Rev. Chil. Pediatr. 58(2): 131-134, 1987

Anticuerpos plaquetarios en púrpura trombocitopénico idiopático del niño

Dra. Paola Zolezzi R.^{1,2}; B.Q. Jaime Inostroza S.³; Dr. Claudio Zapata O.¹;
Dr. Eduardo Pérez F.⁴; Dra. María Elena Cabrera C.⁵; T.M. Clara Mansilla M.¹

Antiplatelet antibodies determination by indirect platelet adhesion immunofluorescence in idiopathic thrombocytopenic purpura

The indirect platelet adhesion immunofluorescence test was used to determine platelet antibodies in 36 patients with childhood idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), 20 acute and 16 chronic. Platelet antibodies were detected in 14/20 with the acute form and in 10/16 with the chronic form. The results obtained are similar to those of other authors with this technique as well as being independent of the platelet count at the moment of sampling the serum and of the previous 6 months transfusion records with blood products. The use of Hamax microtrays, taking advantage of using the platelet's capacity to adhere to glass surface, seems to increase the sensitivity of the test simplifying its procedure and increasing its efficiency.

(Key words: antiplatelet antibodies, indirect platelet adhesion immunofluorescence, idiopathic thrombocytopenic purpura).

La naturaleza inmune en la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) fue establecida por Harrington en 1951, quien se autoadministró una unidad de plasma i.v. de un paciente con PTI y desarrolló bruscamente una profunda trombocitopenia que se recuperó al cabo de una semana. En los años siguientes, comprobó la existencia de un factor antiplaquetario presente en la fracción gamaglobulina del suero, mediante un test sencillo de aglutinación de plaquetas normales con el suero de pacientes con PTI¹. En 1965, Shulman y col.² demuestran que el factor antiplaquetario estaba en la fracción gamaglobulina 7S del suero, es adsorbido por plaquetas humanas y es específico para la especie, afectando tanto plaquetas autólogas como homólogas.

Diez años más tarde, Dixon y Rosse³ hicieron una importante contribución en este campo al desarrollar una técnica de determinación cuantitativa de anticuerpo unido a plaquetas, demostrando su positividad en los pacientes con PTI analizados. Este hecho fue rápidamente confirmado por otros laboratorios empleando técnicas

similares u otras, incluyendo radioinmunoanálisis⁴.

En 1978, Borne y col.⁵, desarrollaron un método sencillo de inmunofluorescencia de suspensión plaquetaria para detectar la presencia de aloanticuerpos plaquetarios. Dos años después, demostraron que esta prueba era aplicable para la detección de autoanticuerpos plaquetarios, cuando el suero de los pacientes se incubaba con plaquetas de donante (prueba indirecta) y cuando se incubaba con plaquetas del propio enfermo (prueba directa)⁶.

Schneider y Schnaidt⁷ aprovechando la capacidad de las plaquetas de adherirse al vidrio, le introdujeron algunas modificaciones al ensayo de inmunofluorescencia de suspensión plaquetaria convirtiéndolo en uno de inmunofluorescencia de adhesión plaquetaria, y demostraron que esta simplificación de la técnica la convertía en un elemento de gran valor en la detección de aloanticuerpos y autoanticuerpos plaquetarios.

El montaje en nuestro medio de la prueba indirecta de inmunofluorescencia de adhesión plaquetaria (PIIFAP), nos ha permitido estudiar la presencia en el suero de anticuerpos plaquetarios en pacientes menores de 15 años, que cumplen los criterios diagnósticos para PTI.

MATERIAL Y METODOS

Se investigaron 36 niños con PTI (22 hombres y 14 mujeres), con rango de edad entre recién nacido y 14

1. Instituto de Hematología, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
2. Instituto de Pediatría, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
3. Departamento de Inmunología, Universidad de la Frontera, Temuco.
4. Servicio de Pediatría, Hospital de Temuco.
5. Servicio de Medicina Interna, Hospital de Temuco.

años, residentes en las Regiones IX y X, y atendidos en los Departamentos de Hematología de los Hospitales de Temuco (11 casos) y de Valdivia (25 casos), en el período marzo-83 a julio-85.

Todos los casos presentaron en algún momento púrpura y trombocitopenia inferior a $30 \times 10^9 \times l$ en sangre periférica, con megacariocitos normales o aumentados en la médula ósea y sin que la trombocitopenia pudiera atribuirse a otra enfermedad no autoinmune, cumpliendo los criterios que habitualmente se exigen para calificar esta condición^{3,8}.

Veinte casos tenían evolución de PTI agudo, incluyendo tres recién nacidos hijos de madres con PTI. Dieciséis casos, fueron catalogados como PTI crónico, de acuerdo a criterios universalmente aceptados⁹.

La muestra para la determinación de anticuerpos plaquetarios séricos se obtuvo entre 1 y 42 días del diagnóstico en los PTI agudos y entre 6 meses y 7 años del diagnóstico en los PTI crónicos. Los recuentos plaquetarios en el momento de obtener la muestra de suero estuvieron entre $4,0$ y $360,0 \times 10^9 \times l$ (media = $30 \times 10^9 \times l$) en los PTI Agudos y entre $2,0$ y $240,0 \times 10^9 \times l$ (media = $15 \times 10^9 \times l$) en los PTI Crónicos.

Las muestras de suero se conservaron a $-70^{\circ}C$ y las determinaciones de anticuerpos plaquetarios se realizaron quincenalmente en el laboratorio de inmunología del Hospital de Temuco por uno de nosotros (J.L.).

PIIFAP: Se utilizó la técnica descrita por Burne⁵, con las modificaciones de Schneider⁷ y pequeñas modificaciones nuestras. Básicamente es la siguiente:

Las plaquetas: se obtienen de un plasma rico en plaquetas por centrifugación diferencial de sangre con EDTA de donantes normales de grupo O. El suero de los pacientes se obtiene a partir de sangre dejada coagular. Como control positivo se utilizó suero antiplaquetario (PIA1) proporcionado por el Dr. C. Mueller-Eckhardt (Instituto de Inmunología Clínica y Transfusiones, Universidad de Giessen, R.F.A.). Como control negativo, se empleó suero de donantes sanos de grupo AB y plaquetas de individuos no sensibilizados. Fases del procedimiento: se coloca la suspensión de plaquetas en contacto con una microplaca de vidrio Hamax (Microtrays Rings, Hamax A.S., Høyden Noruega), formando una delgada placa de plaquetas adheridas al vidrio. Se cubre esta placa de plaquetas con el suero a investigar y se incubaba. Se agrega el reactivo isotiocianato de fluoresceína conjugado con IgG antihumana (Dako Corporation, Copenhagen, Dinamarca). Luego se procede a eliminar, por aspiración el exceso de anticuerpos conjugados con fluoresceína y se realiza la observación de las plaquetas montadas en el glicerol en un microscopio de fluorescencia, con aumento de 600X.

Los resultados se expresan en cruces 0 a 5+, considerándose positivo el ensayo cuando al menos 2/5 de las plaquetas utilizadas presentan fluorescencia.

Se empleó Chi cuadrado como prueba estadística.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se encuentran los resultados con la PIIFAP, que fue positivo en 24 de los 36 niños con PTI (66,6%).

En la Tabla 2 se observan los resultados de la PIIFAP en relación al recuento plaquetario del día en que se obtuvo la muestra de suero, sin que se detectara diferencia entre los grupos ($p > 0,05$).

En la Tabla 3 se observan los resultados de la PIIFAP en relación con el antecedente de transfusiones de productos sanguíneos en los seis meses previos a la toma de la muestra, siendo la positividad del test independiente de este antecedente.

En la Tabla 4 se encuentra un cuadro resumen de los tres recién nacidos con PTI neonatal inmune.

Los resultados con el suero antiplaquetario (PIA1) fueron siempre fuertemente positivos (5+) en tanto que los resultados del suero control de individuos de grupo AB no sensibilizados fueron repetidamente negativos.

Tabla 1.
PIIFAP en 36 niños con PTI. (IX y X Regiones)

	n	PRUEBA	
		Positiva	Negativa
PTI Agudo	20	14 (70,0%)	6 (30,0%)
PTI Crónico	16	10 (62,5%)	6 (37,5%)
Total	36	24 (66,6%)	12 (33,3%)

Tabla 2.
PIIFAP en niños con PTI en relación con el recuento plaquetario del día de la obtención de la muestra de suero.

Plaquetas (n)	Prueba	
	Positiva	Negativa
< $20 \times 10^9 \times l$		
PTI Agudo	7	4
PTI Crónico	8	5
Total	15	9 (60,0%)
$20 - 100 \times 10^9 \times l$		
PTI Agudo	9	7
PTI Crónico	6	3
Total	15	10 (66,6%)
> $100 \times 10^9 \times l$		
PTI Agudo	4	3
PTI Crónico	2	2
Total	6	5 (83,3%)

$p > 0,05$

Tabla 3.
PIIFAP en niños con PTI en relación al antecedente de transfusiones con productos sanguíneos en los seis meses previos a la toma de la muestra.

Antecedente	n	PRUEBA	
		Positiva	Negativa
Con transfusiones	11	8 (72,7%)	3 (27,3%)
Sin transfusiones	14	14 (75,7%)	4 (24,3%)
No consignado	11	6 (54,5%)	5 (45,5%)
Total	36	24	12

Tabla 4.
PIIFAP en tres Recién Nacidos con PTI neonatal inmune.

Caso	Día de obtención suero RN	Recuento plaquetas ($\times 10^9 \times l$)	Resultado	Diagnóstico de la madre	Recuento plaquetas madre ($\times 10^9 \times l$)	Resultado suero materno
1	24	177	+	PTI Crónico	9	+
2	6	30	+	Sana	250	+
3	3	30	-*	PTI Agudo	30	+*

+ : positivo; - : negativo.

*: IgG asociada a plaquetas elevada, medida por RIA.

DISCUSION

La utilización de la técnica descrita por Borne⁵ en pacientes con trombocitopenia autoinmune⁶, ya sea mediante el ensayo directo con las propias plaquetas del paciente, o con el indirecto, utilizando plaquetas de donantes sanos incubadas con el suero del paciente, ha permitido el empleo de una prueba sensible para el reconocimiento de anticuerpos plaquetarios, cuyos resultados son similares a los obtenidos con técnicas de determinación de inmunoglobulina asociada a plaquetas^{3,4}. Existe un grupo variable de 10 a 39% de pacientes con PTI en los que no se demuestra el aumento de la IgG asociada a plaquetas o la presencia de anticuerpos plaquetarios⁶. Cuando se emplea la prueba de inmunofluorescencia de suspensión plaquetaria en sus formas directa e indirecta en el mismo grupo de pacientes con PTI, la positividad del ensayo es algo superior con la forma directa (69% vs 44% en la experiencia de Borne y col.⁶).

La modificación introducida por Schneider⁷, aprovechando la capacidad de las plaquetas de adherirse a las superficies de vidrio, empleando microplacas Hamax simplifica la prueba original y elimina manipulaciones que consumen tiempo, sin que disminuya el rendimiento de la técnica. De esta forma, nosotros hemos obtenido en un grupo de niños con PTI, un porcentaje de positividad del 66% con la PIIFAP.

Por otra parte, no observamos diferencias en la positividad del ensayo en relación al recuento plaquetario del día de la obtención de la muestra de suero. El reconocimiento de anticuerpos plaquetarios en los pacientes con recuento plaquetario por debajo de $20 \times 10^9 \times l$ puede ser muy difícil con las técnicas directas, por lo que la PIIFAP es de especial ayuda en estos casos, con la ventaja adicional que la realización del test puede diferirse porque se pueden emplear muestras de suero conservadas en congelación. En

nuestra casuística, 40% de los pacientes (15 niños) presentaban recuentos plaquetarios inferiores a $20 \times 10^9 \times l$ en el momento de la obtención de la muestra de suero y 2/3 de ellos tenían resultados positivos en la prueba.

La similar positividad de los resultados en nuestros pacientes, independientes de si habían recibido o no transfusiones con productos sanguíneos en los seis meses previos, hace poco probable que los anticuerpos plaquetarios detectados en estos casos sean atribuidos a aloanticuerpos.

Hasta la fecha, la mayor información correspondiente a la persistencia de anticuerpos plaquetarios en pacientes con PTI proviene de adultos¹⁰. Recientemente, Ware y col.¹¹ analizaron 20 niños con PTI —11 con evolución aguda y 9 con evolución crónica— que llevaban más de doce meses de remisión, determinando por prueba de antiglobulina monoclonal marcada con radioyodo, que los niveles de IgG asociada a plaquetas directo e indirecto (suero) estaban normales en los 20 pacientes, sugiriendo que la prevalencia de anticuerpos plaquetarios elevados es baja en los niños con PTI en remisión prolongada sin medicamentos. En el caso de nuestros niños con PTI Agudo, la obtención del suero se hizo hasta 24 días después del diagnóstico y sólo cuatro niños —en un plazo variable entre 13 y 24 días— habían normalizado sus recuentos plaquetarios al momento de la obtención de la muestra de suero, y de ellos, tres casos tuvieron positiva la PIIFAP. En nuestros niños con PTI Crónico, dos casos se encontraban en remisión con recuentos plaquetarios normales en el momento de obtenerse la muestra de suero y en ambos se observaron anticuerpos plaquetarios con la PIIFAP.

Ware y col.¹¹ atribuyen a los casos con anticuerpos plaquetarios persistentes una especial significación, en el sentido que corresponderían a pacientes con riesgo de recaer. En el caso de mujeres con historia de PTI en su niñez, la presencia de anticuerpos plaquetarios durante el

embarazo indicaría que pueden dar a luz a niños con PTI neonatal inmune, secundario al paso de IgG plaquetario materno que atravesaría la placenta. Nuestra casuística comprende tres RN con PTI neonatal. De los dos casos con PIIFAP positiva, la madre del primero tenía PTI Crónica activa durante el embarazo con anticuerpos plaquetarios séricos demostrados y la madre del segundo presentaba anticuerpos plaquetarios séricos en el puerperio precoz aunque no tenía antecedentes clínicos de púrpura. Un tercer RN con PTI neonatal tuvo la PIIFAP negativa, siendo hijo de una mujer que había presentado un PTI Agudo durante el embarazo con anticuerpos plaquetarios séricos demostrados. Tanto el RN como su madre tenían niveles elevados de IgG asociada a plaquetas, medido por radioinmunoanálisis⁴, lo que confirma la naturaleza inmune de este caso.

RESUMEN

Se determinó la presencia de anticuerpos plaquetarios en el suero de 36 niños con Púrpura Trombocitopénico Idiopático (PTI), 20 agudos y 16 crónicos, mediante la prueba indirecta de inmunofluorescencia de adhesión plaquetaria (PIIFAP). Se observaron anticuerpos plaquetarios en 14/20 de los PTI Agudos (70%) y en 10/16 de los PTI Crónicos (62,5%). Los resultados son similares a los descritos por otros autores con esta técnica e independientes del recuento plaquetario al momento de obtención de la muestra de suero y del antecedente de transfusión con productos sanguíneos en los seis meses previos. El empleo de microplacas Hamax, aprovechando la capacidad de las plaquetas para adherirse a superficies de vidrio, parece aumentar la sensibili-

dad del test simplificando su realización y aumentando su eficiencia.

REFERENCIAS

1. Harrington, W.J., Minnich, V., Arimura, G.: The autoimmune thrombocytopenias. In Tocantins LM (ed): Progress in Hematology. Vol. 1. New York, Grune & Stratton, 1956, pp 166-192.
2. Shulman, N.R., Marder, V.J., Weinbach, R.S.: Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic purpura. Ann NY Acad Sci 124: 499, 1965.
3. Dixon, R., Rosse, W., Ebbert, L.: Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura. Correlation of serum and platelet-bound antibody in clinical response. N Engl J Med 292: 230, 1975.
4. Mueller-Eckhardt, C., Mahn, I., Schulz, G., Mueller-Eckhardt, G.: Detection of platelet autoantibodies by a radioactive anti-immunoglobulin test. Vox Sang 35: 357, 1978.
5. Borne, A.E.G., Verheugt, F.W.A., Oosterhof, F., Riesz, E., Brutel, A., Engelfriet, C.P.: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. Br J Haematol 39: 195, 1978.
6. Borne, A.E.G., Helmerhorst, F.M., Leeuwen, E.F., Pegels, H.G., Riesz, E., Engelfriet, C.P.: Autoimmune thrombocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. Br J Haematol 45: 319, 1980.
7. Schneider, W., Schnaidt, M.: The platelet adhesion immunofluorescence test: A modification of the platelet suspension immunofluorescence test. Blut 43: 389, 1981.
8. Koller, C.A.: Immune thrombocytopenic purpura. Med Clin North Am 64: 761, 1980.
9. Karpaluk, S.: Autoimmune thrombocytopenic purpura. Blood 56: 329, 1980.
10. Veenhoven, W.A., Schans, G.S., Neijweg, H.O.: Platelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura. Clin Exp Immunol 39: 645, 1980.
11. Ware, R., Kinney, T.R., Rosse, W.: Platelet antibody in prolonged remission of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. J Pediatr 107: 708, 1985.