

**Heparinassoziierte Antikörper bei  
neurologisch erkrankten Patienten unter Thromboseprophylaxe mit  
niedermolekularem und unfractioniertem Heparin**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Andrea Waßmer geb. Kredtek  
aus Saarbrücken

2014

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Oldenburg
2. Gutachter: PD Dr. med. C. Hammerstingl

Tag der Mündlichen Prüfung: 2. August 2013

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. J. Oldenburg

Meinen Eltern gewidmet



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Chemische und biochemische Charakteristika von Heparin</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 Unfraktioniertes Heparin (UFH) und niedermolekulares Heparin (NMH) als Arzneistoff.....	9
1.1.2 Antikoagulatorische Wirkungsweise und Pharmakokinetik von Heparin .....	10
<b>1.2 Heparinassoziierte Antikörper (HA-AK) und das Krankheitsbild der     heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT)</b> .....	<b>12</b>
1.2.1 Begriffsbestimmungen und Definitionen .....	12
1.2.2 Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) .....	13
1.2.3 Inzidenz der HIT und der HA-AK .....	20
<b>1.3 Fragestellung</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Patienten, Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Patienten</b> .....	<b>24</b>
2.1.1 Therapie mit Heparin .....	24
2.1.2 Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien.....	25
2.1.3 Demographische Daten .....	26
2.1.4 Patientenexploration.....	28
2.1.5 Probanden .....	31
<b>2.2 Material</b> .....	<b>31</b>
2.2.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials .....	31
2.2.2 Diagnostisches Vorgehen im Rahmen der Studie.....	32
<b>2.3 Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.3.1 Labordiagnostik .....	34
2.3.2 Thrombozytenzählung.....	34
2.3.3 HPIA-ELISA .....	35
2.3.4 HIPA-Test.....	38
2.3.5 Statistische Auswertung .....	43
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 Antikörperinzidenz im HPIA-ELISA</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 Klinische Relevanz der HA-Antikörper</b> .....	<b>50</b>
3.2.1 HIT-Inzidenz im neurologischen Patientenkollektiv .....	50
3.2.2 HIPA-Testergebnisse .....	50
3.2.3 Thrombozytenabfall .....	51
3.2.4 Inzidenz thromboembolischer Ereignisse unter NMH- und UFH-Therapie .....	51
3.2.5 Korrelation von Thrombozytenzahl und Extinktion im HPIA-ELISA.....	53

<b>3.3 Einflussfaktoren auf die Antikörperinzidenz .....</b>	<b>55</b>
3.3.1 Vergleich der beiden Gruppen UFH- und NMH-Patienten.....	55
3.3.2 Einflussfaktoren auf die Antikörperentwicklung.....	59
<b>3.4 HAT (HIT I) unter NMH-Therapie .....</b>	<b>61</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Unterschiede in der Antikörperinzidenz bei NMH- und UFH-Patienten.....</b>	<b>63</b>
4.1.1 Einfluss von einzelnen Faktoren auf die Antikörperinzidenz .....	64
4.1.2 Primär antikörperpositive Patienten.....	68
<b>4.2 Vergleich mit Antikörperinzidenzen in der Literatur.....</b>	<b>69</b>
4.2.1 Prophylaxe mit NMH versus UFH und nicht-chirurgisches Patientenkollektiv .....	74
4.2.2 Prophylaxe mit NMH versus UFH und chirurgisches Patientenkollektiv .....	76
<b>4.3 HIT-Inzidenz .....</b>	<b>78</b>
<b>4.4 Klinische Aspekte .....</b>	<b>81</b>
<b>4.5 Einzelfalldarstellung.....</b>	<b>83</b>
<b>4.6 Aspekte zur klinischen Relevanz der Antikörper.....</b>	<b>84</b>
<b>4.7 HAT (HIT 1) .....</b>	<b>86</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>88</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACD-Puffer	Acidum-Citricum-Dextrose-Puffer
AK	Antikörper
AT	Antithrombin
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CPB	OP-Verfahren mit Verwendung eines kardiopulmonalen Bypass
EIA	Enzym-Immuno-Assay
g	Erdbeschleunigung
G/l	Giga pro Liter, Einheit für Thrombozytenzahl
HA-AK	Heparinassozierte Antikörper
HAT	Heparinassozierte Thrombozytopenie
HIT	Heparininduzierte Thrombozytopenie (synonym HIT II)
H/PF 4	Komplex aus Heparin und Plättchenfaktor 4
HIPA	Heparin-Induced Platelet Activation Assay
HPIA-ELISA	Heparin/Platelet Factor 4 Induced Antibodies Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IE	Internationale Einheiten
ITP	Immunthrombozytopenie
i.v.	Intravenös
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
M.	Morbus
M	Molar
µl	Mikroliter
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
NMH	Niedermolekulares Heparin
OD	Optical Density (optische Dichte), Einheit für Extinktion
PAT	Plättchenaktivierungstest
Pat.	Patient oder Patienten
PF 4	Plättchenfaktor 4
rpm	Rotationen pro Minute
PRP	Plättchenreiches Plasma
RCT	Randomized Controlled Trial (randomisierte klinische Studie)
RF	Risikofaktor
s.c.	Subkutan
SRA	Serotonin Release Assay (Serotonin-Freisetzungstest)
TIA	Transitorisch Ischämische Attacke
U/ml	Units pro Milliliter
UFH	Unfraktioniertes Heparin

## **1. Einleitung**

### **1.1 Chemische und biochemische Charakteristika von Heparin**

Seit den 1950er Jahren ist Heparin als wichtiges therapeutisches Agens in der Behandlung venöser und arterieller Thrombosen etabliert. Trotz der Entwicklung neuer Substanzen ist Heparin noch immer das am häufigsten verwendete Antikoagulans zur Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Prozesse bei ambulanten und stationären Patienten (Greinacher et al., 2003). Die Heparine bilden eine heterogene Klasse linearer, polysulfatierter, polyanionischer Mukopolysaccharide (Mutschler et al., 2001). Die einzelnen Ketten weisen große Unterschiede in Bezug auf ihre Länge (16-170 Monosaccharideinheiten) und ihr Molekulargewicht auf. Es liegt im Bereich von 3-50 Kilodalton (kDa) mit einer mittleren Molekülmasse von 15 kDa (Hirsh et al., 1998). Ferner bestehen auch große Unterschiede hinsichtlich der Sulfatierungsstellen und des Sulfatierungsgrades.

Den Grundbaustein dieser Glycosaminoglykane bildet ein aus Alpha-L-Iduronsäure und Alpha-D-Glucosamin bestehendes Disaccharid, welches in unregelmäßigen Abständen von N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure unterbrochen wird (Mutschler et al., 2001). Die beachtliche Größe und die repetitive Struktur sind dafür verantwortlich, dass das Heparinmolekül ein idealer Kandidat für die Bildung von Immunkomplexen ist (Warkentin und Kelton, 1990).

Das Heparinmolekül stellt eine der stärksten in der Natur vorkommenden organischen Säuren dar und ist das Glycosaminoglykan mit der größten negativen Ladungsdichte. Heparin ist auch ein körpereigenes Molekül und wird bei Menschen und Säugetieren in den Mastzellen von Lunge, Darm und -wie der Name sagt- in der Leber gebildet. Dort wird es in Granula zusammen mit Histamin gespeichert. Neben dem antikoagulatorischen Effekt hat Heparin auch die Eigenschaft, an verschiedene Plasmaproteine und an Zelloberflächen zu binden, so dass es auch zu nicht immunologischen Wechselwirkungen kommen kann (Greinacher, 1999). Hier sind insbesondere die Interaktionen mit Thrombozyten und Endothelzellen zu nennen. Im Endothel bewirkt Heparin die Synthese von antikoagulatorisch wirksamem Heparansulfat sowie die Freisetzung von Tissue Factor Pathway Inhibitor und eine erhöhte fibrinolytische Aktivität durch Freisetzung von Tissue Plasminogen Activator (Mani und Lindhoff-Last, 2006). Die Heparinbindung an Thrombozyten hängt vom Sulfatierungsgrad, vom Molekulargewicht des Stoffes sowie vom Grad der Thrombozytenaktivierung ab (Horne, 1993; Greinacher et al., 1993).

Plättchenfaktor 4 (PF 4), welcher als Plasmaprotein und auf der Thrombozytenoberfläche vorkommt, ist das Protein mit der höchsten Affinität für Heparin aufgrund seiner positiv geladenen Lysinreste (Horne und Hutchinson, 1998). Durch Bindung an PF 4 wird die Heparinwirkung aufgehoben (Mani und Lindhoff-Last, 2006). Unfraktioniertes Heparin (UFH) führt nachweislich zu einer direkten Thrombozytenaggregation (Salzman et al., 1980). Die Wirkung von niedermolekularem Heparin (NMH) in Bezug auf eine direkte Thrombozytenaggregation wird kontrovers diskutiert. Sie ist abhängig von Dosis und Molekulargewicht und tritt in geringerem Umfang auf als bei UFH (Brace und Fareed, 1990; Burgess und Chong, 1997; Salzman et al., 1980).

### **1.1.1 Unfraktioniertes Heparin (UFH) und niedermolekulares Heparin (NMH) als Arzneistoff**

Rohheparin zur Arzneistoffherstellung wird aus tierischen Quellen gewonnen, in Mitteleuropa vorwiegend aus den Mastzellen der Mukosa von Schweinedünndarm und zu einem geringeren Teil auch aus dem Lungengewebe von Rindern (Lüllmann und Mohr, 1999). Die tierischen Organe werden homogenisiert, die Glykosaminoglykane werden extrahiert und dann partiell gereinigt. Konsequenterweise sind Heparinpräparationen polydispers und enthalten kontaminierende Substanzen (Warkentin und Kelton, 1990).

Für hochmolekulares Arzneistoffheparin wird auch die Bezeichnung unfraktioniertes Heparin (UFH) verwendet. Diese Bezeichnung leitet sich ab aus der Herstellung und wurde zur Abgrenzung gegen das niedermolekulare Heparin eingeführt. Die Herstellung der niedermolekularen Heparine (NMH) erfolgt aus hochmolekularem (entspricht unfraktioniertem) Heparin (UFH). Dafür werden prinzipiell zwei Verfahren angewendet: die Fragmentierung und die Fraktionierung. Bei der Fragmentierung werden die hochmolekularen Ketten des Rohheparins durch chemische oder enzymatische Depolymerisation zerkleinert. Als Mittel werden hierbei unter anderem Heparinase, schweflige Säure, Perjodat, salpetrige Säure und Wasserstoffperoxid eingesetzt. Bei der Fraktionierung wird Rohheparin durch mehrfache Alkoholfällung in hochmolekulare und niedermolekulare Heparinmoleküle getrennt. Dadurch entstehen bei beiden Verfahren Arzneimoleküle mit einem mittleren Molekulargewicht von nur 5 kDa und einem Molekulargewichtsbereich von 1-10 kDa. Die Moleküle weisen eine Kettenlänge von 5-17 Monosacchariden auf. Die Herstellungsverfahren sind präparatspezifisch und je nach Hersteller verschieden.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Arzneistoff handelt es sich um Nadroparin-Calcium (Fraxiparin<sup>®</sup>, Sanofi-Synthelabo, Berlin). Bei der Produktion des verwendeten Nadroparin-Calcium (Fraxiparin<sup>®</sup>) wird nach Herstellerangaben in Gebrauchs- und Fachinformation zunächst durch eine Alkoholfällung hochmolekulares von niedermolekularem Heparin getrennt. Das niedermolekulare Heparin liegt zunächst als Natriumsalz vor. Nach mehrfachen Ethanol-fällungen schließt sich eine Chromatographie an und das Produkt wird in ein Calciumsalz umgewandelt. Es entsteht der Rohstoff Nadroparin (Fraxiparin<sup>®</sup>), ein niedermolekulares Heparin mit einem mittleren Molekulargewicht von 4,5 kDa.

### **1.1.2 Antikoagulatorische Wirkungsweise und Pharmakokinetik von Heparin**

Die antithrombotische Wirkung von Heparin wurde in den Vierzigerjahren des letzten Jahrhunderts entdeckt. Für die pharmakologische Wirkung ist eine Pentasaccharidsequenz aus Iduronsäure, Glucosamin und Glucuronsäure verantwortlich, welche in 1-4-glykosidischer Bindung verknüpft ist. Diese Sequenz ist bei etwa einem Drittel der natürlich vorkommenden Heparinketten vorhanden (Hirsh und Weitz, 1999; Mani und Lindhoff-Last, 2006). Die wesentliche Wirkung auf das Gerinnungssystem besteht in der Aktivierung des körpereigenen Glykoproteins Antithrombin (AT), das seinerseits Serinproteasen wie Thrombin (= Faktor IIa) oder Faktor Xa inhibiert. Dieser Vorgang läuft unter physiologischen Bedingungen sehr langsam ab. Nach Bindung von Heparin an AT kommt es in der Folge zu einer Konformationsänderung von AT. Hierdurch wird die Bindung von AT an Thrombin und Faktor Xa und ihre Inhibition dramatisch (um den Faktor 1000) beschleunigt (Gürtler et al., 2006). Unfraktioniertes Heparin wirkt etwa gleichstark auf Faktor Xa und Thrombin, also im Verhältnis 1:1 (Korte, 2006). Der Heparin-Antithrombinkomplex wirkt auch hemmend auf die Faktoren IX, XI und XII und auf die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin (Gürtler et al., 2006).

Neben AT existiert noch ein zweiter heparinabhängiger Inhibitor von geringerer Bedeutung. Es handelt sich um Heparinkofaktor II. Dieser kann nur Thrombin hemmen, der Wirkeintritt wird durch höheres Molekulargewicht und höhere Heparindosierung beschleunigt (Mani und Lindhoff-Last, 2006).

#### ***Wirkung und Pharmakokinetik von niedermolekularem Heparin (NMH)***

Seit den 1980er Jahren werden NMH-Präparationen entwickelt. Wie UFH entfaltet NMH seine Wirkung durch Katalysierung der Aktivität von AT. Nur etwa ein Drittel des Heparinmoleküls

enthält die dafür bedeutsame Pentasaccharidstruktur (Mani und Lindhoff-Last, 2006; Weitz, 1997). UFH und NMH unterscheiden sich trotz ihrer ähnlichen Wirkmechanismen in ihrer relativen inhibitorischen Aktivität gegen Faktor Xa und Thrombin. Hierbei kommt es bei NMH und UFH mit abnehmendem Molekulargewicht zu einer Abnahme der Thrombinhemmung und einer Zunahme bzw. einem Konstantbleiben der Anti-Faktor-Xa-Aktivität. Dies ist darin begründet, dass die AT-vermittelte Inaktivierung von Thrombin die Formation eines ternären Heparin-Thrombin-Antithrombin-Komplexes erfordert. Dieser Komplex kann nur von Molekülen mit einer Kettenlänge von wenigstens 18 Monosaccharideinheiten gebildet werden (Homer et al., 1986, Mani und Lindhoff-Last, 2006). Die Anti-Faktor-Xa- zu Anti-Faktor-IIa-Wirkung liegt bei NMH je nach Substanz in einem Verhältnis von 2:1 bis 4:1 (Korte, 2006). Hierbei hemmen Moleküle mit mindestens 18 Monosaccharideinheiten Faktor Xa und Thrombin; Moleküle mit 5-18 Monosaccharideinheiten hemmen fast ausschließlich den Faktor Xa. Ein Molekül mit weniger als 5 Monosaccharideinheiten hat –wegen des pentasaccharidvermittelten Wirkmechanismus- fast keine gerinnungshemmende Wirkung (Homer et al., 1986).

Die Vorteile von NMH liegen in einem tierexperimentell nachgewiesenen, günstigen Nutzen-Risiko-Verhältnis in Bezug auf Blutung/Thrombose und in der verbesserten Pharmakokinetik. Eine gegenüber UFH bessere Bioverfügbarkeit, eine vorhersagbare und stabile Dosis-Wirkungsbeziehung und damit verbunden eine verminderte Notwendigkeit der Therapieüberwachung sowie eine längere Plasmahalbwertszeit sind hier zu nennen (Hirsh et al., 1998). Die Bioverfügbarkeit von NMH beträgt nach subkutaner Anwendung über 90 % im Vergleich zu etwa 20-30 % für UFH (Weitz, 1997). Die Eliminierung von NMH verläuft dosisunabhängig und fast gänzlich renal. Die Eliminierung von UFH verläuft hingegen dosisabhängig in zwei Phasen. Es existieren eine schnelle hepatische und eine langsame renale Phase.

Die Vorteile von NMH sind am ehesten auf die verminderten unspezifischen Bindungen zurückzuführen. Die geringe Bindung an Plasmaproteine führt zu einer besseren Vorhersagbarkeit der Dosis-Wirkungsbeziehung, weniger Bindung an Makrophagen und Endothelzellen und zu einer längeren Plasmahalbwertszeit. Die verminderte Bindung an Thrombozyten und PF 4 ist möglicherweise für eine geringere HIT-Inzidenz verantwortlich (Hirsh und Weitz, 1998).

Für das in der vorliegenden Studie verwendete Nadroparin-Calcium (Fraxiparin<sup>®</sup>, Sanofi Synthelabo) liegt das Verhältnis von Anti-Xa- zu Anti-Thrombin-Wirkung bei 3,6:1. Dies

entspricht einer 3,6-fach höheren Affinität zu Faktor Xa als zu Thrombin (Weitz, 1997).

Die Festlegung auf das Präparat Fraxiparin® erfolgte einerseits wegen der einfach durchführbaren Körpergewichtsadjustierung und war andererseits auch dadurch begründet, dass diese Substanz zum Studienzeitpunkt das breiteste Zulassungsspektrum aufweisen konnte.

## **1.2 Heparinassoziierte Antikörper (HA-AK) und das Krankheitsbild der heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT)**

### **1.2.1 Begriffsbestimmungen und Definitionen**

Im Themenbereich HIT existiert eine historisch gewachsene, heute nur noch teilweise gebräuchliche Nomenklatur. Ferner bemüht man sich seit Jahren um gültige, aktuelle und klinisch nutzbare Definitionen. Hier sind insbesondere die Arbeiten von Warkentin und Greinacher zu nennen (Warkentin et al., 1998; Warkentin, 1999).

Man unterscheidet in der Literatur zwei Formen der heparininduzierten Thrombozytopenie, welche als HIT Typ I und II benannt wurden (Chong et al., 1982, Chong und Berndt 1989). Diese Bezeichnung zweier im Grunde sehr unterschiedlicher Entitäten kann für Verwirrung sorgen.

#### HIT I

Unter HIT I versteht man eine nicht immun vermittelte, milde passagere Thrombozytopenie, welche zwischen Tag 1 und Tag 5 der Heparintherapie auftritt (Greinacher, 1999). Diese bedarf keiner spezifischen Behandlung. Die Thrombozytenzahl normalisiert sich meist innerhalb von 3 Tagen trotz fortgesetzter Heparintherapie. Eine Umstellung der Therapie oder Beendigung der Heparinisierung ist nicht indiziert, denn bei einem Therapieabbruch besteht die Gefahr thromboembolischer Komplikationen durch die herkömmlichen Risikofaktoren (z.B. Immobilisation). Heute wird für diese Entität auch die Bezeichnung nicht immun vermittelte, heparinassoziierte Thrombozytopenie (HAT) benutzt (Warkentin et al., 1998).

Die Pathogenese ist nicht abschließend aufgeklärt. Wahrscheinlich ist eine direkte Heparin-Thrombozyteninteraktion mit proaggregatorischem Effekt die Ursache (Burgess und Chong, 1997). Es handelt sich um eine Ausschlussdiagnose; Labortests stehen nicht zur Verfügung.

#### HIT II

Die heparininduzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II), heute auch nur „HIT“ genannt, ist die gefährlichste unerwünschte Wirkung des Arzneistoffes Heparin. Dieses Antikoagulans induziert hierbei paradoxerweise einen prothrombotischen Zustand, der mit arteriellen und venösen

Thrombosen und Thromboembolien einhergehen kann. Dieses Krankheitsbild wird durch Antikörper vermittelt und weist einen autoimmunen Charakter auf.

Heute und zum Planungszeitpunkt der vorliegenden Arbeit ist die HIT als ein klinisch-pathologisches Syndrom definiert, welches typischerweise durch das klinische Bild mit Thrombozytopenie und häufig thromboembolischen Ereignissen sowie das Vorliegen von Antikörpern charakterisiert ist. (Greinacher, 1999; Warkentin, 1999). Im folgenden Kapitel wird dieses Krankheitsbild näher erläutert.

## **1.2.2 Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT)**

### **1.2.2.1 Geschichte der HIT**

Das Paradox von Heparin als Thromboseursache wurde erstmals von Weismann und Tobin (1958) beschrieben. In ihrer Publikation wurde über das Auftreten arterieller Thrombosen im Zusammenhang mit systemischer Heparintherapie bei zehn Patienten berichtet. Im Lauf der folgenden 15 Jahre konnten weitere Fälle identifiziert werden (Roberts et al., 1964). Schließlich bestätigte sich die von Roberts et al. (1964) vermutete Ursache. Ein zugrunde liegender immunologischer Mechanismus wurde entdeckt, welcher mit Thrombozytopenie und einem Zustand der Hyperkoagulabilität einhergeht (Rhodes et al., 1973; Rhodes et al., 1977). Weitere wegweisende Schritte waren die Identifizierung des Antigens Heparin-Plättchenfaktor 4 (H/PF 4) von Amiral et al. (1992) und die Entwicklung von Labortests zum Nachweis der Antikörper, zunächst von Fratantoni et al. (1975) und später von Sheridan et al. (1986) und Greinacher et al. (1991).

### **1.2.2.2 Pathogenese der HIT**

Im Zentrum der Pathogenese steht bei dem Krankheitsbild HIT die Bildung heparinassoziierter Antikörper, die in vielen Fällen thrombozytenaktivierende Eigenschaften aufweisen. Diese können zu thromboembolischen Komplikationen führen. Blutungskomplikationen wie bei anderen medikamenteninduzierten Thrombozytopenien sind bei der HIT die Ausnahme. HIT wird durch Heparinbehandlung getriggert und durch Antikörper (typischerweise IgG) gegen einen Komplex aus Plättchenfaktor 4 (PF 4) und Heparin vermittelt. Dieser Prozess verläuft in mehreren Stufen:

### 1. Bindung von Heparin und PF 4

Grundlage für die Induktion der Immunreaktion sind zunächst nicht immunologisch bedingte Interaktionen zwischen Heparin und Thrombozyten (Greinacher, 1995). PF 4 ist ein basisches Protein, welches im Blut zirkuliert. Es wird in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert und kann infolge von Plättchenaktivierung auf der Oberfläche von Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert werden (Levy und Hursting, 2007). Das stark negativ geladene Heparin hat eine hohe Affinität für PF 4.

### 2. Exposition des Neoantigens und Antikörperinduktion

Nach der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung mit Exposition von Neoantigenen. Hierdurch wird ein Autoantigen exponiert, welches eine Antikörperbildung (HA-AK) induziert (Amiral et al., 1992; Amiral et al., 1995; Greinacher et al., 1994; Visentin et al., 1994). Diese Antikörper erkennen nicht benachbarte, konformationelle Epitope, die gebildet werden, wenn 4-8 Moleküle PF 4 durch Heparin gebunden werden (Horsewood et al., 1996; Suh et al., 1998).

Interessanterweise liegen die Antikörperbindungsstellen dabei, wie mittlerweile bekannt ist, eher auf PF 4 als auf Heparin selbst bzw. einem zusammengesetzten Antigen (Li et al., 2002).

PF 4 ist das wichtigste Antigen der HIT. Es wurden bei HIT-Patienten allerdings auch Antikörper gegen Interleukin 8 und Neutrophilen-aktivierendes Peptid 2 identifiziert (Amiral et al., 1996a).

### 3. Thrombozytenaktivierung

Die PF 4/Heparin-Komplexe bilden eine Kette aus repetitiven Antigenen. Diese können gleichzeitig mehrere HA-Antikörper binden und es entstehen PF 4/Heparin/Antikörper-Immunkomplexe (Thiele et al., 2010). Dabei sind manche HA-Antikörper fähig, Thrombozyten mit Hilfe von deren Fc $\gamma$ Ia-Rezeptoren zu aktivieren. Dass der Prozess der Plättchenaktivierung vom Fc $\gamma$ Ia-Rezeptor abhängig ist, wurde erstmals von Kelton et al. (1988) berichtet. Auf der Thrombozytenoberfläche formen PF 4 und UFH große, stabile Komplexe, welche wahrscheinlich die Fähigkeit der Antikörper vergrößern, die Fc $\gamma$ Ia-Rezeptoren zu besetzen und quer zu vernetzen. Diese Vernetzung führt zur intravasalen Thrombozytenaktivierung und Aggregation (Chong et al., 1989; Denomme et al., 1997; Kelton et al., 1988; Thiele et al., 2010).

### 4. Entstehung eines prokoagulatorischen Syndroms

Wenn die Thrombozyten aktiviert werden, setzen sie prothrombotische Mikropartikel frei. Bei gleichzeitiger Aktivierung der Gerinnungskaskade auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten und der thrombozytären Mikropartikel entsteht Thrombin (Thiele et al., 2010). In der Folge kommt es zu exzessiver Thrombingenerierung, welche Thrombosen induziert.

Intravasale Plättchenaggregation, Plättchenverbrauch, Thrombozytopenie und Thrombose sind die Folgen (Chong et al., 1989). Weitere Prozesse, die den prothrombotischen Zustand einer HIT begünstigen, sind Interaktionen zwischen Immunkomplexen und Monozyten. Die PF 4/ Heparin/IgG-Komplexe aktivieren außerdem Monozyten und indirekt neutrophile Granulozyten, wobei Aggregate entstehen, die aus Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten bestehen und die Thrombinbildung weiter verstärken: HA-Antikörper können ferner Endothelzellen aktivieren, welche dann Gewebefaktor exprimieren, der wiederum die Thrombinbildung verstärkt (Pouplard et al., 2001; Thiele et al., 2010). Es kommt zu einem prokoagulatorischen Syndrom, welches zu einem komplikationsreichen klinischen Bild führen kann.

Es ist davon auszugehen, dass bei einer NMH-Therapie weniger immunogene H/PF 4- Komplexe gebildet werden (Fondu, 1995), da keine äquimolaren Konzentrationsverhältnisse erreicht werden. Ob ein HIT-Antigen entsteht ist ferner auch von der Kettenlänge des Heparins abhängig (Greinacher et al., 1995; Greinacher et al., 2008). Bei länger-kettigen Heparinen können sich größere H/PF 4-Komplexe ausbilden, welche entsprechend mehr Antikörper binden können; grosse Immunkomplexe können mehr Fc $\gamma$ IIa -Rezeptoren vernetzen (Thiele et al., 2010; Warkentin et al., 2007).

Ein weiterer Aspekt ist die verminderte Affinität von NMH zu Plasmaproteinen wie PF 4, aber auch zu Thrombozyten und Endothelzellen (Horne, 1993; O'Brian et al., 1985; Turpie, 1996). Daher entstehen weniger multimolekulare Komplexe und es kommt in der Folge seltener zur Induktion einer Immunreaktion. Die beschriebenen großen, stabilen Komplexe auf der Thrombozytenoberfläche formieren sich mit PF 4 und NMH nur begrenzt, und überhaupt nicht mit dem Pentasaccharid Fondaparinux (Levy und Hursting, 2007).

### **1.2.2.3 Klinisches Bild der HIT**

Die HIT wird charakterisiert durch eine Abnahme der Thrombozytenzahl, durch neu auftretende thromboembolische Ereignisse und das Vorliegen heparinassoziierter Antikörper (Greinacher, 1999). Die klinischen Manifestationen der HIT entwickeln sich typischerweise 5-14 Tage nach Beginn der Heparintherapie (Warkentin und Greinacher, 2004; Warkentin und Kelton 2001b, Greinacher, 1999).

Wird das Krankheitsbild nicht korrekt diagnostiziert und therapiert, können die Folgen für den betroffenen Patienten katastrophal sein: Lungenembolien, ischämische Hirninsulte,

Myokardinfarkte, Amputationen von Extremitäten und Tod sind mögliche Komplikationen.

#### a) Thrombozytopenie

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Thrombozytenabfall auf unter 120 G/l oder um mehr als 50 % des Ausgangswertes als signifikant bewertet. Die Definition Thrombozytenzahl <150 G/l oder ein Thrombozytenabfall von  $\geq 50$  % des Ausgangswertes gilt heute als allgemein übliches Kriterium eines Thrombozytenabfalls bei HIT (Warkentin et al., 1995; Warkentin et al., 1998). In der aktuellen britischen Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der HIT wird sogar ein Thrombozytenabfall um 30% als verdächtig bewertet, der allerdings zu einem typischen Zeitpunkt von Tag 4 – Tag 14 auftreten muss (Watson et al., 2012).

Hierbei liegen die Thrombozytenzahlen meist um die 100 G/l, selten unter 30 G/l (Lo et al., 2006); allerdings wurden (vor allem bei später Diagnosestellung) auch HIT-Fälle mit massiver Thrombozytopenie und HIT-Fälle mit nur geringgradig erniedrigten oder normalen Thrombozytenzahlen beschrieben (Hach-Wunderle, 1997). Aus diesen Gründen ist es von großer Bedeutung vor einer Heparintherapie einen Thrombozytenausgangswert zu bestimmen (Watson et al., 2012).

Thrombozytopenien treten häufig auf, es gilt, die Differentialdiagnose zu bedenken. Die Differentialdiagnose der Immunthrombozytopenie lautet nach der Leitlinie von Matzdorff et al. (2010), herausgegeben von der Deutschen Fachgesellschaft für Hämatologie und Onkologie, wie folgt:

- Pseudothrombozytopenie (EDTA-Thrombozytopenie)
- Hereditäre Thrombozytopenie
- Medikamenteninduzierte Thrombozytopenie
- Zytostatikainduzierte Thrombozytopenie
- Virustatikainduzierte Thrombozytopenie
- Posttransfusionelle Purpura
- Schwangerschaftsassozierte Thrombozytopenie
- Lymphom
- Infektionen (Viren, Bakterien, Parasiten)
- Lebererkrankungen
- Alkoholabusus
- Sarkoidose

- Vitaminmängel (B12, Folsäure, auch schwerster Eisenmangel)
- Autoimmunerkrankungen
- Evanssyndrom
- Hämatologische Systemerkrankungen (akute Leukämie, myeloproliferative Syndrome, Myelodysplasie, Plasmozytom, Lymphome, variables Immundefektsyndrom (CVID), autoimmunlymphoproliferatives Syndrom, aplastische Anämie, paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie, Graft versus Host Erkrankung)
- Thrombotisch thrombozytopenische Purpura und Hämolytisch Urämisches Syndrom
- Verbrauchskoagulopathie
- Große Hämangiome (z.B. Kasabach-Merritt-Syndrom)

### b) Thrombose

Thromboembolische Ereignisse treten häufig vergesellschaftet mit abnehmender Thrombozytenzahl auf, dies ist jedoch nicht zwingend der Fall (Greinacher, 1999).

Paradoxerweise treten bei der HIT nur selten Blutungen, aber häufig thromboembolische Komplikationen mit Gefäßverschlüssen auf. Die Thrombosen und Embolien entwickeln sich meist gleichzeitig oder kurz nach dem Thrombozytenabfall, das Ereignis kann einem Thrombozytenabfall jedoch auch vorausgehen (Thiele et al., 2010). Am häufigsten sind in beiden Stromgebieten die Bein Gefäße betroffen; venöse Thrombosen und Lungenembolien sind häufiger als arterielle Verschlüsse (Warkentin und Kelton, 1996). Das Verhältnis venöser zu arteriellen Thrombosen beträgt 4:1 (Kelton, 2005). Etwa 25 % der HIT-Patienten erleiden eine Lungenembolie (Warkentin, 2007a). Andere mögliche Lokalisationen von Thrombosen sind die Beinarterien, die Koronarien oder wie Pohl et al. (1999) berichten die Hirngefäße. Auch Sinusvenenthrombosen und Mesenterialgefäßverschlüsse sind exemplarisch zu nennen. Prinzipiell kann jede Gefäßstrombahn betroffen sein, besonders betroffen sind Gefäßareale mit einer vorbestehenden Endothelschädigung jedweder Art. Diese kann iatrogen (z.B. zentrale Venenverweilkanüle) oder endogen (arteriosklerotischer Plaque) sein. Wie Thiele et al. (2010) berichten, sollte hier auch besonders eine untypische Thromboselokalisation im Zusammenhang mit Heparintherapie als sehr verdächtig angesehen werden. Erfreulicherweise konnten durch die frühzeitige Diagnose und neue Therapieoptionen Mortalität und Amputationsrate signifikant gesenkt werden (Farner et al., 2001). Die Letalität liegt jedoch bei Eintreten einer arteriellen Thrombose bei 20 % (Gürtler et al., 2006).

### c) Andere Komplikationen

Hier sind in erster Linie Hautveränderungen und Bolusreaktionen zu nennen. Bei ca. 10-20 % der HIT-Patienten sind Hautläsionen an den subkutanen Injektionsstellen beschrieben, wie etwa schmerzhafte, lokale erythematöse Hautplaques oder eine Hautnekrose im Bereich der subkutanen Injektionsstelle (Warkentin, 1996; Warkentin, 2005). Hierbei sind Hautnekrosen mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer HIT assoziiert, während in einer neueren Arbeit erythematöse Hautläsionen unter NMH-Therapie immer einer allergischen Reaktion vom Spättyp (Typ IV) zuzuordnen waren (Schindewolf et al., 2010). Nach Gabe eines intravenösen Heparin-Bolus kann es zu einer akuten systemischen Reaktion kommen. Diese kann inflammatorischer, kardiopulmonaler, gastrointestinaler oder neurologischer Art sein und ein vielfältiges Erscheinungsbild aufweisen (Warkentin, 2007a; Warkentin, 2007b).

Da die Leitsymptome Thrombozytopenie und Thrombose nicht spezifisch für eine HIT sind, ist es wichtig auch andere Spezifika zu berücksichtigen wie den Zeitpunkt und das Ausmass des Thrombozytenabfalls, um Patienten mit hohem Risiko für eine HIT zu identifizieren (Thiele et al., 2010). Das hierzu entwickelte Score-System nach Lo et al. (2006) wird als 4-T-Test bezeichnet und beinhaltet folgende Aspekte: das Ausmaß der Thrombozytopenie, den Zeitpunkt des Thrombozytenabfalls, das Auftreten von Thrombosen oder anderen Folgeerscheinungen sowie das Vorliegen anderer Gründe für eine Thrombozytopenie. Die einzelnen Aspekte werden in 3 Kategorien eingeteilt und mit Punkten belegt. Die höchste Punktzahl (und damit die höchste HIT-Wahrscheinlichkeit) erzielt ein Patient mit einem Thrombozytenabfall  $>50\%$  und einem Nadir  $\geq 20$  G/l, welcher zwischen Tag 5 und Tag 10 auftritt (oder bei Heparinexposition innerhalb der letzten 30 Tage binnen eines Tages); ferner wird das Auftreten einer gesicherten Thrombose oder einer Bolusreaktion und das Fehlen anderer plausibler Gründe für einen Thrombozytenabfall mit der höchsten Punktzahl belegt. Ein geringer Thrombozytenabfall  $<30\%$  oder ein Nadir von  $<10$  G/l ein Thrombozytenabfall innerhalb der ersten 4 Tage (ohne vorausgegangene Heparinexposition in den letzten 30-100 Tagen) sowie das Fehlen von Thrombosen oder einer systemischen Reaktion und das Vorliegen anderer plausibler Gründe für einen Thrombozytenabfall werden mit der geringsten Punktzahl belegt.

#### **1.2.2.4 Zeitliche Aspekte zur HIT**

Die Diagnose HIT wird unter Umständen dadurch erschwert, dass die klinischen Manifestationen in sehr unterschiedlichem zeitlichen Abstand zum Beginn der Heparintherapie auftreten können.

Typischerweise fallen die Thrombozytenzahlen zwischen Tag 5 und Tag 10 nach Beginn der Heparintherapie ab und normalisieren sich nach Absetzen des Heparins innerhalb von 5-7 Tagen (Greinacher, 1999). Dies gilt für UFH, für NMH gab es zum Entstehungszeitpunkt der vorliegenden Studie lediglich Einzelfallberichte.

Es gibt jedoch auch eine früher einsetzende Form. Die schnell einsetzende HIT („rapid onset HIT“) tritt in den ersten Stunden oder 1-3 Tagen nach Heparin(re)exposition auf und ist verursacht durch zirkulierende H/PF 4-Antikörper von einer vorangegangenen Heparinexposition (Lubenow et al., 2002; Thiele et al., 2010; Warkentin und Kelton, 2001a).

Mittlerweile wurde auch das Auftreten von HIT nach Beendigung der Heparintherapie beschrieben („delayed onset HIT“). Sie tritt Tage bis 3 Wochen nach Beendigung der Heparintherapie auf, oft hat der Patient das Krankenhaus bereits verlassen (Rice et al., 2002; Warkentin und Kelton 2001b). Dieses Phänomen ist ebenfalls assoziiert mit der Anwesenheit noch reaktiver H/PF 4-Antikörper. Oft, aber keinesfalls immer, liegt eine Thrombozytopenie vor. Diese Form ist verständlicherweise mit einigen diagnostischen Schwierigkeiten verbunden.

#### **1.2.2.5 Charakteristika und Nachweisverfahren der heparinassozierten Antikörper**

Die heparinassozierten Antikörper (HA-AK) richten sich hauptsächlich gegen H/PF 4-Komplexe (Amiral et al., 1992; Greinacher et al., 1994), aber auch Interleukin 8 (IL 8) und neutrophilenaktivierendes Peptid 2 (NAP 2) konnten als Antigene identifiziert werden (Amiral et al., 1996a). Die Antikörper können verschiedenen Immunglobulinklassen angehören, sind also biochemisch heterogen. Es lassen sich Antikörper der Klassen IgG, IgM und IgA nachweisen (Amiral et al., 1996c; Suh et al., 1997), wobei die Antikörper hauptsächlich der Klasse IgG angehören (Kelton et al., 1988).

Die Entwicklung schneller und sensitiver Testverfahren ist ein enormer Fortschritt. Es ergibt sich erstmals die Gelegenheit, nicht nur symptomatische Patienten sondern auch asymptomatische Patienten zu untersuchen z.B. in Form prospektiver Studien. Eine solche ist wesentliche Grundlage für die hier vorliegende Arbeit.

Man unterscheidet vom Grundprinzip her immunologische Antikörpertests und funktionelle Antikörpertests.

Bei den ersteren geht es um den substantiellen Nachweis von Antikörpern/Antikörperklassen. Insbesondere ist hier das HPIA-ELISA-Verfahren (Heparin/Platelet Factor 4 Induced Antibodies Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zu nennen nach Amiral et al. (1992). Das Zielprotein wird

immobilisiert und im nächsten Schritt durch einen enzymkonjugierten Antikörper gebunden. Die nachfolgende, enzymkatalysierte Farbreaktion ergibt einen Farbstoff, der mittels optischer Dichte gemessen wird und dieses Ergebnis ist proportional zur HA-Antikörperkonzentration im Ausgangsmaterial. Die Antikörperkonzentration wird durch Messung eines optischen Dichtewertes ermittelt. Mit diesem Verfahren können im polyspezifischen Testverfahren Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgM nachgewiesen werden. Bei den funktionellen Verfahren wird eine indirekte Aussage über die Qualität der Antikörper getroffen; dabei wird die heparinabhängige Aktivierung von Plättchen durch Patientenserum oder –plasma oder gereinigte Immunglobulinfraktionen gemessen.

An einzelnen funktionellen Testverfahren sind zu nennen der Plättchenaggregationstest (PAT) nach Fratantoni et al. (1975) und Chong et al. (1981), der Serotonin Release Assay (SRA) nach Sheridan et al. (1986) und der hier verwendete Heparin-Induced Platelet Activation-Test (HIPA-Test) nach Greinacher et al. (1991). Beim HIPA-Test wird die Thrombozytenaktivierung durch HA-AK in Anwesenheit von Heparin als Thrombozytenagglutination sichtbar gemacht.

Immunologische und funktionelle Verfahren ergänzen sich, eine Kombination der beiden Verfahren zur HIT-Diagnostik wird empfohlen (Warkentin et al., 1998).

### **1.2.3 Inzidenz der HIT und der HA-AK**

Die Inzidenz der HIT hat seit Entdeckung der HIT zu Kontroversen geführt, sie wurde sowohl als praktisch nicht existent (Bell, 1988) wie als häufig angesehen (Kelton, 1986). Mit dem verbesserten Labornachweis von HIT-Antikörpern wurde offensichtlich, dass nur bei einer Subgruppe von Patienten, die HIT-AK entwickeln, auch klinische Symptome auftreten (Thrombozytopenie), bei einer noch kleineren Anzahl von Patienten treten auch thromboembolische Komplikationen auf (Greinacher, 1999). Das heißt, bei den meisten Patienten mit H/PF 4-Antikörpern kommt es weder zu einer Thrombozytopenie, noch zu thrombotischen Ereignissen, sondern die immunologische Antwort bleibt auf die Serokonversion bezüglich der HIT-Antikörper beschränkt.

Zum Planungszeitpunkt der vorliegenden Arbeit lagen nur wenige Studien vor, welche eine Untersuchung der Antikörper- und HIT-Inzidenz vorgenommen haben. Hierbei waren insbesondere chirurgische Patienten untersucht worden: Patienten nach Hüftgelenkersatz (Warkentin et al., 1995) und nach Operationen mit kardiopulmonalem Bypass (Bauer et al., 1997; Visentin et al., 1996). Ferner lagen Arbeiten über kardiologische Patienten (Kappers-Klunne et

al., 1997) und Hämodialysepatienten vor (Greinacher et al., 1996).

Im Gegensatz zu den in Tabelle 1 dargestellten Arbeiten, die ausschließlich UFH als Gegenstand hatten wurde in einer ersten Arbeit von Warkentin et al. (1995) in einem großen Kollektiv (n=658) die HIT-Inzidenz unter Therapie mit UFH und NMH untersucht. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied von 2,7 % in der UFH-Gruppe vs. 0 % in der NMH-Gruppe. In einer Subgruppe von 387 Patienten war die Antikörperinzidenz untersucht worden. Hierbei konnten bei 7,8 % in der UFH-Gruppe vs. 2,2 % in der NMH-Gruppe H/PF 4-Antikörper nachgewiesen werden. Es liegen also offensichtlich ausgeprägte Unterschiede zwischen den einzelnen Patientenkollektiven vor. Für ein neurologisches Patientenkollektiv unter Thromboembolieprophylaxe liegen (bis heute) keine Daten anderer Autoren für die Antikörper- und HIT-Inzidenz vor.

Tab. 1: Studienlage bezüglich Antikörper- und HIT-Inzidenz zum Planungszeitpunkt dieser Arbeit unter Verwendung sensitiver Testverfahren bei Patienten unter UFH-Therapie

Studie	Patientenkollektiv	Antikörper- Inzidenz (%)	HIT- Inzidenz (%)	Nachweis- verfahren	Fallzahl
Bauer et al., 1997	kardiochirurgisch	51 13	0	EIA-IgM/A/G SRA	111
Visentin et al., 1996	kardiochirurgisch	61 52	0	EIA-IgM/A/G EIA-IgG	44
Trossaert et al., 1998	kardiochirurgisch	27,5 4	0	EIA-IgM/A/G PAT	51
Kappers-Klunne et al., 1997	kardiologisch	2,5 8,4	0,3	EIA-IgG HIPA	358
Greinacher et al., 1996	Hämodialyse	4,2	0	HIPA	165
Luzzatto et al., 1998	Hämodialyse	12	0	EIA-IgG	50

Abkürzungen: EIA = Enzym Immuno Assay = HPIA-ELISA = Heparin/PF 4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,

EIA-IgM/A/G: HPIA-ELISA mit Nachweis von IgG- IgA- und IgM-Antikörpern

EIA-IgG: HPIA-ELISA mit Nachweis von Antikörpern vom IgG-Typ

### 1.2.3.1 Einfluss von niedermolekularem Heparin auf die Entwicklung von HA-Antikörpern und HIT

Diese oben genannten Patientengruppen erhielten sämtlich unfraktioniertes Heparin. Lediglich in der Arbeit über die orthopädischen Patienten wurde eine Subgruppe mit NMH zur

Thromboseprophylaxe behandelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Induktion von HA-Antikörpern als auch das Auftreten einer klinisch manifesten HIT bei Verwendung von NMH signifikant seltener ist als bei Verwendung von UFH (Warkentin et al., 1995).

Niedermolekulare Heparine weisen in sensitiven Tests (HIPA, SRA, HPIA-ELISA) eine mehr als 90 %-ige Kreuzreaktivität mit durch UFH-Therapie induzierten Antikörpern auf. Auch können unter NMH-Therapie in vivo schwere Komplikationen bei HIT-Patienten auftreten (Greinacher et al., 1992), auch wenn sie initial sogar teilweise mit mäßigem Erfolg zur Therapie der HIT herangezogen wurden (Gouault-Heilmann et al., 1987). Dies wird in aktuellen Leitlinien nicht mehr empfohlen (Watson et al., 2012; Linkins et al., 2012).

Ferner ist aus Kasuistiken bekannt, dass niedermolekulare Heparine zu Hautläsionen und Thrombozytopenien (Balestra et al., 1994; Eichinger et al., 1991; Illuminati et al., 1996; Lecompte et al., 1991) und auch zu einem Vollbild der HIT II mit schweren thromboembolischen Komplikationen führen können bis hin zu einem letalen Verlauf (DeRaucourt, 1996; Elalamy et al., 1996; Harbrecht et al., 1998; Pohl et al., 1999).

### 1.3 Fragestellung

Eine der schwerwiegendsten Nebenwirkungen der Thromboseprophylaxe mit Heparinen ist die heparininduzierte Thrombozytopenie. Wahrscheinliche Einflussfaktoren auf die HA-Antikörperinzidenz sind die Art des Heparins, das Patientenkollektiv und die Therapiedauer.

Neurologische Patienten wurden für die vorliegende Arbeit ausgewählt, weil dieses Kollektiv aufgrund fachspezifischer Charakteristika häufig hospitalisiert ist (hoher Anteil chronisch Kranker). Diese Patienten erhalten häufig Heparin als Akuttherapie oder zur Thromboembolieprophylaxe. Eine entsprechende Untersuchung ist daher bei diesen Patienten von besonderem Interesse.

Im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie werden bei neurologisch erkrankten Patienten die Inzidenz und das thrombozytenaktivierende Potential von H/PF 4-Antikörpern bei Durchführung einer Thromboseprophylaxe mit NMH evaluiert. Arbeitshypothese ist, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit von H/PF 4-Antikörpern bei Verwendung von NMH niedriger ist als bei Verwendung von UFH. Die Festlegung auf das Präparat Fraxiparin<sup>®</sup> erfolgte wegen des breiten Zulassungsspektrums dieser Substanz.

Primäre Fragestellungen sind:

- Häufigkeit des Auftretens von H/PF 4-Antikörpern unter NMH im Vergleich zu UFH im

## HPIA-ELISA

- Häufigkeit des Nachweises thrombozytenaktivierender Eigenschaften dieser Antikörper

Sekundäre Fragestellungen sind:

- HIT-Inzidenz (Häufigkeit von Thrombozytopenie oder thromboembolischen Ereignissen mit Nachweis von Antikörpern)
- Nachweis von Thrombozytopenien oder thromboembolischen Ereignissen ohne Nachweis von Antikörpern
- Mögliche Einflussfaktoren auf die Antikörperinzidenz aus klinisch anamnestischen Daten

Die Ergebnisse werden verglichen mit denen von Patienten, welche UFH zur Thromboembolieprophylaxe erhalten haben. Die Daten der UFH-Patienten stellen eine Subgruppe von 104 prophylaktisch mit UFH therapierten Patienten aus dem in der Promotionsarbeit von Fr. Dr. med. B. Bastians publiziertem Gesamtkollektiv von 200 Patienten dar. Die Abschätzung der Populationsgröße erfolgte hierzu unter Zugrundelegung von der Literatur entnommenen Daten von 8-15 % H/PF 4-AK bei Einsatz von UFH und 2-3 % H/PF 4-AK bei Einsatz von NMH.

Zu diesem Zweck wurden bei den Patienten klinisch anamnestische Daten erhoben und alle 5 Tage Blutproben zur Antikörpertestung akquiriert.

Zum Zeitpunkt der Studiendurchführung war die Antikörperinzidenz unter Therapie mit niedermolekularem Heparin noch weitgehend unklar. In Anbetracht ihres vermehrten Einsatzes und der Häufigkeit einer so potentiell gefährlichen Nebenwirkung wie der HIT ist die Kenntnis des Risikos bei den zur Thromboembolieprophylaxe zur Verfügung stehenden Präparaten von elementarer Bedeutung. So soll ein Beitrag dazu geleistet werden, die Antikörperinzidenz und das HIT-Risiko in einem spezifischen, nicht chirurgischen Patientenkollektiv aufzuklären.

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Die Studie zum laboranalytischen Nachweis von heparinassoziierten Antikörpern im Rahmen der Thromboseprophylaxe bei neurologischer Grunderkrankung wurde an der Neurologischen Klinik und Poliklinik und dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

Die Rekrutierung von Patienten begann im April 1999 und erstreckte sich über einen Zeitraum von einem Jahr. Das verwendete Präparat war in allen Fällen Nadroparin-Calcium (Fraxiparin® Sanofi-Synthelabo GmbH, Berlin), welches körpergewichtsadjustiert subkutan nach Herstellerempfehlung verabreicht wurde.

Die Patienten wurden über Inhalt und Ziel der Studie aufgeklärt. Die Aufklärung und das Einverständnis zur Studienteilnahme wurden schriftlich gemäß den Vorgaben der medizinischen Fakultät Bonn und auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen dokumentiert. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission gebilligt.

Die Patienten wurden nach Unterzeichnung einer Einverständniserklärung mittels eines Standardfragebogens über die relevanten persönlichen und klinischen Daten befragt.

#### **2.1.1 Therapie mit Heparin**

Die Indikation zur Heparintherapie wurde studienunabhängig vom behandelnden Arzt der neurologischen Klinik und Poliklinik gestellt, welcher über Präparat, Dosis, Therapiedauer und Therapieüberwachung entschied.

Die Patienten (n=111) erhielten als niedermolekulares Heparin Fraxiparin® in einer Dosierung von 20-50 Anti-Faktor Xa Einheiten pro kg Körpergewicht und Tag subkutan.

Die aus 104 Patienten bestehende Vergleichsgruppe (Daten von Frau Dr. B. Bastians, Arbeitsgruppe Harbrecht/Pohl) erhielt Liquemin N® 25000, Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa (Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) subkutan zur Thromboembolieprophylaxe. Hierbei betrug die Dosierung 200-250 IE/kgKG pro Tag (verteilt auf 2-3 Einzeldosen) bei Patienten mit niedrigem und mittlerem Thromboserisiko. Als Hochrisikopatienten wurden Patienten mit genetischen Risikofaktoren für die Entstehung von Thrombosen und thrombotischen Ereignissen in der Vorgeschichte angesehen. Diese erhielten

eine höhere Dosis von 250-300 IE/kg KG pro Tag verteilt auf 3 Einzeldosen. Angestrebt wurde hier eine aPTT im oberen Bereich der Norm.

### 2.1.2 Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien

Das einzige *Einschlusskriterium* war die Therapie mit niedermolekularem Heparin und voraussichtliche Behandlungsdauer von mindestens 5 Tagen.

Als *Ausschlusskriterien* wurden die üblichen Kontraindikationen (laut Fachinformation) für eine Therapie mit niedermolekularem Heparin gewählt. Hierbei handelt es sich um:

- Intrazerebrale, intraokulare oder andere aktive Blutungen
- Bekannte Koagulopathien
- Schwere, unkontrollierbare Hypertonie
- Einschränkungen der Nierenfunktion (Kreatininwert >1,6 mg/dl oder Kreatininclearance <60 ml/min)
- Schwere Leberfunktionsstörung (Quick-Wert <60 %)
- Akutes Ulkus ventrikuli oder duodeni
- Subakute, bakterielle Endokarditis
- Diabetische Retinopathie
- Bekannte Heparinunverträglichkeit und/oder vorangegangene heparininduzierte Thrombozytopenie

Des Weiteren erfolgte ein studienspezifischer Ausschluss bei:

- Schwangerschaft und Stillzeit
- Gleichzeitige Gabe eines hochmolekularen Heparinpräparates (etwa im Rahmen einer Dialysetherapie)
- Wechsel des Präparates zur Thromboseprophylaxe innerhalb der ersten 5 Behandlungstage
- Abbruch der Thromboseprophylaxe vor dem Ablauf von 5 Behandlungstagen

Aus den Gründen Schwangerschaft/Stillzeit und vorangegangene HIT war kein Ausschluss erforderlich. Aufgrund gleichzeitiger Hämodialysetherapie wurde eine Patientin ausgeschlossen, eine weitere Patientin wurde wegen eines Präparatewechsels ausgeschlossen. Bei einem Patienten wurde wegen eines Vorhofflimmerns innerhalb der ersten 5 Tage die Therapie von niedermolekularem auf hochmolekulares Heparin umgestellt. Er wurde intravenös mit unfraktioniertem Heparin in therapeutischer Dosis behandelt und deshalb aus der Patientengruppe

der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen. Bei 12 Patienten wurde die Thromboembolieprohylaxe vor dem 5. Tag beendet. Die Gründe hierfür waren vorzeitige Entlassung oder Verlegung, die übrigen Patienten erhielten keine Heparintherapie. Weitere 15 Patienten lehnten die Studienteilnahme ab.

### **2.1.3 Demographische Daten**

Nach Anwendung der Ausschlusskriterien bestand das Studienkollektiv von 111 NMH-Patienten aus 75 Frauen und 36 Männer (67,6 % Frauen und 32,4 % Männer), das durchschnittliche Alter betrug  $57,3 \pm 16,6$  Jahre. Die Gruppe der UFH-Patienten bestand aus 63 Frauen und 41 Männern (entspricht 60,6 % Frauen und 39,4 % Männer). Das Durchschnittsalter betrug  $56,8 \pm 17,2$  Jahre. Eine Übersicht über weitere klinische und demographische Daten ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Die Einweisungsdiagnose „Zerebrovaskuläre Erkrankung“ umfasste Patienten mit zerebraler Ischämie (Apoplex, TIA), intrazerebraler Blutung, hypertensiver Enzephalopathie, Sinusvenenthrombose und Karotisstenose. Die entzündlichen ZNS-Erkrankungen waren im einzelnen Enzephalomyelitis disseminata, Optikusneuritis, Meningitis, Myelitis oder Enzephalitis bakterieller, viraler oder unklarer Genese, zerebrale Vaskulitis, Arteriitis temporalis und das Tolosa-Hunt-Syndrom, bei den ZNS-Tumoren lagen im Einzelnen Meningeom, Glioblastom, Astrozytom, zerebrales Lymphom, Metastasen eines Karzinoms und ein Verdacht auf eine zerebrale Raumforderung vor.

An Neuro- oder Radikulopathien konnten polyneuropathische Syndrome, Mononeuropathien, Radikulopathien, Trigeminusneuralgie und Guillain-Barré-Syndrom erhoben werden, bei den neurodegenerativen Erkrankungen waren es M. Parkinson, amyotrophe Lateralsklerose und Kleinhirnatrophie, bei den Muskelerkrankungen Dermatomyositis und Myasthenia gravis, bei den Epilepsien waren es sowohl bekannte Epilepsien und Absencen als auch die Abklärung eines epileptischen Anfalls. In die Kategorie „Sonstige“ wurden die Diagnosen Schwindel allein oder in Kombination mit anderen Symptomen, Amnesie, Pseudotumor cerebri, Hydrozephalus, Enzephalopathie (metabolisch), internukleäre Ophthalmoplegie, hirnorganisches Psychosyndrom, Verdacht auf Prionerkrankung und zerebrale Manifestation eines M. Whipple eingeordnet.

Tab. 2: Vergleich klinischer und demographischer Parameter der neurologischen Patientengruppen unter NMH- und UFH-Therapie

Parameter	NMH	UFH	p-Wert
<b>Präparat</b>	Nadroparin-Calcium aus Schweinedarmmukosa	Heparin-Natrium aus Schweinedarmmukosa	
<b>Patientenzahl (n)</b>	111	104	
<b>Geschlecht (n)</b>			p=0,29
<b>weiblich</b>	75 (67,6 %)	63(60,6 %)	
<b>männlich</b>	36 (32,4 %)	41(39,4 %)	
<b>Durchschnittsalter (Jahre)</b>	57,3 ± 16,6	56,8 ± 17,2	p=0,86
<b>Einweisungsdiagnose</b>			
Zerebrovaskuläre Erkrankungen	36 (32,4 %)	12 (11,5 %)	<b>p&lt;0,001</b>
Entzündliche ZNS- Erkrankungen	12 (10,8 %)	6 (5,8 %)	p=0,18
ZNS-Tumoren	25 (22,5 %)	31 (29,8 %)	p=0,22
Periphere Neuro- oder Radikulopathien	11 (9,9 %)	18 (17,3 %)	p=0,11
Neurodegenerative Erkrankungen	7 (6,3 %)	13 (12,5 %)	p=0,16
Muskelerkrankungen	1 (0,9 %)	5 (4,8 %)	p=0,11
Epilepsien	4 (3,6 %)	7 (6,7 %)	p=0,36
Sonstige	15 (13,5 %)	12 (11,5 %)	p=0,66
<b>Summen (n)</b>	<b>n = 111 (100 %)</b>	<b>n = 104 (100 %)</b>	

Die p-Werte wurden mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt; für die Parameter „Neurodegenerative Erkrankungen“, „Muskelerkrankungen“ und „Epilepsien“ wurde aufgrund geringer Fallzahlen Fisher`s Exact Test verwendet.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bis auf den Parameter „Einweisungsdiagnose: zerebrovaskuläre Erkrankung“.

### 2.1.4 Patientenexploration

Vor Einschluss in die Studie wurde ein Aufklärungsgespräch mit den Patienten geführt. Anschließend wurde die Erhebung der Anamnese mittels eines standardisierten Fragebogens durchgeführt (Abb.1).

Hierbei wurden neben den Ausschlusskriterien die folgenden Fragen anamnestisch erhoben:

- Demographische Angaben
- Neurologische Aufnahmediagnose
- Vaskuläre Vorerkrankungen
- Frühere und aktuelle Behandlung mit Heparin
- Medikamenteneinnahme
- Vaskuläre Komplikationen im Verlauf der Behandlung (Thrombose, Embolie, Blutung)

Bei der Frage der Heparinanamnese wurden 4 mögliche Antworten zugelassen. Neben den Antwortmöglichkeiten „ja“ und „nein“ wurde die Antwort „wahrscheinlich“ gewählt, wenn dem Patienten oder seinen Angehörigen zwar eine Heparintherapie nicht erinnerlich war, jedoch ein Ereignis in der Anamnese mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einer Heparintherapie einher ging z.B. operative Eingriffe bei denen standardmäßig eine Thromboembolieprophylaxe durchgeführt wird (z.B. Cholezystektomie, Knie-/Hüftgelenkeingriffe). Die Antwort „fraglich“ wurde gewählt, wenn kein solches Ereignis in der Anamnese vorlag.

Bei gesicherten kardiovaskulären Risikofaktoren 1. Ordnung (art. Hypertonie, Hyperlipidämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus) wurde im Falle des Vorhandenseins noch unterschieden, ob dies bereits vorher bekannt war (Kodierung mit Ziffer 2) oder erst beim jetzigen Krankenhausaufenthalt zu Tage trat (Kodierung mit Ziffer 1; siehe auch Abb. 1). War ein solcher Risikofaktor nicht vorhanden, wurde mit Ziffer 0 kodiert.

Des Weiteren wurde beim Nikotinabusus eine grob quantitative Abschätzung des Schweregrades vorgenommen. Ein Konsum von  $\geq 5$  package years wurde als deutlicher Nikotinabusus (Code 1) bezeichnet, weniger als geringer Nikotinabusus (Code 2).

## Anamnesebogen

Datum:	<input type="text"/>	Größe:	<input type="text"/>
Patienten-ID:	<input type="text"/>	Gewicht:	<input type="text"/>
Name:	<input type="text"/>		
Vorname:	<input type="text"/>		
Adresse:	<input type="text"/>		
	<input type="text"/>		
Tel.:	<input type="text"/>		

---

Aufnahmegrund:

Indikation der Heparintherapie:

- 0 unbekannt
- 1 Immobilisation
- 2 Antikoagulation
- 3 Cortison
- 4 sonstige

Heparinananamnese:

- 0 nein
- 1 fraglich
- 2 wahrscheinlich
- 3 ja

Datum:

Heparinart:

- 0 unbekannt
- 1 hochmolekular
- 2 niedermolekular
- 3 andere

Besonderheiten akt. oder anamnest.:

Dosis:  IE/Tag

- Applikationsart:
- 1 subkutan
- 2 intravenös

Komplikationen unter Heparintherapie:

- Thrombose
- Blutung
- Thrombozytenabfall
- HIT

Bemerkungen:Vorerkrankungen:

- Spezielle: Thrombose
- Lungenembolie
- Schlaganfall
- KHK
- arterielle Verschlusskrankheit

Risikofaktoren:

- Hypertonie 0  1  2
- Diabetes mellitus 0  1  2
- Nikotin 0  1  2
- Hypercholesterinämie 0  1  2
- Hypertriglyceridämie 0  1  2

Weitere Erkrankungen:

- Postmenopausenöstrogen
- Orales Kontrazeptivum
- Adipositas
- Keine Risikofaktoren

Medikamente:Familienanamnese

- Schlaganfall
- Thrombose
- Vaskuläre Erkrankungen

Besonderheiten:

Abb. 1: Standardisierter Anamnesebogen

Durch Einsichtnahme in die Patientenakten und Analyse wurden die Daten vervollständigt, sowie erhoben, ob ein Thrombozytenabfall oder eine arterielle oder venöse Thrombose unter oder nach Heparintherapie auftraten.

Es wurden ferner die folgenden Risikofaktoren für die Entstehung einer Thrombose erfasst:

- Immobilisation
- Hochdosistherapie mit Cortison
- Vorliegen eines arteriellen oder venösen thrombotischen Ereignisses in der Vorgeschichte (Thrombose, Lungenembolie, Insult/TIA)
- genetische Risikofaktoren wie z.B. Faktor V-Leiden-Mutation
- höheres Lebensalter (>65 Jahre)
- Adipositas (BMI >30)
- Einnahme eines Postmenopausenöstrogens oder eines oralen Kontrazeptivum

### **2.1.5 Probanden**

Um die Spezifität des verwendeten HPIA-ELISA zu erfassen, wurde ferner eine Gruppe von 100 Blutspendern untersucht. Hierbei handelte es sich um gesunde, nicht unter Heparintherapie stehende Probanden, welche nach den für Blutspender gültigen Kriterien ausgewählt wurden.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Die Gewinnung des Untersuchungsmaterials erfolgte durch Blutentnahmen. Nach einer Stauung von 60-80 mmHg erfolgte mit einer 19-21 G-Kanüle eine venöse Blutentnahme aus einer Kubital- oder Unterarmvene. Hierbei wurden 10 ml Vollblut, 4 ml EDTA-Blut und 10 ml Zitratblut (3,8 % Natriumzitrat, Mischungsverhältnis 1:9) entnommen. Aus dem EDTA-Blut wurde ein Blutbild bestimmt. Vollblut und Zitratblut wurden 10 min lang bei 22 °C und 3600 g zentrifugiert. Das Plasma bzw. Serum wurde abpipettiert, in Portionen zu 1ml in Eppendorf-Caps abgefüllt, im Anschluss bei -70 °C tief gefroren und (maximal 6 Monate) zur Diagnostik gelagert. Die übrigen Blutbestandteile wurden verworfen.

### 2.2.2 Diagnostisches Vorgehen im Rahmen der Studie

Eine Blutentnahme erfolgte -wenn möglich- am Tag vor der ersten Heparin-gabe oder am Tag der ersten Heparin-gabe, ansonsten in den ersten 5 Tagen der Heparintherapie. Von 40 Patienten liegt ein Ausgangswert von Tag 0 oder Tag 1 vor, von 64 Patienten wurde der erste Wert im Verlauf der ersten 5 Tage gewonnen, bei 7 Patienten erfolgte die erste Blutentnahme an oder nach Tag 5. Die Verteilung ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zur Antikörper-testung unter NMH-Therapie

Tag 0 (n)	12
Tag 1 (n)	28
Tag 2 (n)	41
Tag 3 (n)	14
Tag 4 (n)	9
Tag 5 oder später (n)	7
<b>Gesamt (n)</b>	<b>111</b>

Diese Verteilung ist begründet in der Struktur der Studie. Die Patienten mussten zunächst in die Studie aufgenommen werden und hatten die Möglichkeit, Bedenkzeit in Anspruch zu nehmen.

Im weiteren Verlauf des Klinikaufenthaltes wurden Blutproben im Abstand von 5 Tagen gewonnen. Nach Möglichkeit wurden die Blutentnahmen zur Antikörperdiagnostik und Thrombozytenzählung mit anderen notwendigen Routinekontrollen verbunden. Bei 30 Patienten (von 111) liegt kein vollständiger Thrombozytenverlauf vor. Die Therapieüberwachung erfolgte durch den behandelnden Arzt der neurologischen Klinik und Poliklinik. Ohne klinischen Verdacht oder Hinweis auf eine manifeste HIT wurde die gesamte Antikörperdiagnostik aus asserviertem Material nach Therapieabschluss durchgeführt. Hierbei wurde als Suchtest der HPIA-ELISA und im Falle eines positiven HPIA-Ergebnisses als Bestätigungstest der HIPA-Test durchgeführt. Bei Warnzeichen für das Auftreten einer HIT (Thrombozytenabfall auf <120 G/l oder um >50 % des Ausgangswertes nach Warkentin et al. (1998) war vorgesehen, die Diagnostik umgehend durchzuführen (Abb. 2).

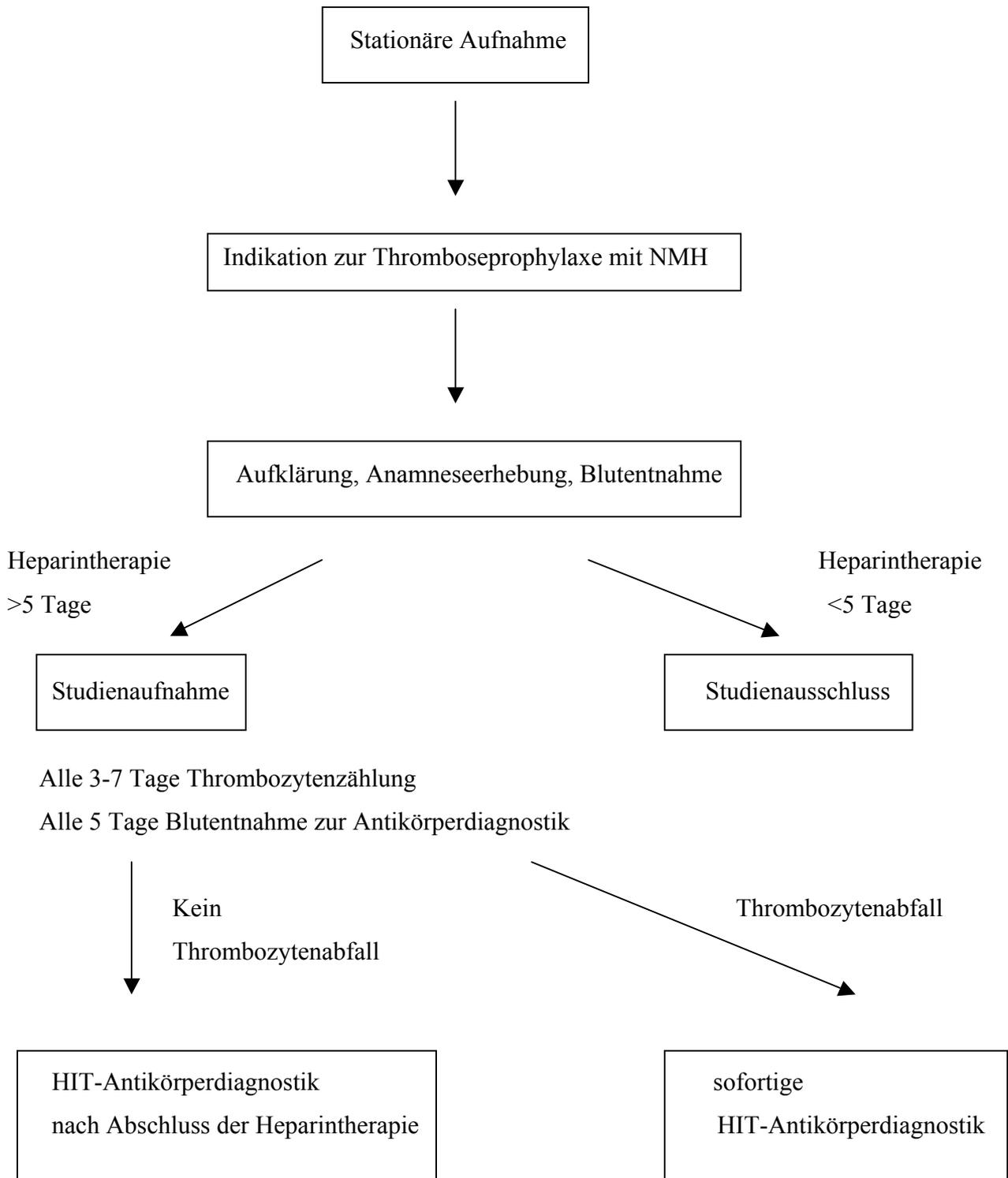


Abb. 2: Diagnostisches Vorgehen bei der Patientenrekrutierung als Flussdiagramm

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Labordiagnostik

An Labormethoden kamen zur Anwendung:

- Bestimmung der Thrombozytenzahl,
- HPIA-ELISA (=Heparin/Platelet Factor 4 Induced Antibodies Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
- HIPA (=Heparin-Induced Platelet Activation Assay) im Falle eines positiven HPIA-Ergebnisses

### 2.3.2 Thrombozytenzählung

Im Rahmen der Therapieüberwachung wurde in der Regel alle 3-7 Tage eine Bestimmung der Thrombozytenzahl durchgeführt. Diese Bestimmung erfolgte aus EDTA-Blut und wurde im Labor der Neurologischen Universitätsklinik oder im Labor des Institutes für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin durchgeführt, je nachdem welche anderen Parameter im Rahmen der klinischen Routinediagnostik ansonsten erforderlich waren.

Im Labor der Neurologie wird ein Coulter Onyx, Fa. Coulter Electronics, Krefeld verwendet, im Labor des Institutes für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin erfolgt die Analyse mit dem Sysmex K-4500-Gerät, Fa. Sysmex, Norderstedt. Bei beiden Geräten handelt es sich um vollautomatische Geräte für die quantitative hämatologische In-vitro-Diagnostik, welche eine Thrombozytenbestimmung nach dem Widerstandsmessprinzip vornehmen. Hierbei wird der Unterschied zwischen der elektrischen Leitfähigkeit von Blutzellen und Suspensionslösung zur Zählung und Größenbestimmung genutzt.

#### *Prinzip der Messung*

Zunächst wird das Blut in einer Verdünnungslösung suspendiert. Dabei handelt es sich um eine isotonische Kochsalzlösung (z.B. Cellpack, Fa. Sysmex, Norderstedt). Dieses Gemisch wird durch die Öffnung eines Messwandlers gesaugt. Der Messwandler ist aus einer inneren und einer äußeren Elektrode aufgebaut, durch welche ein konstanter Strom fließt. Wenn eine Blutzelle in die Öffnung des Messwandlers gesaugt wird, ändert sich der Widerstand, weil die Blutzelle einen höheren Widerstand hat als die Verdünnungslösung. Da nach dem Ohmschen Gesetz gilt:

$U=I \times R$  tritt eine der Widerstandsänderung proportionale Spannungsänderung ein. Diese

Spannungsänderung ist proportional zum Volumen der Zelle und kann damit zur Identifizierung und Zählung dieser Zelle entsprechend ihrer Größe herangezogen werden. Da die Spannungsänderungen relativ klein sind, werden sie verstärkt und gefiltert, um Impulse, die z.B. von Zellfragmenten stammen, zu unterdrücken.

### Reagenzien

#### **Symex K-4500**

Systemex, Norderstedt:

Cellpack-Verdünnungsmittel

Stromatolyser-3 WP

Sulfolyser

Cellclean

#### **Coulter Onyx**

Coulter Euro Diagnostics GmbH, Krefeld:

Reagenz I: Coulter<sup>®</sup> stabilisierte

Elektrolytlösung

Reagenz II: Coulter<sup>®</sup> Lysier-Reagenz

### Exemplarische Bestimmung der Thrombozytenzahl mit dem Systemex K-4500

Das zur Messung vorliegende EDTA-Blut wird aus der Monovette in das Probendosierventil gesaugt. Dieses misst exakt 4 µl der Probe ab, welche anschließend mit 1,996 ml Cellpack verdünnt werden (Verhältnis 1:500). Die verdünnte Probe wird in die Mischkammer transportiert, aus dieser saugt das Probendosierventil dann erneut 40 µl ab und verdünnt sie erneut mit 1,96 ml Cellpack (Mischungsendverhältnis 1:25000). Anschließend wird diese Probe in die Thrombozytenmesskammer transportiert. 250 µl werden durch eine Kapillare angesaugt und die Thrombozyten werden nach dem Widerstandsmessprinzip gezählt. Die gezählten Zellimpulse werden in ein Histogramm überführt, welches Thrombozyten mit einer Größe von 2-40 fl darstellt.

### **2.3.3 HPIA-ELISA**

Dieses Testverfahren wurde erstmals 1992 von Amiral et al. beschrieben. Ziel ist der Nachweis heparinassoziierter Antikörper der Klassen IgG, IgA und IgM. In der vorliegenden Arbeit wurde ein kommerziell erhältliches Testkit (Asserachrom<sup>®</sup> HPIA) der Fa. Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, Frankreich) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

### Prinzip der Messung

Es handelt sich bei dem Verfahren um einen ELISA-Test nach dem Sandwichprinzip. Die

nachzuweisenden HA-Antikörper werden an einer festen Oberfläche immobilisiert und in einem zweiten Schritt mittels einer Farbreaktion nachgewiesen. Das zu untersuchende Serum wird in eine Mikrotiterplatte gegeben, mit Kavitäten, welche kovalent gebundenes Heparin-PF 4 in einer stöchiometrischen Mischung enthalten. Wenn im Serum Antikörper gegen Heparin-PF 4 vorhanden sind, binden diese an die Gefäßbeschichtung. Diese Bindung kann mit Hilfe von Anti-Human-Antikörpern, an die das Enzym Peroxidase („Detektor“) gekoppelt ist, sichtbar gemacht werden. Bei den Anti-Human-Antikörpern handelt es sich um Anti-HumanIgG-, -IgA- und IgM-Antikörper von der Ziege. Wie viel Enzym Peroxidase (und damit letztlich auch nachzuweisende Antikörper gegen Heparin-PF 4) vorhanden sind, wird aufgedeckt durch die Enzymaktivität und Umsetzung von Ortho-Phenyldiamin (Substrat) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in einer vorgegebenen Zeit. Die Reaktion wird durch Zugabe einer starken Säure gestoppt. Durch die Substratumsetzung wird ein Farbumschlag bewirkt. Dieser wird bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen und ist in seiner Intensität proportional der Menge an HIT-Antikörpern im untersuchten Serum.

### Geräte und Reagenzien

MRX ELISA-Platten-Reader, Dynatech Laboratories, Denkendorf, zur Messung der Extinktion

Ein HPIA-ELISA-Testkit der Fa Diagnostica Stago enthält folgende Reagenzien

- Reagenz 1: Mikrotitrationsstreifen mit Kavitäten mit kovalent gebundenem Heparin-PF 4 (H/PF 4)
- Reagenz 2: Anti-Human-IgG, -IgA, -IgM-AK von der Ziege, gekoppelt mit Peroxidase
- Reagenz 3a: Ortho-Phenyldiamin (OPD)
- Reagenz 3b: Harnstoffperoxid als Quelle für Wasserstoffperoxid
- Reagenz 4: Zitratpuffer mit Ziegenserum zur Verdünnung
- Reagenz 5: Waschlösungskonzentrat (50 ml ad 1 Liter H<sub>2</sub>O)
- Reagenz 6: Referenzmaterial (gefriergetrocknetes menschliches Plasma mit Anti-Heparin-PF 4-Antikörpern)
- Reagenz 7a: negative Kontrolle (gefriergetrocknetes menschliches Plasma ohne Anti-H/PF 4-Antikörper)

- Reagenz 7b: positive Kontrolle (gefriergetrocknetes menschliches Plasma mit Anti-H/PF 4-Antikörpern)

3-molare Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) zum Abstoppen der Enzym-Substrat-Reaktion

### Durchführung

#### a) Immunreaktion 1

10  $\mu\text{l}$  Patientenserum werden mit 1 ml Reagenz 4 auf das Verhältnis 1:101 verdünnt. Jede Kavität der mit PF 4 beschichteten Mikrotiterplatte wird mit 200  $\mu\text{l}$  verdünntem Patientenserum beschickt oder mit 200  $\mu\text{l}$  der unverdünnten Positiv- und Negativkontrolle (Reagenz 7a und 7b). Nun folgt eine einstündige Inkubation bei 18-25 °C. Danach erfolgt ein fünfmaliges Waschen mit Reagenz 5 (welche 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde), um nicht gebundenes Serum zu entfernen.

#### b) Immunreaktion 2

In jede Kavität werden 200  $\mu\text{l}$  Reagenz 2 (Anti-Human-IgG-, -IgA- und -IgM-AK gekoppelt mit Peroxidase) hinzugefügt. Sind an der Oberfläche der Mikrotiterplatte im vorangegangenen Schritt Antikörper aus dem Patientenserum gebunden worden, kommt es nun zur Bindung an diese und damit zur Sandwichbildung. Es erfolgt eine weitere einstündige Inkubation bei 18-25 °C und ein erneutes fünfmaliges Waschen mit verdünntem Reagenz 5 (Waschlösung).

#### c) Farbentwicklung

Pro Kavität werden direkt im Anschluss je 200  $\mu\text{l}$  OPD als Substrat für die Peroxidase und Harnstoffperoxid als Wasserstoffperoxidquelle (Reagenz 3a+3b) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von exakt 5 min bei Raumtemperatur wird Säure (50  $\mu\text{l}$  3-molare  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) hinzugegeben und damit die Farbentwicklung beendet. Nach einer weiteren Inkubation von 10 min zur Farbstabilisierung kann innerhalb der nächsten zwei Stunden bei 492 nm die Extinktion abgelesen werden.

### Auswertung

Als Ablesebedingung müssen die mitgelieferten Positiv- und Negativkontrollen richtig sein, anderenfalls können die Patientenergebnisse nicht ausgewertet werden. Nach Herstellerangaben können sehr hohe Heparinkonzentrationen ( $>2,5$  IE/ml) unter Umständen aberrante Testresultate

liefern. Ferner wurden nach Herstellerangaben 100 gesunde Probanden getestet. Für diese lag der mittlere OD-Wert (optische Dichte, Absorptionswert) bei 0,09 mit einer Standardabweichung von 0,06.

Zur Ermittlung des Cut-off-Wertes für ein positives Testergebnis dient ein bestimmter Prozentsatz (20-35 %) der Extinktion eines vom Hersteller mitgelieferten Referenzmaterials. Dabei handelt es sich um menschliches Plasma mit Anti-Heparin-PF 4-Komplexen (Reagenz 6), welches chargenabhängig leicht variiert. Proben, deren Ergebnis-OD oberhalb dieses Referenzbereiches liegt, werden als antikörperpositiv bewertet.

#### **2.3.4 HIPA-Test**

Dieser Test wurde in der vorliegenden Arbeit bei den Patienten durchgeführt, die ein positives Testergebnis im HPIA-ELISA aufwiesen. Es wurde hierfür Probenmaterial vom Tag mit der höchsten gemessenen Extinktion verwendet. Der Test wurde durchgeführt in Anlehnung an die Beschreibung von Greinacher et al. (1991).

##### Prinzip der Messung

Es handelt sich um einen funktionellen Test, welcher die Fähigkeit der Anti-H/PF 4-Antikörper Thrombozyten zur Aktivierung und Aggregation zu bringen untersucht. Wenn das Patientenserum HIT-Antikörper mit plättchenaktivierenden Eigenschaften enthält, dann werden die Spenderthrombozyten in Anwesenheit von Heparin aggregiert. Das Ergebnis wird beurteilt durch Inspektion der Transparenz der Thrombozytensuspension.

##### Geräte

- Heraeus Megafuge 1.0 RS
- Magnetrührer Highdolph Typ MRO

##### Materialien

- Mikrotiterplatte in U-Form, (Nunc GmbH, Wiesbaden)
- Stahlkugeln RB 2-RS, 2 mm Durchmesser aus rostfreiem Stahl, in Alkohol fettfrei gewaschen, (IB Häuser, Gießen)
- mit ACD(Acidum-Citricum-Dextrose)-Puffer antikoagulierte Blutproben von 4 verschiedenen Spendern (nach den für Blutspender gültigen Richtlinien ausgewählt) zur Herstellung einer

## Thrombozytensuspension

- Patientenserum, inaktiviert bei 56 °C für 45 min

Reagenzien

- UFH (Liquemin<sup>®</sup>) 2,1 IE/ml und 1050 IE/ml (Hoffmann LaRoche AG, Mannheim)
- Danaparoid (Orgaran<sup>®</sup>) 2,0 U/ml (Thiemann Arzneimittel GmbH, Waltrop)
- Kollagen 40 µg/ml (Nycomed Arzneimittel GmbH, Ismaning)
- r-Hirudin (Hoechst Marion Roussel, Frankfurt)
- Reagenzien für Pufferlösungen:
  - BSA (bovines Serumalbumin) (Sigma, Taufkirchen)
  - Natriumzitat
  - Zitronensäure
  - Dextrose
  - Natriumchlorid
  - Kaliumchlorid
  - Natriumhydrogenkarbonat
  - Natriumdihydrogenphosphat
  - Glukose
  - Kalziumchlorid
  - Magnesiumchlorid
 (Merck, Eurolab GmbH, Darmstadt)

## Herstellung ACD-Puffer (Acidum-Citricum-Dextrose-Puffer)

25 g Trinatriumzitat-2-hydrat

15 g Zitronensäure-1-hydrat

20 g Dextrose

---

 ad 1000 ml Aqua dest., pH 4,5

## Herstellung Waschpuffer

16,0 g NaCl  
0,4 g KCl  
0,2 g NaHCO<sub>3</sub>  
0,1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O  
2,2 g Glukose  
7,0 g BSA  
200 µg Hirudin

---

ad 2000 ml Aqua dest., pH 6,4

## Herstellung Suspensionspuffer

8,0 g NaCl  
0,2 g KCl  
0,1 g NaHCO<sub>3</sub>  
0,05 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 1 H<sub>2</sub>O  
1,1 g Glukose  
3,5 g BSA  
0,44 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
0,2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

---

ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4

### Durchführung

#### a) Gewinnung der Spenderthrombozyten:

Von 4 Spendern (Auswahl nach den für Blutspender gültigen Kriterien, insbesondere keine ASS-Einnahme in den letzten 10 Tagen) werden jeweils 20 ml mit ACD antikoaguliertes Blut benötigt. In 8 neutrale Monovetten à 10 ml werden jeweils 1,6 ml ACD-Puffer vorgelegt. Im Anschluss daran werden jeweils 8,4 ml der Spenderblutproben in die Monovetten aufgezogen und vorsichtig durchmischt.

#### b) Herstellung der Spenderthrombozytensuspension:

Das Blut wird nach 30 min weiter verarbeitet. Nach vorsichtigem, viermaligem Mischen werden die Monovetten im Anschluß 2 min bei 1550 g zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wird abpipettiert und pro Milliliter mit 111 µl ACD-Puffer aufgefüllt und vorsichtig vermischt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 2410 g wird der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wird der Vorgang wiederholt, wobei das Pellet diesmal in 2 ml Suspensionspuffer resuspendiert wird. Nun wird die Thrombozytenzahl bestimmt. Durch Zugabe von weiterem Suspensionspuffer wird die Thrombozytenzahl auf 400 G/l eingestellt und die Thrombozytensuspension wird weitere 30 min bei 37 °C inkubiert um eine herstellungsbedingte Thrombozytenaktivierung abklingen zu lassen.

#### c) Beschickung der Mikrotiterplatte:

Die Mikrotiterplatte wird mit 2 Stahlkugeln pro Vertiefung beschickt. Es werden pro Kavität jeweils 10 µl Reagenz und 20 µl Patientenserum pipettiert und anschließend mit 75 µl Thrombozytensuspension vermischt.

Als Reagenzien werden verwendet:

1. Suspensionspuffer als Negativkontrolle
2. unfraktioniertes Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, 2,1 IE/ml)
3. unfraktioniertes Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, 1050 IE/ml)
4. Danaparoid (Orgaran<sup>®</sup>, 2 U/ml)
5. Kollagen als Positivkontrolle (40 µl/ml)

Das Pipettierschema ist Abb. 3 zu entnehmen.

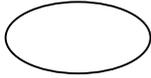
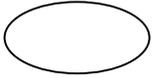
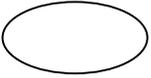
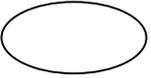
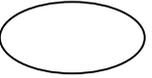
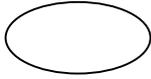
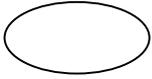
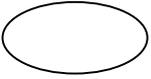
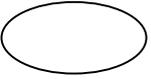
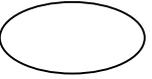
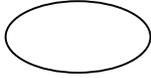
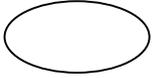
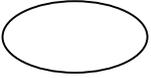
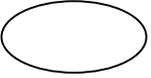
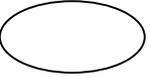
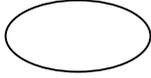
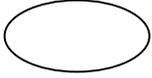
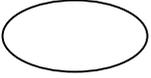
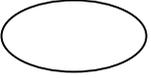
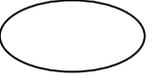
	Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
<b>1 Patient</b>	Suspensionspuffer 10 µl	Liquemin 2,1 IE/ml 10 µl	Liquemin 1050 IE/ml 10 µl	Orgaran 2 U/ml 10 µl	Kollagen 40 µl/ml 10 µl
Spenderthrombozyten 1 75 µl pro Kavität					
Spenderthrombozyten 2 75 µl pro Kavität					
Spenderthrombozyten 3 75 µl pro Kavität					
Spenderthrombozyten 4 75 µl pro Kavität					
	Pro Kavität werden 20 µl inaktiviertes Patientenserum (45 min bei 56 °C) eingebracht				

Abb. 3: Pipettierschema des HPIA für einen einzelnen Patienten

Es liegen damit in der einzelnen Kavität (105 µl) folgende Endkonzentrationen vor:

Spalte 1: Suspensionspuffer

Spalte 2: unfraktioniertes Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, Endkonzentration 0,2 IE/ml)

Spalte 3: unfraktioniertes Heparin (Liquemin<sup>®</sup>, Endkonzentration 100 IE/ml)

Spalte 4: Danaparoid (Orgaran<sup>®</sup>, Endkonzentration 0,19 U/ml)

Spalte 5: Kollagen als Positivkontrolle (Endkonzentration 4 µl/ml)

Die Mikrotiterplatte wird 45 min auf einem Magnetrührer (Geschwindigkeit 230-250 rpm) inkubiert. Das Auftreten einer Thrombozytenaktivierung wird unmittelbar danach makroskopisch abgelesen durch Beurteilung der Transparenz der Suspensionslösung einerseits und der Identifizierung von Thrombozytenaggregaten mit Hilfe eines Spiegels andererseits.

#### Ablesung

Bei einem positiven Testergebnis sind Thrombozytenaggregate erkennbar; die Lösung ist im

Übrigen klar. Ein negatives Testergebnis liegt vor, wenn die Thrombozytensuspension trüb aussieht und keine Aggregate erkennbar sind.

#### Auswertung

Bei negativer Kollagenkontrolle ist die Reihe mit den entsprechenden Spenderthrombozyten nicht auswertbar. Dasselbe gilt für ein positives Testergebnis bei der Pufferkontrolle und/oder der hohen Heparinkonzentration. Es liegt dann eine unspezifische Aktivierung der Thrombozyten vor, das entsprechende Testergebnis ist nicht auswertbar. Dies bedeutet, eine Reihe in Abb. 3 ist komplett nicht auswertbar. Um eine klare abschließende Aussage treffen zu können, müssen mindestens 3 der 4 eingesetzten Spenderthrombozyten ablesbar sein. Da die Reagibilität der eingesetzten Spenderthrombozyten erheblichen Unterschieden unterworfen ist, ist der Test bereits als positiv zu bewerten, wenn bei mindestens 2 Spenderthrombozytenreihen Aggregate auftreten. Der Test wird als HIT-positiv bewertet, wenn die Pufferkontrolle sowie die Reihe mit der hohen Heparinendkonzentration (100 IE/ml) negativ ausfallen, und der Test für Kollagen sowie für eine Heparinendkonzentration von 0,2 IE/ml eine Aggregation zeigt. Der Test wird als HIT-negativ bewertet, wenn die Kollagenkontrolle positiv ausfällt und alle anderen Ansätze ein negatives Ergebnis zeigen.

#### **2.3.5 Statistische Auswertung**

Die gesamten Daten wurden EDV-gestützt erfasst und ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogrammpaket SPSS 11.0.2. für Mac OSX. Für die Signifikanzprüfungen der Gruppenvergleiche wurden der Chi-Quadrat-Test und Fishers Exact Test verwendet. Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die Antikörperinzidenz zu evaluieren, wurde eine logistische Regressionsanalyse verwendet.

Die statistische Beratung erfolgte durch Herrn PD. Dr. M. Knapp, Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn (IMBIE).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Antikörperinzidenz im HPIA-ELISA

Der HPIA-ELISA wurde als immunologischer Test zur HA-Antikörpersuche bei allen Patienten (wenn irgend möglich) zu Therapiebeginn und in der Folge alle 5 Tage während der gesamten Dauer des stationären Aufenthaltes durchgeführt. Als antikörperpositiv wurde das Testergebnis für einen Patienten bewertet, wenn die OD (Optische Dichte) oberhalb des Cut-off-Wertes lag: Dabei handelt es sich um einen bestimmten Prozentsatz (20-35 %) der Extinktion eines vom Hersteller mitgelieferten Referenzmaterials (menschliches Plasma mit Anti-Heparin-PF 4-Komplexen), welches chargenabhängig leicht variiert.

Zur Chargenprüfung wurde vom Hersteller das Plasma von 100 gesunden Probanden getestet. Für diese lag der mittlere OD-Wert bei 0,09 mit einer Standardabweichung von 0,06. Außerdem wurde in dieser Studie eine Kontrollgruppe von 100 Blutspendern untersucht.

In der vorliegenden Arbeit fand sich bei neurologischen Patienten, die eine Thromboembolieprophylaxe mit NMH erhielten, eine Antikörperinzidenz von 1,8 % (2/111). Die Vergleichsgruppe erhielt UFH zur Thromboembolieprophylaxe, hier fand sich eine Antikörperinzidenz von 10,6 % (11/104). Dieses Ergebnis wurde im Rahmen einer übergeordneten Studie im Jahr 2005 publiziert (Pohl et al., 2005)

Tab. 4: Inzidenz heparinassoziierter Antikörper bei neurologischen Patienten in Abhängigkeit von der Heparinpräparation als Vierfeldertafel

	NMH (n)	UFH (n)	Gesamt (n)
AK-Positiv (n)	2	11	13
AK-Negativ (n)	109	93	202
Gesamt (n)	111	104	215

p=0,009; Fisher's Exact Test

Die Antikörperinzidenz war unter NMH-Therapie signifikant niedriger als unter UFH-Therapie (0,009; Fisher's Exact Test)

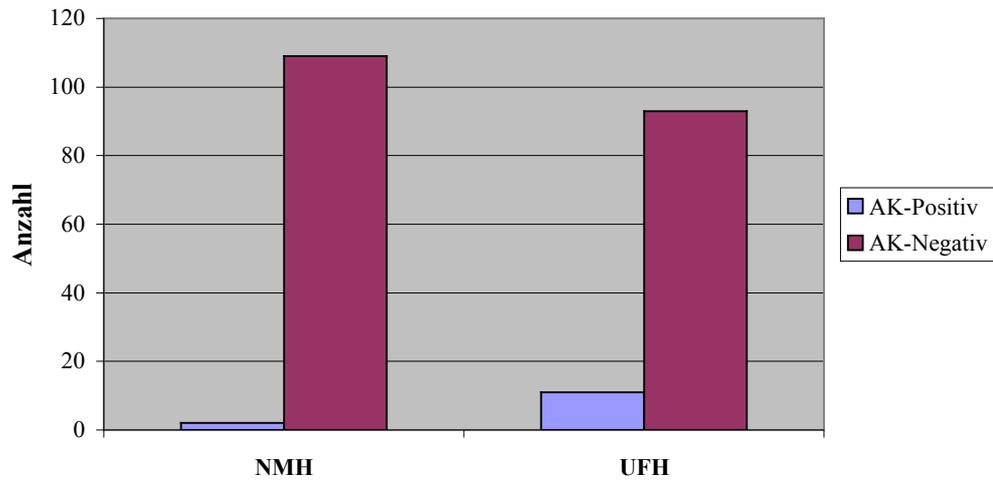


Abb. 4: Häufigkeit von antikörperpositiven und antikörpernegativen Patienten unter hochmolekularem vs. niedermolekularem Heparin

In Tabelle 5 sind die antikörperpositiven Patienten im einzelnen aufgeführt mit Angabe von Geschlecht, Diagnose, Heparinanamnese, maximaler OD, dem Zeitpunkt der Serokonversion und der Frage nach dem Auftreten einer Thrombose.

Tab. 5a: Darstellung der HA-antikörperpositiven NMH-Patienten (n=2)

n	Pat. / Geschlecht (m/w)	OD max.	Serokonversion	Diagnose	Thrombose	Letzte Heparintherapie
1	B. M./w	1,15	Serokonversion Tag 7	ICB	nein	unbekannt
2	S. B. /m	1,03	Serokonversion Tag 8	SAB	nein	keine

Tab. 5b: Darstellung der HA-antikörperpositiven UFH-Patienten (n=11)

n	Pat. / Geschlecht (m/w)	OD max.	Serokonversion	Diagnose	Thrombose	Letzte Heparintherapie
1	A. W./m	0,82	Primär AK- positiv	Cervicale Myelopathie	nein	8 Jahre vorher
2	A. N./w	0,66	Primär AK- positiv	Neuro- zystizerkose	Unterschenkel- venenthrombose	Beginn in anderer Klinik 3 Wochen zuvor
3	D. G./m	0,71	Serokonversion Tag 13	ICB	nein	zuletzt 6 Monate zuvor
4	H. M./m	0,74	Primär AK- positiv	ED	nein	keine
5	K. S./w	1,07	Primär AK- positiv	Epilepsie	nein	keine
6	M. K./m	2,7	Primär AK- positiv	ED	nein	8 Jahre vorher
7	P. A./w	1,5	unklar	Polyneuro- pathie	Vena Iliaca- Thrombose re., Lungenembolie beidseits	Beginn in anderer Klinik 28 Tage vor erstem AK-Nachweis
8	P. I./w	0,73	Primär AK- positiv	Kleinhirn- insult	nein	Beginn 10 Tage zuvor in anderer Klinik
9	S. H./w	0,57	Serokonversion Tag 18	Gangstörung	nein	zuletzt vor 10 Monaten
10	S. M./w	2,4	Serokonversion Tag 12	Meningitis	nein	2 Jahre vorher
11	S. R./w	0,72	Serokonversion Tag 5	Schwindel	nein	keine

Abkürzungen: m = männlich, w = weiblich, ICB = intracerebrale Blutung,  
SAB = Subarachnoidalblutung, ED = Enzephalomyelitis disseminata

Die beiden seropositiven Patienten in der NMH-Gruppe waren neu serokonvertiert. Dies bedeutet, dass die ersten Proben negativ waren und mindestens eine Folgeprobe ein positives Ergebnis zeigte. In der Vergleichsgruppe UFH wiesen von den 11 antikörperpositiven Patienten 6 Patienten ein primär seropositives Ergebnis auf (d.h. bereits die erste erhobene Probe war positiv) und 5 wiesen eine neue Serokonversion auf.

In der folgenden Abbildung 5 sind die Zeitpunkte der Serokonversion für NMH- und UFH-Patienten graphisch dargestellt.

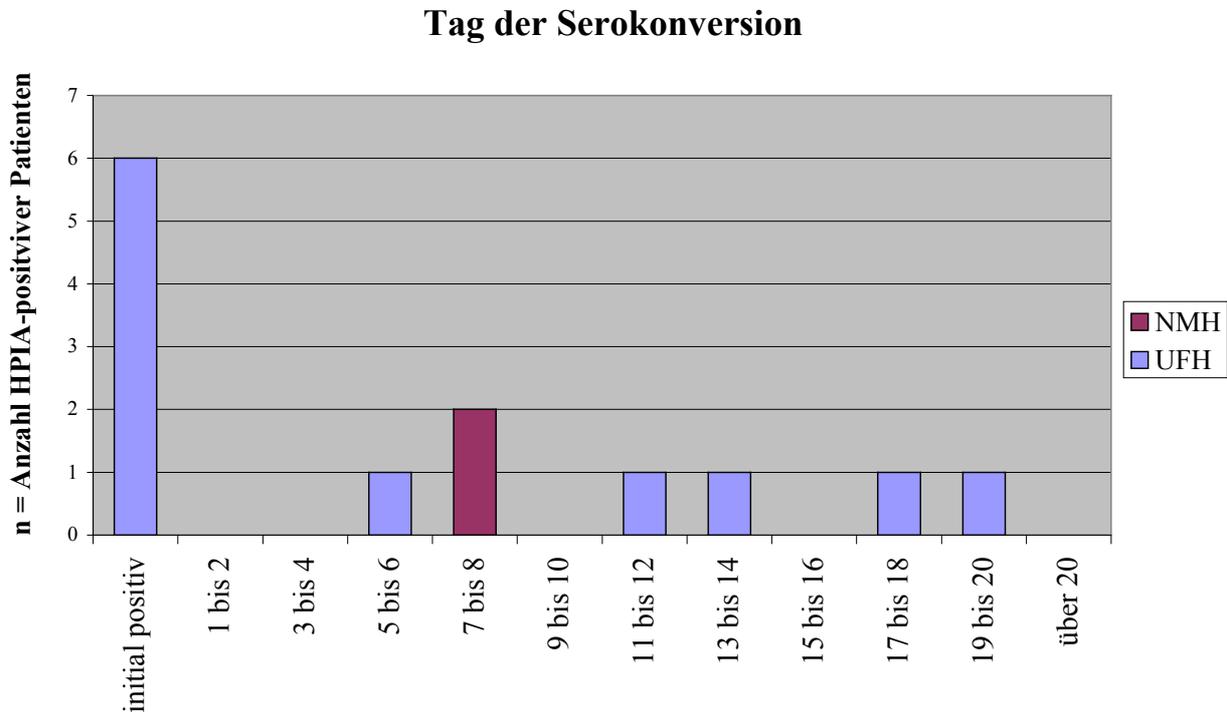


Abb. 5: Zeitpunkt der Serokonversion für die HA-antikörperpositiven NMH- und UFH-Patienten

Es zeigt sich, dass die beiden NMH-Patienten im selben Zeitraum serokonvertiert sind. Um die Spezifität des HPIA-ELISA zu erfassen, wurde auch eine Gruppe von 100 Blutspendern untersucht. Hierbei zeigte sich ein positives Ergebnis (1%) im Antikörpersuchtest. Bei den Blutspendern handelte es sich um gesunde Probanden.

Bei den folgenden Darstellungen (Abb. 6 und 7) wurde bei den UFH- und NMH-Patienten der höchste Extinktionswert im HPIA-ELISA nach Tag 3 ausgewählt wurde. Von den Blutspendern, welche nicht mit Heparin behandelt wurden, wurde jeweils eine Blutprobe entnommen, deren OD-Wert zu Darstellung kommt.

In Abbildung 6 sind die Extinktionswerte der beiden Gruppen UFH und NMH aufgeschlüsselt verglichen zur Kontrollgruppe der Blutspender dargestellt. In Abbildung 7 ist die höchste OD nach Tag 3 bei antikörperpositiven im Vergleich zu antikörpernegativen Patienten dargestellt.

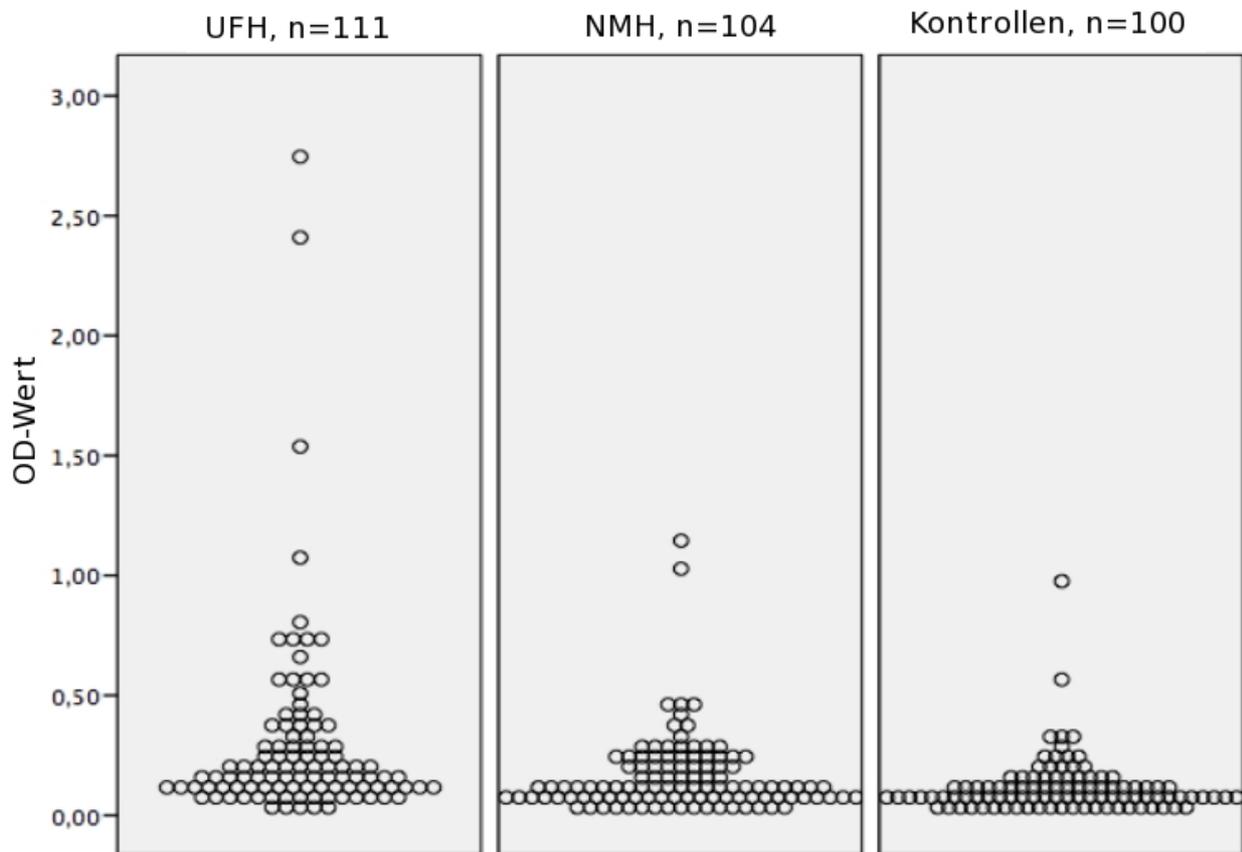


Abb. 6: Darstellung der höchsten Extinktion (OD) nach Tag 3 bei NMH und UFH-Patienten sowie bei Kontrollprobanden (Blutspendern)

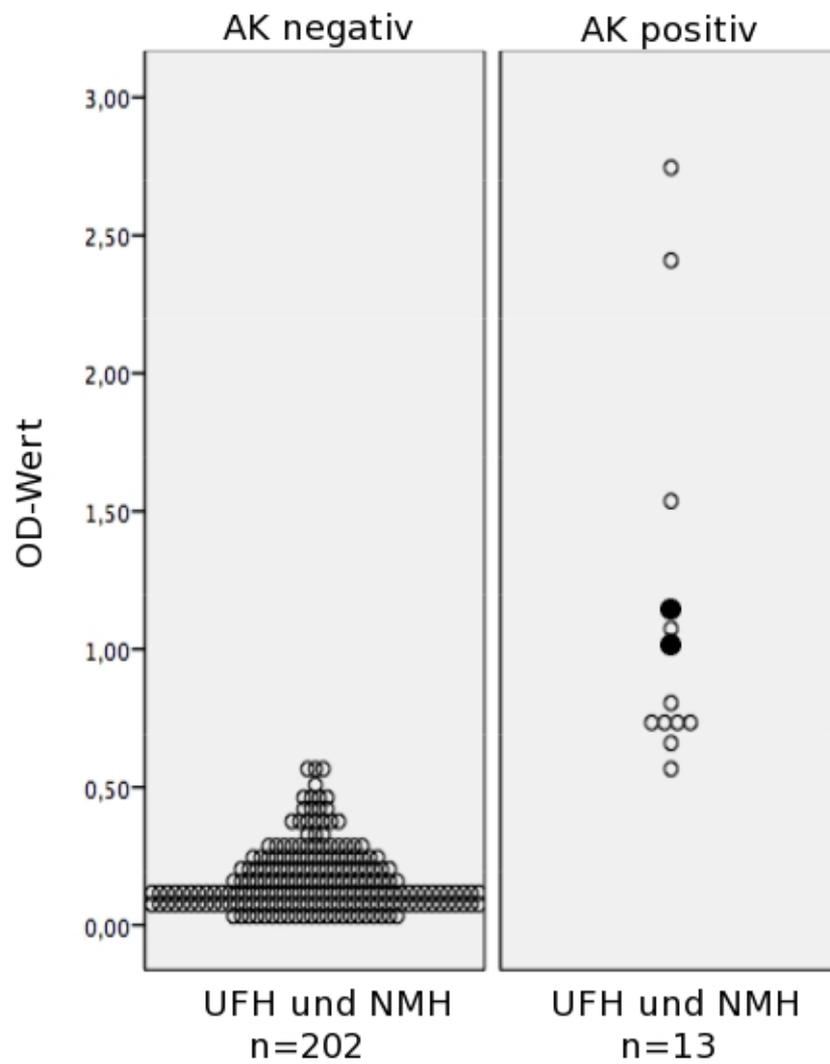


Abb. 7: Darstellung der höchsten OD nach Tag 3 bei antikörperpositiven (○=UFH, ●=NMH) im Vergleich zu antikörpernegativen Patienten

### 3.2 Klinische Relevanz der HA-Antikörper

Zur Beurteilung der Relevanz von HA-Antikörpern wurden die plättchenaktivierenden Eigenschaften der Antikörper im HIPA-Test, das Auftreten eines Thrombozytenabfalles und/oder das Auftreten thromboembolischer Ereignisse, sowie das Auftreten einer HIT untersucht.

#### 3.2.1 HIT-Inzidenz im neurologischen Patientenkollektiv

Eine klinisch manifeste HIT wurde definiert durch einen Thrombozytenabfall auf  $<120$  G/l oder einen Abfall vom Ausgangswert  $\geq 50\%$ , jeweils in Verbindung mit einem positiven Antikörpernachweis.

In der Gruppe der mit NMH behandelten Patienten fand sich kein HIT-Fall. In der Vergleichsgruppe, welche mit UFH behandelt wurde, fand sich ein Fall des HIT-Vollbildes ( $p=0,48$ ; Fisher's Exact Test).

Tab. 6: HIT-Inzidenz im neurologischen Patientenkollektiv unter Therapie mit UFH (n=104) im Vergleich mit NMH (n=111) als Vierfeldertafel

	NMH (n)	UFH (n)	Gesamt (n)
HIT (n)	0	1	1
keine HIT (n)	111	103	214
Gesamt (n)	111	104	215

$p=0,48$ ; Fisher's Exact Test

#### 3.2.2 HIPA-Testergebnisse

Bei Patienten mit einem positiven HPIA-ELISA Testergebnis wurde der HIPA-Test durchgeführt, um die plättchenaktivierenden Eigenschaften der Antikörper zu untersuchen. Hierfür wurde diejenige Probe ausgewählt, die den höchsten OD-Wert im HPIA-ELISA aufwies.

Tab. 7: HIPA-Testergebnisse der NMH- und UFH-Patienten in der Übersicht

	NMH (n)	UFH (n)	Gesamt (n)
HPIA-ELISA positiv (n)	2	11	13
HIPA positiv (n)	0	1	1
Gesamt (n)	111	104	215

Bei den beiden AK-positiven Patienten in der Behandlungsgruppe NMH fand sich kein positiver HIPA-Test, das heißt es konnten keine plättchenaktivierenden Eigenschaften nachgewiesen werden. In der Vergleichsgruppe der UFH-Patienten konnten bei einer von 11 im HPIA-ELISA positiven Patienten (9 %) mittels HIPA-Test thrombozytenaktivierende Eigenschaften nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Thrombozytenabfall

Ein Thrombozytenabfall konnte bei 6 Patienten der NMH-Gruppe nachgewiesen werden. Der Thrombozytenverlauf war bei 30/111 Patienten mit nur einem Wert dokumentiert. Dies gilt auch für einen der beiden antikörperpositiven Patienten. In der folgenden Übersicht sind Patienten mit Thrombozytenabfall dargestellt.

Tab. 8: Thrombozytenabfall unter Therapie mit NMH

n	Patient/ Geschlecht (w/m)	Ausgang wert (G/l)	Nadir (G/l)	HPIA-ELISA- Ergebnis	HIPA- Ergebnis	Vermuteter Grund des Thrombozytenabfalls
1	M.B./w	413	146	positiv	negativ	schwere Pneumonie und/oder HA-Antikörper
2	C.H./w	95	39	negativ	negativ	MTX-Therapie bei NHL
3	M.G./w	421	70	negativ	negativ	Chemotherapie bei NHL
4	M.W./w	207	87	negativ	negativ	ungeklärt
5	J.G./m	260	72	negativ	negativ	Chemotherapie
6	G.B./w	535	270	negativ	negativ	Gramnegative Sepsis bei BronchialCa

Abkürzungen: w=weiblich, m=männlich, MTX=Methotrexat, NHL=Non-Hodgkin Lymphom

### 3.2.4 Inzidenz thromboembolischer Ereignisse unter NMH- und UFH-Therapie

Die Erfassung eines thrombotischen Ereignisses erfolgte klinisch im Rahmen des stationären Aufenthaltes. Hierbei wies unter NMH-Therapie keiner der antikörperpositiven Patienten klinische Zeichen einer Thrombose auf, unter UFH-Therapie entwickelten zwei antikörperpositive Patientinnen eine tiefe Beinvenenthrombose bzw. eine Beckenvenenthrombose mit Lungenembolie (Tab. 5b). Ein Patient aus der NMH-Gruppe (J.G., s. Tab. 5 und Tab. 8), bei

dem auch eine passagere Thrombozytopenie nachweisbar war, erlitt eine tiefe Beinvenenthrombose. HA-Antikörper ließen sich bei diesem Patienten nicht nachweisen. Aufgrund der malignen Grunderkrankung (Zerebrales Non-Hodgkin Lymphom) und der laufenden Chemotherapie sind beide Phänomene (Thrombozytopenie und tiefe Beinvenenthrombose) jedoch hinreichend erklärbar.

Die niedrige Thromboseinzidenz (1/111) zeigt, dass die Thromboseprophylaxe mit Nadroparin (Fraxiparin<sup>®</sup>) effektiv ist.

### **Einzelfalldarstellung einer AK-positiven Patientin unter NMH-Therapie**

Im Folgenden wird exemplarisch der Verlauf einer serokonvertierten, neurologisch erkrankten Patientin unter Therapie mit NMH dargestellt.

Die Patientin war initial wegen einer Hysterektomie bei Funduspolypen in einem auswärtigen Krankenhaus in stationärer Behandlung. Wegen einer akut auftretenden linksseitigen Hemiplegie mit Blickdeviation nach rechts erfolgte die Verlegung in die neurologische Universitätsklinik. Es zeigte sich eine große intrakranielle Blutung im Bereich der rechten Stammganglien. Die Patientin erhielt während des gesamten stationären Aufenthaltes Fraxiparin<sup>®</sup> 0,3 ml 1x tgl. s.c. zur Thromboseprophylaxe. Der Verlauf wurde im Weiteren kompliziert durch eine Pneumonie und einen intermittierenden AV-Block II.Grades.

Bemerkenswert ist, dass es trotz einer fortgesetzten Therapie mit Fraxiparin<sup>®</sup> zu einem Abfall der Antikörperreaktivität im HPIA-ELISA und zu einer spontanen Erholung der Thrombozytenzahl kommt. Differentialdiagnostisch muss in Betracht gezogen werden, dass der Thrombozytenabfall im Rahmen des Infektgeschehens aufgetreten ist.

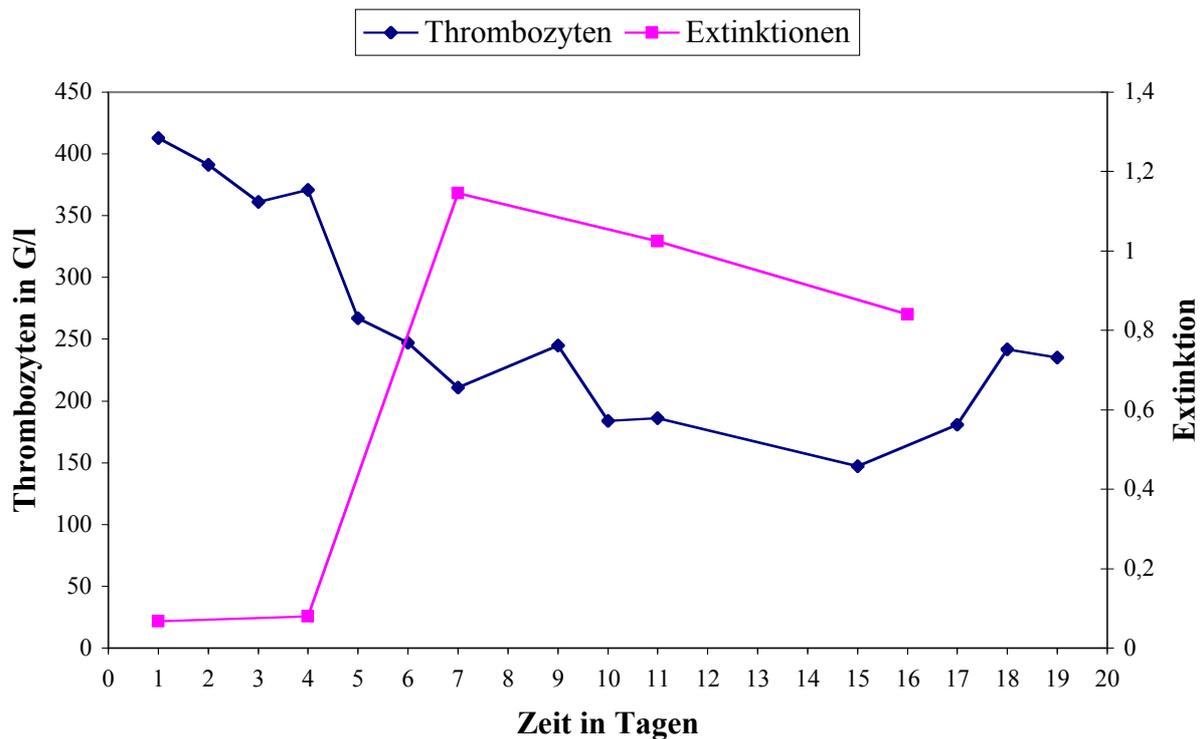


Abb. 8: Verlauf von Thrombozytenzahl und Extinktion (OD) im HPIA-ELISA über die Zeit bei einer unter NMH-Therapie serokonvertierten Patientin

### 3.2.5 Korrelation von Thrombozytenzahl und Extinktion im HPIA-ELISA

Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen Thrombozytenzahl und Extinktion (OD) untersucht (vgl. Abb. 9-11). Hierbei wurden die OD-Werte von Tag 5 (Abb. 9) und Tag 10 (Abb. 10 und 11) verwendet. Da im Kollektiv der neurologischen NMH-Patienten nur zwei Patienten antikörperpositiv waren und lediglich von einem dieser beiden Patienten Thrombozytenverlaufswerte vorliegen, wurden hier in erster Linie antikörpernegative Patienten betrachtet. Bei 82 Patienten unter NMH-Therapie existieren Thrombozytenwerte für Tag 5, von n=44 Patienten existieren Thrombozytenwerte für Tag 10. Da zu diesem Zeitpunkt die oben beschriebene Patientin M.B. bereits antikörperpositiv war, zeigt Abb. 10 die Korrelation unter Einschluß, die Abb. 11 die Korrelation unter Ausschluß der Patientin.

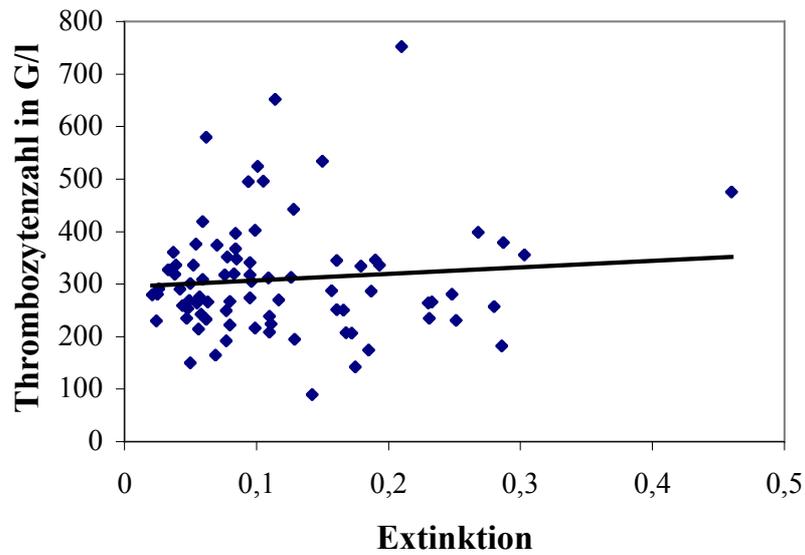


Abb. 9 Korrelation von Thrombozyten und Extinktion im HPIA-ELISA (OD) am Tag 5 (n=82) mit linearer Regression.

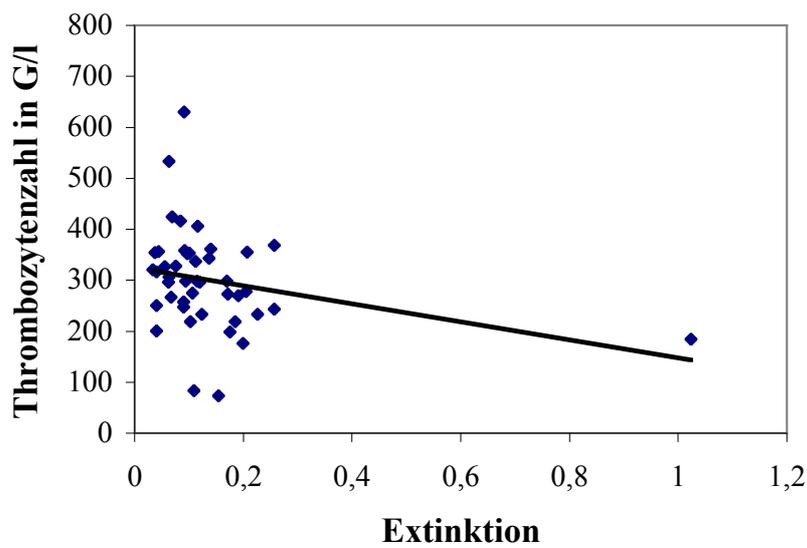


Abb. 10: Korrelation von Thrombozyten und Extinktion im HPIA-ELISA (OD) am Tag 10 (n=44) mit linearer Regression

Besonders auffällig in Abbildung 10 ist das Wertepaar der antikörperpositiven Patientin M.B. (Extinktion 1,02)

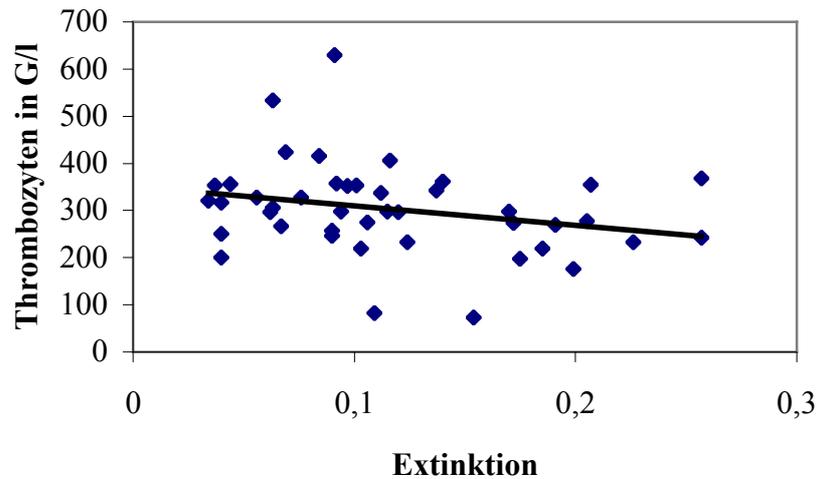


Abb. 11: Korrelation von Thrombozytenzahl und Extinktion im HPIA-ELISA am Tag 10 (n=43) ohne die antikörperpositive Patientin M.B. mit linearer Regression

Die lineare Regressionsanalyse zeigte folgende Ergebnisse: Für Tag 5 ergab sich eine allenfalls schwache positive Korrelation mit Korrelationskoeffizient  $r=0,09$ , die nicht signifikant ist ( $p=0,41$ ) (Abb. 9).

Für Tag 10 ergab sich (mit der Patientin M.B) ein negativer Korrelationskoeffizient ( $r=-0,27$ ). Diese lineare Korrelation ist nicht signifikant ( $p=0,08$ ). Die analoge Rechnung ohne die antikörperpositive Patientin M.B. ergab ein sehr ähnliches Bild: ( $r=-0,26$ ,  $p=0,10$ ).

Es konnte also in keinem Fall ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Thrombozytenzahl nachgewiesen werden.

### 3.3 Einflussfaktoren auf die Antikörperinzidenz

#### 3.3.1 Vergleich der beiden Gruppen UFH- und NMH-Patienten

Im Folgenden werden die Patientengruppe unter NMH-Therapie und die Vergleichsgruppe unter UFH-Therapie in einer Übersicht auf Unterschiede bezüglich klinischer Parameter untersucht, bevor eine mögliche Einflussnahme dieser Parameter auf die Antikörperinzidenz durch logistische Regressionsanalyse dargestellt wird.

Tab. 9: Häufigkeit der Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers, Heparinanamnese und Therapiedauer bei NMH- und UFH-Patienten

Parameter	NMH (n)	UFH (n)	p-Wert
<b>Thrombozytenaggregationshemmer</b>			p=0,15
Einnahme	39 (35 %)	27 (26 %)	
Keine Einnahme	71 (64 %)	76 (73 %)	
Einnahme unbekannt	1 (1 %)	1 (1 %)	
<b>Zeitpunkt letzte Heparinabgabe</b>			p=0,23
0 - 3 Monate	11 (10 %)	5 (5 %)	
4 - 6 Monate	9 (8 %)	5 (5 %)	
> 6 Monate oder nie	90 (81 %)	90 (87 %)	
Information fehlt	1 (1 %)	4 (4 %)	
<b>Dauer der Heparintherapie</b>			p=0,29
5 bis 7 Tage	36 (32 %)	28 (27 %)	
8 bis 11 Tage	26 (23 %)	18 (17 %)	
12 Tage und länger	49 (44 %)	58 (56 %)	
<b>Mittelwert der Therapiedauer</b> (Tage ± Standardabweichung)	12,6 ± 8,0	15,3 ± 10,6	

Die p-Werte wurden durch Chi-Quadrat-Test ermittelt.

Für alle drei Parameter ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen (p=0,15 für Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmer, p=0,23 für Heparinanamnese und p=0,29 für Therapiedauer; Chi-Quadrat-Test)

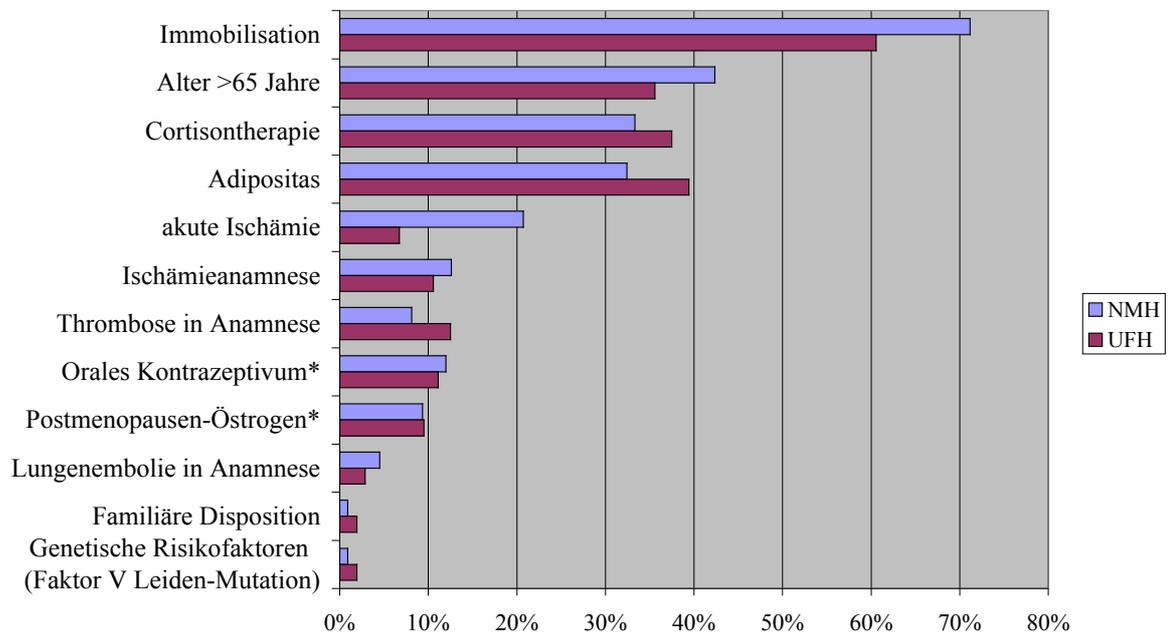
Im Folgenden sind Risikofaktoren für arterielle und venöse Thrombosen und ihre Verteilung in der NMH- und UFH-Patientengruppe aufgelistet bzw. graphisch dargestellt.

Tab. 10: Auflistung der Risikofaktoren für thrombotische Ereignisse

	NMH		UFH	
	Anzahl	in % der Gesamtzahl (111)	Anzahl	in % der Gesamtzahl (104)
Immobilisation	79	71 %	63	61 %
Alter >65 Jahre	47	42 %	37	36 %
Cortisontherapie	37	33 %	39	38 %
Adipositas	36	32 %	41	39 %
akute Ischämie	23	21 %	7	7 %
Ischämieanamnese	14	13 %	11	11 %
Thrombose in Anamnese	9	8 %	13	13 %
Orales Kontrazeptivum	9	8 % (12 %*)	7	7 % (11 %*)
Postmenopausen-Östrogen	7	6 % (9 %*)	6	6 % (10 %*)
Lungenembolie in Anamnese	5	5 %	3	3 %
familiäre Disposition	1	1 %	2	2 %
Genetische Risikofaktoren (Faktor V Leiden-Mutation)	1	1 %	2	2 %

\*Angabe in Prozent der Frauen (NMH-Gruppe: 75 Frauen, UFH-Gruppe: 63 Frauen,)

Die Risikofaktoren wurden angegeben in % der jeweiligen Gesamtzahlen, bzw. bei den Faktoren „Orales Kontrazeptivum“ und „Postmenopausenöstrogen“ in % der Gesamtzahlen der Frauen.



\*Angabe in Prozent der Frauen (NMH-Gruppe: 75 Frauen, UFH-Gruppe: 63 Frauen)

Abb. 12: Risikofaktoren für thromboembolische Ereignisse bei neurologischen Patienten unter NMH- und UFH-Therapie

Der folgenden Tabelle ist die Verteilung der Anzahl der Risikofaktoren pro Patient zu entnehmen.

Tab. 11: Verteilung der Anzahl der Risikofaktoren pro Patient

Anzahl der Risikofaktoren	NMH		UFH	
	Anzahl	in % der Gesamtzahl	Anzahl	in % der Gesamtzahl
1	26	23 %	28	27 %
2	40	36 %	39	38 %
3	23	21 %	25	24 %
4	17	15 %	10	10 %
5	5	5 %	2	2 %
Gesamt	111	100 %	104	100 %

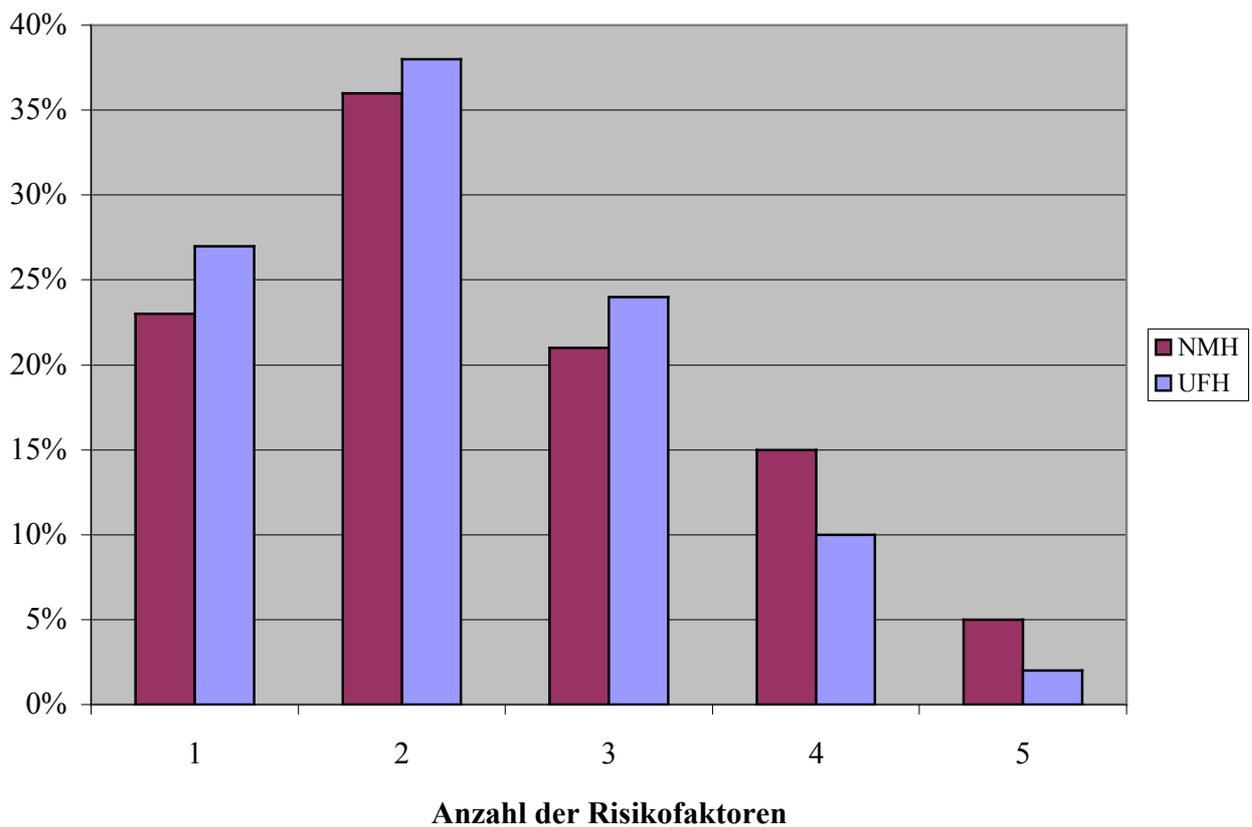


Abb. 13: Verteilung der Anzahl der Risikofaktoren für thrombotische Ereignisse bei neurologischen Patienten unter NMH- und UFH-Therapie

In der NMH-Gruppe sind mehr Patienten mit mehr als 3 Risikofaktoren eingeschlossen als in der UFH-Gruppe (20 % vs. 12 %). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ( $p=0,09$ ; Chi-Quadrat-Test)

### 3.3.2 Einflussfaktoren auf die Antikörperentwicklung

Folgende Einflussfaktoren auf die Entwicklung von Antikörpern wurden mittels logistischer Regressionsanalyse untersucht: Therapiedauer, Heparinart, Geschlecht, Alter, Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers und Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes als Diagnose. Bei dem Punkt „Einnahme eines Thrombozytenaggregationhemmers“ fehlte die Information in zwei Fällen, diese Datensätze wurden ausgeschlossen.

Tab. 12a: Erster Schritt der logistischen Regressionsanalyse (Backward iteration)

Einflussfaktoren	beta	p-Wert
Therapiedauer	0,0	0,502
Heparinart	2,1	0,015
Geschlecht	0,2	0,760
Alter	0,0	0,821
Einnahme Thrombozytenaggregationshemmer	-2,0	0,077
Zerebrovaskuläres Krankheitsbild	1,8	0,021

Die Einflussgrößen der linearen Regression waren folgendermaßen parametrisiert: Therapiedauer: in Tagen, Heparinart: (NMH=0, UFH=1), Geschlecht: (Mann=0, Frau=1), Alter: in Jahren, Einnahme Thrombozytenaggregationshemmer: (nein=0, ja=1), Zerebrovaskuläres Krankheitsbild (nein=0, ja=1).

Die logistischen Regression lieferte sowohl mit der Forward- als auch mit der Backward-Iteration das folgende Ergebnis: Kein Einfluss konnte nachgewiesen werden für Therapiedauer, Geschlecht und Alter. Die übrigen Parameter sind tabellarisch aufgeführt.

Tab. 12b: Letzter Schritt der logistischen Regressionsanalyse (Backward iteration)

	beta	p-Wert
Heparinart	2,1	0,013
Zerebrovaskuläres Krankheitsbild	1,8	0,018
Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers	-2,0	0,075

Patienten unter Therapie mit NMH entwickelten signifikant seltener Antikörper als unter Therapie mit UFH ( $p=0,013$ ). Diese Zielgröße ist bereits mittels Fisher's Exact Test (siehe Abschnitt 3.1.) überprüft worden und ergab dort ebenfalls einen signifikanten p-Wert von 0,009. Das Vorliegen einer zerebrovaskulären Erkrankung ist in der logistischen Regressionsanalyse ebenfalls signifikant für die Ausbildung von Antikörpern ( $p=0,018$ ). Betrachtet man diese Einflussgröße isoliert mittels Fisher's Exact Test (Tab. 13), so lässt sich aber kein signifikanter Einfluss auf die Bildung von Antikörpern zeigen ( $p=0,48$ ).

Tab. 13: Einfluss des Vorliegens eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes auf die Bildung von Antikörpern als Vierfeldertafel

	Zerebrovaskuläres Krankheitsbild		Gesamt (n)
	liegt nicht vor (n)	liegt vor (n)	
AK-Positiv (n)	9	4	13
AK-Negativ (n)	161	41	202
Gesamt (n)	170	45	215

$p=0,48$  Fisher's Exact Test

Hier ist anzumerken, dass sich die beiden Gruppen der NMH und UFH-Patienten signifikant unterscheiden (vgl. Tab. 2) in dem Merkmal „Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes“; deutlich mehr Patienten der NMH-Gruppe waren zerebrovaskulär erkrankt ( $p<0,001$ ).

Der Parameter „Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers“ liefert in der logistischen Regressionsanalyse einen negativen Betawert. Dies zeigt, dass er die Antikörperentwicklung negativ beeinflusst. Dementsprechend scheint die Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers zumindest im Trend einen protektiven Effekt gegenüber der Bildung von Antikörpern zu haben; es konnte allerdings keine Signifikanz nachgewiesen werden ( $p=0,075$ ).

Eine Überprüfung des isolierten Einflusses mittels Fisher's Exact Test (Tab 14) zeigt ebenfalls keine Signifikanz ( $p=0,11$ ).

Tab. 14: Einfluss der Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers auf die Bildung von Antikörpern als Vierfeldertafel

	Thrombozytenaggregationshemmer		Gesamt (n)
	Einnahme (n)	Keine Einnahme (n)	
AK-Positiv (n)	1	11	12
AK-Negativ (n)	65	136	201
Gesamt (n)	66	147	213

$p=0,11$  Fisher's Exact Test

### 3.4 HAT (HIT I) unter NMH-Therapie

Limitierungen bezüglich der Bewertung einer HAT ergaben sich aus der Tatsache, dass tägliche Thrombozytenverlaufswerte nur bei einem Teil der Patienten vorlagen. Von  $n=34$  Patienten lagen Werte für die Tage 1, 3 und 5 vor. Tägliche Thrombozytenwerte der Tage 0 bis 5 lagen für  $n=9$  Patienten vor. Diese Subgruppen werden mit der Fragestellung HAT grafisch dargestellt.

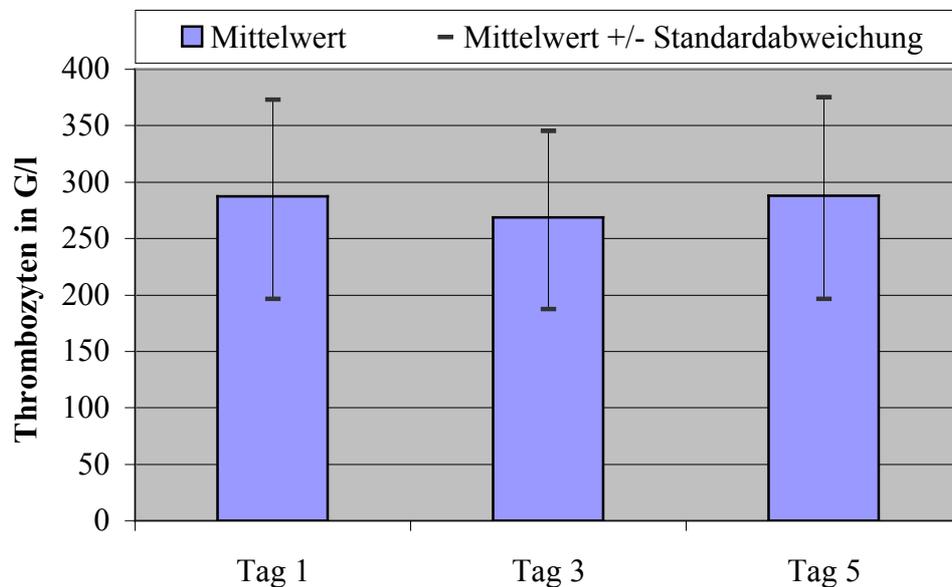


Abb. 14: Thrombozytenverlauf mit den Messpunkten Tag 1, 3 und 5 (Subgruppe  $n=34$ )

Tab. 15: Thrombozytenverlauf (G/l) für n=34 NMH-Patienten

	Tag 1	Tag 3	Tag 5
Mittelwert	285	266	286
Standardabweichung	88	79	89

Es fällt auf, dass Tag 1 und Tag 5 einen fast identischen Mittelwert aufweisen, während der Mittelwert für Tag 3 niedriger ist. Diese Tendenz ist in folgender Darstellung mit täglichen Messpunkten noch deutlicher zu erkennen.

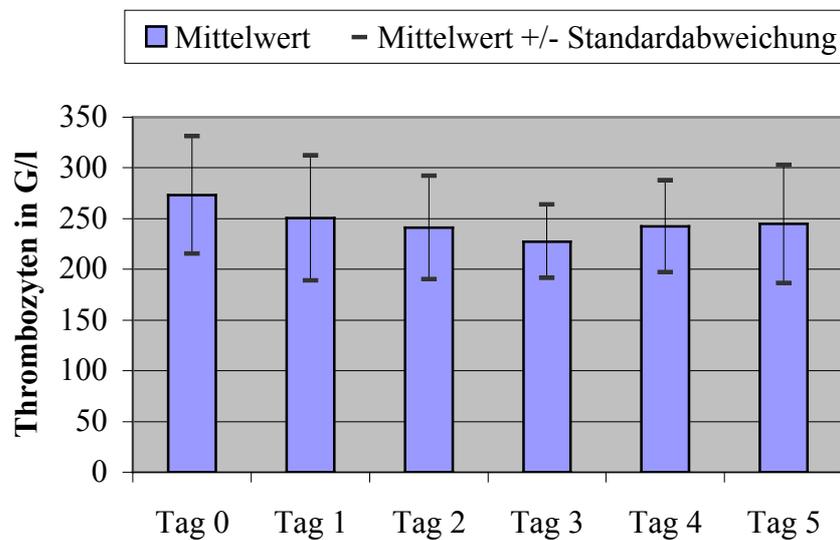


Abb. 15: Thrombozytenverlauf (tägliche Messung) in den ersten 5 Tagen (Subgruppe n=9)

Tab. 16: Thrombozytenverlauf in G/l (n=9)

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5
Mittelwert	273	251	241	228	242	245
Standardabweichung	58	62	51	36	46	58

## 4. Diskussion

Die Ergebnisse von Antikörper- und HIT-Inzidenz unter NMH versus UFH werden in Bezug auf die aktuelle Literatur eingeordnet. Ergänzend dazu soll diskutiert werden, ob Faktoren isoliert werden konnten, welche die AK-Inzidenz beeinflussen. Das Phänomen der primär antikörperpositiven Patienten soll gesondert betrachtet werden.

Die Studienlage bezüglich Antikörperinzidenz und HIT-Inzidenz in anderen Kollektiven bei Applikation von unterschiedlichen Heparinpräparationen wird dargestellt. Es liegt der Schwerpunkt auf Arbeiten, die auf einem systematischen Antikörperscreening mittels sensitiver Tests basieren wie die vorliegende Arbeit und auf der Applikation von Heparin zur Thromboembolieprophylaxe.

Ferner sollen die klinische Bedeutung der Antikörper und die Ergebnisse bezüglich HAT erörtert werden.

### 4.1 Unterschiede in der Antikörperinzidenz bei NMH- und UFH-Patienten

Die HA-Antikörperinzidenz war in den Patientengruppen unter subkutaner UFH- und NMH-Therapie statistisch signifikant unterschiedlich (Tab. 4).

Dies wird in der Literatur in vielen Arbeiten dargestellt, eine niedrigere HIT-Inzidenz unter NMH- im Vergleich zu UFH-Therapie wird als gesichert angesehen. Bestätigt wurde dies unter anderem in den letzten Jahren durch eine große randomisierte klinische Studie von Warkentin et al. (2003), in nicht-randomisierten Kohortenstudien von Greinacher et al. (2005) und Pouplard et al. (1999 und 2005), in Metaanalysen von diesen und anderen Studien von Martel et al. (2005) und Warkentin et al. (2006) und in verschiedenen retrospektiven populationsbasierten Studien von Gruel et al (2003), Creekmore et al. (2006) und Smythe et al. (2007) mit jeweils einer großen Anzahl an Patienten. Die innerhalb der Studien durchgeführten serologischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass deutlich niedrigere Frequenzen von Anti-H/PF 4-Antikörperbildung bei NMH verglichen mit UHF vorliegen (Greinacher et al., 2005; Warkentin et al., 2003). Bei orthopädischen Patienten konnten klare Unterschiede sowohl bei der Immunogenität (AK-Induktion) als auch bei der HIT-Inzidenz gezeigt werden (Warkentin, 2006). Für internistische Patienten bei Betrachtung der HIT-Inzidenz ist dieses Bild nicht so eindeutig (vgl. Kap. 4.3).

#### **4.1.1 Einfluss von einzelnen Faktoren auf die Antikörperinzidenz**

Bei chirurgischen Patienten unter Therapie mit dem NMH Enoxaparin und Fondaparinux konnten in einer Untersuchung Einflussfaktoren auf die Antikörperinzidenz isoliert werden: Art des chirurgischen Eingriffs (Knie- vs. Hüftchirurgie), Zeitpunkt der ersten Medikamentenapplikation (prä- vs. postoperativ) sowie der BMI (Warkentin et al., 2009).

In der logistischen Regressionsanalyse bei den hier untersuchten neurologischen Patienten wurden 6 Parameter untersucht: Alter, Geschlecht, Therapiedauer, Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers, Heparinart und Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes.

Ein Einfluss des Lebensalters auf die Antikörperinzidenz konnte nicht nachgewiesen werden. Hierbei bleibt offen, ob eine größere Patientengruppe mit einem höheren Durchschnittsalter ein anderes Ergebnis aufweist, denn die HIT scheint ein Erkrankungsbild vor allem des älteren und multimorbiden Patienten zu sein. Die hier untersuchten Patienten wiesen ein Durchschnittsalter von 57,3 ( $\pm$  16,6) Jahren bei den NMH-Patienten bzw. 56,8 ( $\pm$  17,2) Jahren bei den UFH-Patienten auf (vgl. Tab. 2) und sind damit im Vergleich zu internistischen Patienten eher als jung einzustufen.

Ein Einfluss des Geschlechts auf die Antikörperinzidenz konnte von uns im Rahmen der logistischen Regressionsanalyse nicht gezeigt werden. Es ist bekannt, dass das weibliche Geschlecht einen (mäßigen) Risikofaktor für das Auftreten einer HIT darstellt mit einer OR von 1,5-2,0 (Warkentin et al., 2006). Ob dies in gleichem Maß für die Antikörperinzidenz gilt, ist nicht bekannt. Vermutlich aufgrund der insgesamt niedrigen Fallzahl an antikörperpositiven Patienten in dieser Arbeit konnte das Ergebnis der Metaanalyse von Warkentin et al. (2006) hier nicht gezeigt werden, obwohl in beiden Gruppen dieser Arbeit der Frauenanteil relativ hoch war (67,6 % in der NMH-Gruppe und 60,6 % in der UFH-Gruppe). In einer neueren Publikation verweisen die Autoren darauf, dass ein derartiger Unterschied zwischen den Geschlechtern bisher nur für Thromboembolieprophylaxe mit UFH gezeigt werden konnte (Warkentin und Eikelboom, 2007).

Für die Therapiedauer konnte ebenfalls kein Einfluss nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen bezüglich der HIT-Inzidenz: Warkentin und Eikelboom (2007) sehen die Dauer der Heparintherapie als einen Schlüssel-Risikofaktor für HIT an; diese Erkenntnisse beziehen sich allerdings ebenfalls auf chirurgische Patienten unter Thromboembolieprophylaxe mit UFH (Lee und Warkentin 2007; Martel et al., 2005; Warkentin et al., 2006). In der Gruppe

der NMH-Patienten gibt es einen etwas höheren Anteil an Patienten mit einer sehr kurzen Therapiedauer von 5-7 Tagen. Dies waren in der NMH-Gruppe 32 %, in der UFH-Gruppe nur 27 %. Manche Autoren berichten über ein späteres Auftreten der HIT in Verbindung mit NMH (Gruel et al., 2003; Lindhoff-Last et al., 2002). Gruel et al. (2003) berichteten, dass die HIT bei NMH-Patienten im Median an Tag 14 auftrat (die Spannweite lag bei Tag 7 bis Tag 48) und bei UFH-Patienten im Median an Tag 9 (Spannweite Tag 1-26). Es ist davon auszugehen, dass auch eine entsprechende Antikörperinduktion bei den NMH-Patienten später stattgefunden hat. Möglicherweise wurde im hier vorliegenden NMH-Kollektiv eine niedrigere Antikörperinzidenz erhoben, als es in einem Kollektiv mit längerer Behandlungsdauer der Fall wäre. Da das Auftreten der HIT sowohl am Tag 5-15 sein kann (typical onset) als auch bei vorheriger Heparinexposition früher (early onset), wählten wir das Kriterium, dass die Heparintherapie mindestens 5 Tage betragen muss und erfassten klinische Daten über die Heparinanamnese. Viele Patienten wiesen keine positive Heparinanamnese auf oder die letzte Heparinexposition lag länger als 3 Monate zurück. Nach dieser Zeit ist der Antikörper nach heutigem Kenntnisstand in der Regel eliminiert. Etliche Patienten waren an einer Meningitis oder einer ED erkrankt und vorher nie ernsthaft krank gewesen oder hospitalisiert. Möglicherweise liegt bei diesen Patienten ein zu kurzes Zeitintervall vor, um das Auftreten neuer Antikörper zu erfassen. In einer retrospektiven Studie bei internistischen Patienten, welche zum Grossteil UFH erhielten, war neben der Gabe von UFH in therapeutischer Dosierung auch eine Heparinadministration für länger als 5 Tage mit einem erhöhten HIT-Risiko assoziiert (Kato et al., 2011). Es ist unklar, ob die Therapiedauer bei Applikation von NMH eine ähnlich wichtige Rolle spielt wie bei UFH-Therapie. Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Einfluss der Therapiedauer hier nicht nachweisbar war, es bleibt jedoch offen, ob ein längerer Beobachtungszeitraum hier zu anderen Ergebnissen geführt hätte.

Der Einfluss der Heparinart war auch in der logistischen Regressionsanalyse statistisch nachweisbar (vgl. Kapitel 5.1 und 5.2). Warkentin und Eikelboom (2007) berichten, dass ein Unterschied im HIT-Risiko durch den Einflussfaktor „Heparinart“ nur für chirurgische Patienten unter Thromboembolieprophylaxe gezeigt werden konnte (Lee und Warkentin, 2007; Martel et al., 2005; Warkentin et al., 2006). Es gibt diverse Argumente für eine unterschiedliche Antikörperinzidenz bei UFH- und NMH-Therapie. Hierbei betrachtet man die beiden Begriffe Immunogenität und Kreuzreaktivität. Es gibt pathophysiologische Überlegungen, die für eine höhere AK-Inzidenz unter UFH sprechen, da größere und vermutlich immunogenere Komplexe

von PF 4-Polysaccharid-Komplexen mit UFH gebildet werden. Obwohl die Antikörper gegen UFH und NMH in ähnlicher Weise *in vitro* kreuzreagieren, gibt es Hinweise, dass es unter NMH zu einer geringeren „Ausbruchsrates“ der HIT kommt (Warkentin, 2006). Die beschriebenen großen stabilen Komplexe auf der Thrombozytenoberfläche formieren sich mit PF 4 und NMH nur begrenzt und überhaupt nicht mit dem Pentasaccharid Fondaparinux (Levy und Hursting, 2007). Dies trägt möglicherweise zu den unterschiedlichen HIT-Inzidenzen dieser Substanzen bei. *In vitro* konnte eine Beziehung zwischen der Bildung immunogener H/PF 4-Komplexe und dem Sulfatierungsgrad von Heparinen gezeigt werden (Greinacher et al., 1992). NMHs sind weniger in der Lage, PF 4 zu binden und in der Folge seine Struktur zu modifizieren (Greinacher et al., 1993). Dies könnte erklären, warum solche Fraktionen wahrscheinlich weniger immunogen sind und weniger häufig eine AK-Entwicklung auf H/PF 4-Komplexe triggern (Amiral et al., 1996b; Warkentin et al., 1995). Die Reaktivität von endothelialen Glycosaminoglykanen mit Heparin ist neben dem Sulfatierungsgrad auch abhängig von der Kettenlänge. Daher ist möglicherweise die Potenz verschiedener NMH eine Immunantwort zu induzieren unterschiedlich. Aufgrund der weiteren unterschiedlichen Charakteristika von niedermolekularen Heparinen (unterschiedliche Herstellungsart, unterschiedliche Charakteristika und Pharmakokinetik) könnten Unterschiede zwischen den verschiedenen NMH bestehen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Antikörperinzidenzen bei den NMH- und UFH-Patienten in der vorliegenden Arbeit bietet das Modell von Greinacher et al. (2008). Die Autoren haben ein stöchiometrisches Modell entwickelt, um die unterschiedliche Immunogenität von UFH, NMH und Fondaparinux zu erklären. Zur optimalen Komplexbildung kommt es bei Gabe von prophylaktischen Dosen UFH und hohen PF 4-Spiegeln. Dies ist eine mögliche Erklärung für die höhere HA-Antikörperinzidenz in Kollektiven mit einem erhöhten Anteil an zerebrovaskulär erkrankten Patienten, welche zugleich UFH erhielten. Therapeutische Dosen an NMH hingegen erzielen eine zu hohe Konzentration, um eine optimale Komplexbildung zu erreichen. Es kommt also eher in Situationen mit hohen PF 4-Spiegeln zu einer Immunisierung. Für einen gegebenen PF 4-Spiegel sieht nach Meinung der Autoren die Reihenfolge der potentiellen Immunisierung wie folgt aus: prophylaktische Dosis UFH > therapeutische Dosis UFH > prophylaktische Dosis NMH > therapeutische Dosis NMH. Warum sich die Gabe von NMH anders als UFH auf die Induktion von HA-Antikörpern auswirkt, konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Man geht heute davon aus, dass Unterschiede in der Fähigkeit von UFH und NMH übergroße Komplexe mit PF 4 zu bilden (Greinacher et al., 2006) und in ihrem stöchiometrischen Verhältnis

zu PF 4 (Greinacher et al., 2008) die niedrigere Inzidenz der HIT bei NMH im Vergleich zu UFH erklären können. Das niedrigere HIT-Risiko unter NMH-Therapie konnte am besten für chirurgische Patientinnen gezeigt werden (Linkins und Warkentin, 2011; Warkentin et al., 2006). Bei der Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers ist ein Trend in Richtung Hemmung der HA-Antikörperinduktion erkennbar. Bei der Pathogenese der HIT wurde eine Einflussnahme des Thrombozyten-ADP-Rezeptors dahingehend diskutiert, dass eine Blockade desselben die Thrombozytenaktivierung verhindern kann (Polgar et al., 1998). Ferner wurden in der Frühphase der Erkenntnisse Thrombozytenfunktionshemmer zur (wenn auch nicht alleinigen) Therapie der HIT empfohlen (Greinacher, 1999). Der Gebrauch von Thrombozytenaggregationshemmern konnte in einer grossen retrospektiven Studie zur HIT-Inzidenz bei internistischen Patienten nicht als Einflussfaktor isoliert werden (Kato et al., 2011).

In der logistischen Regressionsanalyse konnte ein Einfluss für den Parameter „Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes“ nachgewiesen werden. Einige pathophysiologische Überlegungen lassen ein derartiges Ergebnis plausibel erscheinen. Bei zerebrovaskulär erkrankten Patienten liegt aufgrund des Krankheitsbildes sehr häufig eine Aktivierung der Hämostasefunktion vor. Dies geht mit höheren PF 4-Spiegeln und Thrombozytenaktivierung einher, was (zumindest in der Akutphase der Erkrankung) eine höhere Immunogenität durch veränderte stöchiometrische Verhältnisse erklären könnte (Greinacher et al., 2008). Dies bedeutet, dass bessere Bedingungen zur Antikörperinduktion und zur Entstehung des Krankheitsbildes HIT vorliegen. In einer Arbeit von Kawano et al. (2011) konnte bei Patienten mit einem zerebrovaskulären Insult (bei Verwendung von intravenösem UFH) eine hohe Antikörperinzidenz von 12,8% (22/172) und bei einer HIT-Inzidenz von 1,7% eine sehr hohe HIT-assoziierte Mortalität (66,7%) festgestellt werden. Dies unterstreicht die Bedeutung des Einflussfaktors „Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes“. Diese Eigenschaft war in der vorliegenden Arbeit in den beiden Gruppen UFH und NMH nicht gleich verteilt. Nur etwa ein Viertel des Gesamtkollektivs litt an einem zerebrovaskulären Krankheitsbild. Es ist die einzige Diagnose, die statistisch signifikant häufiger in der Patientengruppe unter NMH-Therapie vorkommt, dennoch ist die HA-Antikörperinzidenz in der UFH-Gruppe höher; dies könnte ein Hinweis sein, dass diese Patienten von der Gabe des NMH profitiert haben.

In einer aktuellen Leitlinie werden als Risikofaktoren für die Entstehung einer HIT Dauer und Art der Heparintherapie, das Patientenkollektiv, die Schwere des Traumas und das Geschlecht benannt (Linkins et al., 2012). Die Daten der hier vorliegenden Arbeit wurden auf

Einflussfaktoren auf die AK-Inzidenz hin ausgewertet. Ein möglicher Einfluss des Patientenkollektivs (chirurgisch vs. internistisch) oder eines Traumas konnte hier nicht untersucht werden, da ein definiertes neurologisches Patientenkollektiv untersucht wurde. Für das Geschlecht und die Dauer der Heparintherapie konnte kein Einfluss festgestellt werden. Die Art der Heparintherapie konnte neben dem Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes als Einflussfaktor identifiziert werden. Offen bleibt die Frage, inwieweit sich die einzelnen Risikofaktoren für die Entstehung von HA-Antikörpern bzw. von HIT gegenseitig beeinflussen bzw. miteinander assoziiert sind.

#### **4.1.2 Primär antikörperpositive Patienten**

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen den hier untersuchten Kollektiven ist das Vorhandensein von primär antikörperpositiven Patienten in der Gruppe der UFH-Patienten. Die beiden antikörperpositiven NMH-Patienten sind beide serokonvertiert. Bemerkenswert ist, dass in der Vergleichsgruppe von den 11 antikörperpositiven UFH-Patienten 6 Patienten primär seropositiv waren, die anderen 5 Patienten sind serokonvertiert. Nur bei zwei Patienten lässt sich dieses Phänomen durch vorhergehende Heparinbehandlung erklären. Dies ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Ein ähnliches Phänomen (Antikörper ohne Heparinexposition) beschreiben Matsuo et al. (2005a). Bei 6 von 40 Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden AK gegen H/PF 4-Komplexe nachgewiesen, obwohl diese Patienten niemals zuvor mit Heparin behandelt worden waren. Auch Thrombozytopenien und thromboembolische Komplikationen konnten bei diesen Patienten beobachtet werden.

Auch in anderen Arbeiten konnten primär seropositive Patienten identifiziert werden. Die Inzidenzen reichen hier von 0,8-4,5 %.

In einer Arbeit von Marx et al. (1999) hatten 10/265 (3,8 %) bereits vor einem orthopädisch-chirurgischen Eingriff HIT-IgG. Yeh et al. (2006) und Foo et al. (2006) beschreiben ähnliche Eingangskohorten bei Patienten vor Koronarangiographie mit einer Prävalenz von HIT-IgG von 3 % (15/500).

Bei der Arbeit von Gluckmann et al. (2005) waren von 154 Patienten vor Koronarintervention 7 Patienten initial positiv im HPIA-ELISA (entspricht 4,5 %). In einer Arbeit von Matsuo et al. (2005b) bei Patienten vor Koronarangiographie oder Koronarintervention konnten 0,8 % seropositive Patienten bereits bei der Ausgangsmessung detektiert werden.

Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Antiphospholipidsyndrom und/oder systemischem Lupus erythematoses sehr häufig falsch positive Ergebnisse in HIT-Antigen-Assays aufweisen (Pauzner et al., 2009); diese Diagnosen wurden bei keinem der hier untersuchten Patienten erfasst.

Die Gründe für das Auftreten von HA-Antikörpern ohne Heparinexposition und der pathophysiologische Zusammenhang sind noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise wurden die AK mit Kreuzreaktivität gegen den H/PF 4-Komplex durch Komplexe von endogenen Glykosaminoglykanen (wie etwa endotheliale Heparansulfat) und PF 4 bereits vor einer ersten Heparintherapie getriggert. Bei bis zu 15 % der HIT-Fälle können auch andere Proteine wie Neutrophilenaktivierendes Peptid 2 und Interleukin 8 an der Bildung der Neoantigene beteiligt sein, möglicherweise kann dies auch in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen (Greinacher, 1999). Möglicherweise handelt es sich auch um die Induktion eines reinen Autoantikörpers.

In neueren Arbeiten wurde die Hypothese von HIT als fehlgeleitetem bakteriellen Abwehrmechanismus überprüft. Argumente hierfür sind, dass PF 4 an verschiedene Bakterien binden kann, dass PF 4/H-Antikörper in der Lage sind, an mit PF 4 bedeckte *E. coli* und *S. aureus* zu binden, und dass Mäuse nach polymikrobieller Sepsis PF 4/H-Antikörper bilden können ohne eine Heparinexposition (Krauel et al., 2011). Ein negativ geladenes Lipopolysaccharid auf der Bakterienoberfläche von gramnegativen Bakterien wurde identifiziert als Bindestruktur für PF 4 (Krauel et al., 2012). Greinacher et al. (2011) untersuchten in diesem Zusammenhang den Einfluss prävalenter Infektionen und konnten eine Assoziation zwischen Periodontitis und der Präsenz von PF 4/H-Antikörpern zeigen. Sie folgern, dass eine Präimmunisierung gegen PF 4-Bakterien-Komplexe hinreichend das schnelle Auftreten und die Präsenz von ihnen als „natürlich“ bezeichneter Antikörper erklären kann.

## **4.2 Vergleich mit Antikörperinzidenzen in der Literatur**

Im Folgenden sollen insbesondere Studien betrachtet werden, die mittels sensitiver Testverfahren (HPIA-ELISA) die Antikörperinzidenz untersuchen. Hierbei liegt ein Schwerpunkt auf den Arbeiten, die das HPIA-ELISA-Testverfahren verwenden. Mit unterschiedlichen Testverfahren erhobene HA-Antikörperinzidenzen sind nicht oder nur eingeschränkt vergleichbar.

Ein Überblick über Arbeiten zur Antikörper-Inzidenz ist einer Übersicht von Lee und Warkentin (2007) zu entnehmen. Eine mögliche Einteilung der Studien kann nach verwendeter Heparinart

und Patientenkollektiv vorgenommen werden, der Schwerpunkt liegt ferner auf den Arbeiten, in denen Heparin zur Thromboseprophylaxe eingesetzt wurde (Tab. 17).

- 1.) Prophylaxe mit NMH versus UFH und nicht-chirurgisches Patientenkollektiv
- 2.) Prophylaxe mit NMH versus UFH und chirurgisches Patientenkollektiv

Tab. 17a Antikörperinzidenzen und HIT-Inzidenzen in Studien über Patienten unter NMH-Therapie sowie deren Vergleichsarme (chirurgische Patienten) nach Lee und Warkentin (2007)

Studie	Patientenkollektiv, Studiendesign	Präparat und Indikation	Antikörperinzidenz		Nachweisverfahren	HIT-Inzidenz		
			n/N	(%)		n/N	(%)	
Warkentin et al., 1995 und 2000	Orthopädisch-operativ, Untergruppe RCT	UFH	29/205	(14,1)	EIA-IgG	10/205	(4,9)	
		s.c. prophylaktisch	19/205	(9,3)	SRA			
		<b>NMH</b> (Enoxparin)	11/182	<b>(6,0)</b>	EIA-IgG	2/182	<b>(1,1)</b>	
		s.c. prophylaktisch	5/182	(3,7)	SRA			
Amiral et al., 1996b	Orthopädisch-operativ	<b>NMH</b> (Dalteparin und Nadroparin) s.c. prophylaktisch	8/100	<b>(8,0)</b>	EIA-IgM/A/G	0/100	<b>(0,0)</b>	
Trossaërt et al. 1998	Retrospektiv, Kardiochirurgisch	UFH bei CPB, dann UFH	14/51	(27,5)	EIA-IgM/A/G	0/51	(0,0)	
		s.c. prophylaktisch	9/51	(17,6)	EIA-IgG			
			2/51	(3,9)	PRP			
Marx et al., 1999	Orthopädisch-operativ prospektiv	<b>NMH</b> s.c. prophylaktisch	13/265	<b>(4,9)</b>	EIA-IgG	0/265	(0,0)	SRA und HIPA-Test bei klinischem Verdacht
Pouplard et al., 1999	Kardiochirurgische OP prospektiv	Alle UFH bei CBP-OP, dann UFH	46/157	(29,3)	EIA-IgM/A/G	6/157	(3,8)	
		postoperativ s.c. oder <b>NMH</b>	24/157	(15,3)	EIA-IgG			
			6/157	(3,8)	SRA			
		s.c. prophylaktisch	37/171	<b>(21,6)</b>	EIA-IgM/A/G	0/171	<b>(0,0)</b>	
			24/171	(14,0)	EIA-IgG			
			2/171	(1,2)	SRA			

Abkürzungen: RCT=randomisierte klinische Studie, CPB=kardiochirurgische OP-Technik unter Verwendung eines kardiopulmonalen Bypass, EIA=HPIA-ELISA mit Nachweis von Antikörpern vom IgM- IgA- und/oder IgG-Typ

Studie	Patienten- kollektiv, Studiendesign	Präparat und Indikation	Antikörper- Inzidenz		Nachweis- verfahren	HIT-Inzidenz	
			n/N	(%)		n/N	(%)
Lindhoff-Last et al., 2000	Gefäß- chirurgische OP prospektiv	UFH	17/50	(34,0)	EIA-IgM/A/G	0/50	(0,0)
		7 Tage lang i.v. dann <b>NMH</b>	6/48	(12,5)	EIA-IgG		
		s.c. prophylaktisch	3/48	(6,3)	HIPA		
Warkentin et al. 2000	Prospektiv, Kardio- chirurgische OP	UFH bei CPB, dann UFH	50/100	(50,0)	EIA-IgG	1/100	(1,0)
		s.c. prophylaktisch	20/100	(20,0)	SRA		
		<b>NMH</b> s.c. prophylaktisch	22/257	<b>(8,6)</b>	EIA-IgG		
Greinacher et al., 2005	Orthopädisch- operativ prospektiv	UFH	46/231	(23,5)	EIA-IgM/A/G	12/231	(5,2)
		s.c. prophylaktisch	25/231	(12,4)	HIPA		
		<b>NMH</b>	19/271	<b>(8,3)</b>	EIA-IgM/A/G		
		s.c. prophylaktisch	13/271	(5,5)	HIPA		
Warkentin et al., 2005	Orthopädisch- operativ,	<b>NMH</b> (Enoxaparin) s.c. prophylaktisch	30/1349	<b>(2,2)</b>	EIA-IgM/A/G	0/1349	<b>(0,0)</b>
			6/1349	(0,4)	EIA-IgG		
			1/1349	(0,1)	SRA		
	Untergruppe RCT	Fondaparinux s.c. prophylaktisch	26/1377	(1,9)	EIA-IgM/A/G	0/1377	(0,0)
			9/1377	(0,7)	EIA-IgG		
			3/1377	(0,2)	SRA		
Lubenow et al., 2006	Trauma RCT	UFH	21/314	(6,7)	EIA <u>und</u> HIPA	4/314	(1,3)
		s.c. prophylaktisch			in beiden		
		<b>NMH</b> s.c. prophylaktisch	5/295	<b>(1,7)</b>	Gruppen		

Abkürzungen: RCT=randomisierte klinische Studie, CPB=kardiochirurgische OP-Technik unter Verwendung eines kardiopulmonalen Bypass, EIA=HPIA-ELISA mit Nachweis von Antikörpern vom IgM- IgA- und/oder IgG-Typ

Tab. 17b Antikörperinzidenzen und HIT-Inzidenzen in Studien über Patienten unter NMH-Therapie sowie deren Vergleichsarme (internistische Patienten) nach Lee und Warkentin (2007)

Studie	Patientenkollektiv, Studiendesign	Präparat und Indikation	Antikörperinzidenz n/N (%)	Nachweisverfahren	HIT-Inzidenz n/N (%)
Amiral et al., 1996b	Retrospektiv internistisch	UFH i.v. therapeutisch	19/109 (17,4) 3/109 (2,8)	EIA-IgM/A/G EIA-IgG	1/109 (0,9)
Boon et al., 1996	Prävalenzstudie bei Dialysepatienten	UFH i.v. therapeutisch <b>NMH</b> s.c. prophylaktisch	4/128 (3,1) 3/128 (2,3) 1/133 ( <b>0,8</b> ) 1/133 (0,8)	EIA-IgM/G EIA-IgG EIA-IgM/G EIA-IgG	0/128 (0,0) 0/133 ( <b>0,0</b> )
Kappers-Klunne et al., 1997	Prospektiv internistisch	UFH i.v. therapeutisch	9/358 (2,5) 30/358 (8,4)	EIA-IgG HIPA	2/358 (0,6)
Lindhoff-Last et al., 2002	Therapie venöser Thrombose oder Embolie	UFH i.v. therapeutisch <b>NMH</b> s.c. therapeutisch	64/309 (20,7) 24/322 ( <b>7,5</b> )	EIA-IgM/A/G EIA-IgM/A/G	2/375 (0,5) 2/374 ( <b>0,5</b> )
Girolami et al., 2003	Multiple Indikationen	UFH i.v. therapeutisch s.c. prophylaktisch			HIPA, EIA bei klinischem Verdacht 5/360 (1,4) 0/238 (0,0) zusammen: 5/598 (0,8)
Prandoni et al., 2005	Prophylaxe venöser oder arterieller Thrombembolie	<b>NMH</b> s.c. therapeutisch und prophylaktisch			14/1754 ( <b>0,8</b> )
Harbrecht et al., 2004	Prospektiv neurologisch	UFH i.v. therapeutisch s.c. prophylaktisch	41/200 (20,5)	EIA-IgM/A/G	5/200 (2,5)

Abkürzungen: EIA=HPIA-ELISA mit Nachweis von Antikörpern vom IgM- IgA- und/oder IgG-Typ

#### 4.2.1 Prophylaxe mit NMH versus UFH und nicht-chirurgisches Patientenkollektiv

Da über neurologische Patienten kaum vergleichbare Arbeiten vorliegen, sind internistische Patienten am ehesten als vergleichbar anzusehen. Diese erhalten jedoch (vor allem im Rahmen von Interventionen) sehr häufig unfraktioniertes Heparin intravenös. Arbeiten, welche bei internistischen Patienten ein Screening auf Antikörper mittels sensitiver Testverfahren durchführen liegen kaum vor (Tab. 17b).

In den neueren Arbeiten mit internistischen Patienten unter Verwendung von HPIA-ELISA-Testverfahren wurden schwerpunktmäßig Patienten untersucht, welche UFH intravenös erhielten. In der Inneren Medizin sind hier vor allem kardiologische Patienten und Hämodialysepatienten zu nennen. Die HA-Antikörperinzidenzen liegen zwischen 2,5 % und 20,5 % unter UFH-Therapie (Amiral et al., 1996b; Harbrecht et al., 2004; Kappers-Klunne et al., 1997; vgl. auch Kap. 4.1.2.) und zwischen 0,8% und 7,5% unter NMH-Therapie (Tab. 17b).

Bei der Arbeit von Amiral et al. (1996 b) handelt es sich um eine retrospektive Studie mit einem gemischten Patientenkollektiv (chirurgisch und internistisch). Die hier dargestellte Aufschlüsselung nach Patientenkollektiv und verwendeter Heparinpräparation stammt von Lee und Warkentin (2007). Die höhere Antikörperinzidenz ergibt sich aus der Verwendung von UFH und einer längeren Therapiedauer (Einschlusskriterium war eine Therapie mit UFH >7 Tage).

In einer Arbeit von Boon et al (1996) mit Hämodialysepatienten wurde ein systematisches Screening auf Antikörper mittels EIA-IgM/G und EIA-IgG durchgeführt. Im UFH-Arm fand sich eine HA-Antikörperinzidenz von 3,1 % und im NMH-Arm von 0,8 %. In unserer Arbeit wurde bei vergleichbarer Fallzahl eine höhere Antikörperinzidenz gefunden (1,8 % vs. 0,8 %); eine mögliche Erklärung ist, dass wir einen HPIA-ELISA zur Diagnostik auswählten, welcher zusätzlich HIT-Antikörper vom IgA-Typ nachweist.

Bei Kappers-Klunne et al. (1997) handelt es sich um eine prospektive Arbeit mit 9% neurologischen Patienten, die übrigen Patienten waren internistisch. Die Patienten erhielten therapeutische Dosen an UFH, vorwiegende Erkrankungen waren tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien und Myokardinfarkte. Die Antikörperbestimmung wurde an Tag 15 bzw. am Entlassungstag durchgeführt. In der Arbeit von Kappers-Klunne et al. (1997) fand sich eine höhere Inzidenz im HIPA als im HPIA-ELISA. Letzterer wurde nur auf Antikörper vom IgG-Typ durchgeführt, so dass die AK-Inzidenz mit der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt vergleichbar ist.

Eine höhere Antikörperinzidenz von 12,8% (22/172) fand sich ebenfalls in einer Arbeit von Kawano et al. (2011) bei Patienten mit zerebrovaskulärem Insult (vgl. Kap. 4.1.1). Hierbei können für die höhere Antikörperinzidenz mehrere Faktoren verantwortlich sein: Es wurde intravenöses UFH verwendet, die Antikörperbestimmung wurde an Tag 14 ( $\pm$  4 Tage) durchgeführt (was auf eine relativ lange Therapiedauer hinweist) und es lag bei allen Patienten ein zerebrovaskuläres Krankheitsbild vor.

Lindhoff-Last et al. (2002) fanden in ihrer großen Studie eine höhere Antikörperinzidenz als in unserer Arbeit. Hierbei spielen wahrscheinlich mehrere Faktoren eine Rolle: In die Tabelle eingetragen sind die Werte der Langzeit-NMH-Gruppe und die Zahlen der Antikörperbestimmung, welche an Tag 21 vorgenommen wurde. Zusätzlich gab es eine Gruppe welche Kurzzeit-NMH erhielt (6,3 Tage mittlere Therapiedauer). An Tag 5-7 wiesen 9,1 % (31/340) der UFH-Gruppe, 2,8 % (10/362) der Kurzzeit-NMH-Gruppe und 3,7 % der (vorgesehenen) Langzeit-NMH-Gruppe einen positiven HPIA-ELISA auf. Diese Zahlen sind ähnlich zu den hier erhobenen Werten und liegen geringfügig höher, was sich mit den vorliegenden Krankheitsbildern erklären lässt. Es handelte es sich bei den Patienten der Lindhoff-Last-Studie um Patienten mit einer thromboembolischen Erkrankung, die eine therapeutische Dosis von UFH bzw. NMH erhielten. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der Grunderkrankung bereits eine stärkere Aktivierung des Gerinnungssystems als bei unseren Patienten vorlag. In unserem Gesamtkollektiv war bei 22 % (11 % in der UFH-Gruppe, 32% in der NMH-Gruppe) eine zerebrovaskuläre Erkrankung nachweisbar.

Die Untergruppe der subkutan prophylaktisch mit UFH behandelten Patienten aus der Arbeit von Harbrecht et al. (2004) ist die Vergleichsgruppe zu der hier vorliegenden Arbeit. Ferner wurden die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zusammen mit den Daten dieser Arbeit publiziert (Pohl et al., 2005).

Die Literaturrecherche ergibt insgesamt kein einheitliches Bild, zum Teil unterschieden sich die gemessenen Antikörperinzidenzen auch bei Verwendung desselben Testverfahrens innerhalb eines Kollektivs ganz erheblich. Dies mag zum Teil darin begründet sein, dass Patienten einer Fachrichtung nicht notwendigerweise ein einheitliches Kollektiv bilden. Internistische Patienten haben je nach Krankheitsbild oder nach Schwere des Krankheitsbildes sicherlich eine ganz unterschiedliche präexistente Aktivierung der Gerinnung und damit sehr unterschiedliche PF 4-Spiegel. Dieser Aspekt scheint eine entscheidende Rolle bei der Antikörperinduktion zu spielen (Greinacher et al., 2008). Insgesamt kann man feststellen, dass es kaum unmittelbar vergleichbare

Arbeiten gibt, in Bezug auf die Heparinpräparation und das Patientenkollektiv, da internistische Patienten meist im Zusammenhang mit einer Intervention, einem sonstigen Eingriff oder einer Therapie mit Heparin auf HA-Antikörper untersucht wurden. Der Bereich der Thromboseprophylaxe wurde eher im chirurgischen Patientenkollektiv untersucht.

#### **4.2.2 Prophylaxe mit NMH versus UFH und chirurgisches Patientenkollektiv**

Die Gabe von NMH zur Thromboembolieprophylaxe wurde vor allem bei chirurgischen Patienten gut untersucht (Tab.17a). In Tabelle 17a wurden Studien zu orthopädisch-operativen, gefäßchirurgischen, kardiochirurgischen und Traumapatienten dargestellt. Die höchsten Antikörperinzidenzen fanden sich jeweils im HPIA-ELISA mit Nachweis von IgG, IgA und IgM im Vergleich zu anderen Testverfahren. Ferner fanden sich in der oben stehenden Tab. 17a die höchsten Antikörperinzidenzen bei den Patienten, die zusätzlich zu NMH auch UFH intravenös erhalten hatten im Rahmen eines gefäß- oder kardiochirurgischen Eingriffs. Bei der hier vorliegenden Arbeit ist ein Präparatewechsel innerhalb der ersten 5 Tage ein Ausschlusskriterium, weil es auch um eine genaue Differenzierung des Einflusses von UFH und NMH ging. Die in der hier vorliegenden Arbeit betrachteten Patienten erhielten im Beobachtungszeitraum ausschließlich NMH oder UFH.

Bei orthopädisch-operativ behandelten Patienten lag die HA-Antikörperinzidenz unter NMH-Therapie im Bereich von 2,2 % - 8,3 % und unter UFH-Therapie sogar bei bis zu 23,5 % (Tab.17a).

In der Arbeit von Warkentin et al. (1995, 2000 und 2005) war das verwendete Heparin Enoxaparin, es wurden Patienten untersucht, die sich einem knie- oder hüftchirurgischen Eingriff unterzogen hatten. In der Arbeit von 2005 wurde eine vergleichbar niedrige Antikörperinzidenz gefunden wie auch in der vorliegenden Arbeit (2,2 % vs. 1,8 %). Dies ist zunächst ein unerwartetes Ergebnis, da die Antikörperinzidenz bei konservativ behandelten Patienten eher niedriger erwartet wird als bei operativ behandelten Patienten.

In der Arbeit von Amiral et al. (1996b) wurde eine höhere Antikörperinzidenz als in der vorliegenden Arbeit und auch als in der randomisierten klinischen Studie von Warkentin et al. (2005) gefunden. Es wurden als NMH Dalteparin (Fragmin<sup>®</sup>) und (wie in der vorliegenden Arbeit) Nadroparin (Fraxiparin<sup>®</sup>) verwendet, das Einschlusskriterium war eine relativ lange Therapiedauer von mehr als 10 Tagen.

Marx et al. (1999) fanden ebenfalls eine hohe HA-Antikörperinzidenz, hierbei ist erwähnenswert,

dass die Therapiedauer im Median 28 Tage betrug. Hierbei wurde die Antikörpertestung an Tag 12 ( $\pm 2$  Tage) durchgeführt.

In der Arbeit von Lindhoff-Last et al. (2000) wurden gefäßchirurgische Patienten eingeschlossen die Heparin länger als 5 Tage erhielten, wobei alle Patienten 7 Tage lang UFH i.v. erhielten. Dabei wurden an Tag 3-5 keine Antikörper gefunden, an Tag 9-11 die meisten Antikörper und vergleichbar viele an Tag 12-18 entdeckt. Die deutlich höhere Antikörperinzidenz im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kann mit der Verwendung von UFH bei allen Patienten und der längeren Therapiedauer in Zusammenhang stehen.

Auffällig sind die sehr hohen Antikörperinzidenzen im HPIA-ELISA mit Nachweis von IgM, IgA und IgG vor allem bei den kardiochirurgischen Patienten.

Patienten, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff unterziehen müssen, waren in der Regel bereits bei einer oder mehreren Gelegenheiten in Kontakt mit Heparin. Insbesondere ist hier die obligate präoperative Koronarangiographie zu nennen. Während einer Operation mit kardiopulmonalem Bypass sind Patienten hohen Dosen von Heparin ausgesetzt und zugleich kommt es zu einer Thrombozytenaktivierung (Bauer et al., 1997). Sowohl durch den operativen Eingriff als auch durch die Gabe von unfraktioniertem Heparin intravenös intraoperativ unterscheiden sich die Patienten in dieser Gruppe am meisten von den Patienten in der vorliegenden Arbeit.

Bei der Arbeit von Trossaert et al. (1998) hatten 2 Patienten präoperativ HIT-IgG, die Inzidenz neuer Serokonversion betrug 12/51 (23,5 %) für den EIA-IgM/A/G und 7/51 für den EIA-IgG, ein positiver PAT lag präoperativ bei keinem Patienten vor. Die zweite Antikörpertestung wurde am 8. postoperativen Tag durchgeführt. Nach Angabe der Autoren war die Heparinexposition eher verlängert mit  $8,5 \pm 3,1$  Tagen.

In der Arbeit von Pouplard et al. (1999) fand sich eine sehr hohe Antikörperinzidenz, alle Patienten hatten 1-3 Monate zuvor eine Heparinexposition. Im Rahmen des kardiochirurgischen Eingriffs mit CPB erhielten alle erneut UFH. Auch gilt ein kardiochirurgischer Eingriff generell als mit einem hohen Risiko der AK-Entwicklung behaftet aufgrund einer höheren PF 4-Freisetzung und vermehrten Plättchenaktivierung. Diese Faktoren sind sicherlich alle für die deutlich höhere Inzidenz als in der vorliegenden Arbeit verantwortlich. Möglicherweise sind diese Unterschiede entscheidend für die deutlichen Unterschiede in der Antikörperinzidenz.

Bei Traumapatienten wurden außer den in der Tabelle aufgelisteten Inzidenzen von Lubenow et al. (2006) weitere detaillierte Ergebnisse publiziert, um den Einfluss des Traumaschweregrades

auf die HA-Antikörperinzidenz und die HIT-Inzidenz darzulegen (Lubenow et al., 2010). Hierbei hatten 13/316 (4,1%) unter UFH-Therapie und 2/298 (0,7%) unter NMH-Therapie einen positiven IgG-HPIA-ELISA-Test. Obwohl es sich um chirurgische Patienten handelt, ist dies in beiden Gruppen eine niedrigere Inzidenz als in der hier vorliegenden Studie. Möglicherweise spielt hier eine Rolle, dass Lubenow et al. (2010) nur auf HA-Antikörper vom IgG-Typ testeten; ferner erhielten die Traumapatienten nach Tag 10 alle NMH, möglicherweise kann dies zu einer niedrigeren Antikörperinzidenz beigetragen haben.

Die Antikörperinzidenz im kardiochirurgischen und gefäßchirurgischen Patientenkollektiv und teilweise auch im orthopädischen Patientenkollektiv ist unter NMH höher als bei den hier untersuchten neurologischen Patienten. Dies ist am ehesten den unterschiedlichen Studienbedingungen zuzuschreiben und wird neben der Art des Heparins beeinflusst von der Therapiedauer, dem Untersuchungszeitpunkt auf Antikörper und der Frage, ob (wie in unserer Arbeit) eine wiederholte Testung durchgeführt wurde. Zusammenfassend kann man sagen, dass die bisher publizierten Daten kein einheitliches Bild ergeben. Es ist sehr schwierig den Einfluss einzelner Faktoren wie Therapiedauer, Heparinpräparation oder anderer Faktoren isoliert herauszuarbeiten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AK-Inzidenz in der hier vorliegenden Arbeit eher vergleichbar ist mit der von chirurgischen Patienten unter Thromboembolieprophylaxephylaxe.

### **4.3 HIT-Inzidenz**

Die HIT-Inzidenz war in unserem untersuchten neurologischen Patientenkollektiv sehr niedrig. Auch aus diesem Grund konnte ein Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen unter UFH- und NMH-Therapie zur Thromboembolieprophylaxe nicht gezeigt werden. Primäres Ziel der Studie war die Frage nach der Antikörperinzidenz.

Nicht alle Patienten mit H/PF 4-Antikörpern entwickeln eine HIT, sondern nur ein kleiner Prozentsatz. Faktoren, die hierbei eine Rolle spielen sind wohl der AK-Titer und das Vorliegen des IgG-Isotyp (Levy und Hursting, 2007; Suh et al., 1997). Der Antikörpertiter im Antigen-Assay korreliert ferner mit der Fähigkeit zur Plättchenaktivierung (Warkentin et al., 2000) und der Ausdehnung der in-vivo Aktivierung des Gerinnungs- und fibrinolytischen Systems (gemessen durch Prothrombinfragment, Thrombin-AT-Komplex und D-Dimer (Chilver-Stainer et al., 2004)). Eine weitere wichtige Rolle spielt anscheinend die Epitopspezifität der HA-Antikörper

(Sachais et al., 2012). Es wird kontrovers diskutiert, ob HA-Antikörper vom IgA- und IgM-Typ in der Lage sind (in Abwesenheit von IgG-AK) eine HIT auszulösen (Amiral et al., 1996c; Juhl et al., 2006; Warkentin, 2003). Ein PF 4-Polymorphismus konnte die Unterschiede in der HIT-Wahrscheinlichkeit nicht erklären (Horsewood und Kelton, 2000).

Mittlerweile existieren auch Arbeiten, welche das HIT-Risiko unter Thromboembolieprophylaxe quantitativ erfassen; hierbei zeigt sich, dass das HIT-Risiko unter Thromboembolieprophylaxe niedrig ist (wie bei den von uns untersuchten Patienten) und dass es bei verbesserten Raten der Thromboembolieprophylaxe überraschenderweise nicht ansteigt (Jenkins et al., 2011; Zhou et al., 2012)

Es gibt zahlreiche randomisierte klinische Studien, welche die Effizienz von NMH zur Thromboembolieprophylaxe bei internistischen Patienten untersuchen. Die publizierten Beschreibungen von sekundären Endpunkten wie HIT sind jedoch oftmals kurz und es kann nicht adäquat beurteilt werden, ob eine Thrombozytopenie tatsächlich auf eine HIT zurückzuführen war oder nicht (Lee und Warkentin, 2007).

In einer Metaanalyse von Morris et al. (2007) wird HIT mit und ohne Thrombose in 13 randomisierten klinischen Studien unter Therapie mit UFH und NMH zur Behandlung einer venösen Thromboembolie analysiert. Hierbei können die Autoren keinen signifikanten Unterschied bei heparinassoziierter Thrombozytopenie zwischen NMH- und UFH-Patienten feststellen und weisen darauf hin, dass nur unzureichende Evidenz vorliegt, um zu folgern, dass die Raten von HIT (mit und ohne Thrombose) in beiden Gruppen unterschiedlich seien. Warkentin und Greinacher (2007) geben hierzu zu bedenken, dass therapeutische Heparindosen möglicherweise weniger immunogen wirken als prophylaktische Dosen und HIT insgesamt relativ selten während der Therapie eines thromboembolischen Ereignisses auftritt.

In einer Metaanalyse von Martel et al. (2005) wird das HIT-Risiko bei NMH niedriger als bei UFH-Therapie eingestuft. In dieser Metaanalyse wurden vorwiegend Studien mit chirurgischen Patienten betrachtet, welche Heparin zur Thromboembolieprophylaxe erhielten. Von den 15 eingeschlossenen Studien untersuchten 5 Arbeiten explizit HIT als Endpunkt, die übrigen 10 als Endpunkt Thrombozytopenie. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass das HIT-Risiko bei NMH-Therapie bei 0,2 % und unter UFH-Therapie bei 2,6 % liegt.

Des Weiteren gibt es eine Fülle von Studien zur HIT-Inzidenz in unterschiedlichen Patientenkollektiven, mit unterschiedlicher Heparinpräparation und verschiedenem Studiendesign mit teils systematischem Antikörperscreening, teils nur bei Verdachtsmomenten (Tab. 17).

Bei den in Tabelle 17 dargestellten Studien mit chirurgischen Patienten liegt die HIT-Inzidenz zwischen 0 % und 5,2 %, die Unterschiede sind sicherlich zum Teil auch mit unterschiedlichem Studiendesign und verschiedenen Definitionskriterien der HIT zu erklären.

Die höchste HIT-Inzidenz bei den nicht-chirurgischen Patienten fand sich in der Arbeit von Harbrecht et al. (2004) bei neurologischen Patienten. Es handelte sich hierbei um s.c. und i.v. mit Heparin behandelte Patienten, von denen ein nicht unerheblicher Teil zerebrovaskulär erkrankt war. In der randomisierten klinischen Studie von Lindhoff-Last et al. (2002) wurde die Behandlung von tiefen Beinvenenthrombosen mit UFH und NMH (Reviparin) verglichen. Hierbei entwickelten zwei der NMH-Patienten (0,53 %) und zwei der UFH-Patienten (0,53 %) eine antikörperpositive HIT. Wendet man andere Diagnosekriterien an (Thrombose und positives HPIA-ELISA-Testergebnis, auch ohne Thrombozytopenie), so steigt die HIT-Inzidenz sogar auf 2,2% an (Warkentin und Greinacher, 2005).

Die Arbeit von Prandoni et al. (2005) wurde dafür konzipiert, die HIT-Inzidenz bei internistischen Patienten unter NMH-Therapie zu erheben. Prandoni et al (2005) evaluierten prospektiv 1754 internistische Patienten unter NMH-Therapie zur Thromboseprophylaxe und -therapie. Dabei betrug die HIT-Inzidenz 0,8 %. Eine vorangehende Untersuchung derselben Arbeitsgruppe von Girolami et al. (2003) mit 598 internistischen Patienten unter UFH-Therapie hatte eine HIT-Inzidenz von 0,84 % gezeigt, eine Antikörpertestung wurde in beiden Arbeiten nur bei klinischem Verdachtsmoment durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Prandoni und Kollegen folgert aus ihren in Tabelle 17b dargestellten Daten, dass die HIT-Inzidenz bei internistischen Patienten durch NMH nicht reduziert wird. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der HIT-Inzidenz unter UFH und NMH festgestellt werden, allerdings waren die Inzidenzen in beiden Gruppen sehr niedrig (0/111 in der NMH-Gruppe, 1/104 in der UFH-Gruppe). Die verhältnismäßig hohe HIT-Inzidenz unter NMH-Therapie in der Arbeit von Prandoni et al. (2005) wird von Warkentin und Greinacher (2005) kritisch bewertet. Sie weisen darauf hin, dass bei internistischen Patienten die Möglichkeit einer Fehldiagnose bei HIT besonders groß ist.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden NMH (und in der Vergleichsgruppe UFH) zum Studienzeitpunkt ausschließlich zur Thromboseprophylaxe eingesetzt. Wenn eine therapeutische Antikoagulation nötig wurde, wurde diese mittels UFH intravenös durchgeführt. In den letzten Jahren gibt es den Trend auch hier (je nach Situation) therapeutische Dosen an NMH einzusetzen. Es zeigt sich, dass vor allem orthopädisch-chirurgische Patienten und onkologische Patienten, die

NMH zur Thromboembolieprophylaxe erhalten, immer noch einem HIT-Risiko ausgesetzt sind und dass dieses Krankheitsbild einen ebenso schwerwiegenden Verlauf aufweisen kann wie früher unter Thromboembolieprophylaxe mit UFH (Linkins und Warkentin, 2011).

Unsere Ergebnisse der niedrigen HIT-Inzidenz decken sich mit denen in den hier dargestellten Arbeiten.

#### **4.4 Klinische Aspekte**

Es ist zu berücksichtigen, dass in den aufgeführten Studien unterschiedliche NMHs verwendet wurden. Diese Stoffe unterschieden sich in ihrer Herstellungsart, in physikochemischen und biologischen Eigenschaften (in vitro und in vivo) und in ihrer Pharmakokinetik und Biotransformation. Aus diesem Grund (so weisen Autoren seit der Einführung von NMH als Medikamente hin) können Untersuchungsergebnisse von einem NMH nicht ohne weiteres auf ein anderes NMH übertragen werden (Frydman, 1996). Inwieweit dieser Aspekt auch bei der Immunisierung bei dem Krankheitsbild HIT eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Eine Besonderheit von neurologischen Patienten im Vergleich zu anderen Kollektiven ist die Tatsache, dass diese häufig eine Hochdosiscortisontherapie erhalten. Ob dieses immunmodulierende Medikament einen Einfluss auf die Antikörperinzidenz hat, bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein klinisch relevanter Thrombozytenabfall bezüglich HIT wurde in der Literatur unterschiedlich definiert. Heute wird ein Thrombozytenabfall auf  $<150$  G/l bzw. um mehr als 50 % des Ausgangswertes als verdächtig auf eine HIT angesehen. Hier konnte in der Gruppe der NMH-Patienten kein sicherer Thrombozytenabfall durch HA-Antikörper nachgewiesen werden.

Ein Zusammenhang zwischen OD und Thrombozytenzahl konnte in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht gezeigt werden. Zu diesem Ergebnis kommen auch Matsuo et al. (2007) in ihrer Arbeit bei Hämodialysepatienten; sie berichten ferner über eine Tendenz zur Abnahme von Thrombozytenzahl und Antikörpertiter bei steigender Dialysedauer.

Bei den beiden antikörperpositiven Patienten unter NMH-Therapie in der hier vorliegenden Arbeit konnte keine Thrombose nachgewiesen werden, in der Vergleichsgruppe unter UFH-Therapie erlitten zwei Patienten eine Thrombose bei Nachweis von HA-Antikörpern, eine Patientin entwickelte eine manifeste HIT mit einer beidseitigen Lungenembolie.

Bei den übrigen antikörpernegativen Patienten der UFH-Gruppe entwickelte ein Patient eine tiefe Beinvenenthrombose. Dieser Patient war an einem NHL des Zentralnervensystems erkrankt und

kann die Thrombose im Rahmen seiner malignen Erkrankung entwickelt haben. Dies zeigt nebenbefundlich die Effektivität der Thromboseprophylaxe mit niedermolekularem Heparin. In der Literatur wird eine große Bandbreite der Thromboseinzidenz bei hospitalisierten internistischen Patienten beschrieben. Dies reicht von 3 % bei Patienten ohne Risikofaktoren bis hin zu 50% bei Patienten mit prädisponierenden Faktoren für das Auftreten einer tiefen Beinvenenthrombose (Bergmann und Elkharrat, 1996).

Möglicherweise wurde allerdings die Thromboseinzidenz in der vorliegenden Arbeit unterschätzt, da ein klinisches Assessment auf Thrombose durchgeführt wurde. Eine kleinere Thrombose hätte klinisch unbemerkt bleiben können. Es wurden keine systematischen Phlebographien oder Duplexsonographien der unteren Extremitäten durchgeführt. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass die Sensitivität letzterer vor allem im Unterschenkelbereich eingeschränkt ist und es sich bei ersterer um eine invasive Untersuchung mit entsprechenden Risiken und Kontraindikation handelt.

In dieser Arbeit konnten drei Patienten mit einer OD  $>1,4$  identifiziert werden (vgl. Kap. 4.6 sowie Tab. 5a und b; Warkentin et al., 2008). Lediglich die Patientin mit HIT kompliziert durch eine tiefe Beinvenenthrombose und eine Lungenembolie unter UFH-Therapie wies einen positiven HIPA-Test auf.

Bei einem primär AK-positiven Patienten kam es zu einem Anstieg der OD auf 2,7 ohne klinisches Ereignis. Einweisungsdiagnose war eine ED. Pazner et al. (2009) konnten zeigen, dass ein Grossteil der Patienten mit Antiphospholipidsyndrom und/oder systemischem Lupus erythematoses falsch positive HIT-Antigen Testergebnisse liefert, welche vermutlich mit autoimmunen PF 4-Antikörpern in Zusammenhang stehen. Diese Diagnosen lagen jedoch bei keinem Patienten im untersuchten Kollektiv vor.

Eine Patientin mit einer maximalen OD von 2,4 nach Serokonversion zeigte keinen Thrombozytenabfall. Einweisungsdiagnose war eine bakterielle Meningitis. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass HIT in den letzten Jahren auch als fehlgeleitete bakterielle Abwehrreaktion gedeutet wird (Greinacher et al., 2011).

Es wären Studien mit einer größeren Anzahl internistischer oder anderer konservativ behandelter Patienten unter Thromboembolieprophylaxe mit systematischem Screening auf Antikörper und Erhebung von Komplikationen wünschenswert.

#### 4.5 Einzelfalldarstellung

Die Besonderheit dieses Falls (vgl. Kap. 3.2.4 und Abb. 8) liegt darin, dass trotz fortgesetzter Therapie mit NMH die Thrombozytenzahlen wieder anstiegen und der Antikörpertiter absank. Hierzu ist folgendes kritisch anzumerken: In verschiedenen Studien sind die Kriterien für das Vorliegen einer HIT unterschiedlich definiert. Wenn man lediglich die Kriterien antikörperpositiv und Thrombozytenabfall  $>50\%$  anwendet, könnte man diesen Einzelfall auch als HIT-Fall werten. Allerdings litt die Patientin unter einer schweren Pneumonie, so dass der Thrombozytenabfall nicht eindeutig kausal zugeordnet werden kann. Ein thromboembolisches Ereignis konnte nicht identifiziert werden. Die Thrombozytenzahlen stiegen wieder spontan an, obwohl die Heparintherapie mit NMH fortgesetzt wurde. Auch dies spricht gegen eine HIT. Die Frage bleibt offen, welche Bedeutung die Antikörper bei dieser Patientin hatten und weshalb es zu einer spontanen Regredienz auch der OD im HPIA-ELISA unter fortgesetzter Heparintherapie kommt.

Greinacher et al. (2009) beschreiben einen Anstieg der OD im HPIA-ELISA bei 56,1% (244/435) chirurgischen Patienten um  $\geq 15\%$  zwischen Tag 4 und Tag 14 unter Thromboembolieprophylaxe mit NMH und UFH. Interessanterweise kam es bei diesen Patienten und zwei weiteren Patienten mit der Diagnose „HIT“ trotz fortgesetzter Heparintherapie (wie im hier beschriebenen Einzelfall) zu einer Erholung der Thrombozytenwerte und einem Rückgang der OD bzw. des Antikörpertiters.

In der Literatur gibt es ferner einzelne Berichte über die Elimination des HIT-Antikörpers trotz fortgesetzter Heparintherapie. Bei einer Studie von Skouri et al. (2006) mit pädiatrischen Hämodialysepatienten scheint die Seropositivität in den ersten Monaten der Hämodialyse am höchsten zu sein, dann verschwinden die Antikörper graduell. Ferner bieten ältere Arbeiten zur HIT einen Hinweis, bei denen NMH zur Therapie der HIT eingesetzt wurde. Dies gilt heute als obsolet (Linkins et al., 2012; Watson et al., 2012). Allerdings erholten sich in einer Arbeit von Gouault-Heilmann et al. (1987) 4/8 Patienten unter NMH-Therapie vollständig, bei 6 Patienten kam es zu einem erneuten Anstieg der Thrombozyten. Dies ist aufgrund der nahezu 100 %igen Kreuzreaktivität der Antikörper in vitro doch überraschend. Als NMH wurde in der Arbeit von Gouault-Heilmann et al (1987) auch das hier verwendete Nadroparin-Calcium (CY 216) eingesetzt.

#### 4.6 Aspekte zur klinischen Relevanz der Antikörper

Insbesondere die funktionellen Tests auf HA-Antikörper bedürfen einer gewissen Erfahrung in der Durchführung. Ein solcher Faktor kann zu Unterschieden zwischen einzelnen Studien beitragen. In der hier vorliegenden Arbeit hatte kein Patient in der NMH-Gruppe ein positives HIPA-Ergebnis und von den 11 antikörperpositiven Patienten der UFH-Gruppe nur eine Patientin, welche auch eine HIT entwickelte. Dies deutet darauf hin, dass auch nur diese eine Patientin Antikörper mit thrombozytenaktivierenden Eigenschaften aufwies. In der Literatur sind bei den oben dargestellten Arbeiten nicht alle antikörperpositiven Patienten auch im HIPA-Test positiv, denn im HIPA können nur IgG-Antikörper erfasst werden. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht ist die Arbeit von Kappers-Klunne et al. (1997), wo die Antikörperinzidenz im HIPA-Test höher lag als im HPIA-ELISA mit Nachweis von IgG (8,4 % vs. 2,5 %). Möglicherweise hatten also die antikörperpositiven Patienten in der vorliegenden Arbeit einen anderen Antikörper-Subtyp, also IgM- oder IgA-Subtyp. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass zwar Antikörper vom IgG-Typ vorlagen, aber der Titer nicht hoch genug für eine Plättchenaktivierung im HIPA-Testverfahren war (vgl. Tab. 5a und b). Warkentin et al. (2011) berichten, dass nur 50% der Patienten mit einem positiven Ergebnis im HPIA-ELISA auch ein positives Ergebnis in einem funktionellen Testverfahren mit gewaschenen Thrombozyten aufweisen. Mögliche Gründe für die unterschiedliche Pathogenität der Antikörper können unterschiedliche HIT-AK-Subklassen oder unterschiedliche HIT-AK-Titer sein (Suh et al., 1997). Eine Studie von Sachais et al. (2012) konnte zeigen, dass für biologische Unterschiede im Verhalten der HA-Antikörper, die Epitop-Spezifität ein wichtiger Faktor zu sein scheint. Diese Unterschiede werden mittels HPIA-ELISA nicht erfasst. Die Bindungskapazität nichtpathogener Antikörper wird nicht verstärkt durch heparininduzierte Oligomerisation des Antigens und sie binden an Stellen, welche ihrerseits die Oligomerstabilität nicht verstärken. Zellaktivierende Antikörper sind möglicherweise in der Lage, die Oligomerbildung zu stabilisieren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte für die beiden antikörperpositiven Patienten eine klinische Relevanz der Antikörper nicht nachgewiesen werden. Die bei einer Patientin vorliegende Thrombozytopenie kann nicht sicher ätiologisch zugeordnet werden, der Nachweis thrombozytenaktivierender Eigenschaften im HIPA-Test gelang nicht.

In einer Arbeit über Patienten mit einem zerebrovaskulären Insult fand sich neben der hohen Antikörperinzidenz (vgl. Kap. 4.1.1.) auch eine hohe Mortalität von 66,7 % bei gesicherter

Diagnose „HIT“ (Kawano et al., 2011). Dies unterstreicht die Bedeutung der Differentialdiagnose HIT bei Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes.

Die klinische Relevanz von HIT-AK bei nicht symptomatischen, nicht thrombozytopenischen Patienten ist unklar. Hierbei reichen die Interpretationen von unbedeutend bis hin zu riskant und mortalitätserhöhend.

Trossaert et al. (1998) berichten, dass das Vorhandensein von Antikörpern ein Risikofaktor für eine HIT sei. Laut Warkentin (1998) ist das Risiko thromboembolischer Komplikationen bei Vorliegen von Antikörpern hoch. In der hier vorliegenden Arbeit wurden IgG-, IgA- und IgM-Antikörper nachgewiesen. Ob IgA und IgM eine pathogene Wirkung haben, ist unklar bzw. wird kontrovers diskutiert. Unsere Ergebnisse lassen aufgrund der geringen Fallzahl und der fehlenden AK-Differenzierung keine diesbezüglichen Rückschlüsse zu. Mögliche Gründe für eine unterschiedliche Pathogenität der Antikörper können neben den unterschiedlichen Antikörper-Subklassen auch unterschiedliche HIT-AK-Titer sein (Suh et al., 1997).

Ferner wird auch die Bedeutung der (alleinigen) IgG-Antikörper kontrovers diskutiert. Levy und Hursting (2007) halten die Heparin-PF 4-AK für höchst bedeutsam, auch ohne die Induktion von HIT, weil sie in verschiedenen Patientenpopulationen die Morbidität und Mortalität vergrößern. Sie räumen ein, dass die pathophysiologische Basis derartiger Effekte noch ausgiebig untersucht werden muss. Eine Arbeit weist in die Richtung, dass (zumindest bei Patienten mit ACS) die Endothelzellaktivierung eine Rolle spielt (Mascelli et al., 2004a). Trotz ihrer Assoziation mit Langzeiteffekten sind die zirkulierenden H/PF 4-AK von temporärer Natur, sie sind im Median für 50 Tage (funktionelle Tests) bis 85 Tage (Antigentests) nachweisbar (Warkentin und Kelton, 2001b). Die Myokardinfarktraten am Tag 30 und das thrombotische Outcome nach einem Jahr sind signifikant höher bei seropositiven ACS-Patienten ohne Thrombozytopenie (Mascelli et al., 2004b; Mattioli et al., 2000; Williams et al., 2003). Ferner ist bei antikörperpositiven Patienten (unabhängig von der Thrombozytenzahl) ein signifikant längerer Krankenhausaufenthalt nachweisbar und eine höhere Sterblichkeit im Krankenhaus nach kardiochirurgischem Eingriff, eine höhere Thromboserate bei akut erkrankten pädiatrischen Patienten sowie perioperative thrombotische Ereignisse bei Patienten mit Gefäßrekonstruktion und postoperative Ereignisse bei orthopädisch-chirurgischen Patienten (Calaites et al., 1999; Greinacher et al., 2005; Risch et al., 2003).

Bei Hämodialysepatienten gab es Hinweise auf einen Zusammenhang von Seropositivität mit vermehrter thrombotischer Morbidität und 2-Jahresmortalität (Lee et al., 2003; Nakamoto et al.,

2005; de la Vega et al., 2005; Yu et al., 2002). Allerdings kommen andere Arbeiten bei diesem Patientenkollektiv zu einem anderen Ergebnis (O'Shea et al., 2002; Skouri et al., 2006).

Warkentin et al. (2008) untersuchten, ob die Höhe des positiven EIA-Ergebnisses etwas über das Risikos des Vorhandenseins von HIT-auslösenden Antikörpern aussagen kann. Diese HIT-Antikörper waren definiert als stark positives Ergebnis im SRA mit >50 % Serotoninfreisetzung. Hierbei waren diese Antikörper mit einer Wahrscheinlichkeit von >50 % nur vorhanden, wenn der OD-Level >1,4 lag. In einer neueren Arbeit von Nellen et al. (2012) war ein positives Testergebnis im HIPA-Test am besten vorhersagbar bei einem OD-Schwellenwert >0,943 im Asserachrom® HPIA-ELISA, dem auch hier verwendeten ELISA-Testverfahren. Wendet man dieses Kriterium auf unsere antikörperpositiven Patienten an, so zeigt sich, dass beide AK-positiven NMH Patienten und vier der AK-positiven UFH-Patienten eine maximale OD >0,943 aufweisen (vgl. Tab. 5a und b). Die mit UFH behandelte Patienten, die eine HIT entwickelte, wies eine OD von 1,5 auf. Auch für unsere Patienten ergeben sich somit Hinweise, dass die Höhe der OD für die Beurteilung entscheidend ist, in einer aktuellen Leitlinie wird mittlerweile die Übermittlung des aktuellen OD-Ergebnisses statt lediglich die Angabe „positiv“ oder „negativ“ bei der Kommunikation des Testergebnisses des HPIA-ELISA empfohlen (Watson et al., 2012). Limitiert wird die Übertragbarkeit der Ergebnisse dadurch, dass kein PF 4/Heparin-Standard existiert, der als Referenzmaterial in allen Labors eingesetzt werden könnte (Greinacher et al., 2010).

Bei der Diskussion der klinischen Relevanz der Antikörper konnten manche Arbeiten eine höhere Komplikationsrate und Mortalität bei seropositiven Patienten nachweisen, auch längere Zeit nach der auslösenden Heparintherapie. Dabei stellt sich die Frage, ob der HIT-AK wirklich ursächlich ist oder ob eine gesteigerte Aktivierung der Gerinnung nicht für beides verantwortlich ist (i.e. höheres Auftreten von Antikörpern und erhöhte Mortalität).

#### **4.7 HAT (HIT 1)**

Bei einer Untergruppe von NMH-Patienten mit täglicher Thrombozytenkontrolle konnte ein milder Thrombozytenabfall an Tag 3 demonstriert werden. Obwohl es sich bei den dargestellten Patienten um eine kleine Gruppe handelt, lässt sich ein Thrombozytenabfall unter Heparintherapie erkennen. Für die Pathogenese wird ein direkter proaggregatorischer Effekt von Heparin auf die Thrombozyten verantwortlich gemacht (Salzman et al., 1980). Bei ausgeprägtem Thrombozytenabfall besteht ein gewisses Verwechslungspotential mit einer HIT (Chong et al.,

1982). Bereits seit der Einführung von Heparin als Arzneistoff gibt es Berichte über eine Reduktion der Thrombozytenzahl (Heiden et al., 1977; Horne, 2007). Die Inzidenz der HAT wird in der Literatur mit 10 % beziffert (Greinacher et al., 1995), Warkentin et al. (1995) fanden bei postoperativen orthopädischen Patienten sogar eine Inzidenz von 28,4 %. Andere Autoren untersuchten sequentiell die Plättchenfunktion nach intravenöser Applikation von UFH und NMH. Die Ergebnisse deuten auf eine Plättchenaktivierung in vivo durch unfraktioniertes Heparin, dieser Effekt war für NMH im Allgemeinen geringer ausgeprägt mit Unterschieden zwischen den NMH-Fractionen. Bei einem MG von  $< 3$  kDa war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Heinrich et al., 1988). Xiao und Theroux (1998) konnten ebenfalls zeigen, dass mit therapeutischen Konzentrationen an UFH eine Plättchenaktivierung durch Potenzierung der ADP-induzierten Plättchenaggregation einhergeht, ein Effekt der für Enoxaparin in vivo und ex vivo nur in geringem Umfang gezeigt werden konnte. In einer neueren Studie von Gao et al. (2010) durchliefen Thrombozyten, die Heparin ausgesetzt wurden, biochemische und morphologische Veränderungen, die auf einen Anregungszustand hinweisen, einschliesslich der Phosphorylierung zytosolischer Schlüssel-Signalenzyme und Veränderungen des Zytoskeletts, die zur Zellspreizung führen. Diese Veränderungen konnten die Autoren auch für Verwendung von NMH und Fondaparinux nachweisen.

Im Einklang hiermit konnten hier interessanterweise trotz der kleinen Untergruppe und der Verwendung von NMH Aspekte der HAT gezeigt werden.

## 5. Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Inzidenz heparinassoziierter Antikörper (HA-Antikörper) bei neurologischen Patienten, die Heparin zur Thromboseprophylaxe erhielten, wurden 111 Patienten unter niedermolekularer Heparin(NMH)-Therapie rekrutiert und mit einer Gruppe von 104 Patienten unter unfraktioniertem Heparin (UFH) in prophylaktischer Dosierung verglichen. Die Häufigkeit des Auftretens von H/PF 4-Antikörpern wurde mittels HPIA-ELISA, die thrombozytenaktivierenden Eigenschaften dieser Antikörper mittels HIPA-Test untersucht. Ferner wurde die HIT-Inzidenz (Häufigkeit von Thrombozytopenie oder thromboembolischen Ereignissen mit Nachweis von Antikörpern) untersucht und mögliche Einflussfaktoren auf die Antikörperinzidenz aus anamnestischen Daten eruiert. Im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie wurde eine HA-Antikörpersuche beginnend mit Tag 0, dann alle 5 Tage durchgeführt. Von allen Patienten wurde eine ausführliche Anamnese erhoben sowie eine Verlaufsbeobachtung auf HIT-Symptome während des stationären Aufenthaltes durchgeführt.

Im Kollektiv der NMH-Patienten fand sich eine Antikörperinzidenz von 2/111 (1,8 %), die Inzidenz des Vollbildes der HIT lag bei 0/111 (0 %), d.h. die beiden betroffenen Patienten waren klinisch nicht auffällig. Im Vergleich dazu zeigte sich bei UFH-Patienten (Datenschnittmenge aus der Promotion von Frau Dr. med. B. Bastians) eine Antikörperinzidenz von 11/104 (10,6 %) und eine HIT-Inzidenz von 1/104 (1 %). Hiermit war zwar keine unterschiedliche HIT-Inzidenz nachweisbar ( $p=0,48$ , Fisher's Exact Test) aber eine signifikant niedrigere Antikörperinzidenz in der NMH-Gruppe ( $p=0,009$ , Fisher's Exact Test). In einer logistischen Regressionsanalyse wurden mögliche Einflussfaktoren (Alter, Geschlecht, Therapiedauer, Vorliegen eines zerebrovaskulären Krankheitsbildes, Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers und Heparinart) auf die Antikörperinzidenz untersucht. Es konnte die Heparinart als Einflussfaktor sicher isoliert werden ( $p=0,015$ , logistische Regressionsanalyse), für die Einnahme eines Thrombozytenaggregationshemmers ergab sich ein Trend in Richtung Protektion ( $p=0,077$ , log. Regression). Ferner fand sich ein Einfluss des Merkmals zerebrovaskuläres Krankheitsbild ( $p=0,021$ , log. Regression). Trotz des signifikant höheren Anteils an zerebrovaskulär erkrankten Patienten in der NMH-Gruppe fand sich dort eine signifikant geringere AK-Induktion.

Die vorliegende Studie zeigt erstmals, dass neurologische Patienten unter Thromboembolieprophylaxe ein niedriges HIT-Risiko aufweisen. Insgesamt sind die hier untersuchten neurologischen Patienten in Bezug auf die Antikörperinzidenz am ehesten mit chirurgischen Patienten vergleichbar, die Heparin zur Thromboembolieprophylaxe erhalten, nicht

jedoch mit kardiochirurgischen oder gefäßchirurgischen Patienten, welche höhere Antikörperinzidenzen aufweisen. Mittlerweile gilt als gesichert, dass die HIT-Inzidenz unter der Gabe von NMH niedriger ist als unter der Gabe von UFH. Diese Einschätzung findet sich vor allem in Arbeiten mit chirurgischen Patienten, wohingegen bei internistischen Patienten ein solcher Unterschied nicht sicher gezeigt werden konnte. Auch wenn bei den hier untersuchten Gruppengrößen kein Unterschied in der HIT-Inzidenz nachweisbar ist, stellt die unterschiedliche Antikörperinzidenz einen Hinweis dafür dar, dass neurologische, zerebrovaskulär erkrankte Patienten besonders von der Gabe eines niedermolekularen Heparins zur Thromboembolieprophylaxe profitieren. Dies ist von Bedeutung, da es bei kardiovaskulär erkrankten Patienten Hinweise gibt, dass bereits das Vorliegen von HA-Antikörpern ohne Thrombozytopenie mit einer höheren Mortalität und Morbidität vergesellschaftet sein kann.

## 6. Literaturverzeichnis

Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissoc AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1992; 68: 95-96

Amiral J, Bridey F, Wolf M, Boyer-Neumann C, Fressinaud E, Vissac AM, Peynaud-Debayle E, Dreyfus M, Meyer D. Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. *Thromb Haemost* 1995; 73: 21-28

Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C, Vissac AM, Fressinaud E, Poncz M, Meyer D. Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood* 1996 a; 88: 410-416

Amiral J, Peynaud-Debayle E, Wolf M, Bridey F, Vissac AM, Meyer D. Generation of antibodies to heparin-PF4 complexes without thrombocytopenia in patients treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *Am J Hematol* 1996 b; 52: 90-95

Amiral J, Wolf M, Fischer A, Boyer-Neumann C, Vissac A, Meyer, D. Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996 c; 92: 954-959

Balestra B, Quadri P, Biasiutti FD, Furlan M, Lämmle B. Low molecular weight heparin-induced thrombocytopenia and skin necrosis distant from injection sites. *Eur J Haematol* 1994; 53: 61-63

Bardett-Fausett M, Vogtlander M, Lee RM, Esplin MS, Branch DW, Rodgers GM, Silver RM. Heparin-induced thrombocytopenia is rare in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 148-152

Bell WR. Heparin-associated thrombocytopenia and thrombosis. *J Lab Clin Med* 1988; 111: 600-605

Bergmann JF, Elkharrat D. Prevention of venous thromboembolic risk in non-surgical patients. *Haemost* 1996; 26:16-23

Boon DM, van Vliet HH, Zietse R, Kappers-Klunne MC. The presence of antibodies against a PF4-heparin complex in patients on haemodialysis. *Thromb Haemost* 1996; 76: 480

Brace LD, Fareed, J. Heparin-induced platelet aggregation. II. Dose/response relationships for two low molecular weight heparin fractions (CY 216 and CY 222). *Thromb Res* 1990, 59, 1-14

Burgess JK, Chong BH. The platelet proaggregating and potentiating effects of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and heparinoid in intensive care patients and healthy controls. *Eur J Haematol* 1997; 58: 279-285

Calaites JG, Liem TK, Spadone D, Nichols WK, Silver D. The role of heparin-associated antiplatelet antibodies in the outcome of arterial reconstruction. *J Vasc Surg* 1999; 29: 779-785

Chilver-Stainer L, Lämmle B, Alberio L. Titre of anti-heparin/PF4-antibodies and extent of in vivo activation of the coagulation and fibrinolytic systems. *Thromb Haemost* 2004; 91: 276-282

Chong BH, Berndt MC. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blut* 1989; 58: 53-57

Chong BH, Fawaz I, Chesterman CN, Berndt MC. Heparin-induced thrombocytopenia: mechanism of interaction of the heparin-dependent antibody with platelets. *Br J Haematol* 1989; 73: 235-240

Chong BH, Grace CS, Rozenberg MC. Heparin-induced thrombocytopenia: effect of heparin platelet antibody on platelets. *Br J Haematol* 1981; 49: 531-540

Chong BH, Pitney WR, Castaldi PA. Heparin-induced thrombocytopenia: association of thrombotic complications with heparin-dependent IgG antibody that induces thromboxane synthesis in platelet aggregation. *Lancet* 1982; 2: 1246-1249

Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med* 1987; 316: 581-589

Creekmore FM, Oderda GM, Pendleton RC, Brixner DI. Incidence and economic implications of heparin-induced thrombocytopenia in medical patients receiving prophylaxis for venous thromboembolism. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 1438-1445

Denomme GA, Warkentin TE, Horsewood P, Sheppard JA, Warner MN, Kelton JG. Activation of platelets by sera containing IgG1 heparin-dependent antibodies: an explanation for the predominance of the Fc gammaRIIa "low responder" (his131) gene in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Lab Clin Med* 1997; 130: 278-284

Eichinger S, Kyrle PA, Brenner B, Wagner B, Kapiotis S, Lechner K, Korninger HC. Thrombocytopenia associated with low-molecular-weight heparin. *Lancet* 1991; 337: 1425-1426

Elalamy I, Potevin F, Lecrubier C, Bara L, Marie JP, Samama MM. A fatal low-molecular-weight heparin-associated thrombocytopenia after hip surgery: possible usefulness of PF4-heparin ELISA test. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 665-671

Farner B, Eichler P, Kroll H, Greinacher A. A comparison of danaparoid and lepirudin in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 2001; 85: 950-957

Fondu P. Heparin-associated thrombocytopenia: an update. *Acta Clin Belg* 1995; 50: 343-357

Foo SY, Everett BM, Yeh RW, Criss D, Laposata M, Cott EMV, Jang I. Prevalence of heparin-induced thrombocytopenia in patients undergoing cardiac catheterization. *Am Heart J* 2006; 152: 290e1-290e7

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

Frydman A. Low-molecular-weight heparins: an overview of their pharmacodynamics, pharmacokinetics and metabolism in humans. *Haemostasis* 1996; 26 Suppl 2: 24-38

Gao C, Boylan B, Fang J, Wilcox DA, Newman DK, Newman PJ. Heparin promotes platelet responsiveness by potentiating  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3-mediated outside-in signaling. *Blood* 2011; 117: 4946-4952

Girolami B, Prandoni P, Stefani PM, Tanduo C, Sabbion P, Eichler P, Ramon R, Baggio G, Fabris F, Girolami A. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in hospitalized medical patients treated with subcutaneous unfractionated heparin: a prospective cohort study. *Blood* 2003; 101: 2955-2959

Gluckman TJ, Segal JB, Fredde NL, Saland KE, Jani JT, Walenga JM, Prechel MM, Citro KM, Zidar DA, Fox E, Schulman SP, Kickler TS, Rade JJ. Incidence of antiplatelet factor 4/heparin antibody induction in patients undergoing percutaneous coronary revascularization. *Am J Cardiol* 2005; 95: 744-747

Gouault-Heilmann M, Huet Y, Adnot S, Contant G, Bonnet F, Intrator L, Payen D, Levent M. Low molecular weight heparin fractions as an alternative therapy in heparin-induced thrombocytopenia. *Haemostasis* 1987; 17: 134-140

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

Greinacher A, Michels I, Mueller-Eckhardt C. Heparin-associated thrombocytopenia: the antibody is not heparin specific. *Thromb Haemost* 1992; 67: 545-549

Greinacher A, Michels I, Liebenhoff U, Presek P, Mueller-Eckhardt C. Heparin-associated thrombocytopenia: immune complexes are attached to the platelet membrane by the negative charge of highly sulphated oligosaccharides. *Br J Haematol* 1993; 84: 711-716

Greinacher A, Pötzsch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost* 1994; 71: 247-251

Greinacher A. Antigen generation in heparin-associated thrombocytopenia: the nonimmunologic type and the immunologic type are closely linked in their pathogenesis. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 106-116

Greinacher A, Zinn S, Birk UW. Heparin-induced antibodies as a risk factor for thromboembolism and haemorrhage in patients undergoing chronic haemodialysis. *Lancet* 1996; 348: 764

Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia--pathogenesis and treatment. *Thromb Haemost* 1999; 82 Suppl 1: 148-156

Greinacher A, Lubenow N, Hinz P, Ekkernkamp A. Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Dtsch Ärzteblatt* 2003; 34-35: A2220-A2229

Greinacher A, Eichler P, Lietz T, Warkentin TE. Replacement of unfractionated heparin by low-molecular-weight heparin for postorthopedic surgery antithrombotic prophylaxis lowers the overall risk of symptomatic thrombosis because of a lower frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2005; 106: 2921-2922

Greinacher A, Gopinadhan M, Günther JU, Omer-Adam MA, Strobel U, Warkentin TE, Papastavrou G, Weitschies W, Helm CA. Close approximation of two platelet factor 4 tetramers by charge neutralization forms the antigens recognized by HIT antibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2386-2393

Greinacher A, Alban S, Omer-Adam MA, Weitschies W, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: A stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings. *Thromb Res* 2008; 122: 211-220

Greinacher A, Kohlmann T, Strobel U, Sheppard JA, Warkentin TE. The temporal profile of the anti-PF4/heparin immune response. *Blood* 2009; 113: 4970-4976

Greinacher A, Ittermann T, Bagemühl J, Althaus K, Fürll B, Selleng S, Lubenow N, Schellong S, Sheppard JI, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: towards standardization of platelet factor 4/heparin antigen tests. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2025-2031

Greinacher A, Holtfreter B, Krauel K, Gätke D, Weber C, Ittermann T, Hammerschmidt S, Kocher T. Association of natural anti-platelet factor 4/heparin antibodies with periodontal disease. *Blood* 2011; 118: 1395-1401

Gruel Y, Pouplard C, Nguyen P, Borg J, Derlon A, Juhan-Vague I, Regnault V, Samama M, Group FHTS. Biological and clinical features of low-molecular-weight heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2003; 121: 786-792

Gürtler K, Euchner-Wamser I, Neeser G. Heparin-induced thrombocytopenia. *Anaesthesist* 2006; 55: 1009-1025

Hach-Wunderle V, Kainer K, Salzmann G, Müller-Berghaus G, Pötzsch B. Heparin-related thrombosis despite normal platelet counts in vascular surgery. *Am J Surg* 1997; 173: 117-119

Harbrecht U, Weber D, Hertfelder H, Andrae-Slone C, Doeffinger J, Hanfland P. Low molecular weight heparin causing heparin-induced thrombocytopenia type II with severe thrombotic complications. *Ann Hematol* 1998; 76 Suppl: 127

Harbrecht U, Bastians B, Kredteck A, Hanfland P, Klockgether T, Pohl C. Heparin-induced thrombocytopenia in neurologic disease treated with unfractionated heparin. *Neurology* 2004; 62: 657-659

Heiden D, Mielke CH, Rodvien R. Impairment by heparin of primary haemostasis and platelet [<sup>14</sup>C]5-hydroxytryptamine release. *Br J Haematol* 1977; 36: 427-436

Heinrich D, Görg T, Schulz M. Effects of unfractionated and fractionated heparin on platelet function. *Haemostasis*, 1988; 18 Suppl 3: 48-54

Hirsh J, Warkentin TE, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 1998; 114: 489S-510S

Hirsh J, Weitz JI. Thrombosis and anticoagulation. *Semin Hematol* 1999; 36: 118-132

Horne MK. The effect of secreted heparin-binding proteins on heparin binding to platelets. *Thromb Res* 1993; 70: 91-98

Horne MK, Hutchison KJ. Simultaneous binding of heparin and platelet factor-4 to platelets: further insights into the mechanism of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol* 1998; 58: 24-30

Horne MK. Nonimmune heparin-platelet interactions: implications for the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, eds. *Heparin-Induced Thrombocytopenia*. New York-London: Informa healthcare, 2007: 117-129

Horsewood P, Warkentin TE, Hayward CP, Kelton JG. The epitope specificity of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996; 95: 161-167

Horsewood P, Kelton JG. Investigation of a platelet factor 4 polymorphism on the immune response in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Platelets* 2000; 11: 23-27

Illuminati G; Calìò FG, Bertagni A, Forte A, Gallinaro L, Montesano G, Ciulli A. Heparin induced thrombocytopenia after low molecular weight heparin treatment: a case report. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996; 18: 225-228

Jenkins I, Helmons PJ, Martin-Armstrong LM, Montazeri ME, Renvall M. High rates of venous thromboembolism prophylaxis did not increase the incidence of heparin-induced thrombocytopenia. *Jt Comm J Qual Patient Saf* 2011; 37: 163-169

Juhl D, Eichler P, Lubenow N, Strobel U, Wessel A, Greinacher A. Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2006; 76: 420-426

Kato S, Takahashi K, Ayabe K, Samad R, Fukaya E, Friedmann P, Varma M, Bergmann SR. Heparin-induced thrombocytopenia: analysis of risk factors in medical inpatients. *Br J Haematol* 2011; 154: 373-377

Kappers-Klunne MC, Boon DM, Hop WC, Michiels JJ, Stibbe J, van der Zwaan C, Koudstaal PJ, van Vliet HH. Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis: a prospective analysis of the incidence in patients with heart and cerebrovascular diseases. *Br J Haematol* 1997; 96: 442-446

Kawano H, Yamamoto H, Miyata S, Izumi M, Hirano T, Toratani N, Kakutani I, Sheppard JA, Warkentin TE, Kada A, Sato S, Okamoto S, Nagatsuka K, Naritomi H, Toyoda K, Uchino M, Minematsu K. Prospective multicentre cohort study of heparin-induced thrombocytopenia in acute ischaemic stroke patients. *Br J Haematol* 2011; 154: 378-386

Kelton JG. Heparin-induced thrombocytopenia. *Haemostasis* 1986; 16: 173-186

Kelton JG, Sheridan D, Santos A, Smith J, Steeves K, Smith C, Brown C, Murphy WG. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. *Blood* 1988; 72: 925-930

Korte W. Treatment of bleeding due to anticoagulants. *Ther Umsch* 2006; 63: 345-353

Krauel K, Pötschke C, Weber C, Kessler W, Fürll B, Ittermann T, Maier S, Hammerschmidt S, Bröker BM, Greinacher A. Platelet factor 4 binds to bacteria, inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2011; 117: 1370-1378

Krauel K, Weber C, Brandt S, Zähringer U, Mamat U, Greinacher A, Hammerschmidt S. Platelet factor 4 binding to lipid A of Gram-negative bacteria exposes PF4/heparin-like epitopes. *Blood* 2012; 120: 3345-3352

Lecompte T, Boiteau R, Richard X, Luo SK, Lecrubier C, Burdin M, Samama M. Severe thrombocytopenia with pulmonary embolism and consumption coagulopathy during treatment with tedelparin. *Presse Med* 1991; 20: 563

Lee DH, Warkentin TE. Frequency of Heparin-Induced Thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, eds. *Heparin-Induced Thrombocytopenia*. New York-London: Informa healthcare, 2007: 67-116

Lee E, Hwang K, Yang J, Hong S. Anti-heparin-platelet factor 4 antibody is a risk factor for vascular access obstruction in patients undergoing hemodialysis. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 69-72

Levy JH, Hursting M. J. Heparin-induced thrombocytopenia, a prothrombotic disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007; 21: 65-88

Lindhoff-Last E, Eichler P, Stein M, Plagemann J, Gerdson F, Wagner R, Ehrly AM, Bauersachs R. A prospective study on the incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients after vascular surgery. *Thromb Res* 2000; 97: 387-393

Lindhoff-Last E, Nakov R, Misselwitz F, Breddin H, Bauersachs R. Incidence and clinical relevance of heparin-induced antibodies in patients with deep vein thrombosis treated with unfractionated or low-molecular-weight heparin. *Br J Haematol* 2002; 118: 1137-1142

Linkins LA, Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: real-world issues. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37: 653-663

Linkins LA, Dans AL, Moores LK, Bona R, Davidson BL, Schulman S, Crowther M, American College of Chest Physicians. 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* 2012; 141: e495S-530S

Li ZQ, Liu W, Park KS, Sachais BS, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood* 2002; 99: 1230-1236

Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759-765

Lubenow N, Kempf R, Eichner A, Eichler P, Carlsson LE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: temporal pattern of thrombocytopenia in relation to initial use or reexposure to heparin. *Chest* 2002; 122: 37-42

Lubenow N, Hinz P, Lietz T, Ladwig A, Jünger M, Ekkernkamp A, Greinacher A. Clinical HIT and HIT-antibody seroconversion in trauma patients receiving unfractionated heparin vs. Certoparin: a randomised, double-blind study. *Transfus Med Hemother* 2006; 33: 7

Lubenow N, Hinz P, Thomaschewski S, Lietz T, Vogler M, Ladwig A, Jünger M, Nauck M, Schellong S, Wander K, Engel G, Ekkernkamp A, Greinacher A. The severity of trauma determines the immune response to PF4/heparin and the frequency of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2010; 115: 1797-1803

Lüllmann H, Mohr K. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 1999

Luzzatto G, Bertoli M, Cella G, Fabris F, Zaia B, Girolami A. Platelet count, anti-heparin/platelet factor 4 antibodies and tissue factor pathway inhibitor plasma antigen level in chronic dialysis. *Thromb Res* 1998; 89: 115-122

Mani H, Lindhoff-Last E. *Pharmakologie niedermolekularer Heparine*. In: Haas S, Hrsg. *Niedermolekulare Heparine*. Heidelberg:Springer, 2006: 34-41

Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a meta-analysis. *Blood* 2005; 106: 2710-2715

Marx A, Huhle G, Hoffmann U, Wang LC, Schüle B, Jani L, Harenberg J. Heparin-induced thrombocytopenia after elective hip joint replacement with postoperative prevention of thromboembolism with low-molecular-weight heparin. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1999; 137: 536-539

Mascelli MA, Deliargyris EN, Damaraju LV, Barnathan ES, Califf RM, Simoons ML, Sane DC. Antibodies to platelet factor 4/heparin are associated with elevated endothelial cell activation markers in patients with acute coronary ischemic syndromes. *J Thromb Thrombolysis* 2004 a; 18, 171-175

Mascelli MA, Deliargyris EN, Damaraju LV, Barnathan ES, Sane DC. Role of anti-PF4/heparin antibodies in recurrent thrombotic events after acute coronary syndromes. *Semin Thromb Hemost* 2004 b; 30: 347-350

Matsuo T, Kobayashi H, Matsuo M, Wanaka K, Nakamoto H, Matsushima H, Sakai R. Frequency of anti-heparin-PF 4 complex antibodies (HIT antibodies) in uremic patients on chronic intermittent hemodialysis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 445-450

Matsuo T, Suzuki S, Matsuo M, Kobayasi H. Preexisting antibodies to platelet factor 4-heparin complexes in patients with acute coronary syndrome who have no history of heparin exposure. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2005 a; 34: 18-22

Matsuo T, Tomaru T, Kario K, Hirokawa T, HIT research group of Japan. Incidence of heparin-PF4 complex antibody formation and heparin-induced thrombocytopenia in acute coronary syndrome. *Thromb Res* 2005 b; 115: 475-481

Mattioli AV, Bonetti L, Sternieri S, Mattioli G. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with unfractionated heparin: prevalence of thrombosis in a 1 year follow-up. *Ital Heart J* 2000; 1: 39-42

Matzdorf A, Giagounidis A, Müller-Beißenhirtz H, 2010: Immunthrombozytopenie (ITP). <http://www.dgho.de/onkopedia/Immunthrombozytopenie> (07.01.2011)

Morris TA, Castrejon S, Devendra G, Gamst AC. No difference in risk for thrombocytopenia during treatment of pulmonary embolism and deep venous thrombosis with either low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin: a metaanalysis. *Chest* 2007; 132: 1131-1139

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001

Nakamoto H, Shimada Y, Kanno T, Wanaka K, Matsuo T, Suzuki H. Role of platelet factor 4-heparin complex antibody (HIT antibody) in the pathogenesis of thrombotic episodes in patients on hemodialysis. *Hemodial Int* 2005; 9 Suppl 1: S2-S7

Nellen V, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Rapid exclusion or confirmation of heparin-induced thrombocytopenia: a single-center experience with 1,291 patients. *Haematologica* 2012; 97: 89-97

O'Brien JR, Etherington MD, Pashley MA. The heparin-mobilisable pool of platelet factor 4: a comparison of intravenous and subcutaneous heparin and Kabi heparin fragment 2165. *Thromb Haemost* 1985; 54: 735-738

O'Shea SI, Sands JJ, Nudo SA, Ortel TL. Frequency of anti-heparin-platelet factor 4 antibodies in hemodialysis patients and correlation with recurrent vascular access thrombosis. *Am J Hematol* 2002; 69: 72-73

Pauzner R, Greinacher A, Selleng K, Althaus K, Shenkman B, Seligsohn U. False-positive tests for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1070-1074

Pohl C, Klockgether T, Greinacher A, Hanfland P, Harbrecht U. Neurological complications in heparin-induced thrombocytopenia. *Lancet* 1999; 353: 1678-1679

Pohl C, Kredteck A, Bastians B, Hanfland P, Klockgether T, Harbrecht U. Heparin-induced thrombocytopenia in neurologic patients treated with low-molecular-weight heparin. *Neurology* 2005; 64:1285-1287

Pouplard C, May MA, Iochmann S, Amiral J, Vissac AM, Marchand M, Gruel Y. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin : clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 1999; 99: 2530-2536

Pouplard C, Iochmann S, Renard B, Herault O, Colombat P, Amiral J, Gruel Y. Induction of monocyte tissue factor expression by antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes developed in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2001; 97: 3300-3302

Pouplard C, May MA, Regina S, Marchand M, Fuscuardi J, Gruel Y. Changes in platelet count after cardiac surgery can effectively predict the development of pathogenic heparin-dependent antibodies. *Br J Haematol* 2005; 128: 837-841

Prandoni P, Siragusa S, Girolami B, Fabris F. The incidence of heparin-induced thrombocytopenia in medical patients treated with low-molecular-weight heparin: a prospective cohort study. *Blood* 2005; 106: 3049-3054

de Raucourt E, Vinsonneau C, Juvin K, Fischer AM, Meyer G. Heparin-induced thrombocytopenia with thrombotic complications during prophylactic treatment with low-molecular-weight heparin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 786-788

Rhodes GR, Dixon RH, Silver D. Heparin induced thrombocytopenia with thrombotic and hemorrhagic manifestations. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 136: 409-416

Rhodes GR, Dixon RH, Silver D. Heparin induced thrombocytopenia: eight cases with thrombotic-hemorrhagic complications. *Ann Surg* 1977; 186: 752-758

Rice L, Attisha WK, Drexler A, Francis JL. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med* 2002; 136: 210-215

Risch L, Fischer JE, Schmutz M, Huber AR. Association of anti-heparin platelet factor 4 antibody levels and thrombosis in pediatric intensive care patients without thrombocytopenia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 113-116

Sachais BS, Litvinov RI, Yarovoi SV, Rauova L, Hinds JL, Rux AH, Arepally GM, Poncz M, Cuker A, Weisel JW, Cines DB. Dynamic antibody-binding properties in the pathogenesis of HIT. *Blood* 2012; 120: 1137-1142

Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, Lindon JN, Favreau L. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J Clin Invest* 1980; 65: 64-73

Schindewolf M, Kroll H, Ackermann H, Garbaraviciene J, Kaufmann R, Boehncke WH, Ludwig RJ, Lindhoff-Last E. Heparin-induced non-necrotizing skin lesions: rarely associated with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 1486-1491

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

Skouri H, Gandouz R, Abroug S, Kraiem I, Euch H, Gargouri J, Harbi A. A prospective study of the prevalence of heparin-induced antibodies and other associated thromboembolic risk factors in pediatric patients undergoing hemodialysis. *Am J Hematol* 2006; 81: 328-334

Smythe MA, Koerber JM, Mattson JC. The incidence of recognized heparin-induced thrombocytopenia in a large, tertiary care teaching hospital. *Chest* 2007; 131: 1644-1649

Suh JS, Malik MI, Aster RH, Visentin GP. Characterization of the humoral immune response in heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Hematol* 1997; 54: 196-201

Suh JS, Aster RH, Visentin GP. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis recognize different epitopes on heparin: platelet factor 4. *Blood* 1998; 91: 916-922

Thiele T, Althaus K, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *Internist* 2010; 51: 1127-1135

Trossaert M, Gaillard A, Commin PL, Amiral J, Vissac AM, Fressinaud E. High incidence of anti-heparin/platelet factor 4 antibodies after cardiopulmonary bypass surgery. *Br J Haematol* 1998; 101: 653-655

de la Vega LP, Miller RS, Benda MM, Grill DE, Johnson MG, McCarthy JT, McBane RD. Association of heparin-dependent antibodies and adverse outcomes in hemodialysis patients: a population-based study. *Mayo Clin Proc* 2005; 80: 995-1000

Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 81-88

Visentin GP, Malik M, Cyganiak KA, Aster RH. Patients treated with unfractionated heparin during open heart surgery are at high risk to form antibodies reactive with heparin:platelet factor 4 complexes. *J Lab Clin Med*, 1996; 128: 376-383

Warkentin TE, Kelton JG. Heparin and platelets. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 243-264

Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent, M, Kelton JG, Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* 1995; 332: 1330-1335

Warkentin TE. Heparin-induced skin lesions. *Br J Haematol* 1996; 92: 494-497

Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 1996; 101: 502-507

Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1-7

Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a clinicopathologic syndrome. *Thromb Haemost* 1999; 82: 439-447

Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96: 1703-1708

Warkentin TE, Kelton JG. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med* 2001 a; 135: 502-506

Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2001 b; 344: 1286-1292

Warkentin TE, Roberts RS, Hirsh J Kelton JG. An improved definition of immune heparin-induced thrombocytopenia in postoperative orthopedic patients. *Arch Intern Med* 2003; 163: 2518-2524

Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Br J Haematol* 2003; 121: 535-555

Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126: 311S-337S

Warkentin TE. New approaches to the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Chest* 2005; 127: 35S-45S

Warkentin TE, Cook RJ, Marder VJ, Sheppard JI, Moore JC, Eriksson BI, Greinacher A, Kelton JG. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies in orthopedic surgery patients receiving antithrombotic prophylaxis with fondaparinux or enoxaparin. *Blood* 2005; 106: 3791-3796

Warkentin TE, Greinacher A. Unfractionated LMWH and the risk of HIT: are medical patients different? *Blood* 2005; 106: 2931-2932

Warkentin TE, Sheppard JI, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A. Gender imbalance and risk factor interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2006; 108: 2937-2941

Warkentin TE. HIT: lessons learned. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 50-57

Warkentin TE. Clinical picture of heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, HRSO. *Heparin-Induced Thrombocytopenia*. New York-London: Informa healthcare, 2007 a: 21-66

Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007 b; 21: 589-607

Warkentin TE, Eikelboom JW. Who is (still) getting HIT? *Chest* 2007; 131: 1620-1622

Warkentin TE, Greinacher A. So, does low-molecular-weight heparin cause less heparin-induced thrombocytopenia than unfractionated heparin or not? *Chest* 2007; 132: 1108-1110

Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Sigouin CS, Kelton JG. The quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1304-1312

Warkentin TE, Cook RJ, Marder VJ, Greinacher A. Anti-PF4/heparin antibody formation postorthopedic surgery thromboprophylaxis: the role of non-drug risk factors and evidence for a stoichiometry-based model of immunization. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 504-512

Warkentin TE, Greinacher A, Gruel Y, Aster RH, Chong BH. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia: a conceptual framework and implications for diagnosis. *J Thromb Haemost* 2011; 9: 2498-2500

Watson H, Davidson S, Keeling D. Guidelines on the diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia: second edition. *Br J Haematol* 2012; 159: 528-540

Weismann RE, Tobin RW. Arterial embolism occurring during systemic heparin therapy. *Arch Surg* 1958; 76: 219-227

Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. *N Engl J Med* 1997; 337: 688-698

Williams RT, Damaraju LV, Mascelli MA, Barnathan ES, Califf RM, Simoons ML, Deliargyris EN, Sane DC. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies: an independent predictor of 30-day myocardial infarction after acute coronary ischemic syndromes. *Circulation* 2003; 107: 2307-2312

Xiao Z, Thérroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 251-256

Yeh RW, Everett BM, Foo S, Dorer DJ, Laposata M, Cott EMV, Jang I. Predictors for the development of elevated anti-heparin/platelet factor 4 antibody titers in patients undergoing cardiac catheterization. *Am J Cardiol* 2006; 98: 419-421

Yu A, Jacobson SH, Bygdén A, Egberg N. The presence of heparin-platelet factor 4 antibodies as a marker of hypercoagulability during hemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 21-26

Zhou A, Winkler A, Emamifar A, Gartland B, Duncan A, Antun A, Arellano M, Tindol GA, Levy JH, Bornstein WA, Horowitz IR, Khoury HJ. Is the incidence of heparin-induced thrombocytopenia affected by the increased use of heparin for VTE prophylaxis? *Chest* 2012; 142: 1175-1178