

LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI FACTOR PLAQUETARIO 4-HEPARINA Y EL ÍNDICE 4T PARA TROMBOCITOPENIA INDUCIDA POR HEPARINA

MARTA E. MARTINUZZO, GRACIELA S. CERRATO, MARÍA L. IGLESIAS VARELA, YOLANDA P. ADAMCZUK, GONZALO POMBO, RICARDO R. FORASTIERO

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Servicio de Hematología, Fundación Favaloro, Hospital Universitario, Universidad Favaloro, Buenos Aires

Resumen La trombocitopenia inducida por heparina (HIT) es un efecto adverso del tratamiento con heparina, mediada por anticuerpos anti complejo factor plaquetario 4 (PF4)-heparina (HPIA). La HIT es frecuentemente moderada pero pueden desarrollarse complicaciones trombóticas. El diagnóstico precoz es importante. La detección de HPIA por ELISA tiene alta sensibilidad pero baja especificidad (títulos bajos sin significación clínica). El índice de las 4T (índice 4T) puede detectar pacientes con alto riesgo de HIT. El propósito del estudio fue correlacionar los niveles de HPIA y el índice 4T de un grupo de pacientes derivados a nuestro centro. Evaluamos 84 pacientes, 34 de ellos desarrollaron trombosis. Cada médico completó un cuestionario clínico que fue remitido con la muestra a nuestro centro. Los cuestionarios fueron analizados por un investigador externo y el índice 4T se calculó previamente al ensayo. Los HPIA se determinaron por un ELISA (*Asserachrom* HPIA) que detecta los 3 isotipos, IgG, IgM e IgA, único reactivo disponible en Argentina. Los resultados se expresaron como porcentaje de absorbancia (%ABS). La correlación del índice 4T con los HPIA fue 0.472 (*rho spearman*, $p < 0.001$). Los pacientes con índice 4T ≥ 6 presentaban %ABS mayores que los ≤ 5 (67 vs. 39, $p < 0.001$). Aquéllos con trombosis presentaron títulos mayores que los que no la desarrollaron (%ABS 59 vs. 39, $p = 0.017$). En conclusión: Los títulos altos de HPIA medidos por ELISA, que detecta los 3 isotipos, correlacionaron claramente con el índice 4T ≥ 6 y fueron más frecuentes en los pacientes con trombosis, coincidiendo con lo ya descrito para ensayos de ELISA específicos para isotipo IgG.

Palabras clave: trombocitopenia inducida por heparina, anticuerpos anti factor plaquetario 4-heparina, trombosis

Abstract *Levels of antiplatelet factor 4-heparin antibodies and 4T score for heparin induced thrombocytopenia.* Heparin induced thrombocytopenia (HIT) is an immune-mediated disorder due to antibodies anti platelet factor 4-heparin (HPIA). Thrombocytopenia is often moderate but certain patients can develop morbid thrombotic complications. HPIA detection by ELISA has high sensitivity but low specificity, and low titers (without clinical significance) are frequent. A pretest clinical score (4T's) was developed in order to recognize patients that are at high risk of HIT. The aim of this study was to correlate HPIA levels and the 4T's score of consecutive patients derived to our center. We evaluated 84 patients (35 of them developed thrombosis); the clinical questionnaire was sent along with the sample and was analyzed by an investigator who did not know the patients' characteristics, and 4T's scores were calculated before performing the laboratory tests. HPIA were measured by ELISA (*Asserachrom* HPIA) that detects IgG, IgM and IgA isotypes, (the only reagent available in our country). 4T's score correlated with HPIA levels (*rho spearman* 0.472, $p < 0.001$). Patients with 4T's ≥ 6 had higher absorbance percentages than those with ≤ 5 (67 vs. 39%, $p < 0.001$), and patients with thrombosis also presented higher titers (59 vs. 39%, $p = 0.017$) than those who did not develop this complication. In conclusion, high titers of HPIA measured by EIA which detects the 3 isotypes, clearly correlate with 4T's score ≥ 6 and are more frequent in patients who develop thrombosis, just as reported when an IgG specific ELISA is used..

Key words: heparin induced thrombocytopenia, anti platelet factor 4-heparin antibodies, thrombosis

La trombocitopenia inducida por heparina (HIT) es una entidad clínica de origen inmunológico debida al desarrollo de anticuerpos dirigidos contra los complejos macromoleculares formados por el factor plaquetario 4 (PF4)-heparina (HPIA)¹.

El desarrollo de los anticuerpos es dependiente del tamaño de los complejos macromoleculares producidos a ciertas relaciones molares entre el PF4 y la heparina por neutralización de cargas². Este efecto adverso de la heparina se asocia, en ciertos pacientes, a trombocitopenia moderada en general y complicaciones trombóticas mórbidas. Una serie de factores tales como la droga (tipo de heparina), tipo de cirugía, trauma, tiempo desde la primera dosis de la droga, el índice de masa corporal, la estequiometría del complejo formado, el sexo y situa-

Recibido: 14-IX-2011

Aceptado: 6-XII-2011

Dirección postal: Dra. Marta Martinuzzo, Av Independencia 2113 1°B, 1225, Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4378-1349 e-mail: memartinuzzo@gmail.com

ciones fisiológicas como el embarazo han sido postuladas como responsables, no solo de la inmunogenicidad sino también del desarrollo de trombocitopenia y trombosis³⁻⁶.

Por otra parte, existen pruebas inmunológicas para la detección de HPIA que son muy sensibles pero poco específicas para los anticuerpos patogénicos de la HIT. La tasa de seroconversión puede ser elevada, pero los títulos bajos sin manifestaciones clínicas de relevancia suelen ser frecuentes, y sin significación diagnóstica. Más aún, los ensayos funcionales están poco disponibles, y su utilidad diagnóstica es variable, ya que la liberación de serotonina es sensible y específica pero engorrosa y no aplicable a la clínica práctica, y la agregación plaquetaria inducida por heparina tiene baja sensibilidad. Todo esto dificulta la decisión de suspender la terapia con heparina y el reemplazo por terapéuticas anticoagulantes alternativas. Por esto, se ha desarrollado y evaluado un índice clínico *pretest* de las 4T (índice 4T)⁷⁻⁸. Los títulos altos (absorbancia > 1.0) de anticuerpos de isotipo IgG detectados en un ELISA específico estarían claramente asociados a anticuerpos capaces de activar las plaquetas en ensayos funcionales y con clínica de HIT en pacientes con elevados *score* 4T⁹⁻¹¹. El propósito del presente estudio fue correlacionar los niveles de HPIA medidos por un ELISA que detecta los 3 isotipos IgG, IgM e IgA, único disponible en nuestro país, y el índice 4T en un grupo de pacientes consecutivos derivados a nuestro centro para el diagnóstico de HIT.

Materiales y métodos

Evaluamos 93 pacientes consecutivos (43 mujeres), mediana de edad 56, rango 32-78 años, cuyas muestras fueron derivadas a nuestro laboratorio entre enero de 2006 y diciembre de 2010 para investigar la presencia de HPIA, dado que somos el único centro en el país que trabaja en este campo y que mide estos anticuerpos. Se envió un cuestionario para ser completado por el médico tratante para obtener los datos clínicos necesarios para el cálculo del índice 4T según lo establecido en la Tabla 1. El mismo fue calculado por un investigador que no conocía las características de los pacientes, previamente a la determinación de los anticuerpos. Se excluyeron 9 pacientes del análisis porque el cuestionario estaba incompleto. Cincuenta y dos de los 84 pacientes finalmente incluidos (62%) habían recibido heparina no fraccionada (HNF) y 32 heparina de bajo peso molecular (HBPM) a dosis profilácticas debido a cirugía reciente. Los sueros fueron congelados a -20 °C hasta su procesamiento. Los HPIA fueron medidos por un ELISA (*Asserachrom* HPIA, Diagnostica Stago, Francia) que detecta los 3 isotipos (IgG, IgM e IgA). Los resultados fueron expresados en porcentaje de absorbancia (%ABS) de un plasma de referencia incluido en el equipo. Con cada experiencia se procesaron un control negativo y uno positivo provistos por el fabricante. Se realizó un análisis cualitativo de los resultados dividiendo la población en cuartiles.

- Negativo: < 27% (indicado por el fabricante), Abs < 0.400
- Positivo débil: 27-50%, Abs 0.400-0.750
- Positivo moderado: 50-80%, Abs 0.750-1.000
- Positivo fuerte: > 80%, Abs > 1.000

Además, en 49 muestras se realizó la prueba funcional de agregación plaquetaria inducida por heparina enfrentando el suero inactivado del paciente con plasma rico en plaquetas de por lo menos 3 donantes sanos, empleando dosis terapéuticas de HNF (0.5 U/ml).

TABLA 1.- Índice de las 4T para trombocitopenia inducida por heparina (HIT)

4 T's Aspectos evaluados	Puntaje adjudicado para cálculo del índice		
	2 puntos	1 punto	0 punto
Trombocitopenia	Caída > 50% y nadir plaquetario > 20000/ml	Caída entre el 30-50% o nadir plaquetario entre 10-20000/ml	Caída <30% o nadir plaquetario < 10000/ml
Tiempo de disminución de recuento plaquetario	Disminución entre día 5-10, o ≤ 1 día si hubo exposición a la heparina los 30 días previos	Compatible con día 5-10 pero no claro (por ej. faltan recuentos intermedios), o después del día 10, o caída ≤ 1 día si hubo exposición entre 30 y 100 días previos	Caída en < 4 días sin exposición reciente a la heparina
Trombosis u otras secuelas	Nueva trombosis confirmada, Necrosis de piel, reacción aguda sistémica post HNF endovenosa (bolo)	Progresiva o recurrente. Reacciones de piel no necrotizantes (eritematosas), trombosis sospechada no probada.	No
Otras causas de trombocitopenia	No aparente	Posible	Definitiva

Estadística: Para la correlación entre el índice 4T y los niveles de HPIS se utilizó la correlación no paramétrica de Spearman. Para la comparación de los niveles de HPIA según 2 niveles de índice 4T o según la historia de trombosis se utilizó el test de Student para muestras independientes. Para comparar la prevalencia de positivos fuertes en distintos subgrupos de pacientes, se utilizó el test de chi cuadrado. Los cálculos estadísticos se realizaron por el programa SPSS versión 15.0.

Resultados

Los niveles de HPIA expresados como %ABS correlacionaron significativamente con el índice 4T (Fig. 1), siendo el coeficiente de correlación de Spearman rho: 0.472, $p < 0.001$. La media de %ABS fue más elevada en los pacientes con índice 4T ≥ 6 (67%) que en los pacientes con índice 4T ≤ 5 (39%), $p < 0.001$. Más aún, la media del %ABS fue superior en los pacientes que desarrollaron un nuevo episodio trombótico o extendieron la trombosis previa (59%), que en aquellos que no tuvieron trombosis (39%), $p = 0.017$. El análisis cualitativo demostró que la prevalencia de los títulos moderados o altos de HPIA se presentaron en el 86% de los pacientes con índice 4T ≥ 7 , en $> 60\%$ con índice 4T ≥ 6 y $< 10\%$ con índice 4T ≤ 4 (Fig. 2). La prevalencia de altos títulos de HPIA se asoció claramente con trombosis, 58% vs. 26% de los pacientes con y sin trombosis, respectivamente, $OR\ 3.28$ (1.26-8.59). El valor predictivo negativo de un índice 4T

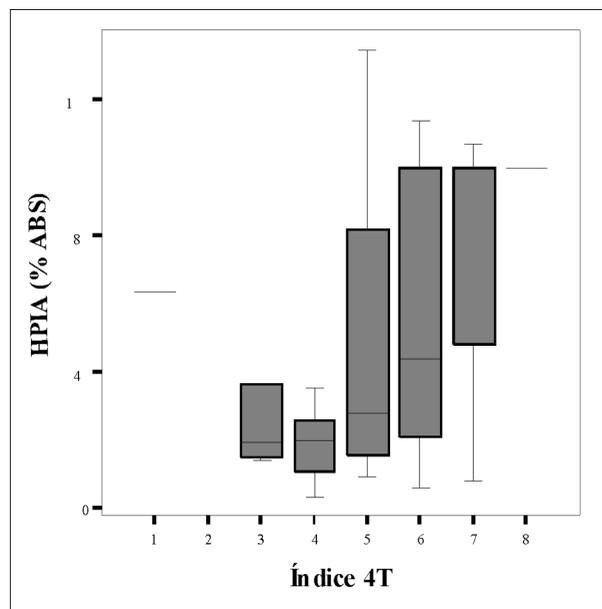


Fig. 1.– Resultados del ensayo de ELISA HPIA poliespecífico (expresado en %ABS) en un gráfico de cajas en el que se expresan los percentilos 25 y 75 como límites de la caja, la mediana con una línea horizontal, y el rango como línea vertical. Representan los valores obtenidos clasificados de acuerdo a cada uno de los valores del índice 4T obtenido.

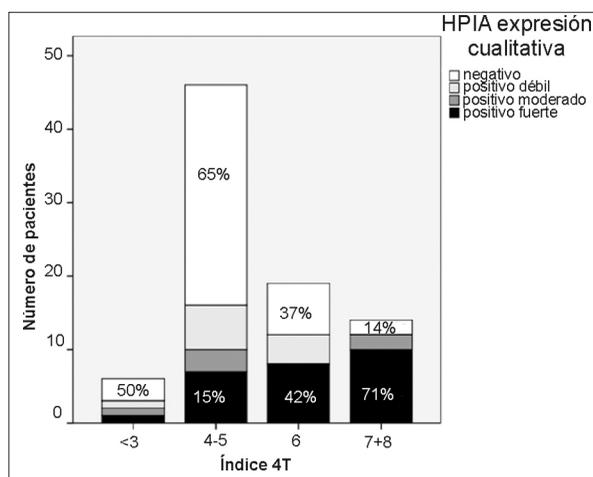


Fig. 2.– Distribución de positividad de los anticuerpos anti complejo factor plaquetario 4 (PF4)-heparina (HPIA) expresados cualitativamente (clasificación por cuartiles como se definió en materiales y métodos), en los pacientes con diferentes índices 4T, bajos, intermedios y altos

≤ 4 fue del 90% cuando se utilizó este ensayo de ELISA. De los 49 pacientes en los que se realizó la prueba de agregación plaquetaria inducida por heparina, 14 dieron positiva la prueba, la media del %ABS de los que dieron la prueba funcional positiva fue superior a la de los que eran negativos, 88 vs. 37%, $p < 0.001$. La prueba de agregación plaquetaria con heparina positiva se asoció a un índice 4T ≥ 6 , $OR\ 20.5$ (3.62-114).

Nueve pacientes tenían otra causa de trombocitopenia, 47 tenían una causa probable y 28 no tenían ninguna explicación para el desarrollo de trombocitopenia. No hubo diferencias en el %ABS entre los 3 grupos de pacientes. Hubo 15 pacientes con enfermedades autoinmunes, de los cuales sólo 7 tenían síndrome antifosfolípido, enfermedad que es conocida por una mayor prevalencia de estos anticuerpos.

Discusión

La HIT es una trombocitopenia inducida por drogas, de origen inmunológico, que complica el tratamiento con heparina. La trombocitopenia se presenta en general entre los días 4 y 10 de tratamiento, seguida en algunos pacientes por complicaciones trombóticas fundamentalmente en territorio venoso. Se produce por anticuerpos dirigidos contra el complejo PF4-heparina que al formar el complejo inmune activan las plaquetas a través de su unión al receptor $Fc\gamma$ -IIa, y que también son capaces de activar monocitos y neutrófilos^{3,12}. Los HPIA unen complejos PF4-heparina con determinado tamaño y estabilidad que dependen en parte del tipo de heparina, siendo la inmunogenicidad $HNF > HBPM > fondaparinux$ ¹².

El diagnóstico de laboratorio de HIT debe ser rápido y específico para los anticuerpos patogénicos, porque es indispensable la rápida suspensión de la heparina y la instauración de otro tratamiento anticoagulante, usualmente más complicado y costoso, porque estos pacientes tienen alto riesgo trombotico pero tienen contraindicados los dicumarínicos, que pueden producir gangrena de miembros inferiores¹³. Esto es aún más importante en países como el nuestro en el que no había otras alternativas hasta que hace poco tiempo la bivaldurina y el fondaparinux se introdujeron en el mercado.

Está claramente establecido que el isotipo IgG es el más relevante por tener capacidad de activar plaquetas, y que solo los títulos altos ABS > 1.000 o 1.500 son los clínicamente relevantes en pacientes con alto *score* 4T⁹⁻¹¹. Esto fue establecido para dos ELISAs comerciales en los que, colocando el punto de corte en ABS > 1.000 en lugar del recomendado por el fabricante (ABS 0.300-0.400) mejoraba la especificidad del ensayo. No obstante, este tipo de punto de corte no ha sido establecido para ensayos que miden los 3 isotipos en forma conjunta como el que utilizamos en nuestro estudio. Por ello nosotros tratamos de establecer un rango de positividad dividiendo los resultados en cuartiles y observamos que los %ABS del 3er y 4to cuartil (ABS 0.750-1.000 y > 1.000, positivo moderado y fuerte, respectivamente) son los que se asocian a índice 4T más altos, de alta probabilidad al desarrollo de trombosis y a la positividad de la prueba de agregación plaquetaria inducida por heparina. No obstante, la técnica de agregación tiene una baja sensibilidad (aproximadamente 75% en nuestra experiencia personal, datos no mostrados), y es engorrosa ya que requiere de un agregómetro y de la obtención de 3 donantes sanos de plaquetas cada vez.

Recientemente, se ha determinado que la inhibición de la unión de los anticuerpos en los ensayos de ELISA, tanto el que usa complejos PF4-heparina como el que usa PF4-polianión como antígeno, por altas concentraciones de HNF (100UI) es una buena herramienta como prueba confirmatoria que mejora la especificidad del ensayo^{11,14}. No pudimos realizar este tipo de procedimiento confirmatorio en nuestro ensayo.

Nuestro estudio demuestra claramente que los títulos altos obtenidos con el ELISA poliespecífico, que corresponde a %ABS > 80% y ABS > 1.000, están asociados a pacientes con alto riesgo de HIT (*score* 4T \geq 6) y a los que desarrollan complicaciones tromboticas. Estas observaciones han sido de utilidad para la toma de decisiones en nuestros pacientes y creemos que puede ser de utilidad para centros de países en vías de desarrollo en los que los ELISAs IgG específicos no estén disponibles.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Bibliografía

1. Amiral J, Bridley F, Dreyfus M, et al. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1992; 68: 95-6.
2. Suvarna S, Espinasse B, Qi R, et al. Determinants in PF4/heparin immunogenicity. *Blood* 2007; 110: 4253-60.
3. Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost* 2005; 94: 132-5.
4. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromboprophylaxis: a metaanalysis. *Blood* 2005; 106: 2710-5.
5. 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: 504-12.
6. Warkentin TE, Sheppard JI, Sigouin CS, Kohlmann T, Eichler P, Greinacher A. Gender imbalance and risk interactions in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2006; 108: 2937-41.
7. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 759-65.
8. Bakchout T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJH. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1260-5.
9. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, et al. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on incidence, platelet activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor4/heparin antibodies of the IgG, IgM and IgA classes. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 1666-73.
10. Warkentin T. PF4-dependent immunoassays and differential detection of HIT antibodies. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 232-4.
11. Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Kelton JG. The use of well-characterized sera for the assessment of new diagnostic enzyme-immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 216-8.
12. Greinacher A. Heparin induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 9-12.
13. Warkentin TE, Greinacher A, Koster A, Lincoff AM. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians. Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Ed). *Chest* 2008; 133: 340S-80S.
14. Whitlatch NL, Kong DF, Metjian AD, Arepally GM, Ortel TL. Validation of high-dose heparin confirmatory step for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2010; 116: 1761-6.