



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

Curriculum Biomedico e Biomolecolare

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**“Riduzione dei falsi negativi nella diagnosi della trombocitopenia
indotta da eparina: proposta di un algoritmo diagnostico che include
due immunodosaggi e uno score clinico”**

Relatore interno: **Prof. Ranzato Elia** *Elia Ranzato*

Correlatore: **Dr.ssa Barbara Montaruli**

Candidata: **Veronica Minei**

Veronica Minei

Anno Accademico 2022-2023

Indice

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Trombocitopenia indotta da eparina (HIT).....	1
1.1.1. HIT classica.....	2
1.1.2. HIT autoimmune.....	3
1.1.3. HIT spontane.....	3
1.1.4. Trombocitopenia trombotica immune da vaccino (VITT).....	4
1.1.5. VITT spontanea.....	4
1.2. Fisiopatologia.....	4
1.3. Epidemiologia.....	7
1.4. Diagnosi clinica e di laboratorio.....	8
1.4.1. Metodi immunologici.....	9
1.4.1.1. Enzyme Linked Immunoassay (ELISA).....	9
1.4.1.2. Chemiluminescenza (CliA).....	10
1.4.1.3. Latex Immunoturbidimetric Assay (LIA).....	10
1.4.1.4. Lateral Flow Immunoassay (LFIA).....	10
1.4.1.5. Particle Gel Immunoassay (PaGIA).....	11
1.4.2. Metodi funzionali.....	12
1.4.2.1. Test di Rilascio della Serotonina (SRA).....	14
1.4.2.2. Heparin-Induced Platelet Aggregation (HIPA).....	14
1.4.2.3. Citofluorimetria (FCA).....	14
1.4.2.4. Platelet Aggregation Test (PAT).....	15

1.5. Uso combinato di più test di laboratorio.....	16
1.6. Trattamento.....	18
2. SCOPO DEL LAVORO.....	20
3. MATERIALI E METODI.....	22
3.1. Pazienti.....	22
3.2. Campioni.....	25
3.2.1. Preparazione dei campioni.....	25
3.2.2. Valutazione clinica: 4T score.....	26
3.2.3. Ricerca anticorpi anti-eparina/PF4.....	28
3.2.3.1. Chemiluminescenza.....	28
3.2.3.2. ELISA.....	31
3.2.3.3. Test di conferma con aggregometro.....	32
3.3. Statistica.....	39
4. RISULTATI.....	39
5. DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	48
6. RINGRAZIAMENTI.....	56
7. BIBLIOGRAFIA.....	57

1. INTRODUZIONE

1.1. TROMBOCITOPENIA INDOTTA DA EPARINA (HIT)

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una rara reazione immunomediata da farmaco causata dall'assunzione di eparina ed è considerata la più frequente reazione immunitaria avversa ai farmaci. Se non è diagnosticata e trattata in tempo aumenta significativamente il rischio di trombosi (HITT) e la mortalità [1].

L'eparina non frazionata (ENF) e in minor misura l'eparina a basso peso molecolare (EBPM) sono implicati nella patogenesi della HIT [2].

Si ha la formazione di anticorpi IgG diretti contro il complesso eparina/PF4 (fattore piastrinico 4) che causano l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine provocando una diminuzione da consumo [1].

Esistono diverse tipologie di HIT classificati in base al fattore scatenante (trigger), come si può vedere in Figura 1 [3].

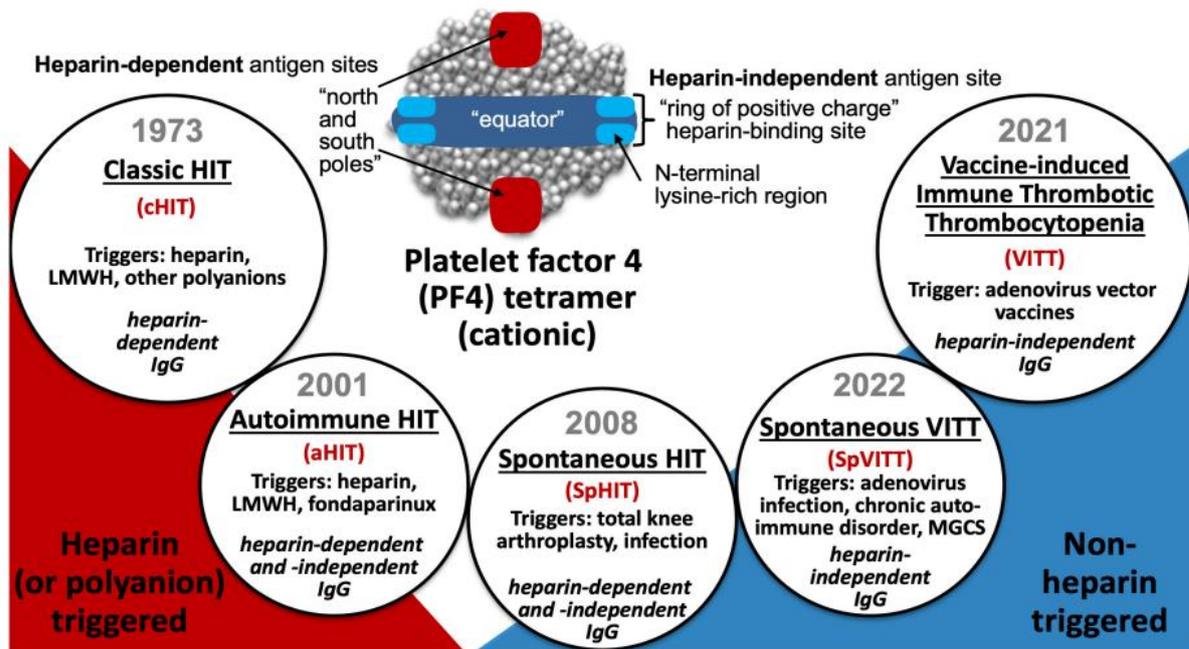


Figura 1: Tratto da [3]

Classificazione HIT.

1.1.1. HIT CLASSICA

La HIT classica fu descritta per la prima volta nel 1973 da G. Rhodes & co. ed ha come trigger l'ENF, l'EBPM e altri polianioni che provocano la formazione di IgG eparina dipendente. Il segno e sintomo principale è la trombocitopenia che si presenta in più del 85% dei casi di HIT. Il calo delle piastrine è all'incirca del 50%, con una conta mediana al nadir di 50-60 x10⁹/L. La diminuzione delle piastrine solitamente inizia tra il giorno 5 e il giorno 10 dopo la prima esposizione all'eparina. La trombocitopenia può incorrere nelle prime 24 ore se il paziente è stato sottoposto a trattamento con l'eparina nei 3 mesi precedenti.

L'altro sintomo caratteristico è la trombosi (35-75% dei pazienti) e può essere di tipo venoso come la trombosi venosa profonda oppure di tipo arterioso come l'infarto del miocardio [4].

1.1.2. HIT AUTOIMMUNE

La HIT autoimmune (aHIT) ha come trigger l'ENF, l'EBPM e il fondaparinux ma non sono coinvolti nella formazione degli immunocomplessi. La conta mediana al nadir delle piastrine è di $20 \times 10^9/L$ con un'alta frequenza di coagulazione intravascolare disseminata (CID) associata, patologia in cui si sviluppano piccoli trombi che ostruiscono i vasi di piccolo calibro [3].

1.1.3. HIT SPONTANEA

La HIT spontanea (SpHIT) è stata riscontrata in pazienti che hanno subito interventi di chirurgia ortopedica come protesi di ginocchio oppure che presentavano un'infezione.

Il legame del PF4 con altri substrati dalle cellule endoteliali come glicosaminoglicani (GAGs), DNA o multimeri di von Willebrand causa la formazione di complessi responsabili dello sviluppo di rari casi di HIT spontanea in pazienti senza esposizione all'eparina [5].

1.1.4. TROMBOCITOPENIA TROMBOTICA IMMUNE INDOTTA DA VACCINO (VITT)

La VITT è la trombocitopenia trombotica immune indotta da vaccino. Scoperta a causa della vaccinazione su scala mondiale contro la pandemia da COVID19. Il vaccino che ha causato questa grave complicanza è stato lo “Vaxzevria” di AstraZeneca. Questa patologia ha come fattore scatenante i vaccini che utilizzano come vettori gli adenovirus ed i complessi che si formano sono IgG eparina-indipendenti [6].

1.1.5. VITT SPONTANEA

La VITT spontanea (spVITT), di recente classificazione, ha come fattori scatenanti l’infezione da adenovirus, disordini autoimmuni cronici e cellule giganti multinucleate.[3]

1.2. FISIOPATOLOGIA

Sul piano patogenetico, la HIT si caratterizza per uno stato protrombotico immuno-mediato multifattoriale, associato ad un’abnorme generazione di trombina. Gli anticorpi che si generano, principalmente di classe IgG, sono rivolti contro un complesso formato da eparina, a dosi terapeutiche e PF4. Il PF4 è una proteina omotetramerica con carica positiva, formata da 4 subunità di 70 amminoacidi ed è presente una zona equatoriale che è il sito di legame

dell'eparina (carica negativa) (Figura 2) grazie alla presenza di 4 regioni N-terminali ricche di lisina (zone azzurre in figura) e da una regione ricca di arginina e altri residui di lisina (zona blu). I siti antigenici eparina-dipendenti sono al polo nord e al polo sud del tetramero dove si attaccano gli anticorpi eparina-dipendenti. Ogni tetramero può legare più di una molecola di eparina formando oligomeri di PF4/eparina, questo spiega la maggiore immunogenicità ENF rispetto EBPM [7].

Il PF4 è immagazzinato nei granuli alfa delle piastrine e rilasciata nel momento in cui queste vengono attivate, si legano attraverso interazioni elettrostatiche con l'eparina e successivamente ai GAGs presenti sulle cellule endoteliali. [5].

Questi macrocomplessi interagiscono con il recettore piastrinico FcγRIIIa che attiva le piastrine e causa un ulteriore rilascio di PF4 creando un feedback positivo dell'attivazione piastrinica [4].

In seguito al legame dell'immunocomplesso eparina/PF4/anticorpi con le piastrine, queste vanno incontro ad attivazione e rilasciano altro PF4, una sorta di circuito a feedback positivo. Tale legame porta sia alla formazione di microaggregati piastrinici con successiva rimozione splenica (da cui la piastrinopenia), sia all'attivazione delle piastrine stesse con conseguente formazione di trombina.

Gli anticorpi anti-eparina/PF4 sono in grado di attivare non solo le piastrine ma anche monociti che espongono il fattore tissutale e neutrofili, si parla quindi di attivazione pancellare.

Gli anticorpi danneggiano l'endotelio vasale e la superficie si trasforma da anticoagulante a procoagulante tramite l'inibizione dell'attivazione della proteina C, ad esempio. Inoltre gli anticorpi si legano al PF4 posto sulle catene del fattore di von Willebrand rilasciato dall'endotelio danneggiato partecipando alla trombosi arteriosa [7].

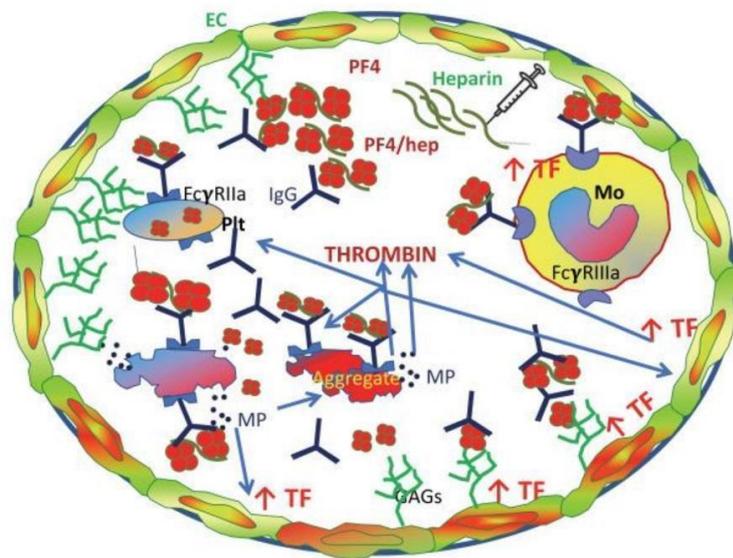


Figura 2: Tratta da [4]

Schema patogenesi della trombocitopenia indotta da eparina.

Legenda. EC: cellule endoteliali, PF4/Hep: complesso PF4-eparina, IgG: anticorpi anti-eparina/PF4, Plt: piastrine, GAGs: glicosaminoglicani, MP: microparticelle, Mo: monociti, TF: fattore tissutale.

1.3. EPIDEMIOLOGIA

La HIT è una patologia rara, ma che nonostante la sua bassa frequenza colpisce 1 su 5000 pazienti ospedalizzati, con una percentuale che varia dall'1 al 3% degli esposti (ovvero pazienti in trattamento con eparina).

Gli anticorpi anti-eparina/PF4 si sviluppano tipicamente dopo 5-10 giorni dall'inizio della terapia e tra 1-5% dei pazienti sottoposti a trattamento con eparina sviluppano la HIT [5].

La frequenza di HIT è variabile e dipende da diversi fattori: tipo di eparina, durata del trattamento, dosi utilizzate, tipo di paziente. Ulteriore elemento di rischio da considerare è la recente esposizione all'eparina (nei precedenti 100 giorni).

La HIT è più frequente in pazienti ortopedici che chirurgici, e meno comune in pazienti medici o ostetrici; le donne gravide sviluppano la HIT con incidenza molto minore rispetto a donne non in gravidanza anche con uso di ENF per lunghi periodi. La HIT è più comune con ENF che con l'uso di EBPM di almeno 8-10 volte; gli anticorpi infine, si formano più spesso in pazienti di reparti medici che ricevono ENF rispetto a EBPM [8].

I pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca sviluppano più frequentemente anticorpi rispetto ai pazienti ortopedici, tuttavia sono i pazienti ortopedici con anticorpi che hanno un maggior rischio di sviluppare HIT [9].

1.4. DIAGNOSI CLINICA E DI LABORATORIO

Una corretta diagnosi deve avvalersi di criteri sia clinici che basati sul risultato dei test di laboratorio. Il sospetto clinico di HIT dovrebbe essere posto ogni qualvolta si abbia un paziente con piastrinopenia (intesa come $PLTs < 150 \times 10^9/L$ o calo delle PLT di almeno il 50% rispetto al conteggio basale) in trattamento eparinico da almeno 5 giorni (o meno se è già stato esposto a eparina negli ultimi 100 giorni), in assenza di altre cause note che possano provocare un calo del numero di piastrine. Inoltre si dovrebbe eseguire un conteggio piastrinico per sospetto di HIT in pazienti in trattamento con eparina da almeno 5 giorni che sviluppino un'improvvisa complicanza tromboembolica. Poiché nei pazienti chirurgici si assiste sovente a una trombocitosi reattiva post-operatoria, il valore "basale" da considerare per valutare l'eventuale calo piastrinico dovrebbe essere il picco post-chirurgico.

Sono presenti diversi score clinici utilizzabili per la diagnosi di HIT, solamente il 4T score e il Lillo-Le Louet sono stati valutati prospetticamente e retrospettivamente. Il Lillo-Le Louet score, essendo stato esaminato in un solo studio prospettico, non viene utilizzato per la diagnosi [10].

Al momento tutte le linee guida raccomandano di utilizzare nella pratica clinica il 4T score (Trombocitopenia, Tempistica, Trombosi, alTro ovvero nessuna altra causa che giustifichi il calo delle piastrine) che valuta il grado di probabilità di sviluppare la HIT oppure il sospetto di HIT in base

all'anamnesi del paziente. Ad ogni fattore che partecipa al calcolo dello score viene attribuito un punteggio, questi vengono sommati per ottenere un totale che ci indica la maggiore o minore probabilità di avere una HIT.

Esistono due gruppi di test di laboratorio per la diagnosi della trombocitopenia da eparina: i test di tipo immunologico sono utili a determinare la presenza degli anticorpi anti-eparina/PF4; mentre i test funzionali sono in grado di valutare la funzionalità di tali anticorpi in vitro con l'uso di piastrine sane da donatori.

L'utilizzo combinato di test di laboratorio e score incrementano l'accuratezza nel confermare il sospetto clinico [4].

1.4.1. METODI IMMUNOLOGICI

1.4.1.1. Enzyme Linked Immunoassay (ELISA)

È un saggio di immunoassorbimento enzimatico che ricerca gli anticorpi anti-eparina/PF4 nel plasma del paziente che, se presenti, vengono individuati da specifici anticorpi secondari che li legano al substrato cromogenico e producono una reazione colorimetrica, proporzionale alla quantità di anticorpi anti-eparina/PF4, misurabile con lo spettrofotometro [3].

1.4.1.2. Chemiluminescenza (CliA)

È un test in chemiluminescenza automatizzato che si basa sulla rilevazione della luce che viene emessa quando avviene il legame tra le particelle paramagnetiche (su cui è presente l'antigene) e l'anticorpo anti-eparina/PF4 nel campione. La luce viene misurata e questo determina la quantificazione degli anticorpi.

1.4.1.3. Latex Immunoturbidimetric Assay (LIA)

È un test immunoturbidimetrico al lattice completamente automatizzato e standardizzato grazie ad un anticorpo monoclonale utilizzato come calibratore. I reagenti vengono inseriti su coagulometro ed il risultato viene fornito in 20 minuti. La presenza degli anticorpi anti-eparina/PF4 determina l'inibizione dell'agglutinazione delle particelle di lattice con gli anticorpi anti-eparina/PF4. La concentrazione degli anticorpi è inversamente proporzionale all'agglutinazione che viene misurata con la diminuzione della luce trasmessa causata dagli aggregati [11].

1.4.1.4. Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

È un test a flusso laterale basato sul principio dell'azione capillare che induce il flusso del campione lungo una fase solida. Il campione scorre lungo la superficie di un tampone con molecole reattive che forniscono una reazione

colorimetrica visibile senza l'utilizzo di ulteriori strumenti (Figura 3). Il risultato è disponibile in circa 10 minuti [12].

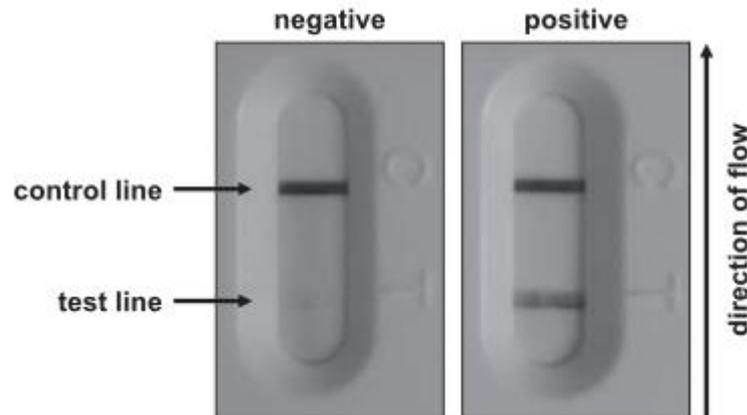


Figura 3: Tratto da [12]

Test a flusso laterale negativo e positivo.

1.4.1.5. Particle Gel Immunoassay (PaGIA)

La sospensione presente nel kit comprende il colorante rosso e le sfere sintetiche ad alta densità coattate con il complesso eparina/PF4. Se il campione contiene gli anticorpi anti-eparina/PF4 si legano sulle biglie e inizia l'agglutinazione. Il test è positivo se le biglie aggregate restano nella parte alta della colonna di gel dopo la centrifugazione. Il risultato è leggibile visivamente (Figura 4) [13].

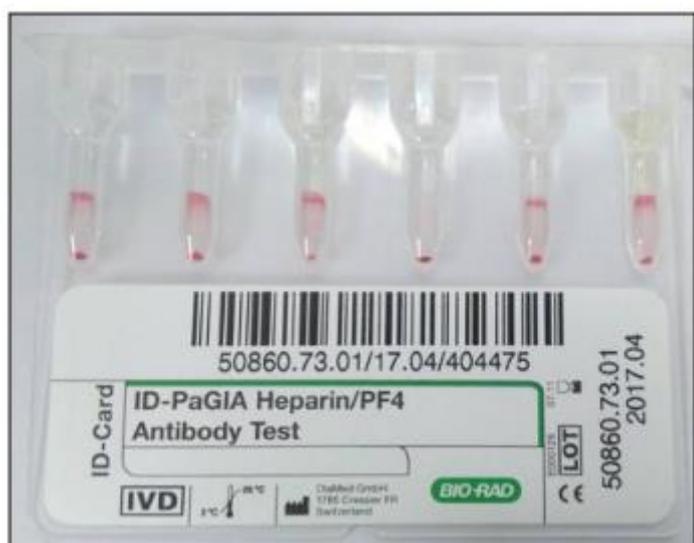


Figura 4: Tratto da [13]

Test PaGIA per la diagnosi di HIT.

1.4.2. METODI FUNZIONALI

I test funzionali sono considerati più specifici dei test immunologici in quanto, valutando direttamente l'attivazione e l'aggregazione piastrinica, non sono influenzati dall'eventuale presenza di IgA e IgM. Tali metodi utilizzano PRP (Plasma ricco di piastrine) o piastrine lavate da donatori, che vengono messe a contatto con il plasma o il siero da testare del paziente, in presenza di diverse concentrazioni di eparina. Se gli anticorpi presenti nel plasma del paziente sono funzionali, essi attiveranno le piastrine in presenza di dosi terapeutiche di eparina, mentre non le attiveranno in eccesso di eparina (un eccesso di eparina infatti si comporta da competitore spiazzando gli immunocomplessi). I vari saggi utilizzano metodi diversi per determinare l'eventuale attivazione o aggregazione delle piastrine. I test funzionali

includono diversi metodi che sono in grado di mostrare la capacità delle piastrine del paziente e di attivarsi in presenza dell'eparina con dose terapeutica.

I test funzionali sono test complessi che richiedono personale specializzato e che pertanto non sono disponibili ovunque. Il loro non dovrebbe essere quindi un utilizzo di routine ma limitato solo a pochi casi selezionati.

Il test di rilascio della serotonina (SRA) marcata con ^{14}C è stato il primo test messo a punto e, per questo, da sempre considerato il gold standard. In tempi più recenti l'"Heparin-Induced Platelet Activation" (HIPA) e la citofluorimetria (FCA), usando come marcatori di attivazione piastrinica l'annessina V, un anticorpo anti-CD62 (p-selettina) o il rilascio di microparticelle procoagulanti, hanno dimostrato sensibilità e specificità comparabili a quelli di SRA. Infine vi è il test di aggregazione piastrinica (PAT), che presenta sensibilità e specificità inferiori rispetto agli altri test di conferma.

Per tutti questi test esiste una variabilità dovuta all'uso di diversi donatori di piastrine, la reattività delle piastrine varia infatti da donatore a donatore; pertanto, per ottenere il massimo della sensibilità, è importante utilizzare piastrine provenienti da almeno 4 donatori diversi.

1.4.2.1. Test di Rilascio della Serotonina (SRA)

Le piastrine lavate dei donatori sani (che reagiscono bene con gli anticorpi della HIT) possono essere marcate con la C-serotonina. Quando le piastrine del paziente rilasciano serotonina, in seguito all'utilizzo dell'eparina non frazionata (0,1-0,3 UI/ml), che è inibita ad alte concentrazioni di eparina (100 U/ml) si ha un risultato positivo. È un test molto sensibile ma di difficile esecuzione a causa della lunga preparazione delle piastrine lavate e dell'utilizzo poco sicuro di sostanze radioattive.

1.4.2.2. Heparin-Induced Platelet Aggregation (HIPA)

Il plasma del paziente viene incubato insieme alle piastrine lavate dei donatori e all'eparina ad una concentrazione bassa (0,2 UI/ml) e ad una concentrazione alta (100 UI/ml) in agitazione per 45 minuti. Se le piastrine aggregano ad una concentrazione di eparina bassa ma non alla concentrazione alta allora il risultato è positivo. È un test che richiede dalle 6 alle 7 ore ed è fondamentale l'esperienza dell'operatore in quanto è un test completamente manuale [14].

1.4.2.3. Citofluorimetria (FCA)

È una tecnica che utilizza laser singoli o multipli che passano attraverso la sospensione cellulare, il rilevatore trasforma le emissioni di luce in segnali elettrici e poi in segnali digitali che vengono analizzati. Il plasma del paziente

analizzato attraverso il citometro a flusso deve essere marcato con un anticorpo monoclonale coniugato fluorescente ed incubato con le piastrine dei donatori e l'eparina ad alta o bassa concentrazione [15].

1.4.2.4. Platelet Aggregation Test (PAT)

Un altro test funzionale basato sull'aggregazione piastrinica (PAT), aggregometria impedenziometrica, espressione delle glicoproteine di membrana delle piastrine e generazione di microparticelle di piastrine possono essere usate.

L'aggregazione è determinata da un incremento nella trasmissione della luce attraverso la sospensione piastrinica [14].

Tutti i test funzionali sopracitati soffrono di molte limitazioni dovute alla complessità, accessibilità ed alle condizioni preanalitiche.

Le principali limitazioni dei test funzionali risiedono innanzitutto nella corretta scelta dei donatori di piastrine. Le piastrine dovrebbero essere prelevate da donatori sani dopo un breve periodo di riposo, almeno 30 minuti senza aver fumato e 2 ore dopo l'assunzione di caffè; i donatori dovrebbero non aver preso nessun tipo di farmaco che possa modificare la funzionalità piastrinica, ed i donatori dovrebbero essere testati per la presenza di fattori intrinseci delle piastrine che possono influenzare la loro reattività e risultare poco responsivi ai test di funzionalità piastrinica.

Un'altra limitazione è sicuramente data dall'utilizzo di un controllo positivo standardizzato. Le linee guida dei test di conferma raccomandano di utilizzare come controllo positivo il siero di un paziente affetto da HIT debolmente positivo così da escludere falsi negativi, ma a causa della bassa incidenza della patologia e della difficile reperibilità del siero di questi pazienti, non è sempre possibile processare un siero come controllo positivo che attesti la buona funzionalità delle piastrine del donatore e limiti il rischio di un falso negativo [14].

Fortunatamente è stato recentemente creato un anticorpo monoclonale di sintesi diretto contro il complesso PF4/eparina, il 5B9, che funziona molto bene come controllo interno positivo a basse concentrazioni, in tutti i test funzionali di conferma della HIT, la sua introduzione riduce quindi il rischio di falsi negativi al test di conferma funzionale [16].

1.5 USO COMBINATO DI PIU' TEST DI LABORATORIO

Storicamente la relazione fra test immunologici ELISA e test funzionali della HIT è stata concettualizzata con un "modello ad iceberg". Questo modello indica che per la HIT solo un sottogruppo di pazienti a cui è stata somministrata eparina sviluppano trombocitopenia e anticorpi anti-eparina/PF4 positivi ai test immunologici ELISA e, di questi, solo un'ulteriore sottopopolazione risulta positiva ai test funzionali di conferma. In questo modello i pazienti con risultati fortemente positivi ai test

immunologici ELISA (densità ottica elevata ai test ELISA) sono quelli che hanno maggiore probabilità di essere positivi ai test funzionali. Recentemente questo modello è stato rivisto con l'inclusione di un sottogruppo di pazienti fortemente positivo ai test immunologici ma negativo ai test funzionali della HIT (SRA negative HIT). ELISA e test funzionale SRA sono quindi considerati test complementari nella valutazione delle diverse proprietà degli anticorpi anti-eparina/PF4, entrambi questi test però purtroppo non sono test rapidi e soprattutto come già evidenziato precedentemente SRA, come tutti i test di conferma, è di difficile esecuzione e non alla portata di tutti i laboratori.

Negli ultimi anni numerosi test rapidi immunologici per la ricerca di anticorpi anti-eparina/PF4 sono stati sviluppati, fra questi test in particolare il LIA ed il CliA entrambi test quantitativi, hanno dimostrato che seppure con sensibilità e specificità inferiori rispetto al test ELISA (95% per LIA e 98% per CliA), riescono a fornire risultati rapidi (entro 30 minuti dall'arrivo del campione in laboratorio) ed attendibili [17].

Alcuni lavori in letteratura hanno quindi valutato se l'utilizzo combinato di più test rapidi integrato con lo score clinico di probabilità pre-test (approccio Bayesiano) offrono l'opportunità di predire in maniera accurata la HIT e di ridurre sia i falsi negativi che i falsi positivi alla malattia [18].

Warkentin et al. hanno dimostrato che l'uso combinato di LIA e CliA consente di raggiungere una sensibilità pari a quella dell'ELISA (99%) nei

confronti della HIT (riducendo quindi la possibilità di falsi negativi di entrambi i test), e che l'integrazione dei risultati dei due test rapidi con il pre-test clinico 4T score, consente di identificare con una specificità del 98% i pazienti con anticorpi anti-eparina/PF4 in grado di attivare le piastrine, riducendo quindi la necessità di eseguire test di conferma della HIT in un numero significativo di pazienti [17].

Più recentemente, Marchetti et al., hanno dimostrato che l'integrazione del pre-test clinico 4T score con l'uso combinato di due test immunologici rapidi il CliA ed il PagiA è accurato nell'escludere la HIT in più del 95% dei pazienti entro 60 minuti dall'arrivo del campione in laboratorio, riducendo sia i falsi negativi che il numero dei test funzionali di conferma da effettuare [18].

1.6 TRATTAMENTO

Modificare la terapia durante il tempo di attesa dei risultati dei test di laboratorio ed in seguito alla diagnosi della malattia è fondamentale per la sopravvivenza del paziente.

Il primo passo è l'interruzione immediata della somministrazione dell'eparina essendo il principale trigger di questa patologia e passare ad una terapia anticoagulante differente. Controproducente è la trasfusione di sacche di piastrine poiché si avrebbe l'aumento delle piastrine e di conseguenza della loro attivazione.

Le alternative possibili all'eparina, per questa patologia, sono danaparoid e argatroban che sono farmaci in grado di bloccare il meccanismo di attivazione delle piastrine.

Il danaparoide è un inibitore diretto del fattore Xa ed è composto da eparan-solfato (85%), condroitin-solfato (10%) e dermatan-solfato (5%), ha la capacità di rompere i legami tra l'eparina e il PF4. Ha l'emivita di circa 25 ore quindi non è indicato in caso di necessità di un intervento chirurgico a breve o in pazienti con aumentato rischio emorragico, viene eliminato per via renale perciò non può essere utilizzato nei pazienti con insufficienza renale. Può essere utilizzato anche per le donne in gravidanza perchè non passa la placenta.

L'argatroban è un farmaco inibitore diretto della trombina con una emivita di circa 1 ora quindi è il farmaco consigliato in caso di intervento chirurgico necessario o di aumentato rischio emorragico del paziente, viene eliminato per via epatica quindi non può essere utilizzato nei pazienti con insufficienza epatica.

La terapia con anticoagulante parenterale deve essere somministrata fino alla normalizzazione della conta piastrinica ($\geq 150 \times 10^9/L$) per poi proseguire con terapia con un anticoagulante orale diretto (DOAC) o un anticoagulante vitamina K-dipendente (AVK) per i successivi 3 mesi [19].

2. SCOPO DEL LAVORO

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una complicanza tra le più temibili della terapia eparinica; nonostante non sia molto frequente è tuttavia gravata da un'elevata morbilità e mortalità. È caratterizzata da trombocitopenia che può essere associata, paradossalmente, a trombosi venosa o arteriosa. In seguito alla somministrazione di eparina taluni pazienti sviluppano anticorpi diretti contro il complesso PF4/eparina. Il neo complesso PF4/eparina/IgG si lega alla superficie delle piastrine e le attiva. Si scatenano così una reazione infiammatoria ed il rilascio di sostanze che promuovono la generazione di trombina e scatenano il fenomeno trombotico. La HIT si può manifestare con quadri clinici diversi. La trombosi del settore venoso è molto più frequente rispetto a quella del settore arterioso, tuttavia sono stati descritti casi di infarto miocardico acuto e di trombosi periferica così grave da determinare l'amputazione dell'arto colpito. La trombocitopenia è il primo segno di HIT e di solito compare dopo 4-5 giorni di somministrazione di eparina. Qualora vi sia il sospetto di HIT la diagnosi deve essere confermata con la ricerca degli anticorpi [1]. Nel sospetto diagnostico è necessario sospendere la somministrazione di ogni forma di eparina ed iniziare una terapia antitrombotica alternativa. Infine se da una parte le HIT non riconosciute sono associate a aumentata morbilità e mortalità, dall'altra la classificazione di un paziente come affetto da HIT

anche se negativo aumenta i costi del sistema sanitario ed espone il paziente ad un rischio emorragico [7].

La diagnosi della HIT si basa su criteri clinici (4T score) e deve essere confermata, in vitro, della presenza di anticorpi anti-eparina/PF4 tramite test funzionali ed immunologici. Questa combinazione (score "pre-test" e test di laboratorio) consente una migliore diagnosi della HIT.

I test funzionali si basano sulla capacità delle IgG anti-eparina/PF4 di attivare le piastrine in presenza di eparina, mentre i test immunologici confermano la presenza degli anticorpi, senza tener conto della loro capacità di attivare le piastrine.

I vari saggi funzionali utilizzano metodi diversi per determinare l'eventuale attivazione o aggregazione delle piastrine e sono test complessi, di difficile esecuzione, che richiedono personale specializzato e che pertanto non sono disponibili ovunque. Il loro non dovrebbe essere quindi un utilizzo di routine ma limitato solo a pochi casi selezionati.

I test immunologici anche se sono più sensibili (ELISA sensibilità >95%), non sono in grado di fornire informazioni sulla capacità delle immunoglobuline di attivare le piastrine ed hanno quindi bassa specificità.

Un test immunologico negativo anche se non completamente (nessun test immunologico ha sensibilità del 100%) può ragionevolmente escludere il

sospetto di HIT, mentre un test immunologico positivo necessita sempre di un test di conferma [4].

L'obiettivo del presente studio è stato quello di determinare se l'utilizzo di un algoritmo diagnostico che integri lo score clinico 4T con 2 test immunologici CliA ed ELISA (approccio Bayesiano) consenta di ridurre al minimo i falsi negativi e i test funzionali di conferma.

3. MATERIALI E METODI

3.1. PAZIENTI

Nel periodo compreso tra aprile 2022 e gennaio 2023 sono stati studiati 163 pazienti consecutivi, 85 uomini (età mediana di 75 anni, range 20-94 anni) e 78 donne (età mediana di 76 anni, range 29-97 anni), con richiesta di ricerca di anticorpi anti-eparina/PF4 per sospetta Trombocitopenia indotta da eparina (HIT), ricoverati nei reparti dell'Ospedale Mauriziano di Torino o provenienti da altri Ospedali del Piemonte (vedi Tabella 5).

82 soggetti erano in trattamento con EBPM, 29 con ENF e 8 con fondaparinux.

	Maschi	Femmine	Totale
Età (mediana)	20-94 (75)	29-97 (76)	20-97 (76)
Reparti	-	-	-
Cardiochirurgia	16 (18%)	10 (13%)	26 (16%)
Cardiologia	1 (1%)	7 (9%)	8 (5%)
Chirurgia	2 (2%)	2 (3%)	4 (2%)
Chirurgia Vascolare	3 (4%)	0 (0%)	3 (2%)
COVID	9 (11%)	8 (10%)	17 (10%)
Endocrinologia	1 (1%)	3 (4%)	4 (2%)
Esterno	23 (27%)	8 (10%)	31 (19%)
Medicina Interna	10 (12%)	12 (15%)	22 (13%)
Medicina d'Urgenza	8 (9%)	2 (3%)	10 (6%)
Nefrologia	2 (2%)	2 (3%)	4 (2%)
Neurologia	0 (0%)	2 (3%)	2 (1%)
Otorinolaringoiatria	2 (2%)	0 (0%)	2 (1%)
Ortopedia	1 (1%)	3 (4%)	4 (2%)
Pneumologia	1 (1%)	3 (4%)	4 (2%)
Rianimazione	3 (4%)	2 (3%)	5 (3%)
Terapia Intensiva	3 (4%)	13 (17%)	16 (10%)
Eparine	-	-	-
Eparina non specificata	28	16	44
Fondaparinux	3	5	8
Eparina a basso peso molecolare	37	45	82
Eparina non frazionata	31	12	29

Tabella 5: Caratteristiche demografiche (sesso ed età), reparto di appartenenza e tipologia di eparina in corso.

La diagnosi di HIT è stata effettuata con l'ausilio di un nostro algoritmo diagnostico (Tabella 6), basato sull'integrazione del pre-test clinico 4T score con l'uso combinato di due test immunologici uno rapido il CliA ed il test gold standard di riferimento per la ricerca degli anticorpi anti-eparina/PF4 (ELISA). Algoritmo decisionale che dovrebbe, secondo quanto riportato in letteratura, offrire l'opportunità di predire in maniera accurata la HIT e di ridurre sia i falsi negativi che i falsi positivi alla malattia.

Algoritmo per la diagnosi di trombocitopenia indotta da eparina (HIT)			
CliA IgG anti-eparina/PF4 U/ml	ELISA IgG anti-eparina/PF4 OD	PAT/HITALERT	HIT
$\leq 0,13$	-	-	Esclusa
$> 0,13 < 1$ Eeguire test in ELISA	$< 0,300$	-	Esclusa
	$\geq 0,300$ Eeguire test di conferma	Negativo	Esclusa
		Positivo	Confermata
≥ 1 Eeguire test di conferma	-	Negativo	Esclusa
	-	Positivo	Confermata

Tabella 6: Tratto da Congresso Siset 2022. Montaruli et al. “Combination of CliA and ELISA assays for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT).”

Algoritmo decisionale diagnostico HIT secondo procedura del Mauriziano.

Sulla base del nostro algoritmo diagnostico un risultato di ricerca anticorpi anti-eparina/PF4 con metodica immunologica CliA $\leq 0,13$ U/ml esclude la malattia. Un risultato CliA ≥ 1 U/ml necessita di conferma con il test funzionale PAT. Per i pazienti con risultato di CliA in zona grigia è stato effettuato un test di ricerca di anticorpi anti-eparina/PF4 con metodica ELISA. Un risultato negativo (OD $<0,300$) dell’ELISA esclude la malattia, mentre un risultato positivo (OD $>0,300$) necessita di conferma di positività con il test funzionale PAT.

La diagnosi di HIT trombotica (HITT) prevedeva, oltre la positività dei test, la conferma di un nuovo evento trombotico venoso o arterioso attraverso una valutazione clinico-funzionale-morfologica.

3.2. CAMPIONI

3.2.1. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il sangue è stato prelevato da vena antecubitale del braccio e raccolto in provette vacutainer tappo azzurro contenenti 109 mM di sodio citrato, con proporzione 9:1 sangue-anticoagulante (Figura 7). Per l'ottenimento del PRP, il sangue è stato centrifugato a 180 x g per 15 minuti a temperatura ambiente; per il plasma del paziente e il Plasma Povero di Piastrine (PPP) invece, le provette sono state centrifugate a 1500 g per 15 minuti. Il surnatante è stato quindi trasferito in provette pulite adeguate all'analisi ed immediatamente analizzato oppure aliquotato e conservato in congelatore a -80°C fino al momento dell'analisi, o alle successive fasi di preparazione del campione nel caso del PRP.



Figura 7: Provetta tappo azzurro contenente anticoagulante sodio citrato.

3.2.2. VALUTAZIONE CLINICA: 4T SCORE

Il 4T score è uno metodo di scoring clinico utilizzato per valutare il grado di probabilità oppure il sospetto di HIT a seconda della storia clinica del paziente. Lo score si basa su 4 fattori: trombocitopenia, tempo di diminuzione della conta piastrinica dopo esposizione all'eparina, trombosi, altre cause possibili di trombocitopenia. Come mostra l'immagine (Figura 8), ad ogni categoria viene attribuito un punteggio che va da 0 a 2 punti in base alla situazione clinica del paziente.

sistema di valutazione a punti per HIT: lo score 4T

PUNTI	2	1	0
Trombocitopenia (riduzione della conta piastrinica)	Riduzione della conta piastrinica > 50% e nadir delle piastrine >20x10 ⁹ /L	Riduzione della conta piastrinica 30-50% o nadir delle piastrine 10-19x10 ⁹ /L	Riduzione della conta piastrinica <30% o nadir delle piastrine <10x10 ⁹ /L
Tempo in cui avviene la riduzione della conta piastrinica	Evidente esordio tra i 5-10 giorni o caduta della conta <1 giorno (esposizione precedente all'eparina entro 30 giorni)	Coerente con una caduta della conta entro 5-10 giorni ma non accertabile (esempio per mancata conta piastrinica iniziale); esordio dopo 10 giorni; caduta della conta <1 giorno (esposizione precedente all'eparina 30-100 giorni prima)	Caduta della conta piastrinica < 4 giorni senza esposizione recente all'eparina
Trombosi o altri sintomi (es. lesioni cutanee)	Nuova trombosi (confermata); necrosi cutanea; reazione sistemica acuta dopo la somministrazione per via endovenosa di bolo di eparina non frazionata	Trombosi progressiva o ricorrente; no necrosi (eritematose); lesioni cutanee; sospetta trombosi (non accertata)	Nessuno
Altre cause di trombocitopenia non evidenti	Non ci sono altre cause di trombocitopenia evidenti	Evidenza di altre possibile cause	Rilevate e definite altre cause

Figura 8: Tratto da brochure Hemosil

Tabella punteggi 4T score

Il punteggio totale è determinante per la classificazione della popolazione presa in esame. Se il risultato dello scoring è tra 0 e 3 punti, il valore predittivo è altamente negativo per la HIT; se è da 4 a 5 il valore predittivo è positivo ma basso; se tra 6 e 8 il valore predittivo è altamente positivo.

In base ai dati a disposizione, la popolazione di pazienti studiati è stata suddivisa in 4 coorti:

- 4T score basso: 0 a 3 punti, valore predittivo altamente negativo,
- 4T score intermedio: da 4 a 5, valore predittivo positivo basso,
- 4 T score alto: da 6 a 8, valore predittivo positivo alto,
- sospetto clinico senza 4T score: i pazienti esterni per i quali non è stato possibile reperire informazioni sulla storia clinica.

3.2.3. RICERCA ANTICORPI ANTI-EPARINA/PF4

3.2.3.1. CHEMILUMINESCENZA

In tutti i pazienti studiati la ricerca degli anticorpi anti-eparina/PF4 IgG è stata effettuata con l'analizzatore HemosIL Acustar HIT IgG CliA (Werfen, Bedford, MA USA) con il kit commerciale HIT-IgG_(PF4-H) (Werfen, Bedford, MA USA).

L'HemosIL Acustar HIT IgG CliA (Figura 9) svolge un test in chemiluminescenza completamente automatizzato ad alta sensibilità che si basa sulla rilevazione della luce emessa in seguito al legame tra le particelle paramagnetiche presentanti l'antigene e l'anticorpo presente nel campione.



Figura 9: Tratta da brochure Werfen

HemosIL Acustar HIT IgG CliA.

La particella paramagnetica di polivinil sulfonato è legata ad un antigene PF4.

Gli anticorpi anti-eparina/PF4 formano un complesso con la particella paramagnetica e l'antigene PF4. Dopo l'incubazione, la separazione magnetica e il lavaggio viene aggiunto un tracer, anticorpo anti-umano IgG marcato con isoluminolo. Il tracer si lega al complesso particella paramagnetica+PF4-anticorpi anti-eparina/PF4. Dopo una seconda incubazione, separazione magnetica e lavaggio viene aggiunto H_2O_2 ed un catalizzatore ed avviene l'emissione di luce (Figura 10).

L'emissione di luce è direttamente proporzionale alla concentrazione di anticorpi anti-eparina/PF4 presenti nel campione.

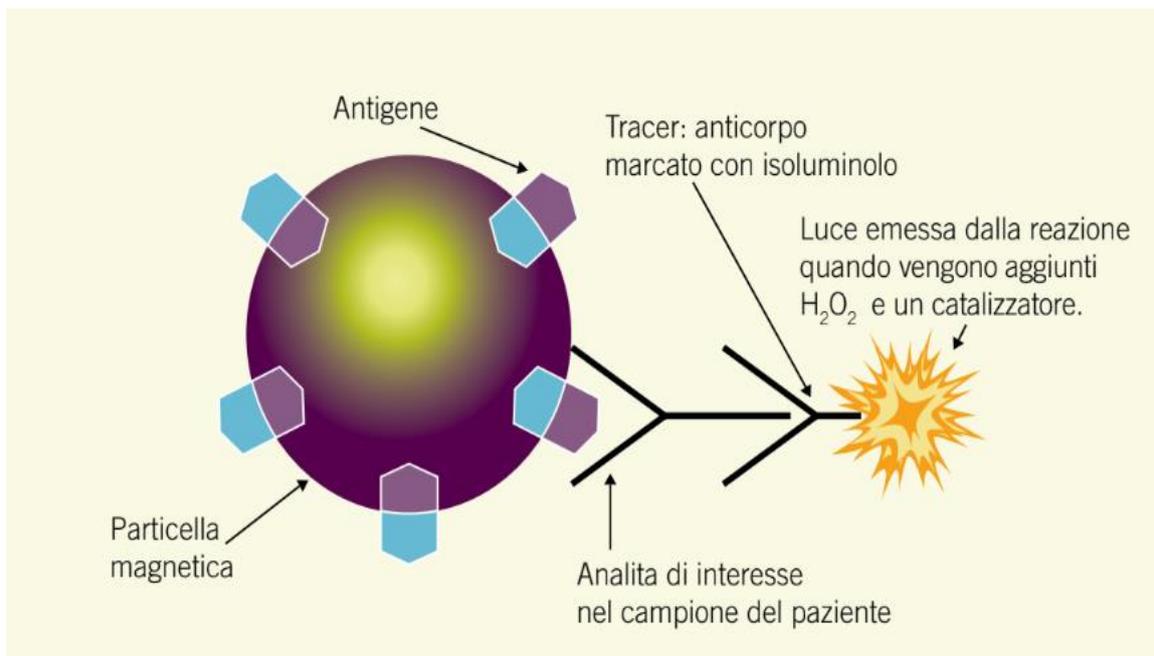


Figura 10: Tratto da brochure Werfen.

Meccanismo di formazione complesso particella-PF4-analita nel campione-tracer.

Tutti i componenti necessari per la reazione sono contenuti all'interno di una cartuccia che deve essere collocata all'interno dello strumento prima di svolgere l'analisi (Figura 11 e 12).



Figura 11: Tratto da brochure Werfen.

Cartucce per analisi Clia.

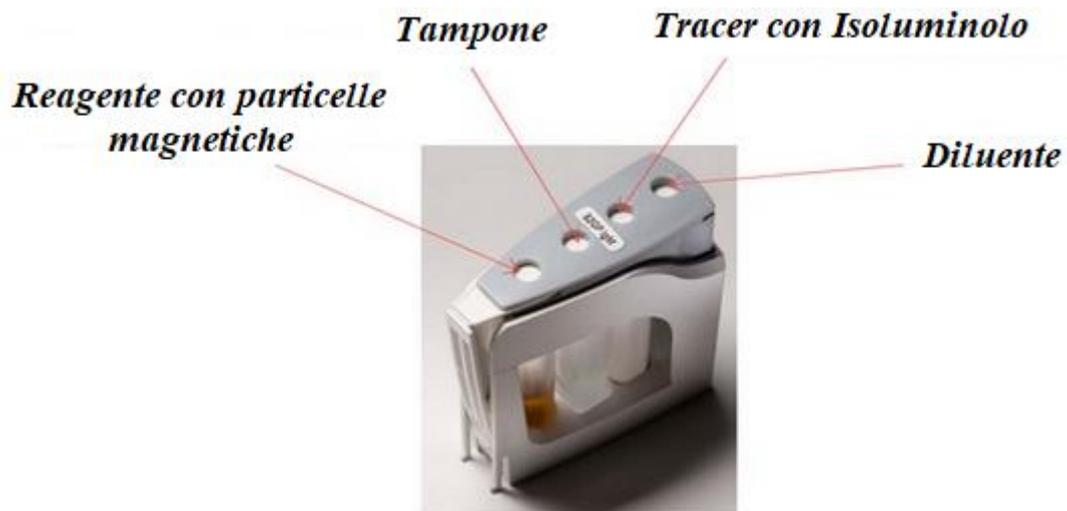


Figura 12: Tratto da brochure Werfen.

Cartuccia per analisi Clia con descrizione varie componenti

Questa metodica presenta diversi vantaggi tra cui la facilità di esecuzione e la velocità con cui si ottiene il risultato, approssimativamente in 30 minuti. Inoltre è caratterizzata da elevata sensibilità e specificità nei confronti della HIT rispettivamente del 97,0% e 98,5% [20].

3.2.3.2. ELISA

Come secondo test immunologico per determinare la presenza degli anticorpi anti-eparina/PF4 di classe G nel plasma in esame nel nostro laboratorio è stato scelto il test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) della ditta, Zymutest-HIA-IgG (Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, France) (Figura 13). Seguendo le indicazioni del produttore, il plasma da testare viene posto nei pozzetti della micropiastra, coattati con ENF, biologicamente disponibile, saturata e stabilizzata. Se gli anticorpi sono presenti nel plasma, si legano alla piastra e vengono riconosciuti da specifici anticorpi secondari legati a fosfatasi alcalina, forniti col kit, in grado di riconoscere la porzione Fc di classe IgG. In seguito all'aggiunta di un substrato cromogenico (PNPP p-nitrofenil fosfato), la reazione viene bloccata con idrossido di sodio. Viene poi misurata spettrofotometricamente (405 nm) la densità ottica (OD), essa è proporzionale alla quantità di anticorpi presenti nel campione. Sono stati considerati positivi i campioni con OD >0,300 [7].



Figura 13: Tratto dal sito della casa produttrice.

Kit Zymutest-HIA-IgG, Hyphen BioMed

3.2.3.3. TEST DI CONFERMA CON AGGREGOMETRO

Come test di conferma per la presenza degli anticorpi anti-eparina/PF4 IgG è stato utilizzato il Platelet Aggregation Test (PAT). All'Ospedale Mauriziano è stato utilizzato il PAP8 BioData Aggregometer (Bio/Data corporation) (Figura 14). Questo test usa l'aggregazione a trasmissione della luce (LTA) per valutare la funzionalità piastrinica [21].



Figura 14: Tratto da sito casa produttrice.

PAP8 BioData Aggregometer (Bio/Data corporation)

Lo strumento presenta degli alloggiamenti dove si posizionano le specifiche cuvette di vetro trasparente dotate di magneti sul fondo e la cuvetta senza magneti, rispettivamente per il campione e per il bianco (per la calibrazione dello strumento). È dotato di un'altra fila di alloggiamenti termostatati a 37°C che contiene agitatori magnetici ed hanno la funzione di agitare il campione depositato all'interno delle cuvette. L'agitazione permette di attivare le piastrine in seguito all'iniezione del reagente durante lo svolgimento del test. All'interno di una terza fila di alloggiamenti passa un fascio di luce UV LED 400–430 nm, dopo la cuvetta è presente una

fotocellula che legge la variazione della densità ottica in seguito all'interazione campione-reagente. Un cambio nell'aspetto del plasma da torbido, piastrine non aggregate, a limpido/trasparente, piastrine aggregate, è considerato come risultato positivo. L'aggregazione è rilevata da un incremento della trasmissione della luce attraverso la sospensione piastrinica. Il software interfacciato con lo strumento crea un grafico relativo alla trasmissione della luce attraverso la sospensione piastrinica, sull'asse delle X vi sono i minuti e sull'asse delle Y la percentuale (%) di aggregazione.

Il PRP ottenuto da 4 donatori gruppo zero viene messo a contatto con il plasma o il siero da testare del paziente, in presenza di basse (0,5 UI/ml) ed alte concentrazioni di eparina (1,5 UI/ml) e di acido arachidonico. Se gli anticorpi presenti nel plasma del paziente sono funzionali, essi attiveranno le piastrine in presenza di dosi terapeutiche di eparina (0,5 UI/ml), mentre in presenza di eccesso eparina non le attiveranno (1,5 UI/ml), un eccesso di eparina infatti si comporta da competitore spiazzando gli immunocomplessi. Le piastrine attivate dall'eparina aggregano e l'incremento nella trasmissione della luce attraverso la sospensione piastrinica viene registrato dallo strumento.

L'aggregazione delle piastrine dei donatori all'acido arachidonico viene effettuata per valutare che le piastrine del donatore abbiano una risposta nella norma ai test di aggregazione piastrinica.

Come controllo positivo abbiamo utilizzato l'anticorpo monoclonale chimerico 5B9 (Stago, France), anticorpo prodotto in seguito a immunizzazione di un topo transgenico e contiene un frammento costante (FC) umano che mima gli effetti degli anticorpi anti-eparina/PF4 [22].

L'anticorpo si presenta sotto forma di liofilizzato e deve essere ricostituito con 0,5 ml di acqua distillata, 500 µl di questi vengono diluiti con 750 µl di plasma senza piastrine (PFP) denaturato (56°C for 60 minutes) di un paziente sano per avere una concentrazione finale di 400 µg/ml. Sono stati effettuati dei test per valutare se anche a bassa concentrazione il 5B9 risultasse essere un buon controllo interno positivo. Abbiamo usato 3 diversi donatori sani di piastrine e si è potuto apprezzare che, anche concentrazioni basse di anticorpo, le piastrine dei donatori aggregano, a volte con una percentuale maggiore rispetto alla concentrazione consigliata dalla ditta con il metodo di funzionale di conferma in uso presso il nostro laboratorio (PAT = 400 µg/ml) (Tabella 15).

PAT						
5B9 concentrazione $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (diluizione)	Donatore 1		Donatore 2		Donatore 3	
	% aggregazione (negativa <18%)	Interpretazione	% aggregazione (negativa <18%)	Interpretazione	% aggregazione (negativa <18%)	Interpretazione
400	20	POS	20	POS	41	POS
200	27	POS	25	POS	45	POS
100	40	POS	30	POS	48	POS
50	72	POS	51	POS	60	POS
25	83	POS	55	POS	80	POS
10	84	POS	58	POS	80	POS

Tabella 15: Tratto da Corso nazionale Siset 2023, Valesella et al.

“Heparin induced thrombocytopenia functional assays: the importance of platelets donor.”

Risultati dell’aggregazione piastrinica di 3 diversi donatori a concentrazioni decrescenti di anticorpo monoclonale 5B9.

Abbiamo quindi deciso di utilizzare basse concentrazioni di anticorpo monoclonale come controllo positivo (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Nella pratica per ogni test funzionale di conferma sull’aggregometro vengono utilizzate 6 cuvette di reazione contenenti:

- 1) 125 μl PRP donatori e 100 μl controllo positivo 5B9
- 2) 125 μl PRP donatori e 100 μl controllo positivo 5B9
- 3) 225 μl di PRP donatori
- 4) 125 μl PRP donatori e 100 μl plasma del paziente

- 5) 125 µl PRP donatori e 100 µl plasma del paziente
- 6) 225 µl di PRP donatori

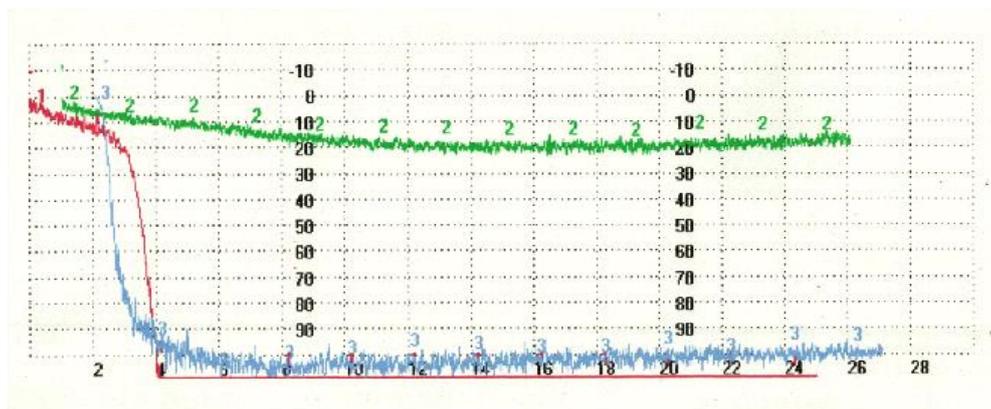
A queste cuvette dopo incubazione a 37°C per 3 minuti, vengono aggiunti rispettivamente:

1. 25 µl di eparina 0.50 UI/ml
2. 25 µl di soluzione fisiologica
3. 25 µl di acido arachidonico
4. 25 µl di eparina 0.50 UI/ml
5. 25 µl di soluzione fisiologica
6. 25 µl di acido arachidonico

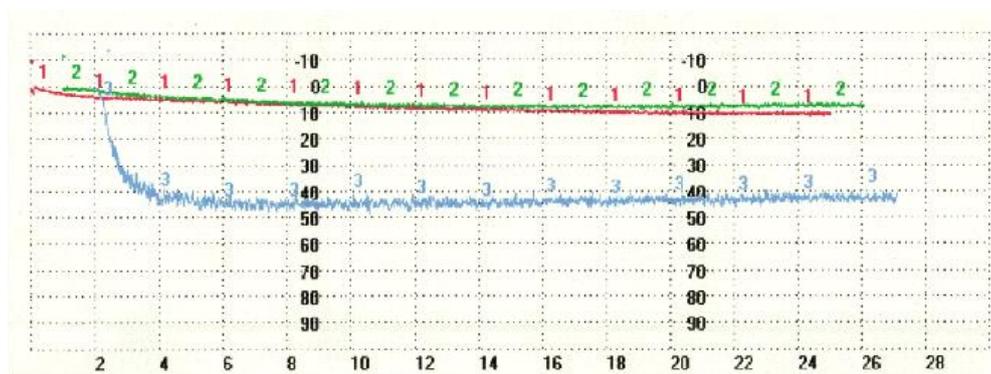
Il software elabora un grafico composto da 6 curve, una per ogni cuvetta analizzata.

La curva è considerata negativa se la massima aggregazione è inferiore al 25% e positiva se la massima aggregazione è maggiore del 25% (Figura 16).

Paziente Positivo



Paziente Negativo



Controllo Positivo (5B9)

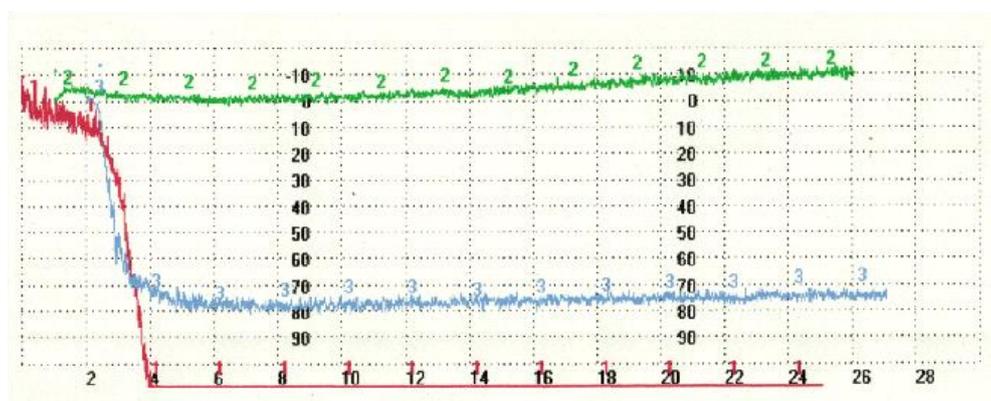


Figura 16: PAT di un paziente positivo alla HIT, PAT di un paziente negativo e del controllo interno positivo (5B9).

3.3 STATISTICA

Per tutti i calcoli statistici come media, mediana e deviazione standard è stato utilizzato il software Analyse-it per Microsoft Office Excel. L'età è stata espressa con mediana e range (età minima e massima).

La prevalenza è stata calcolata con un livello di confidenza del 99% e un margine di errore del 5%.

4. RISULTATI

Nel periodo compreso fra aprile 2022 e gennaio 2023 sono stati studiati 163 campioni di pazienti consecutivi con richiesta di anticorpi anti-eparina/PF4 per sospetta Trombocitopenia indotta da eparina (HIT), ricoverati nei reparti dell'Ospedale Mauriziano di Torino o provenienti da altri Ospedali del Piemonte.

Dei 163 pazienti esaminati, 85 erano maschi (52.1%) e 78 femmine (47.9%). L'età mediana dei soggetti era di 75 anni (range: 20-97 anni). Le caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti studiati sono riportate in tabella 17: numero, sesso, reparto di provenienza, eparina somministrata, score clinico e diagnosi confermata di HIT.

Il grafico 18 mostra la ripartizione dei pazienti nei diversi reparti, divisi per sesso e il relativo numero di pazienti positivi.

	4T score				Diagnosi di laboratorio HIT positiva n (%)	Totale n (%)
	Sospetto clinico senza 4T score n (%)	Bassa probabilità (0-3) n (%), media score)	Intermedia probabilità (4-5) n (%), media score)	Alta probabilità (6-8) n (%), media score)		
Range d'età (mediana)	-	-	-	-	-	20-97 (76)
Femmine	7 (0.1)	41 (52.6, 1.8)	24 (30.8, 4.4)	6 (7.7, 6)	2 (2.6)	78 (47.9)
Maschi	19 (22.3)	35 (41.2, 2.1)	25 (29.4, 4.4)	6 (7.1, 6)	3 (3.5)	85 (52.1)
Reparto						
Cardiologia	0	16 (61.5, 1.4)	8 (30.8, 4.25)	2 (23.1, 6)	1 (3.8)	26 (16.0)
Chirurgia	0	4 (50.2)	3 (37.5, 5)	1 (12.5, 6)	0	8 (4.9)
Chirurgia Vascolare	0	2 (50.2, 5)	2 (50.4)	0	0	4 (2.5)
COVID	0	1 (33.3, 2)	2 (66.6, 4)	0	0	3 (1.8)
Endocrinologia	0	12 (70.6, 2.3)	4 (23.5, 4.5)	1 (5.9, 6)	0	17 (10.4)
Esterno	26 (83.9)	1 (25.3)	3 (75.4, 3)	0	0	4 (2.5)
Medicina Interna	0	5 (16.1, 1.4)	0	0	2 (6.4)	31 (19.0)
Medicina d'urgenza	0	13 (59.1, 1.92)	7 (31.8, 4.6)	2 (9.1, 6)	0	22 (13.5)
Nefrologia	0	5 (50.1, 6)	3 (3.3)	2 (2.6)	0	10 (6.1)
Neurologia	0	2 (50.2, 5)	2 (50.4)	0	0	4 (2.5)
Otorinolaringoiatria	0	2 (100.0)	0	0	0	2 (1.2)
Ortopedia	0	1 (50.1)	0	1 (50.6)	1 (50)	2 (1.2)
Pneumologia	0	2 (50.1)	1 (25.5)	1 (25.6)	0	4 (2.5)
Rianimazione	0	3 (60.2)	2 (40.4)	0	0	5 (3.1)
Terapia Intensiva	0	4 (80.2, 5)	1 (20.5)	0	0	5 (3.1)
	0	5 (31.3, 2.4)	9 (56.3, 4.6)	2 (12.5, 6)	1 (6.2)	16 (9.8)
Eparina						
Eparina non specificata	24 (54.5)	17 (38.6, 1.1)	3 (6.8, 4.3)	0	2 (4.5)	44 (27)
Fondaparinux	2 (25)	4 (50.2, 5)	2 (25.4, 5)	0	0	8 (5)
Eparina a basso peso molecolare	0	38 (46.3, 2.4)	37 (45.1, 4.4)	7 (8.5, 6)	0	82 (50)
Eparina non frazionata	0	17 (58.6, 2.1)	7 (24.1, 4.3)	5 (17.2, 6)	3 (10.3)	29 (18)
Diagnosi di laboratorio HIT positiva n (%)	2 (9.6)	0	1 (2.4)	2 (1.7, 6)	-	5 (3.1)

Tabella 17: Suddivisione dei pazienti in base al reparto di provenienza, tipo di eparina e la positività alla malattia.

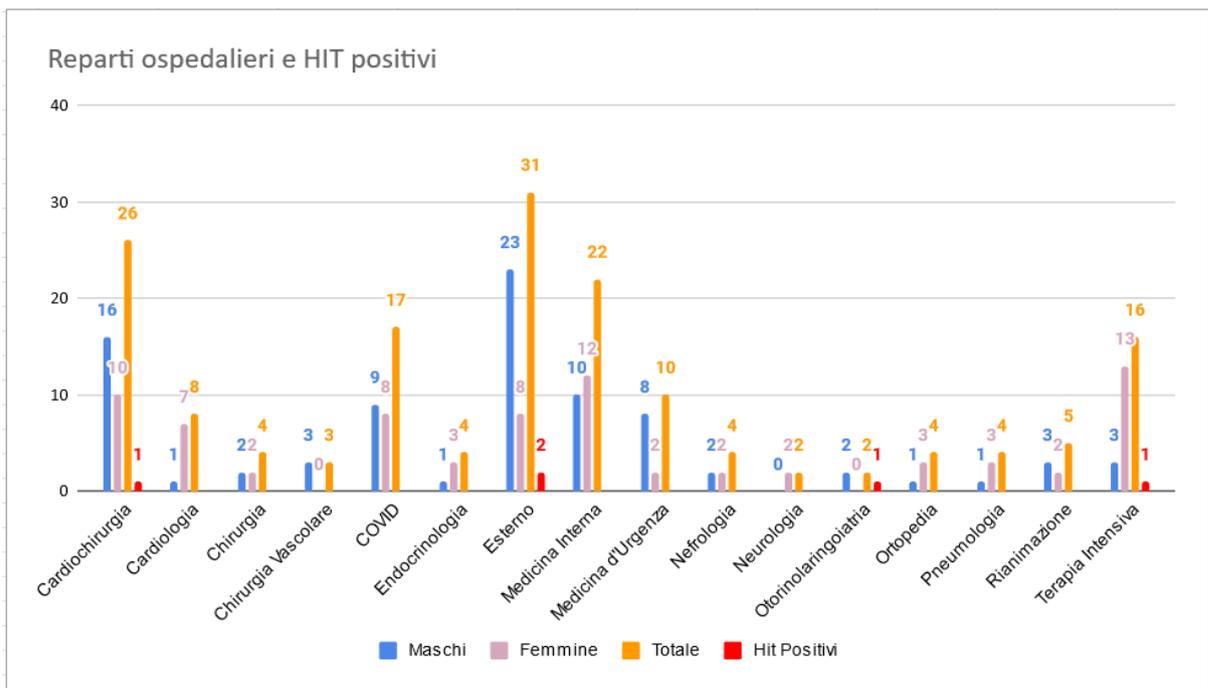


Grafico 18: Grafico a colonne che mostra la suddivisione dei pazienti in base al reparto di provenienza e la positività alla malattia.

I reparti con il maggior numero di richieste sono stati la cardiocirurgia con 26 (16%), la medicina interna con 22 (13,5%), il reparto COVID con 16 (10,4%) e la terapia intensiva con 16 richieste (9,8%).

Il 18% (29) dei pazienti hanno ricevuto ENF, il 50% (82) EBPM, il 5% (8) fondaparinux e il restante 27% (44) eparina non specificata in quanto provenienti da altri Ospedali (Grafico 19).

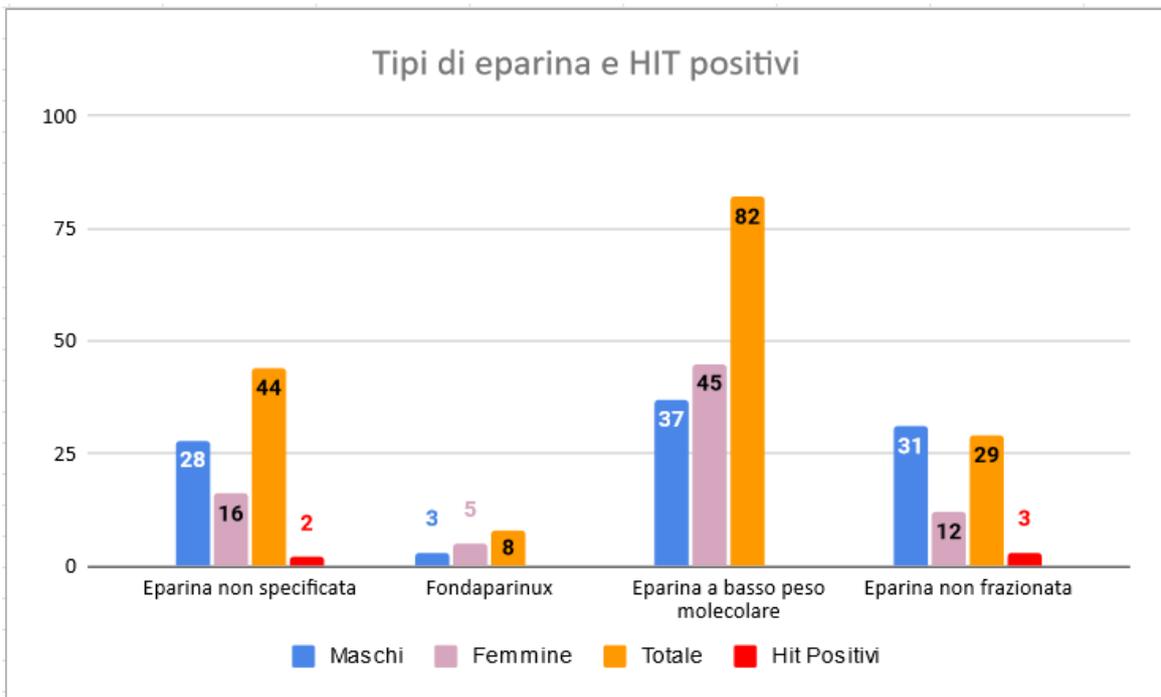


Grafico 19: Grafico a colonne che mostra la suddivisione dei pazienti in base al genere e al tipo di eparina con relativo numero di pazienti positivi.

Sulla base del calcolo della probabilità clinica del 4T score il 46,6% dei pazienti studiati (76 soggetti) è risultato avere un basso 4T score (score 0-3), il 30,1% (49 pazienti) uno score intermedio (score 4-5) e il 7,4% (12 pazienti) un alto 4T score (score 6-8). Il 16% (26 pazienti) dei pazienti studiati presentavano o un sospetto di HIT o 4T score non calcolabile. La media di tutti i 4T score è risultata pari a $3,15 \pm 1,7$.

55/163 (33%) pazienti sono risultati positivi al test immunologico rapido CliA (vedi Tabella 20). Dei 55 pazienti positivi al test immunologico CliA 23/55 presentavano 4T score basso, 16/55 intermedio, 2/55 alto e 14/55 un sospetto clinico o 4T score non calcolabile. Se analizziamo l'eparina

somministrata ai 55 pazienti positivi al test CliA: 21/55 avevano assunto EBPM, 10/55 ENF, 4/55 fondaparinux e di 20/55 pazienti non conoscevano l'eparina somministrata.

In accordo con il nostro algoritmo diagnostico basato sull'integrazione del pre-test clinico 4T score con l'uso combinato di due test immunologici, uno rapido il CliA ed il test gold standard per la ricerca degli anticorpi anti-eparina/PF4, l'ELISA, in 9 pazienti positivi al test immunologico rapido di screening CliA, con risultati ≥ 1 U/ml, abbiamo effettuato il test funzionale di conferma PAT. Di questi, 4/9 pazienti sono risultati positivi e quindi diagnosticati come affetti da HIT. Analizzando lo score clinico di questi pazienti, 1/4 presentava un 4T score intermedio, 2/4 un 4T score alto e 1/4 un sospetto clinico. Analizzando infine l'eparina somministrata ai pazienti positivi al test funzionale abbiamo osservato che a 3 pazienti su 4 è stata somministrata l'ENF e ad 1 paziente un tipo di eparina non specificata.

46/55 pazienti CliA positivi (28,2%) presentavano, invece, valori di anticorpi anti-eparina/PF4 in zona grigia (nel range compreso tra 0,13 e 1 U/ml) vedi Tabella 20. In tutti 46 pazienti con CliA in zona grigia abbiamo eseguito la ricerca degli anticorpi anti-eparina/PF4 con metodica ELISA. 36/46 (78%) sono risultati negativi al test ELISA. Di questi, 16/36 presentavano un 4T score basso, 12/36 un 4T score intermedio e 8/36 un sospetto clinico. A 5 pazienti CliA positivi ed ELISA negativi è stata somministrata l'ENF, a 19 l'EBPM, a 2 il fondaparinux e a 10 eparina non specificata.

Dei 10/46 (21,7%) pazienti CliA positivi in zona grigia e positivi al test ELISA, 5/10 presentavano uno score clinico 4T basso, 2/10 intermedio e 3/10 sospetto clinico. A tutti questi pazienti abbiamo effettuato il test di conferma funzionale PAT. Solamente 1/10 pazienti è risultato positivo al test funzionale di conferma, questo paziente assumeva eparina non specificata e presentava un sospetto clinico.

Il nostro algoritmo diagnostico basato sull'integrazione del pre-test clinico e di 2 test immunologici (ELISA e CliA) per la ricerca di anticorpi anti-eparina/PF4 ci ha quindi consentito di escludere il sospetto clinico di HIT in 144 su 163 pazienti (88%). Abbiamo dovuto effettuare solo 19/55 test funzionali di conferma e abbiamo evitato di dare risultati falsi negativi in 1/46 pazienti (vedi Tabella 20).

In accordo con quanto riportato in letteratura abbiamo osservato che 3/5 pazienti HIT positivi erano in terapia con ENF (Grafico 19). Di 2 di questi pazienti non conoscevamo la terapia eparinica in atto. È noto dalla letteratura che l'incidenza di HIT, nei pazienti in trattamento con ENF, aumenta di 10 volte rispetto ai pazienti in trattamento con EBPM [2], [4].

Sempre secondo dati della letteratura, i pazienti con risultati fortemente positivi ai test immunologici quantitativi ELISA (densità ottica elevata ai test ELISA >1,000 OD) e/o CliA (> 12,4 U/ml) sono quelli che hanno maggiore probabilità di essere positivi ai test funzionali. Alcuni lavori suggeriscono addirittura che non è necessario effettuare il test di conferma nei soggetti con

ELISA >1,000 OD o CliA > 12,40 U/ml. Inoltre Warkentin evidenzia come esista un sottogruppo di pazienti fortemente positivo ai test immunologici che risulta negativo a tutti i test funzionali della HIT compresi i test gold standard, pazienti che lui definisce “SRA negative HIT” [23].

Nei pazienti da noi studiati abbiamo osservato che solamente 2 dei 5 pazienti positivi al test funzionale avevano valori di CliA > 12,40 U/ml. Gli altri 3/5 avevano valori di CliA <12,4 U/ml ed ELISA <1,000 OD. Abbiamo anche osservato che 2 pazienti con CliA >12,4 U/ml e 2 pazienti con ELISA >1,000 OD sono risultati negativi al test funzionale di conferma PAT. Questi 4 pazienti avevano un 4T score basso. Sono quindi stati considerati, nonostante il 4T score basso, secondo quanto suggerito da Warkentin, “SRA negative HIT”.

Infine, una delle limitazioni principali dei test di conferma funzionali della HIT, è sempre stata, l’uso come controllo positivo del siero di un paziente affetto da HIT debolmente positivo. Il tutto, allo scopo di attestare la buona funzionalità delle piastrine del donatore e limitare il rischio di falsi negativi. A causa della bassa incidenza della patologia non è infatti sempre possibile reperire e processare il siero di questi pazienti come controllo positivo. L’utilizzo dell’anticorpo monoclonale di sintesi diretto contro il complesso PF4/eparina, il 5B9, ha dimostrato di essere, secondo quanto riportato in letteratura, un ottimo controllo interno positivo dei test funzionali di conferma della HIT.

Nello studio multicentrico di valutazione dell'efficacia come controllo positivo dell'anticorpo monoclonale 5B9, Pouplard et al., evidenziano come la maggior parte dei laboratori abbiano ottenuto risultati negativi del controllo positivo con il test PAT alle basse concentrazioni di anticorpo ($< 50 \mu\text{g/ml}$), cosa che non avveniva con i test funzionali gold standard SRA e HIPA. Di particolare interesse, quindi, che a differenza di quanto riportato in letteratura la nostra attenta selezione dei donatori (pazienti di gruppo zero che non avevano assunto nei 10 giorni precedenti farmaci e/o erbe medicinali antiaggreganti) ci abbia consentito di utilizzare basse concentrazioni di anticorpo come controllo positivo, così come avviene nei test gold standard di conferma della HIT (SRA e HIPA), e quindi di limitare il rischio di risultati falsi negativi [22].

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una reazione avversa all'eparina (sia ENF che EBPM.), potenzialmente fatale, mediata da meccanismo immunologico e caratterizzata da piastrinopenia associata ad una condizione di spiccata trombofilia. Il quadro clinico è causato dalla formazione di anticorpi di classe IgG che riconoscono un epitopo complesso formato dal PF4 di origine piastrinica e dall'eparina. Il legame dell'anticorpo al neoantigene PF4/eparina induce una marcata attivazione piastrinica che ha come conseguenza l'insorgenza di fenomeni trombotici sia venosi che arteriosi. La diagnosi si basa sulla valutazione della probabilità clinica pre-test ("4T" score: Trombocitopenia, Tempistica, Trombosi, nessuna altra causa che giustifichi il calo delle piastrine) e sull'identificazione, attraverso metodiche immunologiche e funzionali, degli anticorpi responsabili dell'attivazione piastrinica. Il 50% dei pazienti positivi al test immunologico non ha la HIT, infatti, questa patologia è confermata dall'individuazione di anticorpi patologici attivanti le piastrine, con il test di attivazione delle piastrine indotta dall'eparina o il rilascio della serotonina.

Una volta giunti alla diagnosi di HIT, è necessaria l'immediata sospensione della terapia eparinica e l'inizio di un trattamento anticoagulante non eparinico. Attualmente i farmaci approvati per il trattamento della HIT sono argatroban e danaparoide. Alternative ad essi sono rappresentate da bivalirudina e fondaparinux.

La HIT esordisce a tutte le età (>3 mesi), ma i casi pediatrici sono rari. La trombocitopenia moderata si manifesta in genere 5-10 giorni dopo la somministrazione di eparina. Se il paziente era già stato trattato con eparina nei 100 giorni precedenti, è possibile un esordio rapido, con una riduzione del numero delle piastrine dopo pochi minuti/ore dalla somministrazione di eparina. È possibile anche un esordio tardivo, con comparsa di trombocitopenia dopo l'interruzione dell'eparina. Di solito la trombocitopenia è asintomatica infatti le emorragie sono rare. La HIT si associa ad un rischio elevato di complicanze trombotiche (embolia polmonare, infarto miocardico, ictus trombotico), in particolare trombosi delle arterie degli arti e trombosi venosa profonda. Altre trombosi microvascolari possono causare cancrena venosa degli arti, che successivamente richiede la loro amputazione. Altre complicazioni sono la necrosi cutanea nei siti di iniezione dell'eparina e le reazioni anafilattoidi (febbre, ipotensione, dolore toracico, dispnea, arresto cardiorespiratorio), che possono insorgere dopo somministrazione di eparina in bolo per via endovenosa [4].

La prevalenza della HIT va dallo 0,1 al 5,0 % e varia considerevolmente in relazione a diversi fattori di rischio, relativi al paziente e al farmaco. L'incidenza è più alta nei pazienti che vengono trattati con eparina dopo operazioni o traumi (1-5 %). La condizione è rara nei pazienti trattati con dosi profilattiche di eparina (<1%) e ancora più rara nelle donne in

gravidanza (<0,1%). Il rischio di HIT è notevolmente superiore con eparina non frazionata, rispetto a quella a basso peso molecolare. Sono fattori determinanti l'origine dell'eparina (bovina > suina), la sua formulazione (non frazionata > basso peso molecolare > fondaparinux), la dose (profilattica > terapeutica > temporalizzata), la via di somministrazione (sottocutanea > endovenosa) e la durata della somministrazione (oltre 4 giorni > 4 giorni o meno). Le donne sembrano avere un rischio di HIT da 1,5 a 2 volte maggiore di quello degli uomini [7].

Nei 163 pazienti con sospetto di HIT da noi studiati confermiamo i dati della letteratura di maggiore incidenza della malattia nei pazienti trattati con eparina soprattutto non frazionata dopo operazioni o traumi, il maggior numero di richiesta di ricerca di anticorpi anti-eparina/PF4 infatti lo abbiamo avuto dal reparto di cardiocirurgia (26 richieste, 16%). Al contrario di quello che ci saremmo aspettati, abbiamo invece, osservato un basso numero di pazienti provenienti dal reparto di ortopedia (4 pazienti, 2,5%), il tutto probabilmente legato all'utilizzo dell'EBPM e non dell'ENF ed alla tipologia di interventi.

La gestione della HIT si basa su due pilastri: l'immediata interruzione del trattamento con eparina, da qui la necessità di una diagnosi rapida, e l'inizio di un trattamento anticoagulante alternativo.

Il sospetto clinico di HIT deve sempre essere confermato attraverso uno o più test di laboratorio specialistici test immunologici e funzionali. I test

immunologici anche se sono più sensibili, non essendo in grado di fornire informazioni sulla capacità delle immunoglobuline di attivare le piastrine, hanno bassa specificità, quindi se negativi anche se non completamente (nessun test immunologico ha sensibilità del 100%) possono ragionevolmente escludere il sospetto di HIT, mentre se positivi positivo necessitano sempre di un test di conferma funzionale.

I test funzionali che utilizzano metodi diversi per determinare l'eventuale attivazione o aggregazione delle piastrine, sono test complessi, di difficile esecuzione, che richiedono personale specializzato e che pertanto non sono disponibili in pochi laboratori.

Negli ultimi anni numerosi test rapidi immunologici per la ricerca di anticorpi anti-eparina/PF4 sono stati sviluppati, alcuni anche quantitativi. Questi hanno dimostrato che seppur con sensibilità e specificità inferiori rispetto al test gold standard per la ricerca degli anticorpi anti-eparina/PF4, l'ELISA, riescono a fornire risultati rapidi, entro 30 minuti dall'arrivo del campione in laboratorio, ed attendibili. Dati della letteratura inoltre riportano come, l'utilizzo combinato di più test rapidi integrato con lo score clinico di probabilità pre-test (approccio Bayesiano), offra l'opportunità di predire in maniera accurata la HIT e di ridurre sia i falsi negativi che i falsi positivi alla malattia e quindi, di ridurre il numero dei test funzionali di conferma da effettuare [2].

L'obiettivo del presente studio è stato quello di determinare se l'utilizzo di un algoritmo diagnostico che integri lo score clinico 4T con 2 test immunologici quantitativi per la ricerca degli anticorpi anti-eparina/PF4 IgG, il test rapido CliA (TAT inferiore ai 30 minuti) ed il test gold standard ELISA (approccio Bayesiano), consenta di ridurre al minimo i falsi negativi e i test funzionali di conferma.

Nei 163 pazienti consecutivi con sospetto clinico di HIT, il nostro algoritmo diagnostico ci ha consentito sulla base dei risultati del 4T score e del solo test rapido CliA di escludere in tempi rapidi (30 minuti) la malattia in 108/163 (66%) pazienti con CliA $<0,13$ U/ml e 4T score basso, medio, alto o sospetto clinico.

In 36/163 (22%) pazienti con risultati di CliA in zona grigia ($>0,13$ e <1 U/ml) e 4T score basso, medio, alto o sospetto clinico, a cui secondo algoritmo diagnostico abbiamo effettuato anche il test immunologico ELISA, abbiamo escluso la malattia sulla base del risultato negativo del secondo test immunologico quantitativo.

In 19/163 (12%) pazienti, 9 con valori di CliA >1 U/ml e 10 con valori di CliA in zona grigia e positivi anche al secondo test immunologico ELISA, tutti con valori di 4T score basso, medio, alto o sospetto clinico, abbiamo effettuato il test funzionale di conferma.

Solamente 5/19 dei pazienti a cui abbiamo fatto il test funzionale di conferma, 4 con valori di CliA > 1 U/ml e 4T score intermedio, alto o

sospetto clinico e 1 con valori di CliA in zona grigia e sospetto clinico, sono risultati positivi per la malattia.

Sulla base del nostro algoritmo diagnostico, quindi, nell'66% dei pazienti studiati con l'ausilio dello score clinico e di un test rapido e nel 22% dei pazienti con l'ausilio di un test immunologico rapido e di un secondo test immunologico quantitativo (ELISA), abbiamo escluso il sospetto clinico di HIT.

Nel 66% dei casi in tempi rapidissimi (30 minuti).

Abbiamo ridotto fortemente il numero di test funzionali di conferma da effettuare (12% dei pazienti studiati) ed abbiamo evitato di dare un risultato falso negativo in 1/163 pazienti (0.7%).

È noto dalla letteratura, inoltre, che i pazienti con risultati fortemente positivi ai test immunologici quantitativi ELISA (densità ottica elevata ai test ELISA $OD > 1,000$) e/o CliA ($> 12,4$ U/ml) sono quelli che hanno maggiore probabilità di essere positivi ai test funzionali. Nei 163 pazienti da noi studiati 2/163 (1,2%) pazienti che presentavano risultati di CliA $> 12,4$ U/ml ed ELISA $> 1,000$ OD e sono risultati negativi al test funzionale di conferma PAT. Entrambi i pazienti avevano un 4T score basso e sono quindi stati considerati, secondo quanto suggerito da Warkentin, "SRA negative HIT".

Sulla base di questi risultati possiamo utilizzare un algoritmo più stringente che ridurrebbe maggiormente il numero sia del secondo test immunologico sia del test funzionale. L'algoritmo decisionale (vedi Tabella 21) non

prevede l'esecuzione di ELISA e/o PAT per chi ha un valore di 4T score ≤ 3 e CliA in zona grigia ($>0,13$ e <1 U/ml). Infatti come prevedono le linee guida nazionali e internazionali non si dovrebbero eseguire test di ricerca anticorpi anti-eparina/PF4 in pazienti con 4T score ≤ 3 .

4T Score	CliA	ELISA	PAT
Bassa Probabilità ≤ 3	$\leq 0,13$	NO	NO
	$> 0,13 < 1$	NO	NO
	≥ 1	NO	SI
Intermedio-Alta Probabilità > 3	$\leq 0,13$	NO	NO
	$> 0,13 < 1$	$< 0,300$	NO
		$\geq 0,300$	SI
≥ 1	NO	SI	
Sospetto Clinico senza 4T Score	$\leq 0,13$	NO	NO
	$> 0,13 < 1$	$< 0,300$	NO
		$\geq 0,300$	SI
≥ 1	NO	SI	

Tabella 21- Algoritmo diagnostico stringente.

Se utilizzassimo questo algoritmo nei 163 pazienti presi in esame sulla base dei risultati del 4Tscore e del solo test rapido CliA escluderemmo la malattia in 108 pazienti con CliA $<0,13$ U/ml e 4T score basso, alto o sospetto clinico ed in 21 pazienti con CliA in zona grigia (>0.13 e <1 U/ml) e 4T score basso, per un totale di 129/163 pazienti (79%) in tempi rapidissimi (30 minuti). Per

giunta eviteremmo 21/46 (46%) di ELISA, come secondo test rapido e 5/19 (26%) di PAT, come test di conferma, evitando falsi negativi.

In conclusione la letteratura e le linee guida raccomandano per la diagnosi di HIT un approccio Bayesiano alla malattia, ovvero l'uso integrato di un pre-test clinico 4T score e di test immunologici e di conferma funzionali. I test immunologici devono ricercare gli anticorpi anti-eparina/PF4 di classe IgG e i test funzionali di conferma, devono dimostrare che le IgG anti-eparina/PF4 sono in grado di attivare le piastrine.

Questo nuovo algoritmo diagnostico che integra il 4T score, con 2 test immunologici quantitativi (il test rapido CliA IgG e il test gold standard ELISA IgG) e con il test funzionale di conferma PAT, ci ha consentito di escludere in tempi rapidissimo (30 minuti) il sospetto clinico di HIT nella maggior parte dei nostri pazienti (79%). Nel restante 12% dei pazienti con sospetto di HIT il clinico deve prendere le decisioni sulla base del suo giudizio individuale nell'attesa dei risultati del test immunologico ELISA e del test funzionale di conferma PAT disponibili in 48-72 ore. L'algoritmo, ci ha inoltre consentito di ridurre i test funzionali di conferma della HIT, test che soffrono di molte limitazioni dovute alla complessità, accessibilità ed alle condizioni preanalitiche e sono quindi appannaggio di pochi laboratori. In ultimo l'algoritmo diagnostico, ha evitato di fornire risultati falsi negativi in 1 su 163 pazienti.

6. RINGRAZIAMENTI

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. P. Reilly *et al.*, «Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through FcγRIIA», *Blood*, vol. 98, fasc. 8, pp. 2442–2447, ott. 2001, doi: 10.1182/blood.V98.8.2442.
- [2] A. Greinacher, «Heparin-Induced Thrombocytopenia», *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, fasc. 3, pp. 252–261, lug. 2015, doi: 10.1056/NEJMcp1411910.
- [3] T. E. Warkentin, «Autoimmune Heparin-Induced Thrombocytopenia», *J. Clin. Med.*, vol. 12, fasc. 21, p. 6921, nov. 2023, doi: 10.3390/jcm12216921.
- [4] R. Marcucci *et al.*, «Heparin induced thrombocytopenia: position paper from the Italian Society on Thrombosis and Haemostasis (SISSET)», *Blood Transfus.*, fasc. Blood Transfusion-1 2021 (January-February), pp. 14–23, dic. 2020, doi: 10.2450/2020.0248-20.
- [5] G. M. Arepally e D. B. Cines, «Pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia», *Transl. Res.*, vol. 225, pp. 131–140, nov. 2020, doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.014.
- [6] M. Franchini, G. M. Liumbruno, e M. Pezzo, «COVID-19 vaccine-associated immune thrombosis and thrombocytopenia (VITT): Diagnostic and therapeutic recommendations for a new syndrome», *Eur. J. Haematol.*, vol. 107, fasc. 2, pp. 173–180, ago. 2021, doi: 10.1111/ejh.13665.
- [7] T. E. Warkentin, «Platelet-activating anti-PF4 disorders: An overview», *Semin. Hematol.*, vol. 59, fasc. 2, pp. 59–71, apr. 2022, doi: 10.1053/j.seminhematol.2022.02.005.
- [8] T. E. Warkentin, J.-A. I. Sheppard, J. C. Moore, R. J. Cook, e J. G. Kelton, «Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia», *Blood*, vol. 113, fasc. 20, pp. 4963–4969, mag. 2009, doi: 10.1182/blood-2008-10-186064.
- [9] S. Bito *et al.*, «Mechanical prophylaxis is a heparin-independent risk for anti-platelet factor 4/heparin antibody formation after orthopedic surgery», *Blood*, vol. 127, fasc. 8, pp. 1036–1043, feb. 2016, doi: 10.1182/blood-2015-06-651620.
- [10] A. Lillo-Le Louet *et al.*, «Diagnostic score for heparin-induced thrombocytopenia after cardiopulmonary bypass», *J. Thromb. Haemost.*, vol. 2, fasc. 11, pp. 1882–1888, nov. 2004, doi: 10.1111/j.1538-7836.2004.00949.x.

- [11] T. E. Warkentin *et al.*, «Combination of two complementary automated rapid assays for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT)», *J. Thromb. Haemost.*, vol. 18, fasc. 6, pp. 1435–1446, giu. 2020, doi: 10.1111/jth.14794.
- [12] L. Rittener-Ruff, M. Marchetti, E. Matthey-Guirao, F. Grandoni, F. J. Gomez, e L. Alberio, «Combinations of rapid immunoassays for a speedy diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia», *J. Thromb. Haemost.*, vol. 20, fasc. 10, pp. 2407–2418, ott. 2022, doi: 10.1111/jth.15811.
- [13] N. Kumar, V. Uppal, J. Ahluwalia, P. Malhotra, N. Varma, e A. Jain, «Evaluation of STic Expert® HIT Kit and Its Comparison with ID-PaGIA™ Test in Suspected Heparin-Induced Thrombocytopenia», *Indian J. Hematol. Blood Transfus.*, vol. 35, fasc. 1, pp. 155–160, gen. 2019, doi: 10.1007/s12288-018-0996-z.
- [14] B. Tardy, T. Lecompte, F. Mullier, C. Vayne, e C. Pouplard, «Detection of Platelet-Activating Antibodies Associated with Heparin-Induced Thrombocytopenia», *J. Clin. Med.*, vol. 9, fasc. 4, p. 1226, apr. 2020, doi: 10.3390/jcm9041226.
- [15] I. Skornova *et al.*, «A Functional Assay for the Determination of Heparin-Induced Thrombocytopenia via Flow Cytometry», *Diagnostics*, vol. 13, fasc. 18, p. 3019, set. 2023, doi: 10.3390/diagnostics13183019.
- [16] C. Kizlik-Masson *et al.*, «5B9, a monoclonal antiplatelet factor 4/heparin IgG with a human Fc fragment that mimics heparin-induced thrombocytopenia antibodies», *J. Thromb. Haemost.*, vol. 15, fasc. 10, pp. 2065–2075, ott. 2017, doi: 10.1111/jth.13786.
- [17] T. E. Warkentin, «Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia», *Int. J. Lab. Hematol.*, vol. 41, fasc. S1, pp. 15–25, mag. 2019, doi: 10.1111/ijlh.12993.
- [18] M. Marchetti *et al.*, «Rapid and Accurate Bayesian Diagnosis of Heparin-induced thrombocytopenia», *Blood*, p. blood.2019002845, gen. 2020, doi: 10.1182/blood.2019002845.
- [19] A. Greinacher, K. Selleng, e T. E. Warkentin, «Autoimmune heparin-induced thrombocytopenia», *J. Thromb. Haemost.*, vol. 15, fasc. 11, pp. 2099–2114, nov. 2017, doi: 10.1111/jth.13813.
- [20] E. Jousselmanne *et al.*, «Prospective evaluation of two specific IgG immunoassays (HemosIL® AcuStar HIT-IgG and HAT45G®) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: A Bayesian approach», *Int.*

J. Lab. Hematol., vol. 43, fasc. 3, pp. 468–476, giu. 2021, doi: 10.1111/ijlh.13404.

[21] C. Pouplard, J. Amiral, J.-Y. Borg, S. Laporte-Simitsidis, B. Delahousse, e Y. Gruel, «Decision Analysis for Use of Platelet Aggregation Test, Carbon 14–Serotonin Release Assay, and Heparin–Platelet Factor 4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia», *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 111, fasc. 5, pp. 700–706, mag. 1999, doi: 10.1093/ajcp/111.5.700.

[22] C. Pouplard *et al.*, «Multicentre evaluation of 5B9, a monoclonal anti-PF4/heparin IgG mimicking human HIT antibodies, as an internal quality control in HIT functional assays: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Immunology», *J. Thromb. Haemost.*, vol. 20, fasc. 1, pp. 252–259, gen. 2022, doi: 10.1111/jth.15560.

[23] T. E. Warkentin, I. Nazy, J. I. Sheppard, J. W. Smith, J. G. Kelton, e D. M. Arnold, «Serotonin-release assay-negative heparin-induced thrombocytopenia», *Am. J. Hematol.*, vol. 95, fasc. 1, pp. 38–47, gen. 2020, doi: 10.1002/ajh.25660.