

PAICA: método de detección de autoanticuerpos plaquetarios en pacientes con púrpura trombocitopénica inmunológica.

Graciela S Cerrato, Alicia I Rovó, Dolores P Puente, Gonzalo Pombo, Ricardo R Forastiero, Marta E Martinuzzo.

Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, Fundación Favaloro y Hospital Ramos Mejía. Buenos Aires, Argentina.



ARTICULO ORIGINAL

Este trabajo recibió el 2do Premio del XIV Congreso Argentino de Hematología otorgado por la Sociedad Argentina de Hematología

HEMATOLOGIA, Vol. 3 N° 3: 270-276
Noviembre-Diciembre, 1999

RESUMEN:

La PTI (Púrpura Trombocitopénica Inmunológica) se caracteriza por destrucción de las plaquetas al depositarse sobre sus membranas autoanticuerpos o complejos inmunes. El sitio de destrucción es usualmente el sistema reticuloendotelial del bazo y menos frecuentemente el del hígado. Su diagnóstico requiere estudios que demuestren la presencia de estos anticuerpos. Nuestro objetivo es evaluar la eficacia de un método para detectar autoanticuerpos unidos a glicoproteínas específicas (GP) de la membrana plaquetaria (PAICA: Platelet-Associated IgG Characterization Assay), y su correlación con los resultados obtenidos por PAIgG (Platelet-Associated IgG). Para ello se estudiaron 37 pacientes (28 mujeres y 9 varones) caracterizados como PTI por presentar trombocitopenia y megacariocitos normales o aumentados en médula ósea. Se investigó la presencia de IgG asociada a plaquetas por el método PAIgG (Leporrier M et al, 1979) que detecta el total de inmunoglobulina unida a la membrana de la plaqueta intacta y por PAICA (Laurent Macchi et al, 1996), que permite identificar la glicoproteína target por medio del uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra GPIIb/IIIa y IbIX, sobre un lisado plaquetario. Trece pacientes fueron negativos por ambos métodos; 20 tuvieron PAICA positivo y 15 de ellos también PAIgG positivo. Otros 4 pacientes mostraron positividad por PAIgG y no por PAICA. La especificidad encontrada por PAICA fue: 8 contra GPIIb/IIIa, 8 contra IbIX, y 4 contra ambas GP. En conclusión, el método PAICA demuestra buena sensibilidad para la detección de anticuerpos antiplaquetas y permite confirmar la etiología autoinmune, lo que significa una ventaja importante en el diagnóstico de PTI.

SUMMARY

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is an autoimmune disorder caused by platelet-specific autoantibodies that bind to target antigens on membrane of autologous platelets, leading to a rapid clearance by the reticuloendothelial system. **Purpose:** to evaluate the efficacy as a diagnostic method of PAICA (Platelet-Associated IgG Characterization Assay), and its correlation with PAIgG (Platelet-Associated IgG) in ITP patients. **Patients and Methods:** a total of 37 consecutive ITP patients (28 females and 9 males) were diagnosed on the basis of thrombocytopenia and bone marrow examination, which showed normal or increased number of megacariocytes. The mean age was 42.4 years (range 15-89). They were examined by PAIgG (Leporrier M et al, Br J Haematol 1979) detecting only the total IgG associated to the surface of platelets, and PAICA, a new method for detecting autoantibodies bound to specific membrane glycoproteins in total platelet lysates (Laurent Macchi et al, Thromb Haemost 1996). We have used murine monoclonal antibodies directed against two of the major glycoproteins of the platelets: GPIIb-IIIa and Ib-IX. **Results:** 13 out of 37 patients showed negative results for PAIgG and PAICA. Twenty were positive for PAICA and 15 of them were also PAIgG positive. The specificity of these antibodies was: 8 against GPIIb-IIIa, 8 against GPIb-IX and both kind of antibodies were found in 4 patients. There was a small group of 4 patients who were only positive for PAIgG. **Conclusions:** diagnosis of ITP requires laboratory tests capable of detecting platelet-reactive antibodies. PAIgG test allows only to identify total IgG bound to the surface of platelets, and in some cases it reflects the thrombocytopenia of non-immune origin. PAICA is a more useful test to confirm the autoimmune etiology, and takes into account the surface-bound and internal pools of antibodies in platelets. This suggests that identifying the antigen to which antibodies are directed would provide an important advantage in the diagnosis of ITP. Nevertheless, none of these tests is sensitive enough to detect the presence of antiplatelet antibodies in all patient samples.

INTRODUCCION

La Púrpura Trombocitopénica Inmunológica (PTI) es un desorden causado por anticuerpos circulantes que reaccionan contra antígenos de la membrana de la plaqueta. El diagnóstico de esta enfermedad es primariamente clínico debido a que los ensayos disponibles para la detección de dichos anticuerpos, tanto en suero como asociados a las membranas de las plaquetas, no son lo suficientemente sensibles ni específicos. Este tipo de desórdenes se caracteriza por trombocitopenia con número normal o incrementado de megacariocitos en médula ósea, y ausencia de esplenomegalia significativa.

Desde la técnica dependiente de complemento desarrollada por Dixon y colaboradores¹, se han implementado varios tests para la detección de anticuerpos anti-plaquetas en los pacientes con PTI. La mayoría de éstos se basa en la medida de la interacción de los anticuerpos presentes en el suero del paciente con plaquetas de controles normales, o miden el total de inmunoglobulina G (IgG) asociada a la superficie de las plaquetas del paciente. Este último grupo de técnicas incluye diversas formas de detección de las IgG, y entre ellas se encuentra el método de PAIgG (Platelet-associated IgG).

Este test ha demostrado tener ciertas limitaciones en el diagnóstico de la enfermedad puesto que suelen encontrarse niveles aumentados de PAIgG tanto en trombocitopenias de etiología inmune como en aquellas debidas a otras causas^{2,3}. A pesar de esto continúa siendo ampliamente utilizado y en la práctica diaria puede observarse una mala interpretación de los resultados, ya que se atribuye la etiología autoinmune a pacientes con trombocitopenia que presentan PAIgG aumentado desconociendo las limitaciones de la técnica.

En forma reciente algunos investigadores han descrito técnicas denominadas "ensayos de fase III" que permiten identificar el antígeno hacia el cual están dirigidos los anticuerpos. Entre ellos se encuentran el inmunoblotting, la inmunoprecipitación y los ensayos de "captura antigénica" (antigen capture).

En los últimos años muchos son los estudios que indican que estos ensayos "antígeno-específicos" son de suma utilidad en el diagnóstico de PTI, por ser más sensibles y específicos^{4,5,6,7}. Sin embargo existen importantes diferencias metodológicas entre ellos; por ejemplo, el MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens) mide las IgG unidas a las glicoproteínas (GP) de la superficie de las plaquetas⁸, mientras que el ensayo descrito en 1996 por Macchi y col.⁹, al cual ellos denominaron tentativamente PAICA (Platelet-Associated IgG Characterization Assay), detecta tanto las IgG unidas

a las GP superficiales, como a aquellas ligadas a las GP internas, aumentando considerablemente la sensibilidad para el diagnóstico de PTI.

Actualmente se sabe que con frecuencia en esta enfermedad se encuentran anticuerpos contra los complejos glicoproteicos IIb-IIIa^{10,11} y Ib-IX⁵, también se han detectado autoanticuerpos dirigidos contra otros receptores plaquetarios tales como la GP Ia-IIa¹².

El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia del método PAICA para detectar autoanticuerpos plaquetarios y correlacionar los resultados con aquellos obtenidos por el método PAIgG.

MATERIALES Y METODOS

Pacientes

Se estudió una serie de 37 pacientes (28 mujeres y 9 varones) con diagnóstico de PTI según los criterios habituales: trombocitopenia periférica con presencia de megacariocitos normales o aumentados en médula ósea. Se los incorporó en forma consecutiva no mediando preselección alguna que tuviera en cuenta ni la severidad de la plaquetopenia, ni si estaban o no bajo tratamiento. La media de edad de la población fue de 42.4 años (15-89 años). El tiempo medio de evolución de la enfermedad fue de 88 meses (1-468 meses). De los 37 pacientes, 17 estaban recibiendo tratamiento al momento del estudio, y 11 habían sido esplenectomizados (Sx).

En 10 pacientes la PTI se consideró secundaria a otras patologías: HIV (n=1), LES (n=1), Síndrome Antifosfolípido (SAF) (n=1), SAF+Tiroiditis (n=1), Tiroiditis (n=2), Artritis Reumatoidea (n=1), Síndrome de Evans (n=1), Hepatitis A virus C (n=1), Cirrosis Biliar Primaria (n=1). En los 27 pacientes restantes la PTI se consideró idiopática (Tabla I).

Obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

La sangre de los pacientes y de 36 controles normales fue extraída por punción venosa y recolectada en EDTA 0.077M (1 parte de anticoagulante y 9 partes de sangre). En el caso de los pacientes el volumen total extraído se ajustó al recuento plaquetario, para salvar los inconvenientes técnicos producidos por las plaquetopenias severas.

Las plaquetas fueron aisladas por centrifugación a 200xg durante 10 min., y se obtuvo de este modo el PRP. Éste fue posteriormente separado en 2 alícuotas de igual volumen para ser centrifugados otros 10 min. a 1500xg y obtener así sendos pellets de plaquetas para proseguir con ambas técnicas.

Previo a los lavados se eliminó la contaminación con eritrocitos, resuspendiendo los pellets en NH₄Cl 1% durante 15 min.

PAIgG

Se utilizó la técnica descrita por Leporrier y col¹³. Luego de 3 lavados con buffer Tris-NaCl-EDTA pH:7.4, el pellet se resuspendió en 0.5 ml del mismo buffer conteniendo al anticuerpo de conejo anti IgG humana conjugado con peroxidasa (SIGMA) en dilución apropiada. Se incubó 1

TABLA I.
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

Caso N°	Edad	Sexo	Rto.Plaq (x10 ⁹ /l)	T.Evoluc (meses)	Tipo PTI	Tto.	Sx
1	26	F	60	204	Idiop.	No	No
2	71	F	170	24	Idiop.	No	No
3	21	F	250	9	Idiop.	No	No
4	18	F	45	20	Idiop.	No	No
5	37	F	50	23	Idiop.	Cort.	No
6	25	F	100	16	Idiop.	Cort.	No
7	55	F	40	96	Idiop.	Ciclof.	Si
8	34	F	320	12	Secund.	No	No
9	46	M	70	24	Idiop.	No	No
10	67	F	230	16	Idiop.	Cort.	No
11	51	F	70	1	Secund.	Ciclof.	No
12	31	F	50	36	Idiop.	No	Si
13	49	M	15	9	Idiop.	Cort/Dan	Si
14	59	F	50	84	Secund.	No	No
15	63	M	5	1	Idiop.	Cort.	No
16	34	F	30	84	Secund.	No	No
17	17	F	160	60	Idiop.	No	Si
18	44	F	300	252	Idiop.	No	Si
19	44	F	7	456	Idiop.	No	Si
20	15	M	10	4	Idiop.	Cort.	No
21	45	F	30	168	Secund.	No	No
22	54	F	200	1	Idiop.	Cort.	No
23	89	F	30	48	Idiop.	Cort.	No
24	20	F	15	96	Secund.	Cort.	Si
25	44	F	50	168	Secund.	Cort.	No
26	41	M	65	48	Idiop.	Cort.	Si
27	31	M	150	132	Idiop.	No	No
28	50	M	75	48	Secund.	Cort.	No
29	60	M	70	48	Idiop.	No	No
30	62	F	110	468	Idiop.	No	No
31	24	F	180	1	Idiop.	No	No
32	58	M	20	252	Secund.	Daps	Si
33	40	F	20	3	Secund.	Daps/Vin	No
34	58	F	300	156	Idiop.	No	Si
35	21	F	140	2	Idiop.	Cort.	No
36	43	F	75	16	Idiop.	No	No
37	23	F	60	132	Idiop.	No	Si

Rto.Plaq: Recuento Plaquetario. T.Evoluc.: Tiempo de evolución. Tto: Tratamiento (Cort.: Corticoides; Ciclof.: Ciclofosfamida; Dan: Danazol; Daps: Dapsona; Vin: Vincristina).

Sx: Esplenectomía.

hora a temperatura ambiente, y se realizaron otros 3 lavados después de los cuales se procedió a contar las plaquetas presentes en el pellet. La reacción de color se realizó con o-dianisidina/H₂O₂ como sustrato y a los 30 min. se detuvo con HCl 6N.

El resultado se expresó en moléculas de IgG/plaqueta y el cálculo utilizado tiene en cuenta el número de Avogadro, el peso molecular de la peroxidasa, la relación estequiométrica entre la peroxidasa y la IgG, el número de plaquetas al final de la reacción y la densidad óptica (DO) medida a 405 nm.

El límite superior de los resultados de PAIgG en la población normal se estableció calculando la media + 2 desviaciones estándar (DE) en 50 controles normales estudiados.

PAICA

Utilizamos la técnica descrita por Macchi y col. en 1996 (9), con unas pocas diferencias. El pellet decontaminado de eritrocitos fue lavado 3 veces con un buffer conteniendo ácido cítrico 36mM, glucosa 5mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, NaCl 103mM, PGE₁ 100nM, apyrasa 25µg/ml y albúmina bovina 1%P/V, pH:6.5. Luego del último lavado, 10⁸ plaquetas se resuspendieron en buffer conteniendo Tritón X-100 al 1% durante 30 min a 4°C. Finalmente, luego de centrifugar a 12000xg, 30 min., el sobrenadante conteniendo al lisado plaquetario se congeló a -80°C hasta el momento de su uso.

Desarrollo del ELISA. Se llevó a cabo sobre microplacas (Maxisorp Nunc) para lo cual se las cubrió con 100 µl/po-

cillo de un anticuerpo de cabra contra el fragmento Fc γ de IgG de ratón a una concentración de 3 μ g/ml en buffer carbonato (Na₂CO₃ 15mM y NaHCO₃ 35mM, pH: 9.5) permaneciendo a 4°C toda la noche. Se lavó 3 veces con buffer de lavado PBS, pH: 7.2 conteniendo 0.05% v/v de Tween 20 (PBS-Tween) y se bloquearon los sitios libres de unión con el mismo buffer conteniendo leche descremada al 5% P/V. Luego de 3 lavados se agregaron 100 μ l de una solución conteniendo 5 μ g/ml de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-glicoproteínas plaquetarias humanas. En el presente estudio se trabajó con anti-IIbIIIa (anti CD41, Immunotech) y anti IbIX (anti CD42b, Immunotech). Finalizada la incubación de 1 hora se realizaron otros 3 lavados y se agregaron 200 μ l de cada lisado plaquetario permaneciendo 1 hora adicional a T° amb. Se repitieron los lavados y se procedió a incubar nuevamente a T° amb. 1 hora con el anticuerpo anti IgG humana conjugado con peroxidasa (SIGMA). El desarrollo de color se produjo con una solución sustrato a base de o-fenilendiamina/H₂O₂, y se determinó la DO a 490 nm en un lector de placas marca Titertek-ICN Flow.

Los resultados de absorbancia de cada paciente fueron divididos por el promedio de las obtenidas con 4 controles normales evaluados simultáneamente en la misma placa. El test se considera positivo cuando la razón de absorbancias paciente/media normal excede el umbral superior calculado previamente con 36 controles normales (límite superior = media + 3 DE).

Análisis estadístico

La comparación de las medias de los resultados en los distintos subgrupos de pacientes fue analizado por el test de Mann-Whitney, debido a la distribución no gaussiana de los datos.

Las correlaciones fueron calculadas a través de un test no paramétrico que se expresa a través del coeficiente de correlación de Spearman (r).

Las prevalencias de resultados positivos fueron analizadas a través del test de contingencia Chi cuadrado con la corrección de Yates. La significación estadística es alcanzada cuando la p es < 0.05.

La sensibilidad de detección de anticuerpos antiplaquetas para cada una de las técnicas se calculó considerando el número de resultados positivos con respecto al número total de pacientes evaluados.

RESULTADOS

La Tabla II resume los resultados obtenidos con las muestras de los 37 pacientes seleccionados, e incluye los datos de recuento de plaquetas ($\times 10^9/l$), PAIgG (expresados en moléculas de IgG/plaqueta), y PAICA (expresados en razones entre absorbancia del paciente/media normal).

Como puede observarse, 13 pacientes fueron negativos por ambas técnicas. Veinte tuvieron resultados positivos con PAICA y 15 de ellos también fueron positivos por PAIgG. La especificidad antigénica obtenida por PAICA fue: 8 contra GP IIbIIIa, 8 contra IbIX y 4 pacientes mostraron tener anticuerpos contra ambas glicoproteínas.

TABLA II.
RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS 37 PACIENTES
UTILIZANDO COMO METODOS DE
CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS
ANTIPLAQUETARIOS PAIgG Y PAICA

Caso N°	Rto.Plaq. ($\times 10^9/l$)	PAIgG (40-250 moléc/ plaq)	PAICA	
			Anti GPIIbIIIa (VN: <1.36)	Anti GPIbIX (VN: <1.27)
1	60	102	0.84	0.85
2	170	83	1.02	0.85
3	250	96	0.91	0.96
4	45	485	6.50	0.83
5	50	1336	0.80	0.82
6	100	402	1.20	2.56
7	40	290	2.50	1.15
8	320	65	1.09	1.29
9	70	76	0.87	0.88
10	230	55	0.92	0.96
11	70	142	2.78	1.23
12	50	101	1.18	1.28
13	15	2281	1.55	3.01
14	50	390	1.67	1.08
15	5	4620	5.89	1.15
16	30	152	1.83	1.12
17	160	103	1.21	1.01
18	300	172	1.06	1.14
19	7	1441	1.18	1.16
20	10	5200	0.95	1.02
21	30	513	2.34	1.04
22	200	56	0.94	0.95
23	30	502	0.98	2.15
24	15	4547	1.54	1.35
25	50	1777	5.12	1.50
26	65	1890	7.11	1.08
27	150	115	1.13	0.91
28	75	211	1.08	1.42
29	70	275	1.01	1.07
30	110	900	5.99	1.77
31	180	155	1.15	1.15
32	20	979	1.11	3.70
33	20	3482	0.68	1.72
34	300	179	0.36	0.88
35	140	139	0.98	1.19
36	75	241	0.82	1.05
37	60	2256	1.29	1.58

La correlación entre los resultados obtenidos con ambas técnicas fue estadísticamente significativa: $r = 0.54$, $p = 0.0006$. Cabe destacar que en el caso del método PAICA se tomó el mayor valor hallado entre las 2 glicoproteínas estudiadas.

Las Figuras I y II muestran que los resultados obtenidos con ambas técnicas presentaron una corre-

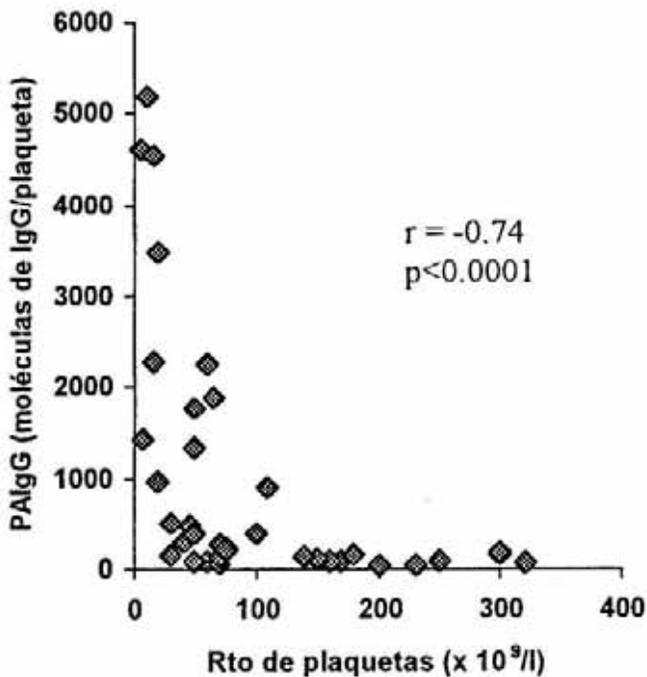


Figura I. Correlación entre los resultados obtenidos con la técnica de PAIgG (moléculas de IgG/plaqueta) y el Recuento de Plaquetas ($\times 10^9/l$)

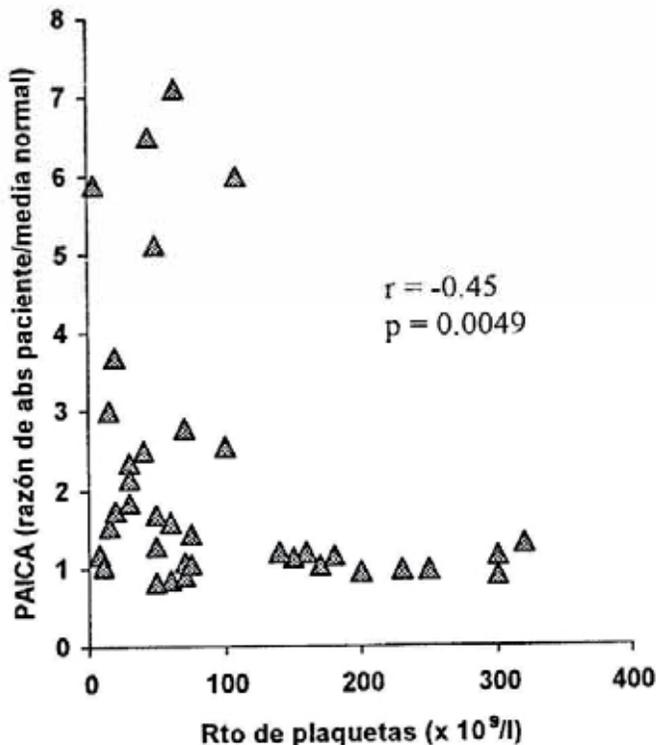


Figura II. Correlación entre los resultados obtenidos con la técnica de PAICA (absorbancia del paciente/media normal) y el Recuento de Plaquetas ($\times 10^9/l$).

lación negativa estadísticamente significativa con el recuento de plaquetas en el momento del estudio. Además la prevalencia de resultados positivos con ambas técnicas fue mayor en aquellos pacientes que

TABLA III.
PREVALENCIA DE ANTICUERPOS
ANTIPLAQUETARIOS EN LOS PACIENTES AGRUPA-
DOS SEGUN EL RECUENTO PLAQUETARIO EN EL
MOMENTO DEL ESTUDIO.

Técnica	Rto plaquetario < $100 \times 10^9/l$	Rto plaquetario > $100 \times 10^9/l$	p
PAIgG (% de pacientes con resultado positivo)	72.0	8.3	0.001
PAICA (% de pacientes con resultado positivo)	72.0	16.7	0.005

tenían recuentos plaquetarios menores a $100 \times 10^9/l$ comparados con aquellos que presentaban recuentos plaquetarios superiores a esta cifra como lo muestra la Tabla III.

La sensibilidad de detección de anticuerpos para el método PAIgG resultó ser de 51.3% y para PAICA, 54.0%. Si consideramos el número total de resultados positivos por ambas técnicas, la sensibilidad mejora, alcanzando un valor de 64.9%.

DISCUSION

La PTI se caracteriza por la destrucción de las plaquetas al depositarse autoanticuerpos o complejos inmunes sobre sus membranas. En ciertas circunstancias es posible identificar algún desorden subyacente responsable de la formación de dichos anticuerpos. En otras, no existe factor etiológico conocido y la PTI se denomina entonces idiopática.

El diagnóstico de esta enfermedad es principalmente clínico complementándose con tests de laboratorio que procuran identificar los anticuerpos ya sea en el suero o sobre las membranas de las plaquetas de los pacientes.

En los últimos años se ha puesto mucho empeño en perfeccionar las técnicas utilizadas para el diagnóstico, mejorando la sensibilidad y especificidad de las mismas. Varios estudios afirman que la realización de más de un test mejora la sensibilidad de detección de los anticuerpos ayudando al diagnóstico de esta enfermedad^{14, 15}. No obstante algunas técnicas que muestran buena sensibilidad para detectar los anticuerpos, no son lo suficientemente específicas, encontrándose niveles aumentados aun en trombocitopenias que no son de origen inmunológico^{16, 17}.

El presente estudio intenta demostrar la utilidad de la técnica de PAICA en el diagnóstico de PTI, al evaluar su capacidad para la detección de anticuerpos antiplaquetas. Compara además los resultados

obtenidos con la técnica de PAIgG, utilizada frecuentemente con el mismo objetivo.

Como todos los métodos que trabajan sobre las plaquetas de los pacientes, ambas tienen la desventaja de que en las trombocitopenias severas la dificultad en la recuperación de plaquetas luego de todos los lavados se transforma en un factor limitante. Sin embargo ambas técnicas parecen ser de mayor utilidad cuando los pacientes estudiados presentan recuentos de plaquetas disminuidos como lo demuestra la correlación negativa hallada entre los resultados obtenidos y el número de plaquetas en el momento del estudio (Figuras I y II).

En la población de pacientes evaluada, encontramos una buena correlación entre los resultados obtenidos con PAIgG y PAICA. No obstante, hubo un grupo de pacientes con resultados discrepantes que merece un análisis más profundo. Los casos N° 5, 19, 20 y 29 presentaron resultados positivos con la técnica de PAIgG y negativos con PAICA. Estos pacientes en particular reunían todas las características clínicas de PTI en actividad. Sin embargo no pudimos confirmar en ellos la presencia de anticuerpos por la técnica de PAICA. Cabe recordar que en este estudio se investigó sólo la presencia de anticuerpos contra GP IIb/IIIa y IbIX que son los más frecuentemente hallados en PTI^{5, 10, 11}. No obstante no puede descartarse que estos pacientes hubieran desarrollado anticuerpos contra alguna otra GP no evaluada por nosotros.

Posiblemente ampliando el espectro de GP *target* investigadas se mejore de manera importante la sensibilidad de esta técnica.

Por el contrario los pacientes N° 8, 11, 12, 16 y 28, presentaron resultados positivos con la técnica de PAICA y negativos con PAIgG. En estos casos en particular, la posibilidad que brinda el PAICA de identificar la GP *target* nos asegura la condición de autoinmunidad de la PTI.

En cuanto a la sensibilidad de detección de anticuerpos de ambas técnicas cabe destacar que se calculó teniendo en cuenta los resultados positivos con respecto a la población total estudiada. La inclusión de los pacientes en este estudio se realizó en forma consecutiva, no mediando preselección alguna. De los 37 pacientes, 13 tuvieron resultados negativos por ambas técnicas y evaluando detenidamente la clínica de éstos, se determinó que 11 estaban en remisión al momento del estudio. Tres de estos 11 pacientes habían sido esplenectomizados y los 8 restantes habían respondido a diversos tratamientos terapéuticos.

Si analizamos la población sin considerar los 11 pacientes en remisión, la sensibilidad de las técnicas para la detección de anticuerpos aumenta a 73% para

PAIgG, 77% para PAICA y 92% para ambas técnicas realizadas simultáneamente.

Esto significa que cualquiera de estas técnicas brinda mayor utilidad cuando se realizan en el momento de actividad de la enfermedad, que corresponde al momento en que se supone la presencia de los anticuerpos como causa de la trombocitopenia.

Si bien el número de pacientes evaluados hasta el momento es pequeño, permite concluir que la técnica de PAICA es suficientemente sensible para la detección de los anticuerpos presentes en la PTI. Por otra parte, brinda la seguridad, al igual que cualquiera de los ensayos antígeno-específicos, de caracterizar a dichos anticuerpos como auto-anticuerpos, y de esta manera corroborar la naturaleza autoinmune de la enfermedad.

CONCLUSION

El diagnóstico de PTI requiere de tests de laboratorio capaces de detectar los anticuerpos dirigidos contra las plaquetas.

La técnica de PAIgG evalúa la presencia de IgG unida a la superficie de las plaquetas, mientras que el método de PAICA permite identificar el antígeno hacia el cual están dirigidos los anticuerpos, confirmando así la etiología autoinmune. Esta última técnica tiene en cuenta además no sólo las IgG de la superficie si no que también detecta los anticuerpos que pudieran estar ligados a las GP del pool interno.

Si bien en el grupo de pacientes estudiados la sensibilidad de ambas técnicas fue similar, realizándolas simultáneamente pudo mejorarse la misma en forma considerable.

En estudios futuros es nuestro objetivo poder comparar la especificidad de las técnicas de PAIgG y PAICA incluyendo pacientes con trombocitopenias de orígenes distintos al inmunológico.

BIBLIOGRAFIA

1. Dixon R, Rosse W, Ebbert L. Quantitative determination of antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura: Correlation of serum and platelet-bound antibody with clinical response. *N Engl J Med* 1975; 292: 230-6.
2. Kelton J, Murphy W, Lucarelli A, y col. A prospective comparison of four techniques for measuring platelet-associated IgG. *Br J Haematol* 1989; 71: 97-105.
3. Mueller-Eckhardt C, Kayser W, Mersh-Baumert K y col. The clinical significance of platelet-associated IgG: a study on 298 patients with various disorders. *Br J Haematol* 1980; 46: 123-131.
4. McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods V. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987; 70: 1040-5.
5. Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, Mueller-Eckhardt C.

- Autoantibodies against platelet glycoprotein IIb/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. **Br J Haematol** 1991; 79: 256-62.
6. Brighton TA, Evans S, Castaldi P, Chesterman C, Chong B. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. **Blood** 1996; 88: 194-201.
 7. Taub J, Warrier I, Holtkamp C, Beardley D, Lusher J. Characterization of autoantibodies against the platelet glycoprotein antigens IIb/IIIa in childhood idiopathic thrombocytopenic purpura. **Am J Hematol** 1995; 48: 104-7.
 8. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Muller-Eckhardt C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. **Blood** 1987; 70: 1722-26.
 9. Macchi L, Clofent-Sanchez G, Marit G y col. PAICA: a new method for characterizing platelet-associated antibodies. Its application to the study of idiopathic thrombocytopenic purpura and to the detection of platelet-bound c7E3. **Thromb Haemost** 1996; 76: 1020-29.
 10. Woods VL, Oh EH, Mason D, McMillan R. Autoantibodies against glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. **Blood** 1984; 63: 368-375.
 11. Fujisawa K, Tani P, O'Toole TE, Ginsberg MH, McMillan R. Different specificities of platelet-associated and plasma autoantibodies to platelet GP IIb/IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. **Blood** 1992; 79: 1441-6.
 12. Deckmyn H, Chew SL, Vermynen J. Lack of platelet response to collagen associated with an autoantibody against GP Ia: A novel cause of acquired qualitative platelet dysfunction. **Thromb Haemost** 1990; 64: 74-9.
 13. Leporrier M, Dighiero G, Auzemery M, Binet JL. Detection and quantitation of platelets bound antibodies with immunoperoxidase. **Br J Haematol** 1979; 42: 605.
 14. McMillan R. Clinical role of antiplatelet antibody assays. **Sem Thromb Haemost** 1995; 21: 37-45.
 15. Kelton Jg. The serological investigation of patients with autoimmune thrombocytopenia. **Thromb Haemost** 1995; 74: 228-33.
 16. Kiefel V. The MAIPA assay and its application in immunohaematology. **Transf Medicine** 1992; 2: 181-8.
 17. Sinha R, Kelton J. Current controversies concerning the measurement of platelet-associated IgG. **Transf Medicine Reviews** 1990; 4: 121-135.