήθεια των σκορο εκτίμησης κινδύνου και εργαστηριακών δοκιμασιών υψηλής ειδικότητας και ευαισθησίας είναι βασικοί παράγοντες για την αντιμετώπιση αυτού του σύνθετου κλινικού προβλήματος.

1.5 Θεραπεία

Στην υποψία ή στο αποδεδειγμένο HIT είναι κρίσιμο να γίνει άμεση διακοπή της ηπαρίνης, τόσο της UFH όσο και της LMWH συμπεριλαμβανομένης και της ηπαρίνης που χρησιμοποιείται για τον ηπαρινισμό των καθετήρων. Πολλές φορές όμως αυτό δεν αρκεί καθώς ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών έως και 10% παρουσιάζει κίνδυνο θρόμβωσης στις δυο πρώτες μέρες μετά την διακοπή της ηπαρίνης και έως 50% τις πρώτες τριάντα ημέρες (Greinacher, et al., 2000). Ως εκ τούτου η έναρξη αντιπηκτικής αγωγής εναλλακτικής της ηπαρίνης είναι αναγκαία.

Η εναλλακτική αντιπηκτική αγωγή χορηγούμενη παρεντερικά περιλαμβάνει τους άμεσους αναστολείς της θρομβίνης DTIs (Direct thrombin inhibitors) Argatroban και Bivalirudin, τους αναστολείς του ενεργοποιημένου παράγοντα X (FXa) Danaparoid και Fondaparinux. Σύμφωνα με νεότερα δεδομένα μπορούν επίσης να χορηγηθούν και τα άμεσα δρώντα από του στόματος αντιπηκτικά (Direct Oral Anticoagulants, DOACS). Η επιλογή του κατάλληλου αντιπηκτικού εξαρτάται από πολλούς παράγοντες και πρέπει να λαμβάνεται η ηπατική και η νεφρική λειτουργία, το κόστος και η διαθεσιμότητα αυτών των φαρμάκων, καθώς και η εμπειρία του κλινικού ιατρού. Η αντιπηκτική αγωγή χορηγείται σε θεραπευτικές δόσεις.

❖ Argatroban

Το Argatroban είναι ένα DTI με άμεση αντιπηκτική δράση μικρό χρόνο ημίσειας ζωής που χορηγείται ως συνεχής ενδοφλέβια έγχυση και είναι κατάλληλο για εκείνους τους ασθενείς που μπορεί να χρειαστούν χειρουργικές επεμβάσεις ή που διατρέχουν υψηλό αιμορραγικό κίνδυνο (Tardy-Poncet, et al., 2015). Επίσης, το Argatroban μεταβολίζεται στο ήπαρ, καθιστώντας το την κατάλληλη επιλογή για ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια,

ενώ πρέπει να αποφεύγεται σε ασθενείς με ηπατική δυσλειτουργία. Το Argatroban επηρεάζει το INR οπότε πρέπει να δίνεται προσοχή στην γέφυρα με αντιβιταμίνη K (Linkins, et al., 2015).

❖ Bivalirudin

Το Bivalirudin είναι ένας άλλος DTI αναστολέας που χορηγείται ως συνεχής ενδοφλέβια έγχυση. Είναι εγκεκριμένο από τον FDA (Food and drug administration) για HIT που επιπλέκει την PCI (Percutaneous Coronary Intervention) και μπορεί να χορηγηθεί είτε στην οξεία φάση της HIT ή σε ασθενείς με ιστορικό HIT (Cuker, et al., 2018). Επίσης, οι κατευθυντήριες οδηγίες ACCP (American College of Clinical Pharmacy) συστήνουν τη χρήση του bivalirudin σε ασθενείς με οξεία ή υποξεία HIT που απαιτούν επείγουσα καρδιοχειρουργική επέμβαση (Linkins, et al., 2015). Όπως και το Argatroban, έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής κάτι που το καθιστά κατάλληλο για εκείνους τους ασθενείς με κίνδυνο αιμορραγίας ή για εκείνους που μπορεί να υποβληθούν σε χειρουργικές επεμβάσεις και χρειάζονται ταχεία διακοπή της αντιπηκτικής δράσης. Το bivalirudin έχει νεφρική κάθαρση καθώς και από πλασματική κάθαρση από τις πρωτεΐνες του πλάσματος και απαιτεί προσαρμογή της δόσης με βάση την κάθαρση κρεατινίνης, ενώ έχει πολύ συγκεκριμένο δασολογικό σχήμα.

❖ Fondaparinux

Το Fondaparinux είναι συνθετικός πεντασακχαρίτης και αναστέλλει τον FXa. Χορηγείται υποδορίως. Συστήνεται ως ασφαλής, αποτελεσματική εναλλακτική της ηπαρίνης αντιπηκτική αγωγή, (Wang, et al., 2018). Το Fondaparinux έχει νεφρική κάθαρση και η νεφρική λειτουργία πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν για την χορήγηση της. Έχει αναφερθεί διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων PF4/ ηπαρίνης με το fondaparinux (Linkins, et al., 2018) αλλά είναι σπανιότατη και δεν σχετίζεται με κλινικές εκδηλώσεις. (Warkentin, et al., 2014).

❖ Danaparoid

Το Danaparoid είναι ένα φυσικό ηπαρινοειδές, που αποτελείται από μείγμα heparan sulphate, dermatan sulphate και μικρή ποσότητα chondroitin sulphate. Είναι αναστολέας του

FXa. Χορηγείται ενδοφλέβια και η εργαστηριακή παρακολούθηση της αντιπηκτικής του δράσης γίνεται μέσω μέτρησης της αντι-Χα δραστικότητας (Greinacher, 2015). Το Danaparoid έχει εγκριθεί για την θεραπεία HIT σε πολλές χώρες (Hogan & Berger, 2020)

❖ Ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ

Στους ασθενείς που λαμβάνουν VKA (Vitamin K antagonist) τη στιγμή της διάγνωσης, θα πρέπει να χορηγηθεί βιταμίνη Κ για αναστροφή της αντιπηκτικής τους δράσης, δεδομένου του κινδύνου νέκρωσης του δέρματος που μπορεί να προκληθεί στους ασθενείς με HIT (Linkins, et al., 2012). Η μετάβαση στη βαρφαρίνη απαιτεί μια περίοδο γέφυρας με ένα αντιπηκτικό εναλλακτικό της ηπαρίνης (Srinivasan, et al., 2004).

❖ Αντιπηκτικά που χορηγούνται από το στόμα

Τα DOACs (Direct oral anticoagulants) περιλαμβάνουν τους άμεσους αναστολείς του FXa, rivaroxaban και apixaban, καθώς και το DTI dabigatran. Τα DOACs, ιδιαίτερα το rivaroxaban, έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον στην αντιμετώπιση HIT. Τα DOACs χαρακτηρίζονται από την ταχεία έναρξη δράσης, την μη αναγκαιότητα παρακολούθησης και την ευκολία χορήγησης. Αυτά τα χαρακτηριστικά, καθώς και η έλλειψη πιθανής διασταυρούμενης αντίδρασης με τα αντισώματα της HIT, τα καθιστούν κατάλληλη επιλογή τόσο στην οξεία φάση όσο και ως εναλλακτική λύση της βαρφαρίνης για μακροχρόνια αντιπηκτική αγωγή. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμη ισχυρά δεδομένα που να υποστηρίζουν τη χρήση του DOAC στο HIT. Μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η οποία περιλάμβανε 54 συνολικά ασθενείς, πρότεινε ότι τα DOACs φαίνεται να είναι ασφαλής επιλογή για τη θεραπεία της HIT μετά από μια αρχική περίοδο θεραπείας με παρεντερικά χορηγούμενο εναλλακτικό της ηπαρίνης αντιπηκτικό (Shatzel, et al., 2016). Η βέλτιστη χρονική στιγμή έναρξης των DOACs δεν είναι ξεκάθαρη και είναι πιθανό τα DOACs να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική αντιπηκτική αγωγή πρώτης γραμμής μετά τη διακοπή της ηπαρίνης. Οι οδηγίες ASH (American Association of Hematology) 2018 υποστηρίζουν τη χρήση DOACs σε HIT που εκδηλώνεται με μεμονωμένη θρομβοπενία και σε οξεία HITT (θρομβοπενία και θρόμβωση) σε σταθερούς ασθενείς με μέτριο κίνδυνο αιμορραγίας (Cuker, et al., 2018). Ωστόσο, η χρήση των DOACs στην HIT δεν έχει ακόμη υιοθετηθεί ευρέως.

❖ Επανεκθεση στην ηπαρίνη

Σε γενικές γραμμές, είναι σωστό να αποφευχθεί η ηπαρίνη σε ασθενείς με ιστορικό HIT. Ωστόσο, για εκείνους τους ασθενείς στους οποίους η ηπαρίνη θεωρείται αναγκαία, όπως οι ασθενείς που θα υποβληθούν σε CPB, αγγειοχειρουργικές επεμβάσεις, καθώς και αιμοκαθαιρόμενοι, είναι δυνατή η επαναχορήγηση ηπαρίνης υπό ορισμένες συνθήκες. Τα δεδομένα που διαθέτουμε γι' αυτό το θέμα προέρχονται κυρίως από αναδρομικές μελέτες και την γνώμη εμπειρογνομόνων.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που καθιστούν δυνατή την επανεκθεση στην ηπαρίνη σε ασθενείς με ιστορικό HIT: τα αντισώματα αντι-PF4/ ηπαρίνης είναι παροδικά. Επίσης φαίνεται ότι οι ασθενείς με ιστορικό HIT και αρνητική ανοσολογική δοκιμασία δεν διατηρούν ανοσολογική μνήμη έναντι της ηπαρίνης. Τέλος χρειάζονται 5 ημέρες συνεχούς έκθεσης σε ηπαρίνη για την ανάπτυξη αντισωμάτων, επιτρέποντας έτσι την χορήγηση ηπαρίνης για διάστημα μικρότερο των 4 ημερών χωρίς να εμφανιστεί εκ νέου HIT (Warkentin & Sheppard, 2014).

❖ Λοιπές θεραπείες

Υπάρχουν δυο κύριες εναλλακτικές λύσεις που πρέπει να ληφθούν υπόψιν για τη θεραπεία του ασθενούς με ανθεκτικό HIT: η πλασμαφαίρεση και η IVIG (intravenous immunoglobulin). Παρόλα αυτά δεν διαθέτουμε αρκετά επιστημονικά δεδομένα που να υποστηρίζουν την χρήση τους. Υπάρχουν αρκετές αναφορές ασθενών με HIT που αντιμετωπίστηκαν με πλασμαφαίρεση ως συμπληρωματική θεραπεία πριν από CPB και θετικά αντισώματα (Ilusonakhame, et al., 2015). Προτείνεται η πλασμαφαίρεση σε καρδιαγγειακούς ασθενείς στους οποίους η χειρουργική επέμβαση δεν μπορεί να καθυστερήσει, σημειώνοντας ότι η διαθεσιμότητα, το κόστος και η εμπειρία του κλινικού ιατρού μπορεί να επηρεάσουν αυτήν την επιλογή.

Υπάρχουν σχεδόν 30 αναφερόμενα περιστατικά θεραπείας της HIT με IVIG. Η IVIG λειτουργεί με κορεσμό των υποδοχέων FcγRIIa των αιμοπεταλίων, αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω των αντισωμάτων (Park, et al., 2018). Η IVIG έχει περιγραφεί ως αποτελεσματική θεραπεία σε περιπτώσεις σοβαρής και ανθεκτικής HIT. Έχει επίσης περιγραφεί σε ασθενείς με θετικά αντισώματα που χρειάστηκε να υποβληθούν σε επείγουσα χειρουργική επέμβαση που απαιτεί διεγχειρητικά ηπαρίνη όπως σε μεταμόσχευση καρδιάς. Σε όλες τις περιπτώσεις, η χρήση IVIG θεωρήθηκε

συμπληρωματική της εναλλακτικής αντιπηκτικής αγωγή. Αν και η δημοσίευση περίπου ενός περιστατικού ανά έτος υποδηλώνει ότι αυτή η θεραπεία πραγματοποιείται σπάνια, η αυξανόμενη αναγνώριση των συνδρόμων αυτοάνοσης HIT aHIT (autoimmune heparin-induced thrombocytopenia) μπορεί να οδηγήσει σε πιο ευρεία εφαρμογή αυτών των θεραπειών στο μέλλον, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σοβαρές και άτυπες κλινικές εκδηλώσεις HIT (Warkentin, 2019).

Κεφάλαιο 2

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Δείγματα

Όλα τα δείγματα (πλάσματος και ορού) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παραχωρήθηκαν ευγενικά από το τμήμα Αιμόστασης του Γ.Ν.Α «Ιπποκράτειο» και από το Αιματολογικό τμήμα του Γ.Ν.Α «Ευαγγελισμός». Τα δείγματα σε καμία περίπτωση δεν συνοδεύονταν από παραπεμπτικά ή οποιοδήποτε άλλο έγγραφο που να περιέχει προσωπικά δεδομένα των ασθενών (φύλο, ηλικία, αριθμό ταυτότητας, ΑΦΜ, ΑΜΚΑ κτλ.). Τα δείγματα έφεραν μόνο την ένδειξη θετικό (+) ή αρνητικό (-) ως προς την υποψία HIT. Δεν πραγματοποιήθηκε καμία νέα αιμοληψία ή οποιαδήποτε ιατρική πράξη για τους σκοπούς της παρούσας πειραματικής εργασίας και δεν δόθηκε καμία απάντηση-αποτέλεσμα στα παραπάνω τμήματα ή σε ασθενείς. Το αίμα από υγιείς δότες που χρειάστηκε για την πραγματοποίηση της ανάλυσης ελήφθη από συναδέλφους εργαζόμενους του εργαστηρίου υστέρα από την συγκατάθεση τους. Οι δότες δεν είχαν λάβει ασπιρίνη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ή οποιοδήποτε άλλο φάρμακο παρεμβαίνει στην λειτουργικότητα των αιμοπεταλίων για τις τελευταίες τουλάχιστον δέκα μέρες. Η εργασία πραγματοποιήθηκε στο Αιματολογικό τμήμα του Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα». Το πλήρες πρωτόκολλο της εργασίας καθώς και όσες διευκρινήσεις χρειάστηκαν κατατέθηκαν στο επιστημονικό συμβούλιο του νοσοκομείου και έλαβαν την έγκριση του.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο συσσωρόμετρο ολικού αίματος (Multiplate® analyzer, Dynabyte Medical, Munich, Germany).

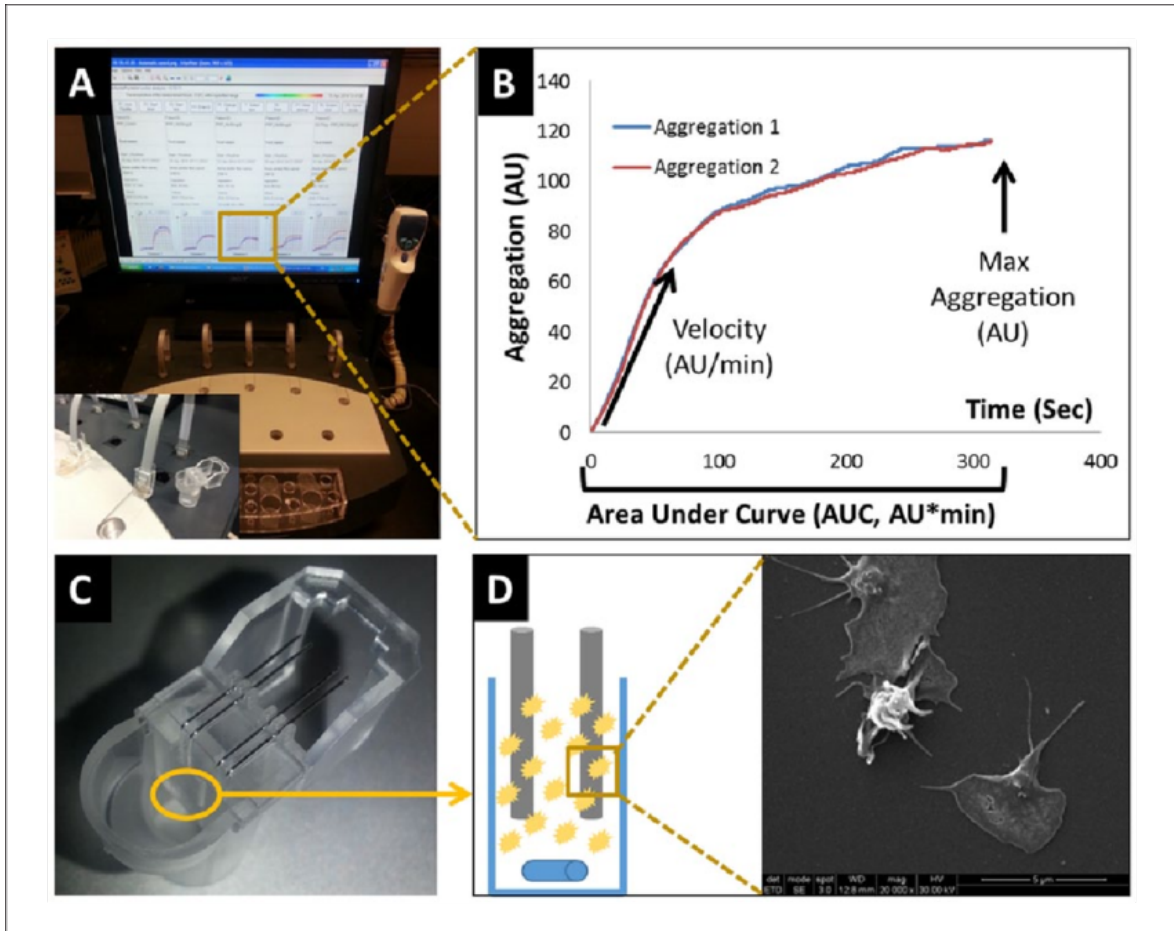
2.2 Συσσωρόμετρο ολικού αίματος – Multiplate

Η συσκευή διαθέτει πέντε κανάλια για παράλληλες μετρήσεις. Μια κυψελίδα δοκιμής μιας χρήσης με διπλούς αισθητήρες ηλεκτροδίων όπου ο κάθε ένας αποτελείται από δύο ευθύγραμμα σύρματα ηλεκτροδίων (περιοχή επαφής αίματος: μήκος 3 mm, διάμετρος 0,3 mm για κάθε καλώδιο αισθητήρα) (βλ.Εικ.7). Η συσκευή καταγράφει το βαθμό αύξησης της ηλεκτρικής αντίστασης σε Ohm που παρουσιάζεται όταν τα αιμοπετάλια προσκολλώνται πάνω στις επιφάνειες των δύο ηλεκτροδίων μετά από ενεργοποίηση τους επαγόμενη από ενεργοποιητή (μειώνουν δηλαδή την αγωγιμότητα τους), τα οποία βυθίζονται σε ένα δείγμα ολικού αίματος. Λόγω της χρήσης τεσσάρων ηλεκτροδίων ανά

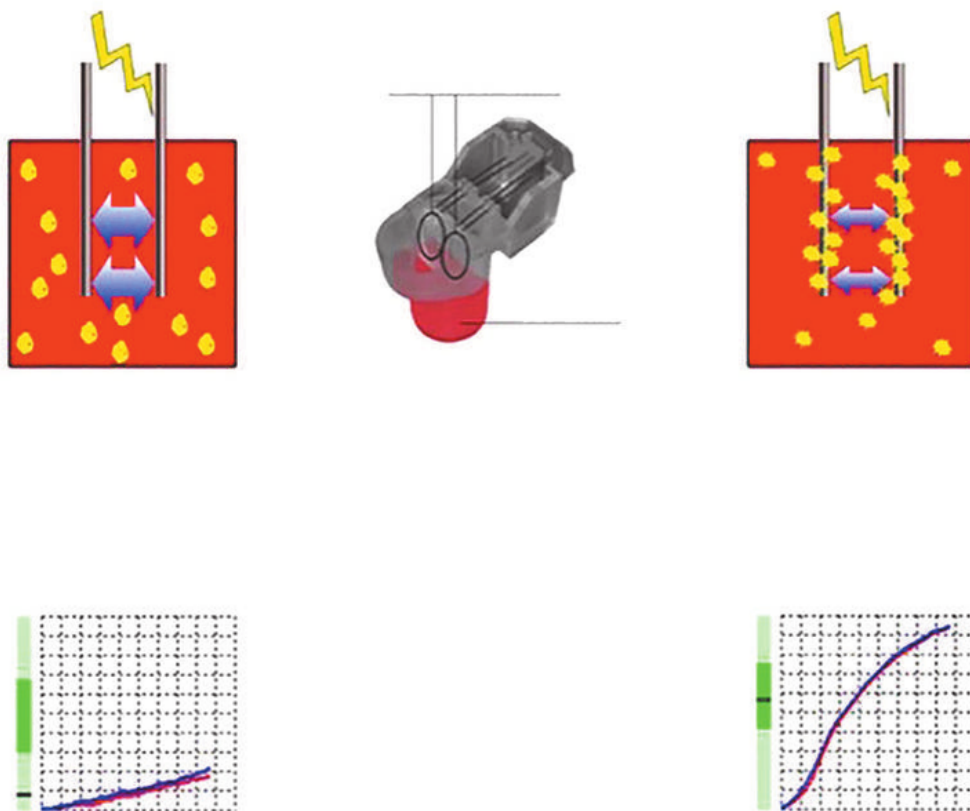
κυψελίδα δοκιμής, η τεχνική ονομάζεται συσσώρευση πολλαπλών ηλεκτροδίων (multiple electrode aggregometry - MEA) (βλ.Εικ.8). Στην κάθε κυψελίδα προστίθεται ένας μαγνήτης επικαλυμμένος με PTFE (Poly-tetra-fluoro-ethylene) ο οποίος βρίσκεται σε συνεχόμενη περιστροφή με την βοήθεια ενός αναδευτήρα. Στην κυψελίδα και με την χρήση της αυτόματης πιπέτας προστίθεται κάθε φορά το δείγμα προς εξέταση. Όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται στα σύρματα των ηλεκτροδίων δημιουργείται διαφορά ηλεκτρικής αντίστασης την οποία οι αισθητήρες εκφράζουν με δυο καμπύλες συσσώρευσης (βλ.Εικ.9). Η παράλληλη καταγραφή των δυο μετρήσεων χρησιμεύει και ως εσωτερικός ποιοτικός έλεγχος. Οι μέσες τιμές των δύο μετρήσεων εκφράζονται σε AU (aggregation units). Ο χρόνος που διαρκεί η δοκιμασία είναι συνήθως από τρία έως τριάντα λεπτά. Το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη συσσώρευσης AUC (area under the aggregation curve) χρησιμοποιείται για να εκφράσει το βαθμό συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά τη διάρκεια του μετρούμενου χρόνου (AU*min) (Τόθ, et al., 2006).



Εικόνα 7. Συσσωρόμετρο ολικού αίματος – Multiplate. <https://roche63-h.assetsadobe2.com/is/image/content/dam/diagnostics/Blueprint/en/products/cps/cps-media-multiplate-analyzer.png?wid=622&hei=457&fmt=png-alpha>.



Εικόνα 8. Α) Συσσωρόμετρο ολικού αίματος Multiplate. Β) Παράδειγμα μιας μέτρησης συσσώρευσης με χρόνο εξέτασης διάρκειας δεκαπέντε λεπτών. Γ) Κυψελίδα δοκιμής για το Multiplate. Δ) Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα ηλεκτρόδια στην οποία οφείλεται η αύξηση της ηλεκτρικής αντίστασης. <https://www.researchgate.net/profile/Phat-Tran-5/publication/284276154/figure/fig1/AS:391436911562753@1470337240259/Multiplate-Analyzer-Impedance-Aggregometry-A-Multiplate-Analyzer-console-B-Example-of.png>



Εικόνα 9. Ο μηχανισμός συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στα ηλεκτρόδια της κυψελίδας δοκιμής του συσσωρόμετρου Multiplate και οι καμπύλες συσσώρευσης. <https://www.researchgate.net/profile/Gabriele-Casso/publication/301534723/figure/fig3/AS:352943799848965@1461159767704/Working-mechanism-of-impedance-aggregometry-Multiplate-R-modified-from-37-with.png>

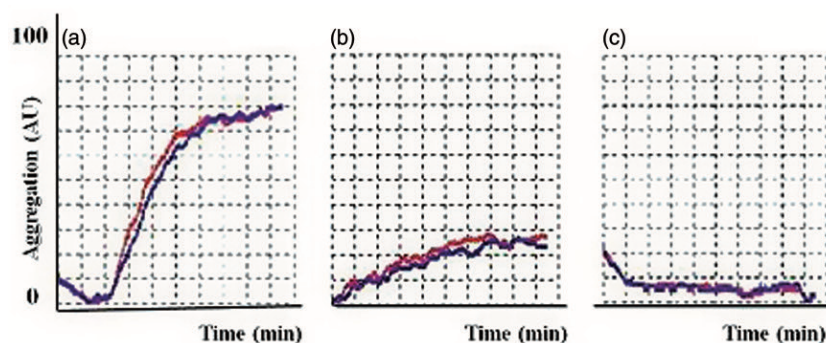
2.3 HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H)

Η HemosIL AcuStar HIT-IgG(PF4-H) είναι ένας ανοσολογικός προσδιορισμός δυο σταδίων χημειοφωταύγειας. Μαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με σύμπλοκο PF4 και σουλφονικό πολυβινυλεστέρα (PVS) ενώνονται με τα αντισώματα έναντι αντι-PF4/UFH που βρίσκονται στο πλάσμα του ασθενούς ύποπτου για HIT. Μετά την επώαση, τον μαγνητικό διαχωρισμό και ένα βήμα πλύσης, προστίθεται ένας ιχνηθέτης που αποτελείται από ένα σημασμένο με ισολουμινόλη αντίσωμα κατά του ανθρώπινου IgG ή ένα μείγμα τριών μονοκλωνικών αντισωμάτων σημασμένων με ισολουμινόλη (αντι- ανθρώπινα IgG, IgA και IgM) όπου μπορεί να συνδεθεί με τα δεσμευμένα αντισώματα αντι-PF4/ηπαρίνης στα σωματίδια. Μετά από μια δεύτερη επώαση, προστίθενται αντιδραστήρια που ενεργοποιούν την αντίδραση φωταύγειας. Ακολουθεί μια ακόμα πλύση και στην συνέχεια τα δείγματα φωτομετρούνται στον αναλυτή ACL AcuStar, σε μονάδες σχετικού φωτός (RLUs). Οι RLU είναι ευθέως ανάλογες με τη συγκέντρωση αντι-PF4/ηπαρίνης IgG ή IgG/IgA/IgM στο δείγμα. Σε μια ξεχωριστή εσωτερική μελέτη που ολοκληρώθηκε από τον κατασκευαστή, οι δύο αναλύσεις συγκρίθηκαν καλά με άλλες εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες ELISA (PF4 Enhanced® και PF4 IgG® ELISA στερεάς φάσης, GTI Diagnostics, Waukesha, WI, ΗΠΑ) με αποτέλεσμα τη συνολική συμφωνία 96,0% (95% CI 90,9% – 98,7%). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, οι δοκιμές δεν δείχνουν παρεμβολή για αιμοσφαιρίνη έως 500 mg/dl, χολερυθρίνη έως 18 mg/dl, τριγλυκερίδια έως 1.250 mg/dl και ηπαρίνη (LMWH και UFH) έως 1 IU/ml (Legnani , et al., 2010).

2.4 Heparin-Induced Multiple Aggregometry, HIMEA

Στην κυψελίδα μέτρησης του συσσωρόμετρου ολικού αίματος – Multiplate προστίθενται 340 μl ολικού αίματος από φυσιολογικούς δότες που συλλέχθηκε σε σωληνάρια κιτρικού νατρίου 3.2% (0,109 M), 200 μl πλάσματος ασθενούς υπόπτου για HIT και 40 μl UFH . Οι τελικές συγκεντρώσεις ηπαρίνης είναι 1 και 100 αντι-Χα IU/ml. Η συσώρευση αιμοπεταλίων αξιολογείται επίσης απουσία UFH (40 μl φυσιολογικός ορός). Μετά από επώαση ενός λεπτού ξεκίνα η καταγραφή της συσώρευσης αιμοπεταλίων η οποία διαρκεί δεκαπέντε λεπτά. Το εμβαδόν περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC, AU*min) χρησιμοποιείται για να εκφράσει τον βαθμό συσώρευσης των αιμοπεταλίων. Το HIMEA θεωρείται θετικό όταν πληρούνται και τα ακόλουθα τέσσερα κριτήρια:

1. Η τιμή AUC παρουσία 1 IU/ml UFH να είναι ίση ή μεγαλύτερη από το όριο θετικότητας. Το όριο θετικότητας υπολογίστηκε από τον έλεγχο 15 υγιών δοτών που δεν είχαν πρόσφατη επαφή με ηπαρίνη (μέση τιμή AUC συν τρεις φορές την σταθερή απόκλιση)
2. Μορφή καμπύλης θετική για HIT: Το αντιπροσωπευτικό σχήμα μιας καμπύλης συσσώρευσης αιμοπεταλίων ασθενούς με HIT χαρακτηρίζεται από καθυστερημένη έναρξη συσσώρευσης και τυπική σιγμοειδή καμπύλη. Η καθυστέρηση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων αντανακλά το χρόνο που απαιτείται για το σχηματισμό του συμπλέγματος αντιγόνου-αντισώματος. Αυτή η μορφή καμπύλης συσσώρευσης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στο PAT και αυξάνει την ειδικότητα της μεθόδου. Μια τυπική καμπύλη συσσώρευσης σε ασθενή με HIT φαίνεται στην εικόνα 10 (βλ.Εικ.10)
3. Η μείωση στην τιμή AUC παρουσία 100 anti-Xa IU/ml UFH θα πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη του 50% της τιμής AUC που παρατηρείται παρουσία 1 anti-Xa IU/ml UFH.
4. Η τιμή AUC παρουσία 1 αντι-Xa IU/ml UFH πρέπει να είναι ίση ή μεγαλύτερη του 20% της τιμής AUC παρουσία φυσιολογικού ορού χωρίς ηπαρίνη (αυτόματη συσσώρευση).



Εικόνα 10. Αποτέλεσμα της HIMEA παρουσία 1 αντι-Xa IU/ml UFH. Οι καμπύλες συσσώρευσης a, b και c αντιπροσωπεύουν τρία διαφορετικά πειράματα (κάθε πείραμα καταγράφηκε για 15 λεπτά): (α) θετικό αποτέλεσμα HIMEA με τυπική σιγμοειδή καμπύλη. (β) μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων, αποτέλεσμα αρνητικό για HIT και (γ) αρνητικό αποτέλεσμα HIMEA, πλήρης απουσία συσσώρευσης (Galea, et al., 2013).

Η ευαισθησία, η ειδικότητα, τα PPV και NPV της HIMEA αξιολογήθηκαν έναντι της μεθόδου αναφοράς, της απελευθέρωση σεροτονίνης, και της PRP σε μια προοπτική μονοκεντρική μελέτη που συμπεριέλαβε 200 ασθενείς (Galea, et al., 2013). Οι ασθενείς έλαβαν θεραπεία είτε με UFH είτε με LMWH. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, το HIMEA παρουσιάζει εξαιρετική ειδικότητα (99%) και καλή PPV (89%) σε ασθενείς ύποπτους για HIT έναντι της SRA. Η PAT σε PRP ήταν λιγότερο ειδική και λιγότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με το SRA. Επιπλέον, το HIMEA έδειξε επίσης πολύ καλό, και υψηλότερο από αυτό του PAT, NPV (98% και 97%, αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώθηκαν και σε μια δεύτερη προοπτική μελέτη που αφορούσε ασθενείς νοσηλευόμενους σε μονάδα εντατικής θεραπείας. Το HIMEA έδειξε άριστα αποτελέσματα συγκρινόμενη με την μέθοδο αναφοράς (αρνητική προγνωστική αξία και ευαισθησία 98% και 92% αντίστοιχα) και ειδικότητα 100%. Ο συντελεστής κ μεταξύ HIMEA και σεροτονίνης ήταν 0.90%. (Gkalea, et al., 2019). Η αποτελεσματικότητα του HIMEA έχει επίσης μελετηθεί και από άλλες ομάδες που έχουν καταλήξει σε παρόμοια αποτελέσματα (Morel-Kopp, et al., 2010), (Minet, et al., 2013), (Minet, et al., 2014)

Σημειώνεται επίσης ότι ομάδα μελέτης της ανοσολογίας των αιμοπεταλίων της Διεθνούς Εταιρείας Θρόμβωσης και Αιμόστασης (ISTH) μετά την ανάλυση των δεδομένων όλων των ομάδων που ασχολούνται με την μελέτη του HIMEA προτείνει την εφαρμογή του στην διάγνωση της HIT (Morel-Kopp, et al., 2016).

2.4.1 Πλεονεκτήματα και περιορισμοί της μεθόδου

Η έγκαιρη διάγνωση του HIT είναι ζωτικής σημασίας και πρέπει να ληφθούν γρήγορες θεραπευτικές αποφάσεις σε περίπτωση υποψίας. Παρ' όλα αυτά, η υπερδιάγνωση εκθέτει τους ασθενείς σε εναλλακτική αντιπηκτική θεραπεία που συχνά σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο αιμορραγίας (Lo, et al., 2007) . Από την άλλη πλευρά, η καθυστέρηση στην έναρξη της εναλλακτικής θεραπείας αυξάνει τον θρομβωτικό κίνδυνο και τη θνησιμότητα (Elalamy , et al., 2009). Η εργαστηριακή επιβεβαίωση που συνίσταται ιδανικά στον συνδυασμό μιας ανοσολογικής δοκιμασίας με μια λειτουργική δοκιμασία θα βελτιώσει τη διάγνωση της HIT. Ωστόσο, ένας από τους σημαντικότερους περιορισμούς της εργαστηριακής αξιολόγησης είναι το γεγονός ότι πολύ λίγα εργαστήρια είναι πραγματικά σε θέση να πραγματοποιήσουν μια δοκιμασία ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. Ένας ακόμα περιορισμός του HIMEA είναι η επιλογή του δότη αιμοπεταλίων, η οποία ωστόσο ισχύει για όλες τις λειτουργικές δοκιμασίες ενώ θα πρέπει πάντα στην αρχή της κάθε δοκιμασίας, να χρησιμοποιείται ως control ένα δείγμα ασθενούς με επιβεβαιωμένο HIT. Να τονίσουμε ακόμα πως τα προαναλυτικά βήματα της μεθόδου απαιτούν εκτός από μεγάλη προσοχή και υψηλή δεξιότητα του χειριστή.

Στον αντίποδα, το HIMEA είναι μία αξιόπιστη και απλή λειτουργική δοκιμασία για την ανίχνευση της ενεργοποίησης αιμοπεταλίων σχετιζόμενης με την HIT. Ο χειρισμός του Multiplate (Multiplate analyzer Dynabyte, Munich, Germany) είναι εύκολος ενώ δεν χρειάζεται η διαδικασία να πραγματοποιείται σε εξειδικευμένο εργαστήριο αιμοπεταλίων με ειδικό υλικοτεχνικό εξοπλισμό. Το HIMEA είναι μια γρήγορη ημιαυτόματη μέθοδος, κατάλληλη και για έλεγχο ενός μόνο δείγματος, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από εργαστήρια ρουτίνας για γρήγορη διάγνωση του HIT.

Ο συνδυασμός μιας ανοσολογικής μεθόδου με υψηλή αρνητική προγνωστική αξία και HIMEA με πολύ καλή εξειδίκευση θα εξαλείψει ιδανικά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και θα εντοπίσει τα αντισώματα που σχετίζονται περισσότερο με το κλινικό HIT.

2.5 Σκοπός και επιμέρους στόχοι

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί και να τεθεί σε εφαρμογή η λειτουργική μέθοδος διάγνωσης της θρομβοπενίας από ηπαρίνη HIMEA (Heparin Induced Multiple Electrode Aggregometry), με το συσσωρόμετρο ολικού αίματος Multiplate (Multiplate analyzer Dynabyte, Munich, Germany) στην καθημερινή πράξη του Αιματολογικού εργαστηρίου Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα». Αυτό θα βοηθήσει σημαντικά στην πιο σωστή αντιμετώπιση των ασθενών με HIT καθώς θα συμβάλλει αποτελεσματικά στην πιο ακριβή εργαστηριακή διάγνωση του συνδρόμου. Συγκεκριμένα, η εφαρμογή του HIMEA θα ελαττώσει σημαντικά το πρόβλημα υπερδιάγνωσης της HIT που είναι επιβλαβής για τον ασθενή και δυσχεραίνει κατά πολύ τον χειρισμό των ασθενών που λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή. Λαμβάνοντας επίσης το δεδομένο ότι ελάχιστα εργαστήρια Πανελλαδικώς διενεργούν λειτουργικές δοκιμασίες HIT η δυνατότητα εφαρμογής αυτής της μεθόδου στο Αιματολογικό εργαστήριο του Γ.Ν.Α «Αλεξάνδρα» κρίνεται σημαντική καθώς μπορεί να συνεισφέρει στην σωστή διάγνωση της HIT σε ένα πιο ευρύ φάσμα.

Κεφάλαιο 3

3. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα στην συγκεκριμένη μελέτη θα παρουσιαστούν με την μορφή καμπύλης συσσώρευσης (AUC, AU*min) και ομαδοποιημένα σε τρεις ομάδες αποτελεσμάτων. α) Θετική (+) ανοσολογική μέθοδο και θετική (+) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων ΗΙΜΕΑ. β) Αρνητική (-) ανοσολογική μέθοδο και αρνητική (-) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων ΗΙΜΕΑ. γ) Θετική (+) ανοσολογική μέθοδο και αρνητική (-) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων ΗΙΜΕΑ.

Κάθε σειρά λειτουργικών δοκιμασιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους ίδιους δότες ολικού αίματος, ενώ πριν τον έλεγχο των ασθενών, η καταλληλότητα του δότη ελέγχθηκε με γνωστό θετικό (+) δείγμα ΗΙΤ.

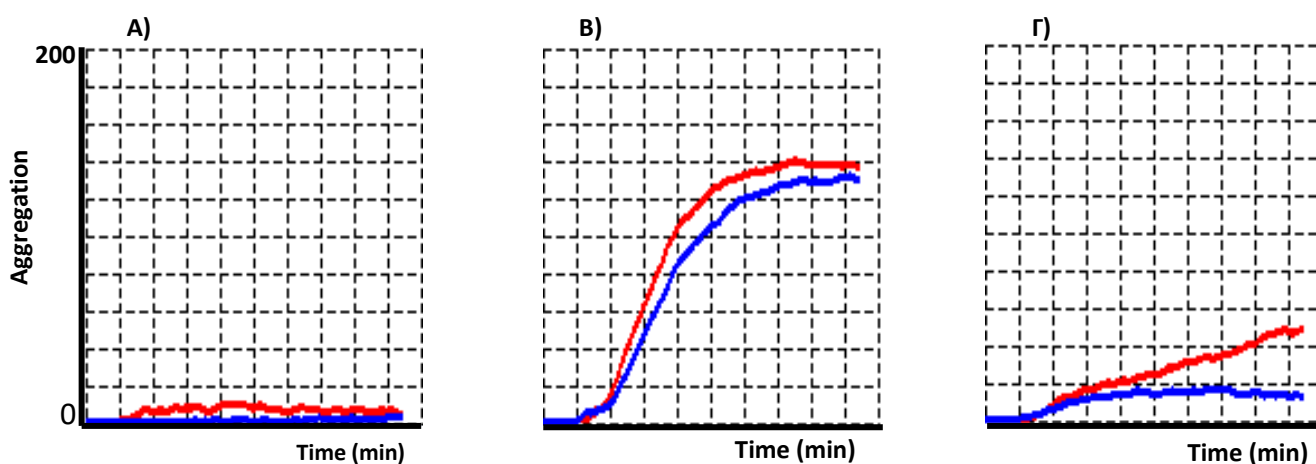
Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα τα οποία πληρούσαν όλα τα κριτήρια θετικότητας όπως έχουν περιγραφεί παραπάνω σύμφωνα με τη μελέτη (Galea, et al., 2013).

Κάποια από τα δείγματα λόγω μικρού αρχικού όγκου, αιμόλυσης και αδυναμίας επιβεβαίωσης της σωστής λήψης και συντήρησης τους δεν εξετάστηκαν.

Πρώτη ομάδα δειγμάτων (α)

Τα παρακάτω πέντε δείγματα είχαν θετική (+) ανοσολογική μέθοδο και θετική (+) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων ΗΙΜΕΑ.

Δείγμα 1.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (ΗΙΜΕΑ): **Συμβατή** με ΗΙΤ με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

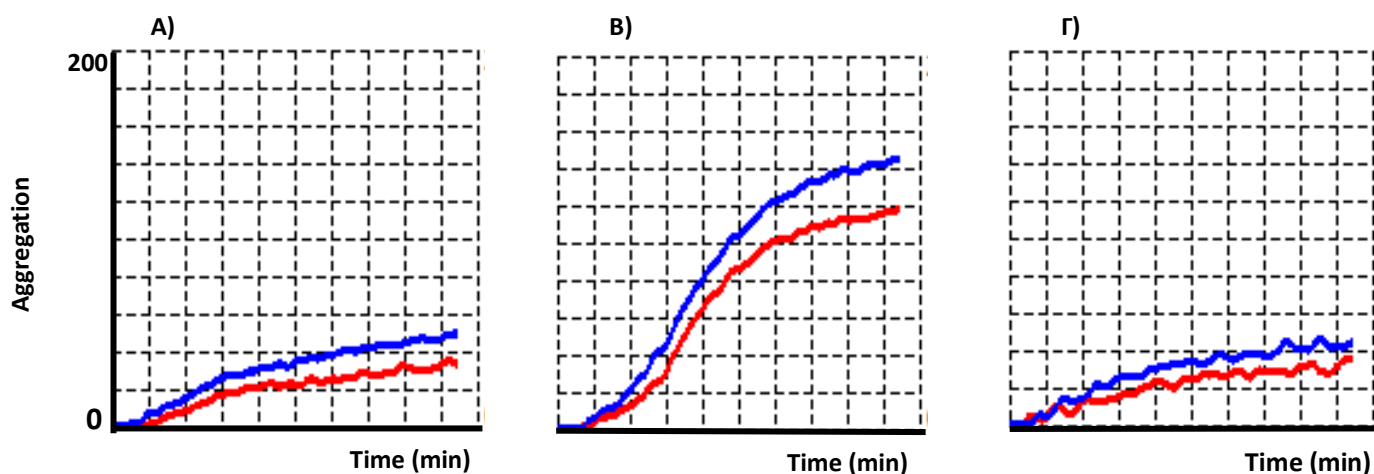
A) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος ασθενούς και φυσιολογικού ορού (0 anti-Χα IU/ml UFH): AUC = 8 U.

B) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Χα IU/ml UFH:

1. AUC = 208 U (όριο θετικότητας > 27 U).
2. Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής.
3. Η τιμή AUC παρουσία 1 αντι-Χα IU/ml UFH είναι μεγαλύτερη του 20% της τιμή AUC παρουσία φυσιολογικού ορού χωρίς την προσθήκη ηπαρίνης (AUC 0 IU/ml UFH = 8 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 208 U)

Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 100 anti-Χα IU/ml UFH: Ελάττωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 80 % (ελάττωση συμβατή με ΗΙΤ \geq 50%) σε σχέση με την συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 1 anti-Χα IU/ml UFH (AUC 100 IU/ml UFH = 42 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 208 U).

Δείγμα 2.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

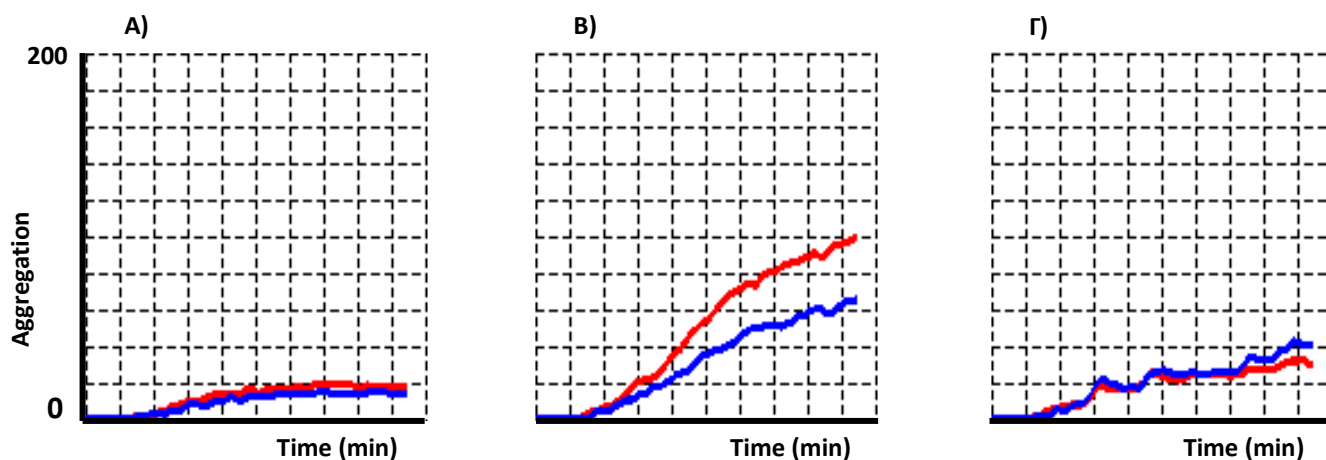
A) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος ασθενούς και φυσιολογικού ορού (0 anti-Χα IU/ml UFH): AUC = 60 U

B) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Χα IU/ml UFH:

1. AUC = 185 U (όριο θετικότητας > 27 U).
2. Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής.
3. Η τιμή AUC παρουσία 1 αντι-Χα IU/ml UFH είναι μεγαλύτερη του 20% της τιμή AUC παρουσία φυσιολογικού ορού χωρίς την προσθήκη ηπαρίνης (AUC 0 IU/ml UFH = 60 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 185 U).

Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 100 anti-Χα IU/ml UFH: AUC = 59 U. Ελάττωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 68 % (πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 50%) σε σχέση με την συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 1 anti-Χα IU/ml UFH (AUC 100 IU/ml UFH = 59 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 185 U).

Δείγμα 3.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

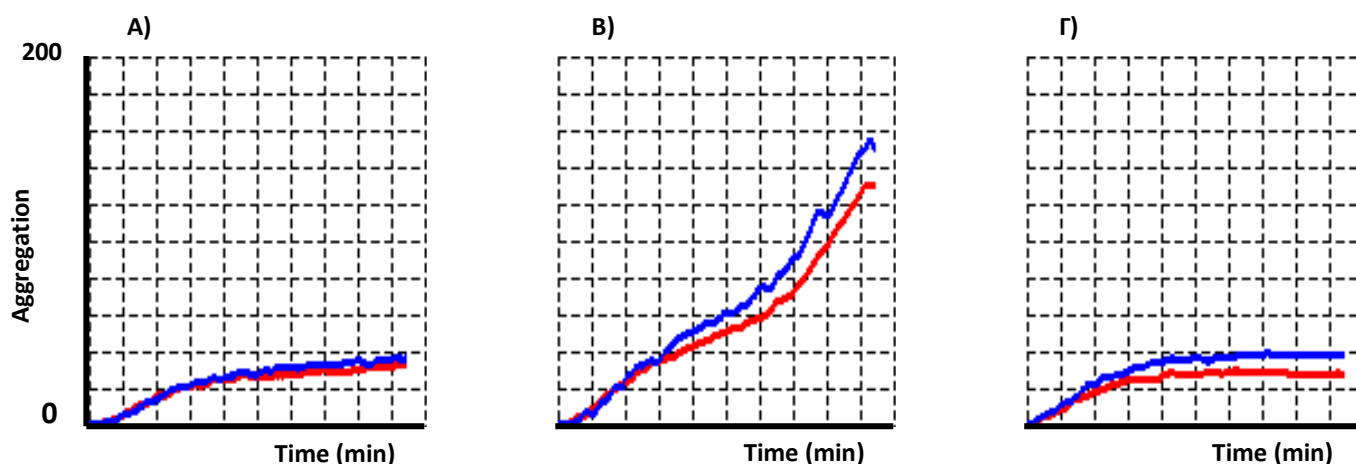
A) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος ασθενούς και φυσιολογικού ορού (0 anti-Χα IU/ml UFH): AUC = 25 U

B) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Χα IU/ml UFH:

1. AUC = 95 U (όριο θετικότητας > 27 U).
2. Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής.
3. Η τιμή AUC παρουσία 1 αντι-Χα IU/ml UFH είναι μεγαλύτερη του 20% της τιμή AUC παρουσία φυσιολογικού ορού χωρίς την προσθήκη ηπαρίνης (AUC 0 IU/ml UFH = 25 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 95 U).

Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 100 anti-Χα IU/ml UFH: AUC = 46 U. Ελάττωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 52 % (πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 50%) σε σχέση με την συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 1 anti-Χα IU/ml UFH (AUC 100 IU/ml UFH = 46 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 95 U).

Δείγμα 4.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

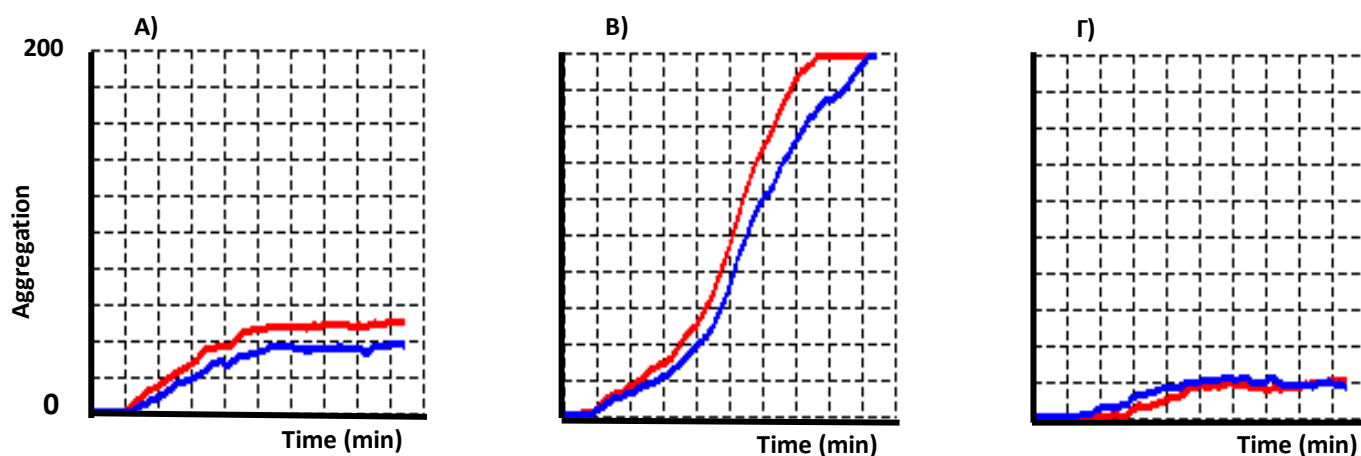
A) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος ασθενούς και φυσιολογικού ορού (0 anti-Χα IU/ml UFH): AUC = 56 U

B) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Χα IU/ml UFH:

1. AUC = 144 U (όριο θετικότητας > 27 U).
2. Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής.
3. Η τιμή AUC παρουσία 1 αντι-Χα IU/ml UFH είναι μεγαλύτερη του 20% της τιμής AUC παρουσία φυσιολογικού ορού χωρίς την προσθήκη ηπαρίνης (AUC 0 IU/ml UFH = 56 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 144 U).

Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 100 anti-Χα IU/ml UFH: AUC = 64 U. Ελάττωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 55,5 % (πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 50%) σε σχέση με την συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 1 anti-Χα IU/ml UFH (AUC 100 IU/ml UFH = 64 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 144 U).

Δείγμα 5.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

A) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος ασθενούς και φυσιολογικού ορού (0 anti-Χα IU/ml UFH): AUC = 72 U

B) Συσσώρευση αιμοπεταλίων υγιούς δότη παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Χα IU/ml UFH:

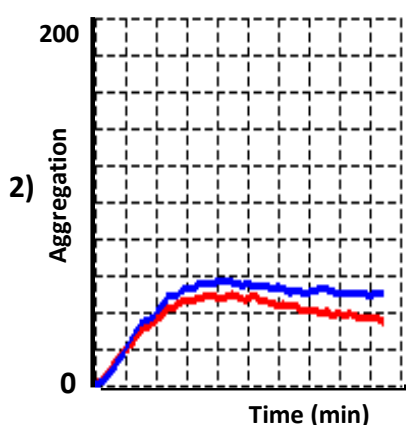
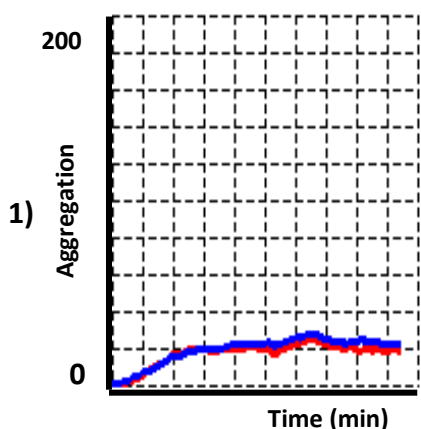
1. AUC = 225 U (όριο θετικότητας > 27 U).
2. Καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής.
3. Η τιμή AUC παρουσία 1 αντι-Χα IU/ml UFH είναι μεγαλύτερη του 20% της τιμή AUC παρουσία φυσιολογικού ορού χωρίς την προσθήκη ηπαρίνης (AUC 0 IU/ml UFH = 72 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 225 U).

Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 100 anti-Χα IU/ml UFH: AUC = 29 U. Ελάττωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων κατά 87,1 % (πρέπει να είναι μεγαλύτερη του 50%) σε σχέση με την συσσώρευση αιμοπεταλίων παρουσία 1 anti-Χα IU/ml UFH (AUC 100 IU/ml UFH = 29 U vs AUC 1 IU/ml UFH = 225 U).

Δεύτερη ομάδα δειγμάτων (β)

Τα παρακάτω πέντε δείγματα είχαν αρνητική (-) ανοσολογική μέθοδο και αρνητική (-) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων HIMEA

Δείγμα 6.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

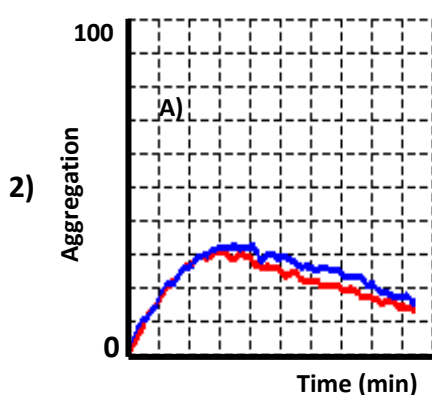
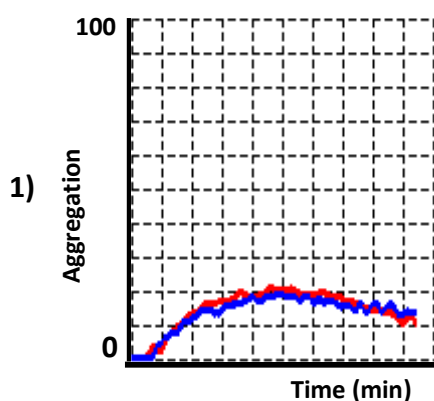
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων με δυο διαφορετικούς υγιείς δότες (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 43 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 102 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 7.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

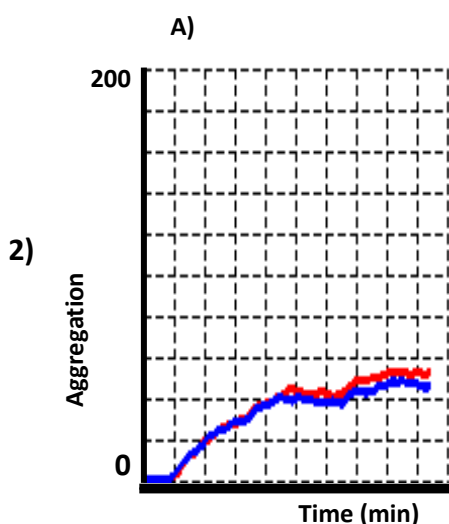
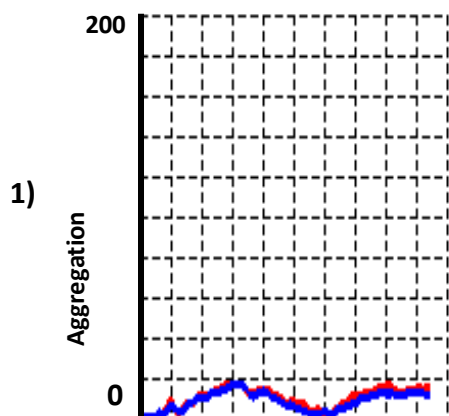
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 34 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 54 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 8.



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

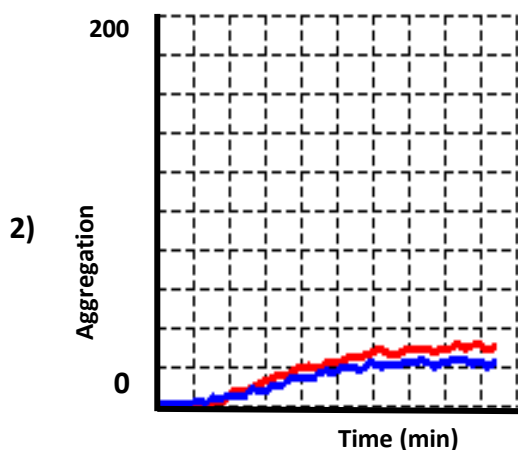
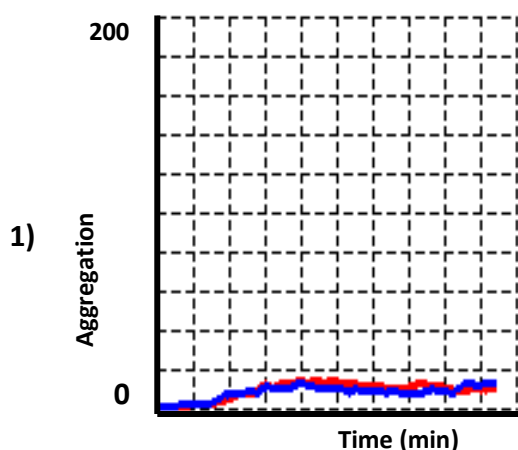
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγείων δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 22 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 80 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 9



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

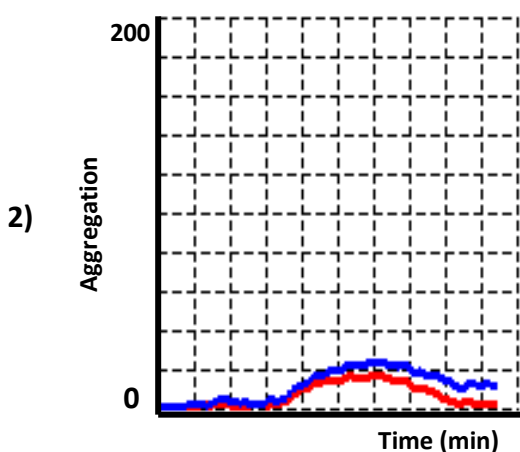
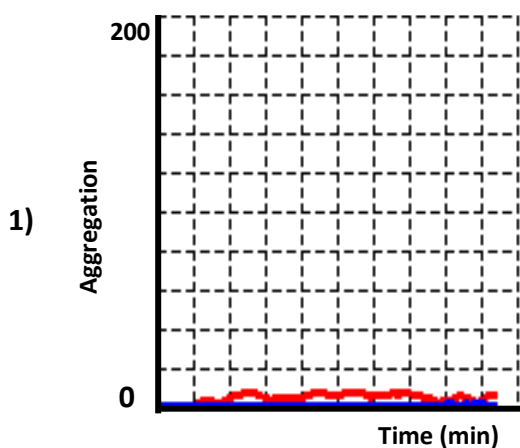
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 20 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 38 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 10



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

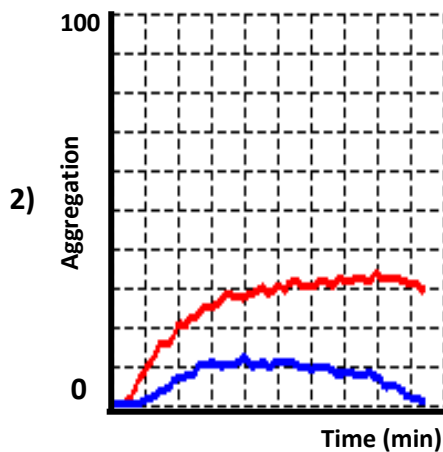
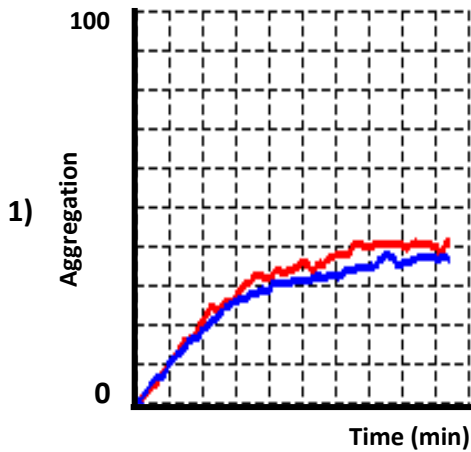
Σχήμα 1) AUC = 6 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC < του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 21 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC < του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Τρίτη ομάδα δειγμάτων (γ)

Τα παρακάτω πέντε δείγματα είχαν θετική (+) ανοσολογική μέθοδο και αρνητική (-) λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων HIMEA.

Δείγμα 11



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

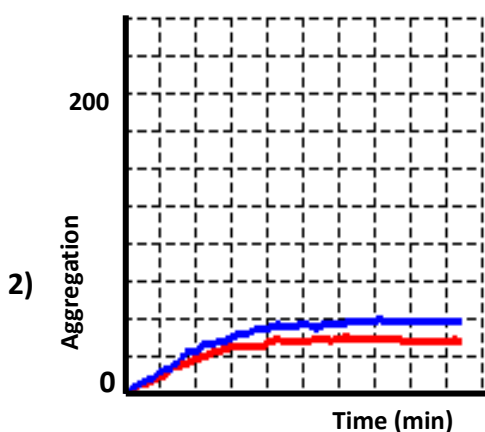
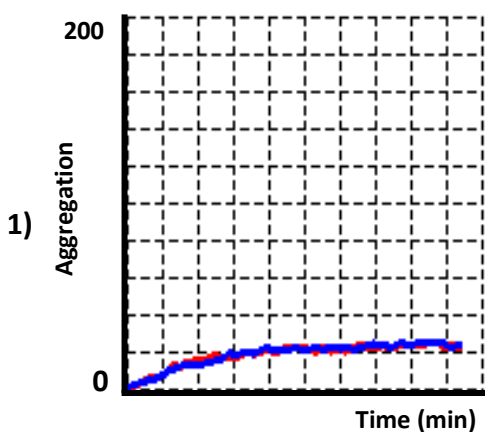
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 69 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 39 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 12



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

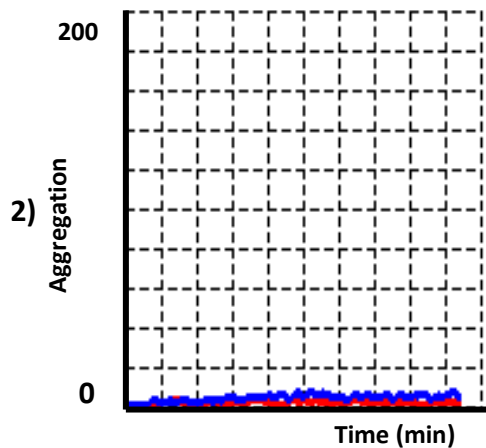
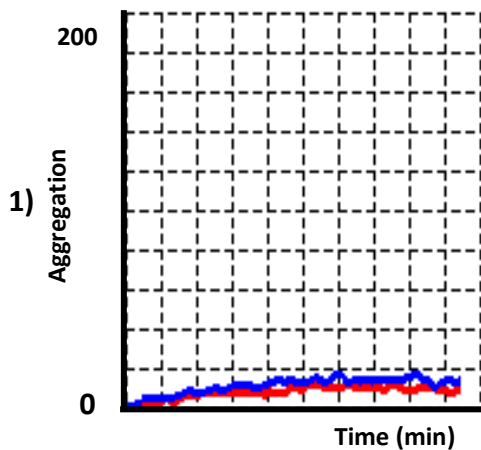
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 44 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 64 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 13



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

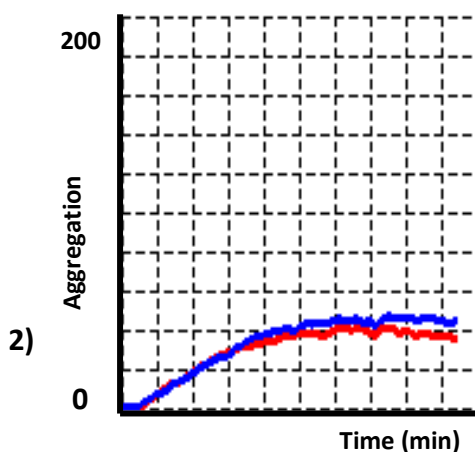
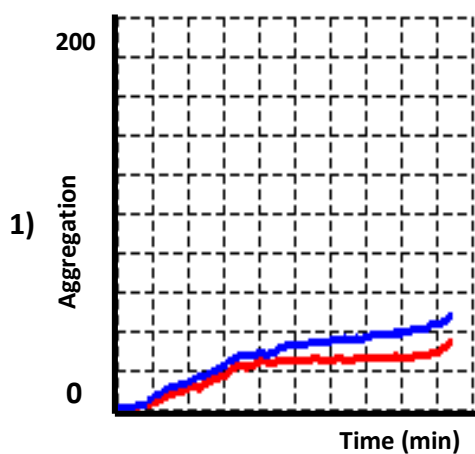
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 22 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 6 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 14



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

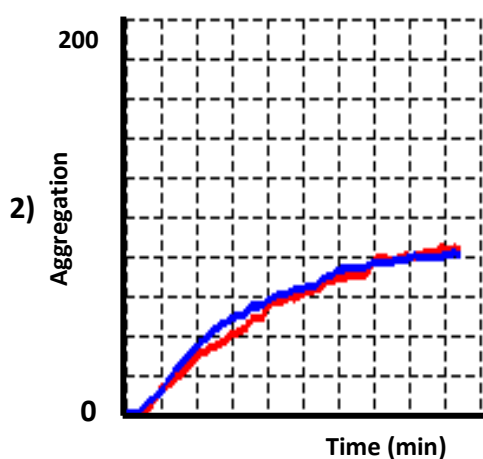
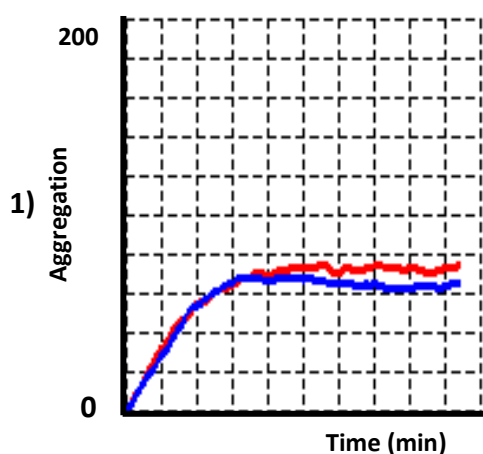
Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 56 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 76 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Δείγμα 15



Λειτουργική δοκιμασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων με τη μέθοδο ολικού αίματος (HIMEA): **Μη συμβατή** με HIT με βάση τα καθορισμένα κριτήρια θετικότητας (Galea, et al., 2013).

Συγκεκριμένα:

Συσσώρευση αιμοπεταλίων δυο διαφορετικών υγρών δοτών (1 και 2) παρουσία πλάσματος του ασθενούς και 1 anti-Xa IU/ml UFH:

Σχήμα 1) AUC = 145 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Σχήμα 2) AUC = 132 U (όριο θετικότητας > 27 U). AUC > του ορίου θετικότητας αλλά δεν παρατηρείται καμπύλη συσσώρευσης αιμοπεταλίων σιγμοειδούς μορφής. Μη ειδική συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση – Συμπεράσματα

Η θρομβοπενία από ηπαρίνη HIT (Heparin-induced thrombocytopenia) αποτελεί μία σοβαρή και απειλητική για την ζωή επιπλοκή της θεραπείας με ηπαρίνη. Πρόκειται για μία κλινικοεργαστηριακή οντότητα ανοσολογικής αρχής, που οφείλεται στην παραγωγή αντισωμάτων έναντι του συμπλόκου ηπαρίνης και αιμοπεταλιακού παράγοντα 4 (PF4). Τα αντισώματα ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, το ενδοθήλιο και τα μονοκύτταρα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης και την θρομβοπενία από κατανάλωση. Η HIT σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο φλεβικών και αρτηριακών θρομβώσεων και υψηλή θνητότητα, ιδίως αν καθυστερήσει η διάγνωση και η αντιμετώπιση της. Η θεραπεία της συνίσταται στην άμεση διακοπή της ηπαρίνης και στην χορήγηση εναλλακτικής αντιπηκτικής αγωγής.

Η συνολική συχνότητα HIT σε ενήλικες που έλαβαν μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη UFH (Unfractionated Heparin) κυμαίνεται από 0,3 έως 5,0%, αν και η εκτίμηση της συχνότητας της νόσου είναι δυσχερής λόγω της δυσκολίας αναγνώρισης και διάγνωσης της νόσου (Krauel, et al., 2011). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης HIT εμπίπτουν στις εξής κατηγορίες: σε εκείνους που σχετίζονται με την χορήγηση της ηπαρίνης και σε εκείνους που σχετίζονται με τον ασθενή.

Το σήμα κατατεθέν του HIT είναι η πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων που ξεκινά μεταξύ των ημερών 5 έως 10 ημέρες μετά την έναρξη της ηπαρίνης (η πρώτη ημέρα χρήσης ηπαρίνης θεωρείται η ημέρα 0) (Warkentin & Kelton, 2001). Η θρομβοπενία εκδηλώνεται σ' αυτό το τυπικό χρονικό διάστημα σε περίπου 70% των ασθενών με HIT. Η HIT μπορεί να παρουσιαστεί πρώιμα πριν τις 5 ημέρες όταν ένας ασθενής έχει ιστορικό πρόσφατης ηπαρινοθεραπείας (εντός των τελευταίων 100 ημερών). Σ' αυτήν την περίπτωση HIT πρώιμης έναρξης, η επανέναρξη της θεραπείας με ηπαρίνη οδηγεί σε απότομη πτώση του αριθμού των αιμοπεταλίων σχετιζόμενη με προϋπάρχοντα κυκλοφορούντα αντισώματα αντι-PF4/ηπαρίνης και όχι με ταχεία παραγωγή αντισωμάτων στα πλαίσια μιας αναμνηστικής (ανοσολογικής απόκρισης) απάντησης (Warkentin, 2011).

Η διάγνωση του HIT σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ηπαρινοθεραπεία σπανίως είναι μια εύκολη υπόθεση. Η κλινική διάγνωση του HIT βασίζεται στην ύπαρξη

θρομβοπενίας ή και θρόμβωσης σε σχέση με την χρονική στιγμή έναρξης της θεραπείας με ηπαρίνη και τον αποκλεισμό άλλων αιτιών θρομβοπενίας. Για να αξιολογηθούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα βασικά διαγνωστικά χαρακτηριστικά της HIT έχουν αναπτυχθεί σκορ εκτίμησης του κινδύνου HIT. Ο συνδυασμός όμως των κλινικών χαρακτηριστικών και της εργαστηριακής διάγνωσης είναι αυτός που τελικά θα επιβεβαιώσει την διάγνωση της HIT.

Το σκορ 4Ts (Thrombocytopenia, Timing of platelet count fall, Thrombosis or other sequelae, other causes for thrombocytopenia present), που αναπτύχθηκε από τον Warkentin είναι το απλούστερο και το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σκορ αξιολόγησης κινδύνου για την HIT (Linkins, et al., 2015).

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες εργαστηριακών δοκιμασιών για την HIT: ανοσολογικές δοκιμασίες που ανιχνεύουν τα αντισώματα PF4/ηπαρίνης, και λειτουργικές δοκιμασίες που ελέγχουν την επαγόμενη από την ηπαρίνη ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Lau, et al., 2017). Οι ανοσοπροσδιορισμοί ανιχνεύουν αντισώματα έναντι συμπλόκου PF4/ηπαρίνης τα οποία περιλαμβάνουν παθογόνα αλλά και μη παθογόνα αντισώματα HIT. Μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: ποιοτικές και ποσοτικές δοκιμασίες, με τους ποιοτικούς προσδιορισμούς να σχετίζονται με χαμηλότερη ειδικότητα (Favaloro, 2018).

Στις λειτουργικές δοκιμασίες, τα αιμοπετάλια του δότη επωάζονται με τον ορό ή το πλάσμα του ασθενούς και ηπαρίνη. Εάν τα αντισώματα HIT είναι παρόντα σε σωστή στοιχειομετρική αναλογία ηπαρίνης και PF4 αυτό θα οδηγήσει στον σχηματισμό ενός συμπλέγματος ηπαρίνης-αντισώματος-PF4 που θα δεσμευτεί στους υποδοχείς FcγRIIIa των αιμοπεταλίων του δότη και θα προκαλέσει την ενεργοποίησή τους.

Στην παρούσα έρευνα επιλέχθηκε να αξιολογηθεί η λειτουργική μέθοδος διάγνωσης της θρομβοπενίας από ηπαρίνη HIMEA και η εφαρμογή της στην καθημερινή πράξη στο αιματολογικό εργαστήριο διότι είναι μια γρήγορη ημιαυτόματη και αξιόπιστη μέθοδος, δεν χρειάζεται να πραγματοποιείται σε εξειδικευμένο εργαστήριο αιμοπεταλίων με ειδικό υλικοτεχνικό εξοπλισμό, είναι κατάλληλη και για έλεγχο ενός μόνο δείγματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από εργαστήρια ρουτίνας για γρήγορη διάγνωση του HIT.

Η επιλογή των δειγμάτων και γενικότερα το προαναλυτικό στάδιο της μεθόδου έγινε με ιδιαίτερη σχολαστικότητα. Απορρίφθηκαν τα ακατάλληλα δείγματα μιας και η σωστή

συντήρηση τους, τυχόν αιμόλυση, καθώς και η επαρκής ποσότητα δείγματος είναι βασικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τα αποτελέσματα της μεθόδου.

Κάθε σειρά λειτουργικών δοκιμασιών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους ίδιους δότες ολικού αίματος οι οποίοι ήταν συνάδελφοι του εργαστήριου με υψηλή απαντητικότητα ώστε να ξεπεραστεί η δυσκολία της επιλογής του κατάλληλου δότη. Εναλλακτικά συστήνεται στα εργαστήρια να χρησιμοποιούν ως δότες τους δότες αιμοπεταλίων από τα τμήματα των αιμοδοσιών, υστέρα από την συγκατάθεση τους.

Ένα ακόμα ζήτημα που ξεπεράστηκε ήταν η αναγκαιότητα συστηματικού ελέγχου της καταλληλότητας του δότη με επιβεβαιωμένο HIT πριν τον έλεγχο των ασθενών. Για τον λόγο αυτό ελέγχθηκε ο δότης αιμοπεταλίων με ένα δείγμα ασθενούς με επιβεβαιωμένο HIT. Συγκεκριμένα από τα δείγματα που βρέθηκαν HIMEA θετικά, επιλέχθηκαν για έλεγχο των δотών εκείνα που είχαν το μεγαλύτερο όγκο ως δείγμα ελέγχου για την επόμενη σειρά λειτουργικών δοκιμασιών. Αυτό επαναλήφθηκε κάθε φορά που εντοπίζονταν κάποιο δείγμα HIMEA θετικό. Εναλλακτικά συστήνεται στα εργαστήρια που επιθυμούν να εφαρμόσουν μια λειτουργική δοκιμασία για την διάγνωση της HIT να δημιουργήσουν μια τράπεζας δειγμάτων με επιβεβαιωμένο HIT. Εφόσον συντηρηθούν στις σωστές συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα ελέγχου στις επόμενες σειρές λειτουργικών δοκιμασιών. Ακόμα, πρόσφατα έγινε διαθέσιμο προς χρήση ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που μιμείται τα αντισώματα της HIT (5B9 Monoclonal Antibody) και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί (Vayne, et al., 2020).

Τέλος, τα κριτήρια θετικότητας που εφαρμόστηκαν είναι σύμφωνα με την μελέτη Galea, et al, 2013 (Galea, et al., 2013) .Ιδανικά συστήνεται στο κάθε εργαστήριο να ορίσει το καθένα το δικό του όριο θετικότητας που θα υπολογιστεί από τον έλεγχο 15 ή και περισσότερων υγιών δотών που δεν είχαν πρόσφατη επαφή με ηπαρίνη (μέση τιμή AUC συν τρεις φορές την σταθερή απόκλιση).

Συμπέρασμα

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι παρά το γεγονός ότι το ΗΙΜΕΑ, όπως και όλες οι λειτουργικές δοκιμασίες παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς, μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα αιματολογικό εργαστήριο ρουτίνας διότι είναι μια μέθοδος, που συμβάλει σημαντικά και ουσιαστικά στη σωστή διάγνωση της ΗΙΤ. Ο συνδυασμός μιας ανοσολογικής μεθόδου με υψηλή αρνητική προγνωστική αξία και ΗΙΜΕΑ με πολύ καλή ειδικότητα θα ελαττώσει την υπερδιάγνωση και θα εντοπίσει τα αντισώματα που σχετίζονται περισσότερο με το κλινικό ΗΙΤ. Τέλος, η ΗΙΜΕΑ μπορεί να συμβάλει στην διάγνωση της αυτοάνοσης ΗΙΤ και συγκεκριμένα του πρόσφατα διαγνωσμένου συνδρόμου VITT (Vaccine-Induced Immune Thrombotic Thrombocytopenia).

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

- Krauel, K. και συν., 2011. Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 27 January, 117(4), pp. 1370-8.
- Krauel, K. και συν., 2011. Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 27 January, 117(4), pp. 1370-8.
- Lindhoff-Last, E. και συν., 2002. Incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients with deep vein thrombosis treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *British journal of haematology*, September, 118(4), pp. 1137-42.
- Morel-Kopp, M.-C. και συν., 2010. Whole blood impedance aggregometry detects heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Thrombosis research*, May, 125(5), pp. e234-9.
- Stein, P. D., Hull, R. D., Yaekoub, A. Y. & Liang, J., 2009. Incidence of thrombocytopenia in hospitalized patients with venous thromboembolism. *The American journal of medicine*, October, 122(10), pp. 919-30.
- Zucker, M. B. & Katz, I. R., 1991. Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, November, 198(2), pp. 693-702.
- Amiral, J. και συν., 1992. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis*, 6 July, 68(1), pp. 95-6.
- Amiral, J. και συν., 1996. Generation of antibodies to heparin-PF4 complexes without thrombocytopenia in patients treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *American journal of hematology*, June, 52(2), pp. 90-5.
- Anon., 1958. Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *American Medical Association archives of surgery*, 76(2), pp. 219-25.
- Ansell, J. και συν., 1980. Heparin induced thrombocytopenia: a prospective study. *Thrombosis and haemostasis*, 29 February, 43(1), pp. 61-5.
- Arepally, G. M., 2017. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 129(21), p. 2864–2872.
- Bakchoul, T. & Greinacher, A., 2012. Recent advances in the diagnosis and treatment of heparin-induced thrombocytopenia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 3(4), pp. 237-251.
- Bartholomew, J. R., 2005. The incidence and clinical features of heparin-induced thrombocytopenia. *Seminars in hematology*, July, 42(3 Suppl 3), pp. S3-8.

- Blank, M. και συν., 2002. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia provoke direct activation of microvascular endothelial cells. *International immunology*, February, 14(2), pp. 121-9.
- Bock, P. E. και συν., 1980. The multiple complexes formed by the interaction of platelet factor 4 with heparin. *The Biochemical journal*, 1 December, 191(3), pp. 769-76.
- Borissoff, J. I. και συν., 2013. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, August, 33(8), pp. 2032-2040.
- Burgess, J. K., Lindeman, R., Chesterman, C. N. & Chong, B. H., 1995. Single amino acid mutation of Fc gamma receptor is associated with the development of heparin-induced thrombocytopenia. *British journal of haematology*, November, 91(3), pp. 761-6.
- Carestia, A., Kaufman, T. & Schattner, M., 2016. Platelets: New Bricks in the Building of Neutrophil Extracellular Traps. *Frontiers in immunology*, July, 6(7), p. 271.
- Carlsson, L. E. και συν., 2003. Platelet receptor and clotting factor polymorphisms as genetic risk factors for thromboembolic complications in heparin-induced thrombocytopenia. *Pharmacogenetics*, May, 13(5), pp. 253-8.
- Chong, B. H. & Isaacs, A., 2009. Heparin-induced thrombocytopenia: what clinicians need to know. *Thrombosis and haemostasis*, February, 101(2), pp. 279-83.
- Copley, A. & Robb, T., 1942. Studies on platelets: III. The effect of heparin in vivo on the platelet count in mice and dogs. *American journal of clinical pathology*, 12(11), pp. 563-570.
- Crowther, M. A. και συν., 2005. Thrombocytopenia in medical-surgical critically ill patients: prevalence, incidence, and risk factors. *Journal of critical care*, December, 20(4), pp. 348-53.
- Crowther, M. και συν., 2014. Heparin-induced thrombocytopenia in the critically ill: interpreting the 4Ts test in a randomized trial. *Journal of critical care*, June, 29(3), pp. 470.e7-15.
- Cuker, A., 2011. Heparin-induced thrombocytopenia: present and future. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, April, 31(3), pp. 353-66.
- Cuker, A. και συν., 2018. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. *Blood advances*, 27 November, 27(2), pp. 3360-3392.
- Cuker, A. et al., 2018. American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Advances*, 2(22), p. 3360–3392.
- Cuker, A. & Cines, D. B., 2012. How I treat heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 8 March, 119(10), pp. 2209-18.

- Cuker, A., Gimotty, P. A., Crowther, M. A. & Warkentin, T. E., 2012. Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood*, 120(20), p. 4160–4167.
- Cuker, A. και συν., 2013. Novel diagnostic assays for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 2 May, 121(18), pp. 3727-32.
- Cuker, A. και συν., 2010. The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. *Journal of thrombosis and haemostasis*, December, 8(12), pp. 2642-50.
- Elalamy, I. και συν., 2009. Risk factors for unfavorable clinical outcome in patients with documented heparin-induced thrombocytopenia. *thrombosis research*, November, 124(5), pp. 554-9.
- Favaloro, E. J., 2018. Laboratory tests for identification or exclusion of heparin induced thrombocytopenia: HIT or miss?. *American journal of hematology*, February, 93(2), pp. 308-314.
- Favaloro, E. J., McCaughan, G. & Pasalic, L., 2017. Clinical and laboratory diagnosis of heparin induced thrombocytopenia: an update. *Pathology*, June, 49(4), pp. 346-355.
- Francis, J. L., Palmer, G. J. 3., Moroosse, R. & Drexler, A., 2003. Comparison of bovine and porcine heparin in heparin antibody formation after cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery*, January, 75(1), pp. 17-22.
- Fratantoni, J. C., Pollet, R. & Gralnick, H. R., 1975. Heparin-induced thrombocytopenia: confirmation of diagnosis with in vitro methods. *Blood*, March, 45(3), pp. 395-401.
- Fuchs, T. A. και συν., 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 7 September, 107(36), pp. 15880-5.
- Galea, V. 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(6), pp. 441-447.
- Gkalea, V. και συν., 2019. Prospective Evaluation of a Rapid Functional Assay for Heparin-Induced Thrombocytopenia Diagnosis in Critically Ill Patients. *Critical care medicine*, March, 47(3), pp. 353-359.
- Gkalea, V. και συν., 2019. Prospective Evaluation of a Rapid Functional Assay for Heparin-Induced Thrombocytopenia Diagnosis in Critically Ill Patients*. *Critical Care Medicine*, 47(3), pp. 353-359.
- Gollomp, K. και συν., 2018. Neutrophil accumulation and NET release contribute to thrombosis in HIT. *Journal of clinical investigation insight*, 20 September, 3(18), p. e99445.

- Gould, T. J. και συν., 2014. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, September, 34(9), pp. 1977-84.
- Gowthami, A. M., 2017. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 25 May, 129(21), pp. 2864-2872.
- Greinacher, A., 2015. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *The New England journal of medicine*, 5 November, 373(19), pp. 1883-4.
- Greinacher, A. και συν., 2000. Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aPTT range. *Blood*, August, 96(3), pp. 846-51.
- Greinacher, A. και συν., 2005. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thrombosis and haemostasis*, July, 94(1), pp. 132-5.
- Greinacher, A. και συν., 2011. Association of natural anti-platelet factor 4/heparin antibodies with periodontal disease. *Blood*, 4 August, 118(5), pp. 1395-401.
- Greinacher, A. και συν., 2010. Heparin-induced thrombocytopenia: towards standardization of platelet factor 4/heparin antigen tests. *Journal of thrombosis and haemostasis*, September, 8(9), pp. 2025-31.
- Greinacher, A. και συν., 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*, May, 34(5), pp. 381-5.
- Greinacher, A. και συν., 1999. Lepirudin (recombinant hirudin) for parenteral anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Heparin-Associated Thrombocytopenia Study (HAT) investigators. *Circulation*, 10 August, 100(6), pp. 587-93.
- Gruel, Y. και συν., 2004. The homozygous FcγRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes. *Blood*, 1 November, 104(9), pp. 2791-3.
- Harris, K., Nguyen, . P. & Van Cott, E. M., 2008. Platelet PIA2 Polymorphism and the risk for thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *American journal of clinical pathology*, February, 129(2), pp. 282-6.
- Hemker, H. C. και συν., 2002. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, Sep-Dec, 32(5-6), pp. 249-53.
- Hogan, M. & Berger, . e. S., 2020. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): Review of incidence, diagnosis, and management. *Vascular medicine*, April, 25(2), pp. 160-173.

- Hong, A. P., Cook, D. J., Sigouin, . C. S. & Warkentin, T. E., 2003. Central venous catheters and upper-extremity deep-vein thrombosis complicating immune heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 15 April, 101(8), pp. 3049-51.
- Hutchison, C. A. & Dasgupta, . I., 2007. National survey of heparin-induced thrombocytopenia in the haemodialysis population of the UK population. *Nephrol Dial Transplant*, June, 22(6), pp. 1680-4.
- Iluonakhamhe, E., Ibekwe, O., Samuel, S. & Zakaria, A., 2015. Plasmapheresis may be an option in urgent management of heparin-induced thrombocytopenia in the setting of acute intracerebral hemorrhage. *Neurocritical care*, February, 22(11), pp. 140-5.
- Joseph, J. και συν., 2019. Diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia: a consensus statement from the Thrombosis and Haemostasis Society of Australia and New Zealand HIT Writing Group. *The Medical journal of Australia*, June, 210(11), pp. 509-516.
- Karnes , J. H., 2018. Pharmacogenetics to prevent heparin-induced thrombocytopenia: what do we know?. *Pharmacogenomics*, December, 19(18), pp. 1413-1422.
- Kelton, . J. G. & Warkentin, T. E., 2008. Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective. *Blood*, 1 October, 112(7), pp. 2607-16.
- Kerényi, A. και συν., 2016. Evaluation of flow cytometric HIT assays in relation to an IgG-Specific immunoassay and clinical outcome. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, September, 92(5), pp. 389-397.
- Khandelwal, S. και συν., 2016. The antigenic complex in HIT binds to B cells via complement and complement receptor 2 (CD21). *Blood*, 6 October, 128(14), pp. 1789-1799.
- Konkle, B. A. και συν., 2001. Heparin-induced thrombocytopenia: bovine versus porcine heparin in cardiopulmonary bypass surgery. *The Annals of thoracic surgery*, June, 71(6), pp. 1920-4.
- Kreimann, M. και συν., 2014. Binding of anti-platelet factor 4/heparin antibodies depends on the thermodynamics of conformational changes in platelet factor 4. *Blood*, 9 October, 124(15), pp. 2442-9.
- Lau, K. K. E., Mohammed, S., Pasalic, L. & Favaloro, E. J., 2017. Laboratory Testing Protocols for Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT) Testing. *Methods in molecular biology*, Τόμος 1646, pp. 227-243.
- Lee , G. M. & Arepally , G. M., 2013. Heparin-induced thrombocytopenia. *Hematology American Society of Hematology. Education Program*, 2013(1), p. 668–674.
- Legnani , C. και συν., 2010. Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis*, August, 104(2), pp. 402-9.

- Lewis, B. E. και συν., 2003. Argatroban anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Archives of internal medicine*, 11-25 August, 163(15), pp. 1849-56.
- Lim, W. και συν., 2015. Failure of anticoagulant thromboprophylaxis: risk factors in medical-surgical critically ill patients*. *Critical care medicine*, February, 43(2), pp. 401-10.
- Linkins , L.-A.και συν., 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*, February, 141(2-Suppl), pp. e495S-e530S.
- Linkins, L.-A.και συν., 2015. Combination of 4Ts score and PF4/H-PaGIA for diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia: prospective cohort study. *Blood*, 30 July, 126(5), pp. 597-603.
- Linkins, L.-A.και συν., 2015. 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*, February, 141(2 Suppl), pp. e495S-e530S.
- Linkins, L.-A., Hu, G. & Warkentin, T. E., 2018. Systematic review of fondaparinux for heparin-induced thrombocytopenia: When there are no randomized controlled trials. *Research and practice in thrombosis and haemostasis*, 9 August, 2(4), pp. 678-683.
- Li, Z. Q. και συν., 2002. Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood*, 15 February, 99(4), pp. 1230-6.
- Lo, G. K., Sigouin, C. S. & Warkentin, T. E., 2007. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia?. *American journal of hematology*, December, 82(12), pp. 1037-43.
- Louët, A. L.-L.και συν., 2004. Diagnostic score for heparin-induced thrombocytopenia after cardiopulmonary bypass. *Journal of thrombosis and haemostasis*, November, 2(11), pp. 1882-8.
- Lubenow, N. και συν., 2010. The severity of trauma determines the immune response to PF4/heparin and the frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 4 March, 115(9), pp. 1797-803.
- Maličev, E., Kozak, M. & Rožman, P., 2016. Evaluation of a flow cytometric assay for the confirmation of heparin-induced thrombocytopenia. *International journal of laboratory hematology*, June, 38(3), pp. 240-5.
- Martel, N., Lee, J. & Wells, P. S., 2005. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood*, 28 June, 106(8), pp. 2710-5.

- Mattioli, A. V. και συν., 2009. Heparin/PF4 antibodies formation after heparin treatment: temporal aspects and long-term follow-up. *American heart journal*, March, 157(3), pp. 589-95.
- Messmore, H. L. και συν., 2011. Simple scoring system for early management of heparin-induced thrombocytopenia. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, April, 17(2), pp. 197-201.
- Michelson, A., 2011. Platelets, 2nd ed. *Elsevier Academic Press*, pp. 861-886.
- Minet, V., Bailly, N., Dogné, J.-M. & Mullier, F., 2015. Platelet microparticle generation assay for heparin-induced thrombocytopenia diagnosis: How should we express the results?. *Thrombosis research*, July, 236(1), pp. 175-7.
- Minet, V. και συν., 2013. Assessment of the performances of AcuStar HIT and the combination with heparin-induced multiple electrode aggregometry: a retrospective study. *Thrombosis research*, September, 132(3), pp. 352-9.
- Minet, V. και συν., 2014. Rapid exclusion of the diagnosis of immune HIT by AcuStar HIT and heparin-induced multiple electrode aggregometry. *Thrombosis research*, June, 133(6), pp. 1074-8.
- Mine, V., Dogné, J.-M. & Mullier, F., 2017. Functional Assays in the Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Review. *Molecules : a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry*, 11 April, 22(4), p. 617.
- Morel-Kopp, M. et al., 2016. Heparin-induced multi-electrode aggregometry method for heparin-induced thrombocytopenia testing: communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 14(12), pp. 2548-2552.
- Nader, N. D. και συν., 1999. Blood product use in cardiac revascularization: comparison of on- and off-pump techniques. *The Annals of thoracic surgery*, November, 68(5), pp. 1640-3.
- Nand, S. και συν., 1997. Heparin-induced thrombocytopenia with thrombosis: incidence, analysis of risk factors, and clinical outcomes in 108 consecutive patients treated at a single institution. *American journal of hematology*, September, 56(1), pp. 12-6.
- Natelson, E. A., Lynch, E. C., Alfrey Jr, C. P. & Gross, J. B., 1969. Heparin-induced thrombocytopenia. An unexpected response to treatment of consumption coagulopathy. *Annals of internal medicine*, 71(6), pp. 1121-5.
- Newall, F., Barnes, C., Ignjatovic, V. & Monagle, P., 2003. Heparin-induced thrombocytopenia in children. *Journal of paediatrics and child health*, May-June, 39(4), pp. 289-92.
- Park, B. D. και συν., 2018. Intravenous immunoglobulin as an adjunct therapy in persisting heparin-induced thrombocytopenia. *Transfusion and apheresis science : official journal of*

the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis., August, 57(4), pp. 561-565.

Pendomo, J. και συν., 2019. Neutrophil activation and NETosis are the major drivers of thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. *Nature Communication*, 21 March, 10(1), p. 1322.

Pishko, A. M. και συν., 2019. The risk of major bleeding in patients with suspected heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of thrombosis and haemostasis*, November, 17(11), pp. 1956-1965.

Pouplard, C. και συν., 2001. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 15 May, 97(10), pp. 3300-2.

Rauova, L. και συν., 2005. Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 1 January, 105(131), p. 1.

Rauova, L. και συν., 2006. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood*, 15 March, 107(6), pp. 2346-53.

Rhodes, G. R., Dixon, R. H. & Silver, D., 1973. Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. *Surgery, gynecology and obstetrics*, March, 136(3), pp. 406-16.

Rice, L., Attisha, W. K., Drexler, . A. & Francis, J. L., 2002. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia. *Annals of internal medicine*, 5 February, 136(3), pp. 210-5.

Roberts, B., Rosato, F. E. & Rosato, E. F., 1964. Heparin—a cause of arterial emboli?. *Surgery*, June, Τόμος 55, pp. 803-8.

Rosato, F. E., Roberts, B. & Kinsley, R. F., 1967. Thromboelastographic evaluation of the method of heparin administration. *American journal of surgery*, June, 113(6), pp. 750-3.

Rother, N. και συν., 2017. Acetylated Histones in Apoptotic Microparticles Drive the Formation of Neutrophil Extracellular Traps in Active Lupus Nephritis. *Frontiers in immunology*, September, 14(8), p. 1136.

Schmugge, M. S. και συν., 2002. Heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis in pediatric intensive care patients. *Pediatrics*, January, 109(1), p. E10.

Selleng, S. και συν., 2010. Early-onset and persisting thrombocytopenia in post-cardiac surgery patients is rarely due to heparin-induced thrombocytopenia, even when antibody tests are positive. *Journal of thrombosis and haemostasis*, January, 8(1), pp. 30-6.

Shatzel , J. J., Crapster-Pregont, M. & Deloughery, T. G., 2016. Non-vitamin K antagonist oral anticoagulants for heparin-induced thrombocytopenia. A systematic review of 54 reported cases. *Thrombosis and haemostasis*, 1 August, 116(2), pp. 397-400.

- Sheridan, D., Carter, C. & Kelton, J. G., 1986. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, January, 67(1), pp. 27-30.
- Smythe, M. A., Koerber, J. M. & Mattson, J. C., 2007. The incidence of recognized heparin-induced thrombocytopenia in a large, tertiary care teaching hospital. *Chest*, June, 131(6), pp. 1644-9.
- Srinivasan, A. F. και συν., 2004. Warfarin-induced skin necrosis and venous limb gangrene in the setting of heparin-induced thrombocytopenia. *Archives of internal medicine*, 12 January, 164(1), pp. 66-70.
- Srinivasan, A. F. και συν., 2004. Warfarin-induced skin necrosis and venous limb gangrene in the setting of heparin-induced thrombocytopenia. *Archives of internal medicine*, 12 January, 164(1), pp. 66-70.
- Stewart, M. W., Etches, W. S., Boshkov, L. K. & Gordon, P. A., 1995. Heparin-induced thrombocytopenia: an improved method of detection based on lumi-aggregometry. *British journal of haematology*, September, 91(1), pp. 173-7.
- Tóth, O. και συν., 2006. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thrombosis and haemostasis*, Dec, 96(6), pp. 781-8.
- Tan, C. W., Ward, C. M. & Morel-Kopp, M.-C., 2012. Evaluating heparin-induced thrombocytopenia: the old and the new. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, Marche, 38(2), pp. 135-43.
- Tardy-Poncet, B. και συν., 2015. Argatroban in the management of heparin-induced thrombocytopenia: a multicenter clinical trial. *Critical care*, 11 November.19(396).
- Tardy-Poncet, B. και συν., 2009. Thrombin generation and heparin-induced thrombocytopenia. *Journal of thrombosis and haemostasis*, September, 7(9), pp. 1474-81.
- Untch, B. και συν., 2002. Prevalence, isotype, and functionality of antiheparin-platelet factor 4 antibodies in patients treated with heparin and clinically suspected for heparin-induced thrombocytopenia. The pathogenic role of IgG. *Thrombosis research*, 15 January, 105(2), pp. 117-23.
- Vayne, C. και συν., 2020. Evaluation of functional assays for the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia using 5B9, a monoclonal IgG that mimics human antibodies. *Journal of thrombosis and haemostasis*, April, 18(4), pp. 968-975.
- Wallis, D. E. και συν., 1999. Failure of early heparin cessation as treatment for heparin-induced thrombocytopenia. *The American journal of medicine*, June, 106(6), pp. 629-35.
- Wang, Y. και συν., 2018. Heparin-induced thrombocytopenia: A critical appraisal of clinical practice guidelines with the AGREE II instrument. *Thrombosis research*, June, Τόμος 166, pp. 10-18.

- Warkentin, T. E. και συν., 1995. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *New England journal of medicine*, 18 May, 332(20), pp. 1330-5.
- Warkentin, T. E., 1999. Heparin-induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. *Thrombosis and haemostasis*, August, 82(2), pp. 439-47.
- Warkentin, T. E., 2006. HIT: lessons learned. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis*, 35(1-2), pp. 50-7.
- Warkentin, T. E., 2019. High-dose intravenous immunoglobulin for the treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: a review. *Expert review of hematology*, August, 12(8), pp. 685-698.
- Warkentin, T. E. & Greinacher, . A., 2003. Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery*, December, 76(6), pp. 2121-31.
- Warkentin, T. E., Roberts, . R. S., Hirsh, J. & Kelton, J. G., 2005. Heparin-induced skin lesions and other unusual sequelae of the heparin-induced thrombocytopenia syndrome: a nested cohort study. *Chest*, May, 127(5), pp. 1857-61.
- Warkentin, T. E. & Sheppard, J.-A. I., 2014. Serological investigation of patients with a previous history of heparin-induced thrombocytopenia who are reexposed to heparin. *Blood*, 17 April, 123(16), pp. 2485-93.
- Warkentin, T. E. και συν., 2009. Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 14 May, 113(20), pp. 4963-9.
- Warkentin, T. E. και συν., 2008. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *Journal of thrombosis and haemostasis*, August, 6(8), pp. 1304-12.
- Warkentin, T. E., 1998. Clinical presentation of heparin-induced thrombocytopenia. *Seminars in hematology*, October, 35(4 Suppl 5), pp. 9-16.
- Warkentin, T. E., 2003. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *British journal of haematology*, May, 121(4), pp. 535-55.
- Warkentin, T. E., 2004. An overview of the heparin-induced thrombocytopenia syndrome. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, June, 30(3), pp. 273-83.
- Warkentin, T. E., 2011. HIT paradigms and paradoxes. *Journal of thrombosis and haemostasis*, July, 9(Suppl 1), pp. 105-17.
- Warkentin, T. E., 2016. Clinical picture of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) and its differentiation from non-HIT thrombocytopenia. *Thrombosis and haemostasis*, 28 October, 116(5), pp. 813-820.
- Warkentin, T. E., Arnold, D. M., Nazi, I. & Kelton, J. G., 2015. The platelet serotonin-release assay. *American journal of hematology*, June, 90(6), pp. 564-72.

- Warkentin, T. E. & Greinacher, A., 2012. Heparin-Induced Thrombocytopenia. *CRC Press*, Τόμος 5.
- Warkentin, T. E. & Greinacher, A., 2016. Management of heparin-induced thrombocytopenia. *Current opinion in hematology*, September, 23(5), pp. 462-70.
- Warkentin, T. E. & Kelton, . J. G., 2001. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *The New England journal of medicine*, 26 April, 344(17), pp. 1286-92.
- Warkentin, T. E., Roberts, . R. S., Hirsh, J. & Kelton, . J. G., 2003. An improved definition of immune heparin-induced thrombocytopenia in postoperative orthopedic patients. *Archives of internal medicine*, 10 November, 163(20), pp. 2518-24.
- Warkentin, T. E. και συν., 2000. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, September, 96(5), pp. 1703-8.
- Warkentin, T. E., Sheppard, J.-A. I. & Manheim, J. C., 2014. HIT complicating fondaparinux prophylaxis: fondaparinux-dependent platelet activation as a marker for fondaparinux-induced HIT. *Thrombosis and haemostasis*, December, 112(6), pp. 1319-22.
- Warkentin, T. E. και συν., 2006. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*, 1 November, 108(9), pp. 2937-41.
- Weismann, R. E. & Tobin, r. W., 1958. Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *American Medical Association archives of surgery*, 76(2), pp. 219-25.