

Thiago Henrique Costa

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETAS**

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade Israelita de Ciências da Saúde
Albert Einstein para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo

2024

Thiago Henrique Costa

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETAS**

Dissertação de mestrado apresentado à
Faculdade Israelita de Ciências da Saúde
Albert Einstein para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jose Mauro Kutner

Coorientadora: Dra. Carolina Bonet Bub

São Paulo

2024

Costa, Thiago Henrique

Avaliação de diferentes metodologias na identificação de anticorpos antiplaquetas / Thiago Henrique Costa -- São Paulo, 2024.
xii, 35 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Evaluation of different methodologies in the identification of antiplatelet antibodies.*

1. Ensaio de imunoabsorção enzimática. 2. Técnica indireta de fluorescência para anticorpo. 3. Antígenos de plaquetas humanas. 4. Antígenos HLA.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Thiago Henrique Costa

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS NA IDENTIFICAÇÃO
DE ANTICORPOS ANTIPLAQUETAS**

Presidente da banca: Prof. Dr. Jose Mauro Kutner

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Dra. Juliana Pires Marafon Franz

Dra. Raquel de Melo Alves Paiva

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Membros suplentes:

Dra. Lucila Nassif Kerbauy

Dra. Ana Paula Hitomi Yokoyama

Aprovada em: 08/08/2024.

Dedicatória

A Deus, meu Senhor e Salvador, que me concedeu saúde, garra e perseverança, e me mostra ser possível ultrapassar qualquer obstáculo.

Agradecimentos

Aos meus pais Salvador Costa e Amália Bertolini Costa pelo amor e exemplos de coragem e esforço. Meus agradecimentos não serão suficientes para expressar minha gratidão.

Ao meu grande amor, Mônica Vilela Colesanti Costa, pelo seu companheirismo, paciência, sabedoria, generosidade e por estar sempre na minha vida. Obrigado por acreditar em mim. Obrigado por ser meu apoio. Obrigado por me ensinar, a cada dia.

A minha querida filha pet, Manu, que me enche de orgulho. Com você aprendo todos os dias a ser a melhor versão de mim mesmo. Te amo mais do que você possa imaginar.

Ao meu querido irmão, Fabricio André Costa, pela amizade fraterna que sempre me incentivou a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus sogros, Maria Lucia Vilela Colesanti e Januário Colesanti, a minha cunhada Luciana Vilela Colesanti, que me apoiaram e incentivaram nesta caminhada.

Ao meu excelentíssimo orientador Dr. José Mauro Kutner, pelos ensinamentos ao longo desses anos que contribuíram e ainda contribuem para meu crescimento profissional.

À minha coorientadora Dra. Carolina Bonet Bub, agradeço pelo imenso auxílio na elaboração e pelos ensinamentos ao longo desses anos, os quais foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

A Maria Giselda Aravechia coordenadora do laboratório de Imuno-hematologia do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein, por sua generosidade ao permitir minha ausência no setor durante a execução deste trabalho, além do incentivo, apoio e amizade.

Aos meus companheiros do laboratório de Imuno-Hematologia, por todo apoio, amizade, e convivência diária.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas	xi
Resumo	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Plaquetas.....	2
1.2 Antígenos plaquetários	2
1.3 Antígenos leucocitário humano	8
1.4 Refratariedade plaquetária	9
1.4.1 Definição.....	10
1.4.2 Refratariedade plaquetária por causas não imune	11
1.4.3 Refratariedade plaquetária por causas imunes	12
1.5 Investigação laboratorial.....	13
1.5.1 Imunofluorescência Indireta plaquetária	14
1.5.2 Imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais	15
1.5.3 Plataforma Luminex.....	17
1.6 Objetivos.....	17
2 MÉTODOS	18
2.1 Casuística.....	18
2.1.1 Amostras de sangue de pacientes com refratariedade plaquetária.....	18
2.1.2 Informações clínicas sobre os pacientes com refratariedade plaquetária	18
2.1.3 Classificação etiológica da refratariedade plaquetária	19
2.2 Validação da técnica de imunofluorescência plaquetária	19
2.2.1 Comparação dos resultados obtidos através da técnica de imunofluorescência plaquetária com os resultados prévios reportados por ensaio de esferas Luminex e imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais	20
2.2.2 Detecção de anticorpos plaquetários por imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais.....	20
2.2.3 Detecção de anticorpos por imunofluorescência plaquetária	21
2.2.4 Detecção de anticorpos por ensaio de esferas Luminex	22

2.2.5 Detecção de anticorpos antígeno leucocitário humano classe-I.....	23
2.3 Aspectos éticos	23
2.4 Análise estatística.....	23
3 RESULTADOS	25
3.1 Características gerais da população	25
3.2 Análises considerando imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais como referência para antígenos Plaquetário Humano	26
3.3 Análise considerando LifeScreen Deluxe como referência para antígenos leucocitário humano.....	27
4 DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÕES	32
6 ANEXO	33
7 REFERÊNCIAS	40
Abstract	
Apêndice	

Lista de figuras

Figura 1. Representação das membranas plaquetária e as glicoproteínas	7
Figura 2. Molécula de antígenos leucocitário humano de classe I.....	9
Figura 3. Cálculo de plaquetas recuperadas	10
Figura 4. Cálculo contagem corrigida do incremento.....	11
Figura 5. Esquema da técnica do teste de imunofluorescência plaquetária	14
Figura 6. Esquema da técnica da imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais.....	16
Figura 7. Esquema da técnica de leitura da imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais.....	16
Figura 8. Apresentação esquemática da classificação etiológica dos pacientes com refratariedade plaquetária	19
Figura 9. Detecção de aloanticorpos por teste de imunofluorescência plaquetária	22

Lista de tabelas

Tabela 1. Expressão antigênica em células de sangue periférico.....	3
Tabela 2. Antígeno plaquetário humano	5
Tabela 3. Antígeno plaquetário humano de baixa frequência – glicoproteína IIb.....	6
Tabela 4. Antígeno plaquetário humano de baixa frequência – glicoproteína IIIa.....	6
Tabela 5. Antígeno plaquetário humano – glicoproteína Ib	7
Tabela 6. Antígeno plaquetário humano de baixa frequência – glicoproteína Ia.....	7
Tabela 7. Características gerais da população de estudo	25
Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de ensaio de esferas Luminex em relação a imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais	26
Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de imunofluorescência plaquetária em relação a imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais.....	26
Tabela 10. Medidas diagnósticas calculadas para imunofluorescência plaquetária e Ensaio de esferas Luminex em relação à imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais.....	27
Tabela 11. Comparação entre metodologias ensaio de esferas Luminex em relação à LifeScreen Deluxe	27
Tabela 12. Comparação entre metodologias imunofluorescência plaquetária em relação à LifeScreen Deluxe	28
Tabela 13. Comparação entre metodologias Imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais em relação à LifeScreen Deluxe	28
Tabela 14. Medidas diagnósticas calculadas para imunofluorescência plaquetária em relação ao LifeScreen Deluxe.....	28

Lista de abreviaturas

APC	Células apresentadoras de antígenos (<i>Antigen presenting cells</i>)
CCI	Contagem corrigida do incremento
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
DLX	LifeScreen Deluxe
DP	Desvios padrão
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FC	Citometria de fluxo (<i>Flow cytometry</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
GP	Glicoproteína
HLA-I	Antígenos leucocitário humano de classe I (<i>Human leukocyte antigens class I</i>)
HLA-II	Antígenos leucocitário humano de classe II (<i>Human leukocyte antigens class II</i>)
HPA	Antígenos plaquetários humanos (<i>Human platelet antigens</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
MAIPA	Imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais (<i>Monoclonal antibody immobilization of platelet antigen</i>)
MFI	Intensidade média de fluorescência
MoAbs	Anticorpos monoclonais (<i>Monoclonal antibodies</i>)
OPD	O-Phenylenediamine
Pak-Lx	Ensaio de esferas Luminex
PE	R-Ficoeritrina (<i>R-phycoerythrin</i>)
PIFT	Teste de imunofluorescência plaquetária (<i>Platelet immunofluorescence test</i>)
PPR	Percentual de plaquetas recuperadas
RP	Refratariedade plaquetária
SNP	Polimorfismos de nucleotídeos únicos (<i>Single nucleotides polymorphisms</i>)

Resumo

Introdução: A detecção e a identificação de anticorpos plaquetários tem um papel importante na escolha terapêutica do paciente. **Objetivos:** Comparar a eficácia das 3 técnicas sorológicas utilizadas na detecção e identificação de anticorpos antiplaquetas em 100 amostras de pacientes com suspeita diagnóstica de anticorpos antiplaquetas.

Métodos: Soro de 100 pacientes com suspeita de anticorpos contra plaquetas foram testados contra os antígenos da Glicoproteína Ia/IIa, Ib/IX, IIb/IIIa, *cluster of differentiation* -109 e antígenos leucocitário humano classe I pelas técnicas do *monoclonal antibody immobilization of platelet antigen*, *platelet immunofluorescence test* e ensaio de esferas Luminex. **Resultados:** As comparações entre as metodologias mostraram (*monoclonal antibody immobilization of platelet antigen versus platelet immunofluorescence test* sensibilidade: 97,73%, especificidade: 78,57%), (*monoclonal antibody immobilization of platelet antigen versus* ensaio de esferas Luminex, sensibilidade 90,91%, especificidade: 96,43%) e Ensaio de esferas Luminex *versus platelet immunofluorescence test* sensibilidade 76,37%, especificidade: 100%.

Conclusões: Neste estudo comparativo de metodologias para detecção de anticorpos contra antígenos leucocitários humanos e antígenos plaquetários humanos, a imobilização de anticorpos monoclonais contra antígenos plaquetários revelou resultados similares aos obtidos no ensaio de esferas Luminex e no teste de imunofluorescência plaquetária. Entretanto, observou-se uma sensibilidade limitada para anticorpos dirigidos aos antígenos leucocitários humanos, tanto no ensaio de esferas Luminex quanto na imobilização de anticorpos monoclonais contra antígenos plaquetários.

Descritores: Ensaio de imunoabsorção enzimática; Técnica indireta de fluorescência para anticorpo; Antígenos de plaquetas humanas; Antígenos HLA

1 INTRODUÇÃO

As transfusões de plaquetas são procedimentos terapêuticos realizados para prevenção e tratamento de hemorragias graves em pacientes trombocitopênicos. A recomendação básica para transfusão é uma contagem de plaquetas abaixo de 10.000 células/ μ L ou abaixo de 20.000 células/ μ L em pacientes com hemorragia. O grupo com maior probabilidade de necessitar de transfusões são os pacientes onco-hematológicos, oncológicos.⁽¹⁾

Entre os riscos associados às transfusões, destaca-se a preocupação global com a transmissão de doenças infecciosas, reunindo esforços para o desenvolvimento de métodos de triagem mais eficazes e seguros. Alguns países alcançaram taxas de incidência tão baixas quanto 1 em 1.000.000 para transmissão de HIV e 1 em 100.000 para hepatite C. Contudo, outras complicações ainda persistentes nas práticas dos bancos de sangue incluem reações febris não hemolíticas e a ocorrência de refratariedade plaquetária (RP) em pacientes submetidos a transfusões de plaquetas.⁽²⁾

Entre 30-70% dos pacientes se tornam refratários a transfusão de plaquetas de doadores aleatórios. Essa refratariedade pode ser causada por uma variedade de fatores clínicos como infecções, coagulação intravascular disseminada (CIVD), esplenomegalia, anticorpos antidrogas entre outros fatores. Entretanto, aproximadamente 20% desses pacientes refratários são afetados por um mecanismo imuno mediado, no qual, a principal razão é devido a presença de aloanticorpos gerados pelo paciente contra antígenos leucocitário humano de classe I (HLA I – *human leukocyte antigens class I*) e antígenos plaquetários humanos (HPA – *human platelet antigens*) expressos pelas plaquetas do doador, levando à depuração plaquetária após a transfusão.⁽³⁾

Os riscos associados à transfusão estão relacionados principalmente a erros de administração, com uma frequência presumida de 1:1000. Além disso, complicações pulmonares, como sobrecarga circulatória e lesão pulmonar relacionada à transfusão, também podem ocorrer.⁽⁴⁾ De acordo com o relatório de 2017 do *Serious Hazards of Transfusion* (SHOT), Foram registradas 90 reações após transfusões de plaquetas, de um total de 284 reações relatadas para todos os produtos sanguíneos. Dessas 90 reações, 33 foram alérgicas, 22 do tipo anafilaxia, 21 febris, 12 mistas

alérgicas/febris e 2 hipotensivas. É muito provável que muitas reações ainda sejam subnotificadas.⁽⁵⁾

O avanço na sensibilidade dos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) desempenhou um papel fundamental na redução significativa do "período de janela" entre a infecção do doador e a detecção do agente infeccioso pelos testes de rastreamento. Isso foi particularmente evidente em infecções transmitidas por transfusão (ITT), como HIV-1 e HCV, reduzindo assim o risco residual de ITT para valores extremamente baixos, abaixo de $1:10^6$ para HIV-1 e de $1:10^6$ - $1:10^7$ para HCV por ano.⁽⁶⁾

1.1 Plaquetas

Plaquetas são pequenos fragmentos discoides ($2-3\mu\text{m}$), anucleadas que originalmente deriva-se da linhagem hematopoiética através do megacariócito. Sua produção a partir do megacariócito é um processo sistemático que ocorre na medula óssea. A vida útil da plaqueta está limitada entre 5 a 7 dias após sua formação e separação do megacariócito.^(7,8)

Elas são encontradas no sangue, com uma concentração normal entre 150 e 400.000 por microlitro em indivíduos saudáveis, e têm um papel fundamental na regulação da hemostasia. Recentemente, também foram relatados papéis na inflamação, resposta imune inata e adaptativa, em doenças cardíacas, doenças autoimunes e em alguns tipos de câncer.⁽⁹⁾

As plaquetas desempenham suas funções por meio da interação ligante-receptor, envolvendo várias glicoproteínas (GP) presentes em sua membrana.⁽⁹⁾

1.2 Antígenos plaquetários

Os HPA podem ser categorizados de acordo com suas naturezas bioquímicas e expressas de acordo com a tabela 1 em:⁽¹⁰⁾

- Antígenos carboidratos em glicolipídios e GP:
 - A, B, O;
 - P e Le.

- Antígenos proteicos:
 - Antígeno leucocitário humano classe I;
 - GP IIb/IIIa, GPIa/IIa, GPIb/IX/V, etc.
- Antígeno droga dependente:
 - Quinina, quinidina;
 - Antibióticos como exemplo, penicilina, cefalosporina, vancomicina;
 - Heparina.

Estes antígenos podem ser alvos por um ou todos os tipos de anticorpos abaixo:

- Autoanticorpos;
- Aloanticorpos;
- Isoanticorpos;
- Anticorpos droga-dependentes.

Tabela 1. Expressão antigênica em células de sangue periférico

Antígeno	Eritrócito	Plaqueta	Neutrófilo	Linfócito-B	Linfócito-T	Monócitos
A, B, H	+++	+/+++*	-	-	-	-
I	+++	++	++	-	-	-
R	+++	-	-	-	-	-
K	+++	-	-	-	-	-
HLA	-/(+)	+++	++	+++	+++	+++
Classe I						
HLA	-	-	-/+++§	+++	-/+++§	+++
Classe II						
GPIIb/IIIa	-	+++	(+)	-	-	-
GPIa/IIa	-	++	-	-	++	-
GPIb/IX/V	-	+++	-	-	-	-
CD109	-	(+)/+	-	-	-/++	(+)
CTL-2	-	(+)	++	++	+++	?/-
CD36	-/+	+++	-	-	-	+++
(GPIV)						

+++ , ++ , +: nível de expressão de antígenos em ordem decrescente. (-): sem expressão. (+): fraca expressão. ?: desconhecido.* Plaquetas de 4-6% dos indivíduos tem uma "alta expressão dos antígenos A e/ou B. §: em células ativadas nível de expressão de antígenos em ordem decrescente.

Fonte: Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014;106(2):93–102.⁽⁹⁾

Atualmente, 35 HPAs são expressos em 6 diferentes GPs, GPIIb, GPIIIa, GPIb α , GPIb β , GPIa e *cluster of differentiation* -109 (Tabela 2). A maioria dos HPAs tem se mostrado bi alélicos. A nomenclatura para os HPAs envolve numeração

consecutiva (HPA-1, -2, -3 entre outros) (Tabelas 3 a 6), de acordo com a data da descoberta, sendo o alelo de maior prevalência em cada sistema nomeado de “a” e o de menor prevalência nomeado de “b”).⁽¹⁰⁾ Para os antígenos plaquetários humanos (HPAs) nos quais os anticorpos detectados são específicos para apenas um dos antígenos presentes no sistema correspondente, adota-se a nomenclatura com acréscimo do sufixo 'w' a identificação do antígeno, indicando a referência ao *workshop*. Por exemplo, HPA-8w.⁽⁹⁾

Tabela 2. Antígeno plaquetário humano

Antígenos	Frequência			GP/aminoácido	Gene/nucleotídeo	Transtorno
	Caucasiano (%)	Africano (%)	Asiático (%)			
HPA-1a	(72) a/a	(90)	(100)	GPIIIa/ L33P	ITGB3/ T196C	FNAIT, PPT, RP
HPA-1b	(26) a/b	(10)	(0)			
	(2) b/b					
HPA-2a	(85) a/a	(71)	(95)	GPIb□□ T145M	GPIBA/ C524T	FNAIT, PPT, RP
HPA-2b	(14) a/b	(29)	(5)			
	(2) b/b					
HPA-3a	(37) a/a	(68)	(59,5)	GPIIb/ I843S	ITGA2B/ T2621G	FNAIT, PPT, RP
HPA-3b	(48) a/b	(32)	(40,5)			
	(15) b/b					
HPA-4a	(>99,9) a/a	(100)	(99,5)	GPIIIa/ R143Q	ITGB3/ G526A	FNAIT, PPT, RP
HPA-4b	(<0,1) a/b	(0)	(0,5)			
	(<0,1) b/b					
HPA-5a	(88) a/a	(82)	(98,6)	GPIa/ E505K	ITGA2/ G1648A	FNAIT, PPT, RP
HPA-5b	(20) a/b	(18)	(0,4)			
	(1) b/b					
HPA-15a	(35) a/a	(65)	(53)	CD109/ Y703S	CD109/ A2108C	FNAIT, PPT, RP
HPA-15b	(42) a/b	(35)	(47)			
	(23) b/b					

GP: glicoproteína. CD: *cluster of differentiation*. FNAIT: trombocitopenia aloimune neonatal. PPT: purpura pós-transfusão. RP: refratariedade plaquetária.

Fonte: Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014;106(2):93–102.⁽⁹⁾

Tabela 3. Antígeno plaquetário humano de baixa frequência – glicoproteína IIb

Antígenos	Frequência	GP/aminoácido	Gene/nucleotídeo	Transtorno
HPA-9bw	<1 b/b	GPIIb/V837M	<i>ITGA2B/A2603G</i>	FNAIT
HPA-20bw	<1 b/b	GPIIb/T619M	<i>ITGA2B/C1949T</i>	FNAIT
HPA-22bw	<1 b/b	GPIIb/K164T	<i>ITGA2B/A585C</i>	FNAIT
HPA-24bw	<1 b/b	GPIIb/S472N	<i>ITGA2B/G1508A</i>	FNAIT
HPA-27bw	<1 b/b	GPIIb/L841M	<i>ITGA2B/C2614A</i>	FNAIT

GP: glicoproteína; FNAIT: trombocitopenia aloimune neonatal.

Fonte: Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014;106(2):93–102.⁽⁹⁾

Tabela 4. Antígeno plaquetário humano de baixa frequência – glicoproteína IIIa

Antígenos	Frequência	GP/aminoácido	Gene/nucleotídeo	Transtorno
HPA-6bw	<1 b/b	GPIIIa/R489Q	<i>ITGB3/A1564G</i>	FNAIT
HPA-7bw	<1 b/b	GPIIIa/P407A	<i>ITGB3/G1317C</i>	FNAIT
HPA-8bw	<1 b/b	GPIIIa/R636Q	<i>ITGB3/T2004C</i>	FNAIT
HPA-10bw	<1 b/b	GPIIIa/R62Q	<i>ITGB3/A281G</i>	FNAIT
HPA-11bw	<1 b/b	GPIIIa/R633H	<i>ITGB3/A1996G</i>	FNAIT
HPA-14bw	<1 b/b	GPIIIa/K611del	<i>ITGB3/A1929G</i>	FNAIT
HPA-16bw	<1 b/b	GPIIIa/T140I	<i>ITGB3/C517T</i>	FNAIT
HPA-17bw	<1 b/b	GPIIIa/T195M	<i>ITGB3/C622T</i>	FNAIT
HPA-19bw	<1 b/b	GPIIIa/K137Q	<i>ITGB3/A487C</i>	FNAIT
HPA-21bw	<1 b/b	GPIIIa/E628K	<i>ITGB3/G1960A</i>	FNAIT
HPA-23bw	<1 b/b	GPIIIa/R622W	<i>ITGB3/C1942T</i>	FNAIT
HPA-26bw	<1 b/b	GPIIIa/K580N	<i>ITGB3/G1818T</i>	FNAIT

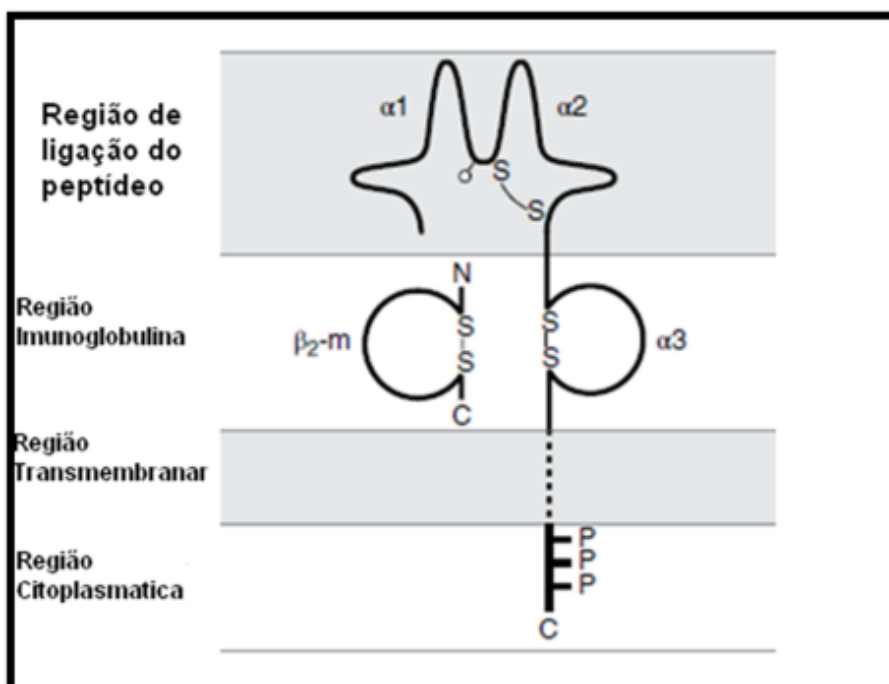
GP: glicoproteína; FNAIT: trombocitopenia aloimune neonatal.

Fonte: Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. Vox Sang. 2014;106(2):93–102.⁽⁹⁾

1.3 Antígenos leucocitário humano

Moléculas do antígeno leucocitário humano classe I, exceto HLA classe II, são expressos nas plaquetas. Antígenos classe I A, B e em um grau menor C, são expressos na membrana plaquetária. As plaquetas são a principal fonte de HLA classe I presente no sangue. Elas expressam, em média, 100.000 moléculas de HLA classe I (variando de 50.000 a 180.000 moléculas por plaquetas).⁽²⁾ A imunização contra HLA classe I é a principal causa da refratariedade plaquetária (RP). Em alguns casos de trombocitopenia aloimune do feto recém-nascido são provavelmente causadas por anticorpos HLA materno, que reagem contra as plaquetas do feto e recém-nascido. Contudo, afirmar que a presença de anticorpos HLA é o responsável pela doença é difícil, pois cerca de 30% das mulheres múltiparas são aloimunizadas contra HLA classe I e a grande maioria dão à luz a recém-nascido não trombocitopênico.⁽⁹⁾

Os genes codificantes do HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6. Os genes do HLA classe I estão definidos de acordo com suas estruturas, expressões e funções. Os genes codificam uma cadeia pesada (α) de aproximadamente 43kd que está ligada a uma cadeia não polimórfica de 12kd conhecida como β 2-microglobulina, o qual é codificada por um gene no cromossomo 15. A porção extracelular possui 3 domínios de cadeia pesada (α 1, α 2 e α 3) de aproximadamente 90 aminoácidos (Figura 2). As cadeias α 1 e α 2 são as cadeias mais polimórficas do domínio e elas formam um sulco de ligação aos peptídeos. Podendo acomodar um peptídeo antigênico de aproximadamente oito a nove aminoácidos.⁽¹⁰⁾



Fonte: Fontão-Wendel R, Silva LC, Saviolo CB, Primavera B, Wendel S. Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. Vox Sang. 2007;93(3):241–9.⁽²⁾

Figura 2. Molécula de antígenos leucocitário humano de classe I

1.4 Refratariedade plaquetária

As causas da RP após transfusão incluem uma variedade de fatores clínicos como febre, sepses e esplenomegalia ou outros relacionados ao serviço de hemoterapia. O desenvolvimento de anticorpos específicos também pode induzir RP após a transfusão, especialmente em pacientes que recebem múltiplas transfusões de plaquetas. Os fatores imunes podem estar presentes em aproximadamente 20% dos pacientes refratários a transfusão. O desenvolvimento de anticorpos dirigidos aos antígenos HLA é particularmente comum, tendo uma frequência de 7 a 55% de desenvolvimento após uma transfusão de plaqueta, esta variável depende do tipo de estudo, população de paciente estudado e ao número e o tipo de transfusão.⁽¹²⁾

Anticorpos dirigidos aos antígenos HPAs também podem gerar uma resposta a transfusão de plaquetas. Estes antígenos parecem ser menos imunogênicos do que os antígenos HLA, resultando em uma frequência menor de aloimunização, tendo uma frequência de 0 a 2%, dependendo da população estudada. Os índices são maiores na presença de anticorpos HLA. Nestes casos, representa um aumento de 9 a 25% dos pacientes.⁽¹²⁾

1.4.1 Definição

A RP é definida como uma resposta deficitária no incremento plaquetário pós transfusional após duas ou mais transfusões consecutivas com plaquetas recentes (≤ 48 horas) e grupo sanguíneo compatível. A RP é causada pela diminuição da sobrevivência das plaquetas transfundidas na circulação do receptor e estas causas podem ser agrupadas em causas imunes e não imunes.^(13,14)

O percentual de plaquetas recuperadas (PPR) após transfusão é a percentagem de plaquetas transfundidas na circulação no momento em que a contagem é determinada e calculada pela seguinte fórmula (Figura 3):

$$PPR = \frac{(\text{Incremento Plaquetario em uL}) \times (\text{Peso em Kg}) \times (\text{Volume de sangue de 75mL}) \times 100\%}{(\text{Contagem de plaqueta do produto por uL}) \times (\text{Volume do produto em mL})}$$

PPR: percentual de plaquetas recuperadas.
 Fonte: Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. Transfus Med Rev. 2000;14(2):180-96.⁽¹⁴⁾

Figura 3. Cálculo de plaquetas recuperadas

A contagem das plaquetas pós-transfusão dependerá da contagem plaquetária pré-transfusão, dose da plaqueta transfundida e outros fatores como técnicos e clínicos. Os valores 60 minutos pós-transfusão deverão ser superiores a $>20\%$ pré-transfusão.⁽¹⁴⁾

A contagem corrigida de incremento (CCI) é o cálculo mais utilizado na investigação de RP. Esse cálculo é realizado utilizando-se a contagem de plaquetas pré-transfusão e a contagem de 1 ou 24 horas pós-transfusão, o número de plaquetas infundidas e a superfície corporal do paciente como fator de correção, segundo a fórmula descrita na figura 4:

$$CCI = \frac{IP \times SC \times 10^{11}}{n}$$

CCI: contagem corrigida do incremento; IP: incremento na contagem de plaquetas; SC: superfície corpórea; N: número de plaquetas transfundidas.

Fonte: Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. Transfus Med Rev. 2000;14(2):180–96.⁽¹⁴⁾

Figura 4. Cálculo contagem corrigida do incremento

O diagnóstico de refratariedade pode ser definido por (CCI-1h) menor que plaquetas por μL ou (CCI-24h) menor do que 2.500 plaquetas por μL . A necessidade de dois resultados consecutivos é fundamentada na diversidade de fatores clínicos, técnicos ou farmacológicos que podem afetar o aumento das plaquetas.⁽¹²⁻¹⁴⁾

1.4.2 Refratariedade plaquetária por causas não imune

As causas não imunes são as mais frequentes. Em estudos observacionais realizados antes da introdução dos métodos de leucorredução, mostraram que 44% das transfusões de plaquetas não produziram resposta adequada e em 88% destes casos, a influência de fatores não imunes foi observada.⁽¹⁵⁾ As características das unidades plaquetárias a serem transfundidas, como a dose, a fonte (aférese ou *pool*), compatibilidade de grupo sanguíneo entre doador-receptor e armazenamento, são fatores que podem afetar ou aumentar a sobrevivência das plaquetas transfundidas.⁽¹⁵⁾

As causas mais comuns de refratariedade plaquetária não imune geralmente estão relacionadas ao consumo excessivo das plaquetas transfundidas, como observado em condições com sangramentos graves, perdas de plaquetas devido a sequestro (por exemplo, esplenomegalia e/ou hepatomegalia) e consumo plaquetário secundário a infecções. Outra causa clínica também relatada é o consumo acelerado de plaquetas transfundidas em situações como febre e o uso de certos medicamentos, como a anfotericina B. O tratamento da RP causada por motivos não imunes envolve abordar diretamente a causa subjacente. Uma vez que a causa é tratada, a eficácia das transfusões de plaquetas é restaurada.^(1,2,14,16)

1.4.3 Refratariedade plaquetária por causas imunes

Aloanticorpos para HLA e HPA podem causar um estado refratário em que as plaquetas transfundidas são rapidamente eliminadas da circulação do receptor devido a ligação antígeno anticorpo. A leucorredução das plaquetas transfundidas diminui consideravelmente a taxa de aloimunização, contudo, o risco de ocorrer a aloimunização leucorreduzidas é de aproximadamente 18%.^(17,18)

A causa imune mais comum na ocorrência de RP é a produção de anticorpos dirigidos a antígenos HLA. A presença de destes anticorpos podem ser devido a sensibilizações anteriores ou por gestações, transfusões, ou transplantes de órgãos e tecidos. Anticorpos dirigidos a antígenos HPA também podem ser gerados em resposta a transfusão de plaquetas incompatíveis. Esses antígenos parecem ser menos imunogênicos que os antígenos HLA, com uma frequência muito menor de aloimunização (0-2%). Em indivíduos com anti-HLA, a frequência de anti-HPA aumenta entre 9 e 25%.⁽¹⁵⁾

O mecanismo imunológico que leva à aloimunização para os componentes sanguíneos ainda não está completamente esclarecido, mas sabe-se que está relacionado à composição celular transfundida e ao estado imunológico do paciente. Em essência, dois mecanismos principais foram identificados como desencadeadores da resposta imunológica.^(18,19)

- Reconhecimento direto, no qual os linfócitos T auxiliares do paciente interagem diretamente com moléculas HLA Classe II presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC – *antigen presenting cells*) do doador. As células T auxiliares do paciente, após interação com as APCs estimulam os linfócitos B do paciente a produzir anticorpos contra estes antígenos. Portanto, para que ocorra este mecanismo, um dos critérios mais relevantes é a presença de células (ou seja, leucócitos) com moléculas HLA classe II no componente transfundido.^(2,18,19)

- Reconhecimento indireto, no qual células transfundidas são fagocitadas e processadas pelas APCs do paciente, que por sua vez, irão apresentar estes antígenos para as suas próprias células T auxiliares, para então induzir a produção de anticorpos. Este mecanismo necessita da colaboração das APCs do receptor, diferentemente do reconhecimento direto, quando a apresentação é feita diretamente pelas células do doador.^(2,18,19)

1.5 Investigação laboratorial

A avaliação laboratorial da refratariedade plaquetária pode ser feita por meio de testes sorológicos e genotipagem. A maioria dos testes para detectar anticorpos antiplaquetários é demorada, exigente e não está amplamente disponível em laboratórios de rotina.^(11,20,21)

O teste ideal para anticorpos plaquetários requer uso de vários métodos. O teste de imunofluorescência plaquetária (PIFT – *platelet immunofluorescence test*) por citometria de fluxo (FC – *flow cytometry*) é altamente sensível, mas é incapaz de distinguir entre anticorpos HPA e HLA classe I. Apesar dessa limitação, continua sendo amplamente utilizado como um ensaio de células integras, capazes de detectar uma ampla especificidade de anticorpos e é especialmente útil na detecção de autoanticorpos e aloanticorpos.

Ensaaios que usam GPs purificados ou capturados, como o Imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais (MAIPA – *monoclonal antibody immobilization of platelet antigen*), foram desenvolvidos para a detecção e identificação de anticorpos HPA e HLA. O teste MAIPA, amplamente utilizado, captura GPs específicas utilizando anticorpos monoclonais (MoAbs) e pode ser usado para analisar misturas complexas de anticorpos plaquetários em soros de pacientes. O teste MAIPA requer conhecimento do operador para garantir a máxima sensibilidade e especificidade e uma seleção de células conhecidas é fundamental para a realização do ensaio. O uso de MoAbs que competem com a ligação dos anticorpos HPA do paciente, plaquetas heterozigotas para os antígenos HPA ou de doadores que têm uma baixa expressão de antígenos específicos, por exemplo HPA-15, pode resultar em falha na detecção de aloanticorpos clinicamente significativos. Além disso, evidências recentes sugerem que a conformação da integrina é um fator importante na sensibilidade do ensaio. Recentemente, foram desenvolvidos ensaios de captura de antígeno monoclonal semelhantes ao MAIPA, que utilizam esferas individuais revestidas com MoAbs específicos para GP utilizando o equipamento Luminex. Esses ensaios são altamente sensíveis e permitem a detecção simultânea de anticorpos contra múltiplos antígenos HPAs e HLA.^(10,20,21)

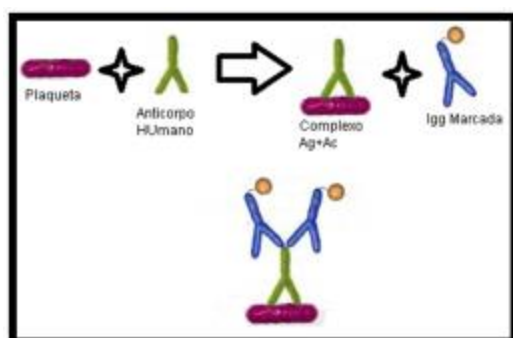
1.5.1 Imunofluorescência Indireta plaquetária

O PIFT foi inicialmente descrito por von dem Borne et al.⁽²²⁾ Trata-se de um teste que pode ser realizado para três finalidades:

- Detectar anticorpos plaquetários ligados a superfície das plaquetas (teste direto);
- Detectar anticorpos plaquetários presentes no soro dos pacientes (teste indireto);
- Identificação de doadores de plaquetas compatíveis (prova de compatibilidade plaquetária).

Nesta técnica, o anticorpo ligado é detectado utilizando um anticorpo contra imunoglobulina humana com um marcador fluorescente, como isotiocianato de fluoresceína (FITC – *fluorescein isothiocyanate*) ou R-ficoeritrina (PE – *R-phycoerythrin*) (Figura 5).

No final do período de incubação, as células são transcorridas através do feixe de laser do citômetro de fluxo para identificar as diferentes populações de células com base em sua morfologia/ granularidade e fluorescência. Normalmente, soros de teste com valores medianos de fluorescência maiores que a média de +3 desvios padrão (DP) dos controles negativos são considerados positivos.^(10,13,21)



Fonte: Bub CB, Gonzalez AC, Barjas-Castro ML, Sousa LC, Monte SJ, Castro V. The use of a potential novel tool in virtual crossmatching for platelet transfusion in platelet refractoriness. Vox Sang. 2016;110(1):70–8.⁽¹¹⁾

Figura 5. Esquema da técnica do teste de imunofluorescência plaquetária

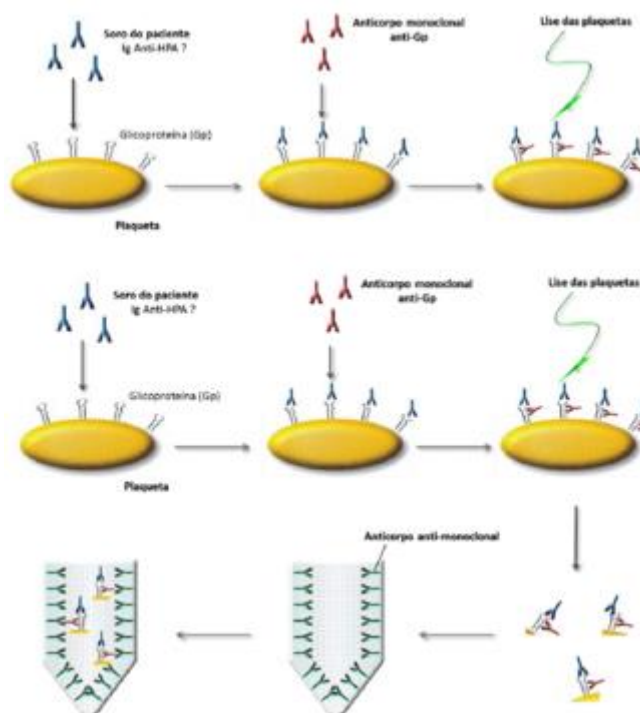
1.5.2 Imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

O método MAIPA foi inicialmente descrito em 1987 por Kiefel.⁽²³⁾ Este baseia-se na identificação de anticorpos plaquetários através da fixação das GP plaquetárias na microplaca de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) com MoAbs específicos.⁽¹¹⁾ O MAIPA provou ser uma ferramenta confiável e útil na imunologia plaquetária. Após a utilização de antígenos plaquetários mais importantes das GPs plaquetárias IIb / IIIa, Ia / IIa, Ib / IX, os anticorpos correspondentes podem ser facilmente detectados com esta técnica.⁽²³⁾

O teste “*gold standard*” para detectar e diferenciar anticorpos plaquetários é o MAIPA. O ensaio foi a primeira técnica a permitir a ligação do anticorpo ao antígeno em sua conformação nativa e mostrou ser mais sensível e com menos resultados falso-positivos em comparação com a maioria das outras técnicas.

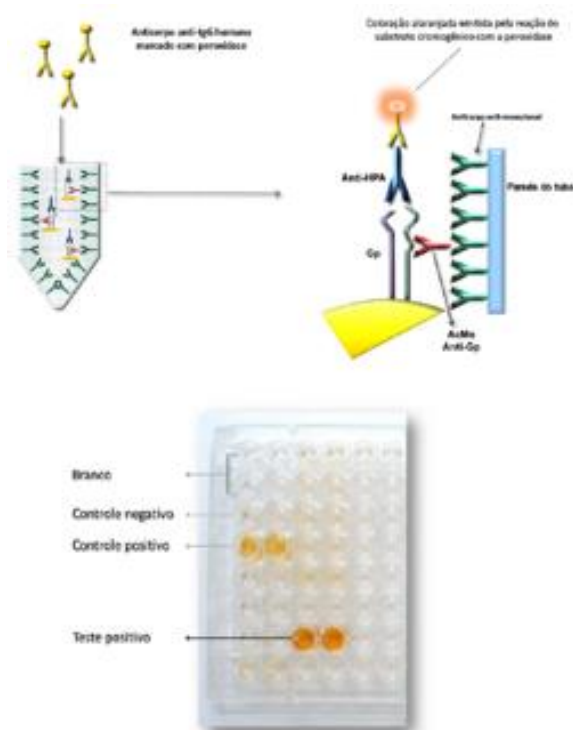
Assim, o MAIPA tem sido amplamente utilizado para o diagnóstico de destruição de plaquetas mediada por imunidade. No entanto, a principal desvantagem do MAIPA é a exigência de MoAbs específicos para detecções de anticorpos humanos e a necessidade de uma grande quantidade de plaquetas fenótipo conhecido para seu uso.⁽²⁴⁾

Em resumo, plaquetas com perfil antigênico conhecido são incubadas com o soro teste e com MoAbs contra as GP a serem estudadas. Após esta incubação, as plaquetas são lisadas. Estes lisados são incubados em uma microplaca previamente sensibilizada com MoAbs dirigidos ao complexo GP-anticorpo formado na etapa anterior. Após lavagem da microplaca, é feita uma nova incubação com uma imunoglobulina anti-humano marcada com uma peroxidase. A revelação é feita após a adição de um substrato cromogênico, sendo assim formando-se uma coloração alaranjada quando houver a existência de anticorpos antiplaquetas (Figura 6). A leitura é realizada por absorbância em espectrofotômetro de microplaca (Figura 7).



Fonte: Bub CB, Gonçalves AC, Barjas-Castro ML, Sousa LC, Monte SJ, Castro V. The use of a potential novel tool in virtual crossmatching for platelet transfusion in platelet refractoriness. Vox Sang. 2016;110(1):70–8.⁽¹¹⁾

Figura 6. Esquema da técnica da imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais



Fonte: Bub CB, Gonçalves AC, Barjas-Castro ML, Sousa LC, Monte SJ, Castro V. The use of a potential novel tool in virtual crossmatching for platelet transfusion in platelet refractoriness. Vox Sang. 2016;110(1):70–8.⁽¹¹⁾

Figura 7. Esquema da técnica de leitura da imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

1.5.3 Plataforma Luminex

A plataforma Luminex trouxe uma nova tecnologia que oferece os benefícios do ELISA, mas também permite maior produtividade, maior flexibilidade, volume de amostra reduzido e custo mais baixo e fluxo de trabalho semelhante. A tecnologia Luminex xMAP é uma plataforma de matriz de microesferas que permite ensaios únicos e múltiplos.^(25,26) O teste utiliza microesferas que apresentam em sua superfície os antígenos HLA e HPA manufaturados. Estas microesferas são incubadas com osoro teste e após a incubação o complexo é lavado e incubado novamente com umanti anticorpo anti-humano marcado com uma fluorescência. A leitura é feita pelo equipamento Luminex. Trata-se de uma plataforma de alto desempenho (analisa várias especificidades de anticorpos ao mesmo tempo), porém, é uma tecnologia de alto custo e não tão acessível para vários centros.^(11,25,26)

1.6 Objetivos

1. Validar a técnica de imunofluorescência plaquetária;
2. Avaliar a eficiência de cada metodologia laboratorial empregada na pesquisa e identificação de anticorpos antiplaquetas em pacientes com refratariedade plaquetária imune;
3. Comparar a eficiência das metodologias imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais, imunofluorescência plaquetária e ensaio de esferas Luminex entre si;
4. Definir uma estratégia através do uso das metodologias (imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais, imunofluorescência plaquetária e ensaio de esferas Luminex para a abordagem dos pacientes com suspeita clínica de refratariedade transfusional imune.

2 MÉTODOS

2.1 Casuística

Neste estudo comparativo de metodologias para detecção de anticorpos contra antígenos leucocitários humanos (HLA) e antígenos plaquetários humanos (HPA), avaliamos uma casuística de 100 pacientes.

2.1.1 Amostras de sangue de pacientes com refratariedade plaquetária

Pacientes com suspeita clínica com RP e atendidos no Hospital Israelita Albert Einstein no período de maio de 2014 a dezembro de 2020 e que possuam amostras de soro armazenadas na soroteca do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, serão incluídas de forma retrospectiva e continua neste estudo.

As amostras foram utilizadas para a validação da técnica PIFT, que é descrita conforme item 2.2.4.

2.1.2 Informações clínicas sobre os pacientes com refratariedade plaquetária

Os dados clínicos dos pacientes cujo soro foi utilizado para a validação da técnica de PIFT, serão consultados no banco de dados do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular. Esse banco de informações está registrado no sistema Progessa do Banco de Sangue. Os dados clínicos a serem utilizados envolvem: sexo, idade, diagnóstico e resultado laboratorial referente a pesquisa de anticorpo plaquetário referentes a metodologia de MAIPA. Tais dados, foram extraídos por um funcionário do banco de sangue e entregues de forma anonimizada ao pesquisador e com as informações em “bloco” dos pacientes. Com esses dados obtidos, os pacientes foram classificados em grupos, de acordo com a etiologia da refratariedade conforme descrito a seguir.

2.1.3 Classificação etiológica da refratariedade plaquetária

O grupo com RP confirmada, considerando as características clínicas e resultados laboratoriais de cada paciente pode ser visualizado de acordo com a figura 8. Após essa análise, cada paciente foi subclassificado quanto a etiologia de refratariedade plaquetária:

- Refratariedade plaquetária imune - presença de anticorpos HLA e/ou HPA;
- Refratariedade plaquetária não imune – presença de uma ou mais características clínicas: esplenomegalia, febre, coagulação intravascular disseminada, uso de medicamentos;
- Refratariedade plaquetária não imune - apresentando tanto causas imunes e não imunes.

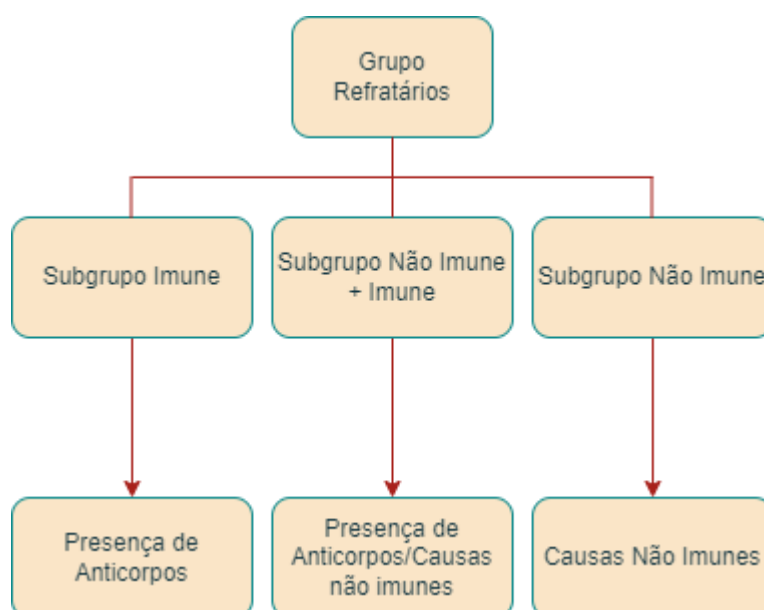


Figura 8. Apresentação esquemática da classificação etiológica dos pacientes com refratariedade plaquetária

2.2 Validação da técnica de imunofluorescência plaquetária

As amostras de soros foram examinadas para detecção de anticorpos plaquetários utilizando o método de FC - PIFT. Para padronização interna do método, foram analisados soros provenientes de 20 doadores de sangue do sexo masculino, sem

histórico prévio de transfusões, estabelecendo-se um padrão de fluorescência negativa. O teste foi conduzido utilizando plaquetas adquiridas de três doadores do sexo masculino, tipagem sanguínea do grupo O, sem histórico de transfusional. As plaquetas foram lavadas, ressuspensas em PBS com ácido etilenodiaminotetra-acético 0,1% (EDTA) na concentração de 100.000 por mL. Foram incubadas 50µL da plaqueta com 50µL do soro teste/controle por 30 minutos a 37°C. Controles negativos e positivos foram incluídos em cada ensaio. Após três lavagens consecutivas, os testes foram incubados por 30 minutos com anti-imunoglobulina G humana (AffiniPure Fab' Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc Fragment Specific – Jackson Immuno Research, Baltimore, EUA) marcada com a fluorescência FITC diluído 80 vezes. As amostras foram adquiridas e analisadas após uma segunda lavagem em um citômetro de fluxo. Para aquisição e análise de dados, foram considerados 10.000 eventos. O teste foi considerado positivo se o *gate* obtido fosse maior ou igual a dois desvios-padrão acima do controle negativo e inconclusivo se estivesse entre um e dois desvios-padrão acima do controle negativo.

2.2.1 Comparação dos resultados obtidos através da técnica de imunofluorescência plaquetária com os resultados prévios reportados por ensaio de esferas Luminex e imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

Os resultados obtidos com a técnica de pesquisa de anticorpos plaquetários do PIFT foram comparados com aqueles obtidos previamente pelos métodos ensaio de esferas Luminex e MAIPA.

Neste estudo, a técnica do MAIPA foi adotada como a técnica de referência. Com base nessa escolha, foram calculados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo.

2.2.2 Detecção de anticorpos plaquetários por imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

O teste MAIPA foi realizado de acordo com os procedimentos descritos por previamente por Kiefel et al.⁽²⁷⁾ Resumidamente, 30µL da suspensão da

plaqueta (1.000.000 por μL) foi incubado com 40 μL do soro do paciente e com 10 μL do anticorpo monoclonal contra a GP. Após 3 lavagens com *Dulbecco's phosphate buffered saline* (D-PBS) (Life Technologies, Suíça) foi incubado adicionado um tampão para a solubilização do imuno complexo formado e incubado a 4°C *overnight*. Após a incubação o imuno complexo foi colocado em uma microplaca contendo Goat Anti-Mouse IgG. Anticorpos humanos ligada as Gp são detectadas através de uma reação de ELISA pela atividade da *horseradish peroxidase* (HRP) e O-Phenylenediamine (OPD). Todos os testes possuíam controles positivos e negativos. O *cutoff* dos valores positivos foi definido pela média de 10 amostras controles negativos + 3DP (>0.2).

Os MoAbs contra CD41 (GPIIb, Clone P2, Beckman Coulter, Indiana, United States), CD42a (GPIX, clone SZ1, Beckman Coulter, Atlanta, USA), CD49b (GPIIa, Clone Gi9, Beckman Coulter, Atlanta, USA), CD109 (Clone TEA 2/16, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), Beta2 microglobulina (MHC-I, clone B1G6, Beckman Coulter, Atlanta, USA) foram utilizados para captura dos antígenos. Anticorpos Goat Anti-Mouse IgG, Fcy (Jackson ImmunoResearch®, West Grove, PA, USA) e Peroxidase AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch®, West Grove, PA, USA) foram utilizados para fixação e revelação, apêndice 1.

Plaquetas de doadores de plaquetas por aférese com fenótipo conhecido para HPA e HLA foram isoladas por diferentes centrifugações e armazenadas à 4°C por até 4 meses.

2.2.3 Detecção de anticorpos por imunofluorescência plaquetária

O teste PIFT foi realizado de acordo com o procedimento descrito por von dem Borne.⁽²²⁾ Resumidamente, uma suspensão de plaquetas (100.000 por μL) foi incubada com o soro do paciente a 37°C por 30 minutos. Após três lavagens contendo PBS-0,1%EDTA-0,22%BSA, anti-IgG Humano marcado com FITC, foi incubada na reação em temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Após 2 lavagens com PBS/0,15%EDTA/0,22%BSA, as plaquetas foram ressuspensas e analisadas no citômetro de fluxo (Navios EX, Beckman Coulter, Indianapolis, United States). Para aquisição e análise, 10.000 eventos foram adquiridos de acordo com as características de *forward and sideways light*. Para a análise, um gráfico de intensidade de fluorescência

foi plotado conforme figura 9.

Anticorpo monoclonal contra IgG humano [F(ab')₂-Goat anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, FITC (Life Technologies, Suíça)] apêndice 1. O *cutoff* dos valores positivos foi definido pela média de fluorescência de 10 amostras controles negativos +3DP (6,98%).

Plaquetas de doadores de plaquetas por aférese com fenótipo conhecido para HPA e HLA foram isoladas por diferentes centrifugações e armazenadas à 4°C por até 3 dias.

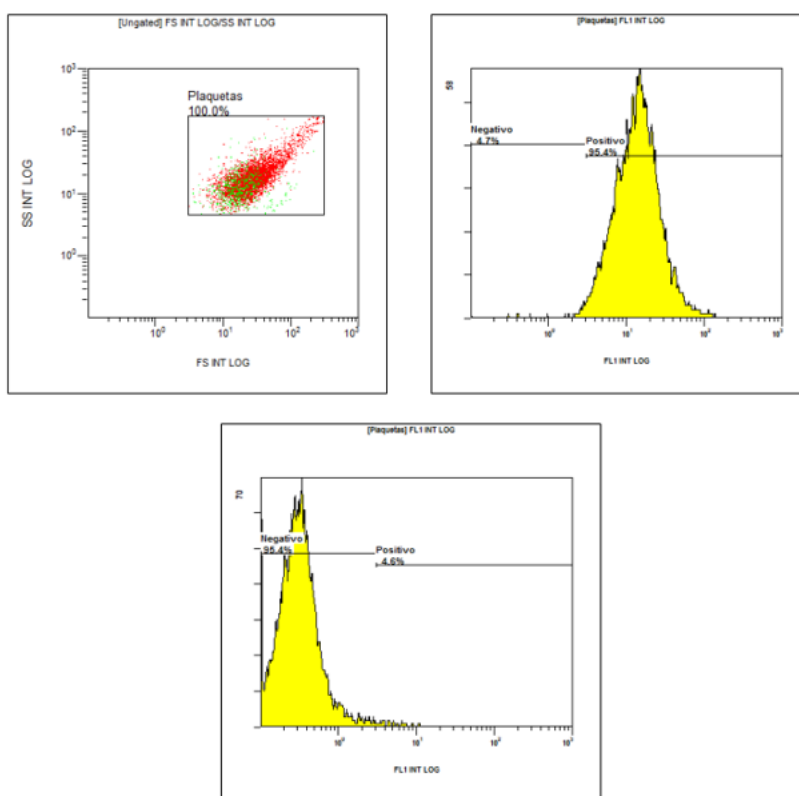


Figura 9. Detecção de aloanticorpos por teste de imunofluorescência plaquetária

2.2.4 Detecção de anticorpos por ensaio de esferas Luminex

O teste de detecção e identificação para anticorpos anti-HLA classe I e anti-HPA (HPA-1a, HPA-1b, HPA-2a, HPA-2b, HPA-3a, HPA-3b, HPA-4a, HPA-4b, HPA-5a, HPA-5b e GPIV) foram realizados pelo kit Pak-Lx Assay (Immucor, Norcross, GA, United States). O teste foi realizado de acordo com o procedimento informado pelo fabricante. Após a reação, a intensidade média de fluorescência (MFI – *average*

fluorescence intensity) de cada *bead* presente no teste foi mensurada em um equipamento Luminex 200 (Luminex, Austin, Texas, United States) apêndice 1. Para aquisição e análise, 60 eventos de cada *bead* utilizada na reação foi analisada e interpretado pelo programa *MATCH IT! Platelet Antibody Software* (Immucor, Norcross, GA, United States).

2.2.5 Detecção de anticorpos antígeno leucocitário humano classe-I

O teste de detecção de anticorpo anti-HLA classe I foram realizados pelo kit Lifecodes LifeScreen *Deluxe* (DLX) (Immucor, Norcross, GA, United States). O teste foi realizado de acordo com o procedimento informado pelo fabricante. Após a reação, a MFI de cada *bead* presente no teste foi mensurada num equipamento Luminex 200 (Luminex, Austin, Texas, United States). Para aquisição e análise 60 eventos de cada *bead* utilizada na reação foi analisada e interpretada pelo programa *MATCH IT! Antibody Software* (Immucor, Norcross, GA, United States).

2.3 Aspectos éticos

O estudo não realizou qualquer intervenção (coleta, entrevista, tratamento).

O banco de dados foi fornecido pelo funcionário do banco de sangue (não participante dessa pesquisa), que entregou de forma anonimizada ao pesquisador.

Durante todo o transcorrer do estudo, incluindo sua divulgação, a preservação da privacidade e identidade dos sujeitos de pesquisa foi uma prioridade.

Dessa forma, a isenção da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (CAAE: 50997721.0.0000.0071, SGPP: 4623-21), anexo 1.

2.4 Análise estatística

A avaliação dos métodos com relação aos padrões foi feita por medidas diagnósticas de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor

preditivo negativo, prevalência e proporção de concordância. As medidas foram todas acompanhadas em intervalos de 95% de confiança. As metodologias foram comparadas quanto à concordância em relação ao método padrão por meio do teste para proporção pareada de McNemar.

3 RESULTADOS

Ao todo foram analisados 100 soros de pacientes com suspeita de aloimunização plaquetária, sendo utilizadas as metodologias de ensaio de esferas Luminex, LifeScreen Deluxe, PIFT e MAIPA em todas as amostras do estudo.

3.1 Características gerais da população

As características gerais da população de estudo estão descritas na tabela 7.

Tabela 7. Características gerais da população de estudo

Características	N
Gênero, n (%)	
Masculino	71(71)
Feminino	29 (29)
Idade	
Média	51 anos
Mediana	47 (1 -91) anos
Classificação, n (%)	
Refratariedade	82
Trombocitopenia	17
Purpura	1
Diagnóstico, n (%)	
Hematológica	63
Não hematológica	37

Na população estudada, o gênero masculino foi 29 amostras e no gênero feminino 71 amostras. A média de idade foi 51 anos com variação entre 1 – 91 anos (mediana de 47 anos). Foram observadas 82 amostras para refratariedade plaquetária, 17 amostras em trombocitopenia aloimune neonatal e 1 caso para purpura pós-transfusional. Em relação ao diagnóstico, 63 amostras eram de pacientes hematológicos e 37 amostras para pacientes não hematológicos.

Nas 100 amostras estudadas, foram encontradas os seguintes anticorpos: anti-HLA (28 – 24,78%), anti-HPA1a (13 – 11,5%), anti-HPA1b (2 – 1,77%), anti-HPA2b (3 – 2,65%), anti-HPA3a (1 – 0,88%), anti-HPA3b (1 – 0,88%), anti-HPA5a (1 – 0,88%), anti-HPA5b (5 – 4,42%), anti-IlbIIla (1 – 0,88%), anti-Ialla (1 – 0,88%) e

negativo para anticorpos antiplaquetas (55 – 48,67%). Não foram encontradas especificidades dirigidas aos antígenos HPA-2a, HPA-4a, HPA-4b, HPA-15a, HPA-15b e glicoproteína IV.

3.2 Análises considerando imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais como referência para antígenos Plaquetário Humano

Considerando Ensaio de esferas Luminex (Pak-Lx) em relação à MAIPA como padrão (Tabela 8), observou-se uma sensibilidade estimada de 91%, especificidade estimada em 96%, valor preditivo positivo de 95% e preditivo negativo de 93%. A concordância estimada foi 94%.

Tabela 8. Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de ensaio de esferas Luminex em relação a imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

Ensaio	MAIPA		Total
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Pak-Lx			
Positivo	40 (40)	2 (2)	42
Negativo	4 (4)	54 (54)	58
Total	44	56	100

MAIPA: imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais; Pak-Lx: ensaio de esferas Luminex.

Considerando PIFT em relação à MAIPA como padrão (Tabela 9), observou-se uma sensibilidade estimada de 95%, especificidade estimada em 82%, valor preditivo positivo de 81% e preditivo negativo de 96%. A concordância estimada foi 88%.

Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos pelas metodologias de imunofluorescência plaquetária em relação a imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

Ensaio	MAIPA		Total
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
PIFT			
Positivo	42 (42)	10 (10)	52
Negativo	2 (2)	46 (46)	48
Total	44	56	100

MAIPA: imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais; PIFT: imunofluorescência plaquetária.

A comparação dos métodos Pak-Lx e PIFT quanto à concordância em relação à MAIPA foi feita por teste de McNemar (Tabela 10), sendo o valor-p obtido de 0,114, ou seja, não há evidências de diferenças entre os métodos quanto à concordância com MAIPA.

Tabela 10. Medidas diagnósticas calculadas para imunofluorescência plaquetária e Ensaio de esferas Luminex em relação à imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais

Medida	Pak % / (IC)	PIFT % / (IC)
Prevalência	44 (34; 54)	44 (34; 54)
Sensibilidade	91 (78; 97)	95 (85; 99)
Especificidade	96 (88; 1.00)	82 (70; 91)
Valor preditivo positivo	95 (84; 99)	81 (67; 90)
Valor preditivo negativo	93 (83; 98)	96 (86; 99)
Proporção de concordância [§]	94 (87; 98)	88 (80; 94)

Dados descritos em: estimativa (intervalo de confiança – IC de 95%). [§]Concordância entre Pak-Lx *versus* PIFT com valor-p=0,114. Pak-Lx: ensaio de esferas Luminex. PIFT: imunofluorescência plaquetária.

3.3 Análise considerando LifeScreen Deluxe como referência para antígenos leucocitário humano

Considerando Pak-Lx em relação à DLX como padrão (Tabela 11), observou-se uma sensibilidade estimada de 72%, especificidade estimada em 77%, valor preditivo positivo de 67% e preditivo negativo de 81%. A concordância estimada foi 75%.

Tabela 11. Comparação entre metodologias ensaio de esferas Luminex em relação à LifeScreen Deluxe

	DLX		Total
	Positivo	Negativo	
Pak-Lx			
Positivo	28	14	42
Negativo	11	47	58
Total	39	61	100

Pak-Lx: ensaio de esferas Luminex; DLX: LifeScreen Deluxe.

Considerando PIFT em relação à DLX como padrão (Tabela 12), observou-se uma sensibilidade estimada de 92%, especificidade estimada em 74%, valor preditivo positivo de 69% e preditivo negativo de 94%. A concordância estimada foi 81%.

Tabela 12. Comparação entre metodologias imunofluorescência plaquetária em relação à LifeScreen *Deluxe*

	DLX		Total
	Positivo	Negativo	
PIFT			
Positivo	36	16	52
Negativo	3	45	48
Total	39	61	100

PIFT: imunofluorescência plaquetária. DLX: LifeScreen *Deluxe*.

A sensibilidade e especificidade de MAIPA em relação à DLX (Tabela 13), foram de 77%, valor preditivo positivo de 68% e valor preditivo negativo de 84%. A concordância estimada foi de 77%.

Tabela 13. Comparação entre metodologias Imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais em relação à LifeScreen *Deluxe*

	DLX		Total
	Positivo	Negativo	
MAIPA			
Positivo	30	14	44
Negativo	9	47	56
Total	39	61	100

MAIPA: imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais; DLX: LifeScreen *Deluxe*.

A comparação dos métodos Pak-Lx, PIFT e MAIPA (Tabela 14) quanto à concordância em relação à DLX foi feita por testes de McNemar, para os quais observou-se valores p 0,114 (Pak x PIFT), 0,683 (Pak x MAIPA) e 0,387 (PIFT x MAIPA), ou seja, não há evidências de diferenças entre os métodos quanto à concordância com DLX.

Tabela 14. Medidas diagnósticas calculadas para imunofluorescência plaquetária em relação ao LifeScreen *Deluxe*

Medidas	Pak % / (IC)	PIFT % / (IC)	MAIPA % / (IC)
Prevalência	39 (29; 49)	39 (29; 49)	39 (29; 49)
Sensibilidade	72 (55; 85)	92 (79; 98)	77 (61; 89)
Especificidade	77 (65; 87)	74 (61; 84)	77 (65; 87)
Valor preditivo positivo	67 (50; 80)	69 (55; 81)	68 (52; 81)
Valor preditivo negativo	81 (69; 90)	94 (83; 99)	84 (72; 92)
Taxa de concordância ^{§§}	75 (65; 83)	81 (72; 88)	77 (68; 85)

^{§§}Concordância entre Pak-Lx *versus* PIFT valor-p=0,114; Pak-Lx *versus* MAIPA valor-p=0,683, e PIFT *versus* MAIPA valor-p=0,387. Dados descritos: estimativa (IC 95%). Pak-Lx: ensaio de esferas Luminex. PIFT: imunofluorescência plaquetária. MAIPA: imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais.

4 DISCUSSÃO

A análise comparativa das metodologias Pak-Lx, PIFT e MAIPA em relação ao padrão-ouro, seja ele MAIPA ou LifeScreen *Deluxe*, mostra esclarecimentos importantes sobre o desempenho dessas técnicas na detecção de anticorpos contra antígenos leucocitários humanos e antígenos plaquetários humanos envolvidos em refratariedade plaquetária, purpura pós transfusional e trombocitopenia aloimune neonatal.

Avanços ocorreram nas últimas décadas na detecção de anticorpos plaquetários. Com o surgimento de anticorpos anti-IgG Humano marcados, MoAb direcionadas a GPs específicas e GPs recombinantes contribuíram para na pesquisa sorologia plaquetária.⁽²⁸⁾

Atualmente, laboratórios de referência plaquetária ao redor do mundo utilizam um ou mais métodos para a identificação de anticorpos plaquetários. A maioria utiliza o MAIPA combinado com ELISA modificado ou em conjunto com ensaios comerciais baseado no Luminex. Comparação entre os ensaios comerciais *versus* MAIPA apontam 6% de resultados falso-negativo no Pak-Lx e 4,1% de resultados falso-positivo.⁽²⁸⁻³⁰⁾

O MAIPA é considerado “padrão ouro” para a detecção de anticorpos HPA.⁽³¹⁾ O MAIPA é uma técnica trabalhosa e a maioria dos reagentes são produzidos *in-house*.⁽³²⁾ Para a realização do MAIPA, o laboratório necessita utilizar plaquetas com antígenos HPAs conhecidos. Contudo, nem todos os laboratórios possuem infraestrutura para determinar através de genotipagem ou fenotipagem, alelos HPA para compor um painel. A escolha dos MoAbs utilizados nas sensibilizações das GPs é de extrema importância, pois existem inúmeros clones conhecidos para as GP analisadas. A escolha de clones inadequados pode interferir na sensibilidade e especificidade da técnica. Assim, tanto a padronização correta da técnica e a frequência da realização dos testes, influenciam no resultado final do ensaio.⁽³³⁾

Ao avaliar o ensaio Pak-Lx em comparação com o padrão-ouro MAIPA, foi observada uma sensibilidade estimada de 91%, especificidade de 96%, valor preditivo positivo de 95% e valor preditivo negativo de 93%. Esses resultados indicam uma concordância estimada de 94%, sugerindo uma boa correlação entre as duas técnicas.

Por outro lado, a comparação entre PIFT e MAIPA revelou uma sensibilidade estimada de 95%, especificidade de 82%, valor preditivo positivo de 81% e valor preditivo negativo de 96%, resultando em uma concordância estimada de 88%. Essa análise destaca uma tendência de maior sensibilidade, mas menor especificidade em comparação com o Pak-Lx.

Os ensaios baseados em microesferas foram validados e demonstraram excelente desempenho na detecção de anticorpos e identificação das especificidades relacionadas ao sistema HPA.^(30,33,34) O estudo revelou que a metodologia com microesferas alcançou uma concordância de 94% em comparação com a metodologia MAIPA, com sensibilidade de 91% e especificidade de 96%. Importante notar que todos os casos discordantes foram atribuídos a anticorpos anti-HLA.

Quanto ao ensaio PIFT na detecção de anticorpos plaquetários, comumente encontrado na refratariedade transfusional, obteve uma concordância de 88% para anticorpos anti-HPA, com sensibilidade de 95% e especificidade de 82%. Para a detecção de anticorpos anti-HLA, a concordância foi de 81%, com sensibilidade de 92% e especificidade de 74%.

A análise estatística revela que não há evidências significativas de diferenças entre os métodos Pak-Lx e PIFT quanto à concordância com a MAIPA. Esses resultados ressaltam a importância de escolher a técnica mais apropriada com base nas características específicas da população.

Três amostras apresentaram resultados discrepantes entre as metodologias utilizadas. Um dos pacientes foi diagnosticado com leucemia mieloide aguda, outro com leucemia linfóide crônica, e ambos receberam imunoglobulina dias antes da realização do teste. Enquanto isso, a terceira amostra foi diagnosticada com infecção por COVID-19. Esses diferentes contextos clínicos podem ter influenciado nos resultados obtidos.

A comparação entre Pak-Lx e DLX mostra uma sensibilidade estimada de 72%, especificidade de 77%, valor preditivo positivo de 67% e valor preditivo negativo de 81%, resultando em uma concordância estimada de 75%. No caso de PIFT em relação a DLX, os resultados indicam uma sensibilidade estimada de 92%, especificidade de 74%, valor preditivo positivo de 69% e valor preditivo negativo de 94%, com uma concordância estimada de 81%.

Devido à alta variabilidade genética presente no sistema HLA, a tecnologia Luminex é extensivamente empregada na pesquisa de anticorpos anti-HLA

nos laboratórios de histocompatibilidade.⁽³⁵⁾ Apesar de ser considerada uma referência no sistema HLA, a tecnologia Luminex tem um custo elevado, o que nem sempre a torna acessível a todos os laboratórios. Buscar alternativas mais econômicas, acessíveis, automatizadas, e de execução simplificada oferece vantagens no tratamento do paciente.⁽³⁶⁾

O estudo indica que não há evidências de diferença entre as concordâncias dos ensaios Pak-Lx e PIFT, ao comparar as metodologias com MAIPA e DLX para a detecção de anticorpos anti-HPA e HLA, respectivamente. Os ensaios baseados em microesferas mostraram-se menos trabalhosos que o MAIPA, destacando-se pela capacidade de analisar simultaneamente os antígenos HPA e HLA. No entanto, sua limitação inclui a ausência de análise do HPA-15. Todavia, não há um único método capaz de detectar todos os anticorpos relevantes, sendo essencial que cada laboratório realize padronizações adequadas e utilize métodos complementares, dependendo da situação clínica do paciente.

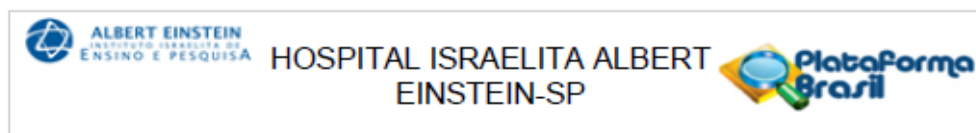
5 CONCLUSÕES

1. A estratégia proposta foi validada como uma técnica rápida e sensível para a detecção de anticorpos plaquetários em pacientes com suspeitas dessa condição, sem evidenciar diferenças significativas entre as técnicas utilizadas. Isso sugere que a abordagem proposta pode ser uma alternativa viável, oferecendo eficácia comparável à técnica estabelecida, mas potencialmente com vantagens em termos de rapidez e sensibilidade;

2. Os resultados sugerem que as metodologias avaliadas são robustas e oferecem opções viáveis para a detecção de anticorpos plaquetários, com implicações práticas na escolha da técnica mais apropriada para as necessidades clínicas e laboratoriais específicas;

3. A escolha da melhor estratégia para a detecção de anticorpos contra antígenos leucocitários humanos e antígenos plaquetários humanos depende de vários fatores como sensibilidade, especificidade, custo e complexidade da técnica. Decidimos utilizar a imunofluorescência plaquetária para o diagnóstico. No caso de um resultado inconclusivo utilizaremos a imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais para confirmação.

Anexo 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



Continuação do Parecer: 5.052.493

O uso repetido de plaquetas alogênicas resulta frequentemente, no aparecimento de anticorpos direcionados aos antígenos presente em plaquetas tanto para HPA e/ou HLA nos pacientes poli transfundidos. O manejo de pacientes refratários à transfusão ainda é motivo de estudos devido à dificuldade de se compreender e classificar as RP, podendo comprometer a evolução e o próprio tratamento do paciente, além do aumento dos custos hospitalares. A comparação entre as metodologias empregadas na identificação de anticorpos antiplaquetas nos pacientes com suspeita de RP, permite identificar qual metodologia será a mais adequada na identificação da RP. Uma vez identificada as causas da RP, será possível selecionar unidades genótipo-compatíveis para os pacientes com RP. Permitindo assim reduzir os custos hospitalares e os índices de morbidades relacionada à transfusão

Metodologia Proposta:

4.1 Casuística 4.1.1 Amostras de sangue de pacientes com Refratariedade plaquetária Pacientes com suspeita clínica com RP e atendidos no Hospital Israelita Albert Einstein no período de maio de 2014 a dezembro de 2020 e que possuam amostras de soro armazenadas na soroteca do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, serão incluídas de forma retrospectiva e continua neste estudo. As amostras serão utilizadas para a validação técnica PIFT, que é descrita conforme item 4.2.1. 4.1.2 Informações clínicas sobre os pacientes com Refratariedade plaquetária Os dados clínicos dos pacientes, cujo soro for utilizado para a validação da técnica de PIFT serão consultados no banco de dados do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular. Esse banco de informações está registrado no sistema Progesa do Banco de Sangue. Os dados clínicos a serem utilizados envolvem: Sexo, idade, Diagnóstico e resultado laboratorial referente a pesquisa de anticorpo plaquetário (resultados referentes a metodologia de MAIPA e PakLx). Tais dados, serão extraídos por um funcionário do banco de sangue e entregues de forma anonimizada ao pesquisador e em informações em "bloco" dos pacientes. Com esses dados obtidos, os pacientes serão classificados em grupos, de acordo com a etiologia da refratariedade conforme descrito a seguir. 4.1.3 Classificação etiológica da Refratariedade plaquetaria O grupo com RP confirmada será analisado, considerando as características clínicas e resultados laboratoriais de cada paciente. Após essa análise, cada paciente será subclassificado quanto a etiologia de RP: • RP imune - RPI (com presença de anticorpos HLA e/ou HPA), • RP não imune – RPNI (presença de uma ou mais características clínicas: esplenomegalia, febre, CIVD, uso de medicamentos) • RP apresentando

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
 Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br



**HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP**



Continuação do Parecer: 5.052.493

tanto causas imunes e não imunes – RPI + NI (presença anticorpos HLA/HPA e causas não imunes de RP).

4.2 Métodos 4.2.1 Validação da técnica de PIFT As amostras de soros serão analisadas para a presença de anticorpos plaquetários utilizando o método de citometria de fluxo (FC-PIFT). Esse método será submetido a uma padronização interna: soros obtidos a partir de 20 doadores de sangue do gênero masculino e sem história anterior de transfusões. Serão analisados e um padrão de fluorescência curva negativa será definido. O teste será realizado com plaquetas obtidas de 3 doadores do gênero masculino e do grupo sanguíneo O, sem história de sensibilização prévia, lavadas, resuspensas em solução salina tamponada com ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) a 0,1% (concentração final de 100.000 plaquetas/mL) e, em seguida, incubadas com soro de paciente (50 uL) durante 30 minutos a 37°C. Os controles negativos e positivos serão adicionados a cada teste. Após três lavagens consecutivas, soro e plaquetas serão incubadas durante 30 minutos com anti-imunoglobulina G humana (AffiniPure F ab' Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc Fragment Specific - Jackson Immuno Research – Baltimore, USA) marcada com o fluorocromo FITC diluído 80 vezes. As amostras serão analisadas depois de uma segunda lavagem com tampão em citômetro de fluxo. Para a aquisição e análise de dados, serão obtidos 10.000 eventos. O teste será considerado positivo se o gate obtido for maior ou igual a dois desvios padrão (DP) acima do controle negativo e inconclusivo se gate estiver entre um e dois DP acima do controle gate negativo.

4.2.2 Comparação dos resultados obtidos através da técnica de PIFT com os resultados prévios reportados por Pak-Lx e MAIPA. Os resultados obtidos com a técnica de pesquisa de anticorpos plaquetários do PIFT serão comparados com aqueles obtidos previamente pelos métodos Pak-Lx e MAIPA. Iremos considerar a técnica do MAIPA como técnica de referência. Considerando isso, serão calculados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo. Por fim, baseado nos resultados obtidos será proposto um protocolo laboratorial de investigação para RP.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo geral deste estudo é avaliar a técnica de PIFT e avaliar metodologias MAIPA, PIFT e Pak-Lx utilizadas na detecção de anticorpos antiplaquetas.

Objetivo Secundário:

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
Bairro: Morumbi **CEP:** 05.652-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2151-3729 **Fax:** (11)2151-0273 **E-mail:** cep@einstein.br



**HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP**



Continuação do Parecer: 5.052.493

Caracterizar clinicamente os pacientes com RP imune (Sexo, idade, HD, nº de transfusão). Validar a técnica de PIFT. Avaliar a eficiência de cada metodologia empregada na pesquisa e identificação de anticorpos antiplaquetas em pacientes com RP imune. Comparar a eficiência das metodologias MAIPA, PIFT e Pak-Lx entre si. Definir uma estratégia através do uso das metodologias (MAIPA, PIFT e Pak-Lx) para a abordagem dos pacientes com suspeita clínica de refratariedade transfusional imune.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O estudo proposto apresenta riscos mínimos, devido a natureza observacional e não intervencionista do mesmo. Os riscos inerentes a perda de confidencialidade dos dados são assegurados pelos pesquisadores que garante o sigilo na análise destes.

Benefícios:

Não haverá benefício direto aos participantes de pesquisa, porém através da análise comparativa dos testes de pesquisa de anticorpos plaquetários haverá a possibilidade de delinear uma estratégia laboratorial mais eficiente ao diagnóstico e condução dos pacientes com refratariedade plaquetária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenho:

Pacientes com suspeita clínica com RP e atendidos no Hospital Israelita Albert Einstein no período de maio de 2014 a dezembro de 2020 e que possuírem amostras de soro armazenadas na soroteca do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular, serão incluídas de forma retrospectiva e continua neste estudo.

Metodologia de Análise de Dados: Análise estatística comparativa

Desfecho Primário: Comparação entre as metodologias MAIPA, PIFT e Pak-Lx

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



**HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP**



Continuação do Parecer: 5.052.493

Tamanho da Amostra no Brasil: 100

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide: Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Recomendações:

vide: Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Resposta ao parecer 4.960.738 de 09 de Setembro de 2021

1) **PENDÊNCIA:** Considerando a Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (Lei nº 13.709/2018), que regula as atividades de tratamento de dados pessoais, e o direito à privacidade, sigilo e confidencialidade do participante de pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens III.2.i e IV.3.e), e considerando que a consulta ao prontuário trata de acesso a informações sensíveis dos participantes, assim, solicita-se que seja incluída a anuência destes para acesso a essas informações através da aplicação do Termo de Consentimento Livre e esclarecido, e/ou justificado a solicitação de dispensa com as justificativas pertinentes com base na legislação vigente.

RESPOSTA: Os pesquisadores esclareceram de forma melhorada, a maneira que se dará o acesso e uso das informações, por se tratarem de dados sensíveis, os pesquisadores garantem o sigilo das informações analisadas. Este estudo tem um desenho observacional e utilizará dados contidos no banco de dados do Departamento de Hemoterapia referente somente aos pacientes deste projeto. O estudo não realizará qualquer intervenção (coleta, entrevista, tratamento).

O banco de dados será fornecido pelo funcionário do banco de sangue (não participante dessa pesquisa), que entregará de forma anonimizada ao pesquisador.

Durante todo o estudo, incluindo durante sua divulgação, a privacidade e identidade dos sujeitos de pesquisa serão preservadas. Por estes motivos, solicitamos ao comitê de ética e pesquisa, a dispensa da assinatura do TCLE. Os dados laboratoriais serão registrados em planilhas Excel, em que a identidade dos pacientes será codificada e sua análise será realizada em bloco, sem a individualização dos dados.

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



ALBERT EINSTEIN
INSTITUTO ISRAELITA DE
ENSINO E PESQUISA

HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 5.052.493

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2) **PENDÊNCIA** A Resolução CNS Nº 466 de 2012, no item III.1.b, define que "A eticidade da pesquisa implica em (...) ponderação entre riscos e benefícios, tanto conhecidos como potenciais, individuais ou coletivos, comprometendo-se com o máximo de benefícios e o mínimo de danos e riscos". Além do mais, o item IV.3.b afirma que "O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deverá conter, obrigatoriamente: (...) explicitação dos possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, além dos benefícios esperados dessa participação e apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições adversas que possam causar dano, considerando características e contexto do participante da pesquisa". Desta forma, solicita-se que sejam revistos os itens Riscos e Benefícios no projeto e formulário da Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Os pesquisadores adequaram, tanto no projeto, quanto na plataforma a correta descrição dos riscos e benefícios desse projeto.

Riscos:

O estudo proposto apresenta riscos mínimos, devido a natureza observacional e não intervencionista do mesmo. Os riscos inerentes a perda de confidencialidade dos dados são assegurados pelos pesquisadores que garante o sigilo na análise destes.

Benefícios:

Não haverá benefício direto aos participantes de pesquisa, porém através da análise comparativa dos testes de pesquisa de anticorpos plaquetários haverá a possibilidade de delinear uma estratégia laboratorial mais eficiente ao diagnóstico e condução dos pacientes com refratariedade plaquetária.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

3) **PENDÊNCIA:** A metodologia do protocolo deve ser apresentada de forma clara, detalhada e ordenada, em especial os procedimentos que afetam os participantes da pesquisa. Desta forma, solicita-se que seja revisado o texto incluído no Formulário da Plataforma Brasil. (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.4.1.8; Resolução CNS nº 466 de 2012, item III.2.e).

RESPOSTA: A metodologia foi reescrita e adequada para a melhor compreensão tanto no projeto

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 5.052.493

quanto na plataforma. As adequações foram sinalizadas ao longo do projeto através do grifado em amarelo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein, de acordo com a Resolução CNS nº 466 de 2012 e Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1795513.pdf	11/09/2021 07:51:00		Aceito
Outros	Carta.pdf	11/09/2021 07:50:40	Thiago Henrique Costa	Aceito
Outros	Carta.docx	11/09/2021 07:50:24	Thiago Henrique Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	11/09/2021 07:49:22	Thiago Henrique Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	11/09/2021 07:49:05	Thiago Henrique Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Isencao_TCLE_revisado.docx	11/09/2021 07:44:20	Thiago Henrique Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Isencao_TCLE_revisado.pdf	11/09/2021 07:44:06	Thiago Henrique Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	05/08/2021 15:36:24	Thiago Henrique Costa	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Responsabilidade.pdf	20/07/2021 08:31:11	Thiago Henrique Costa	Aceito

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 266

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

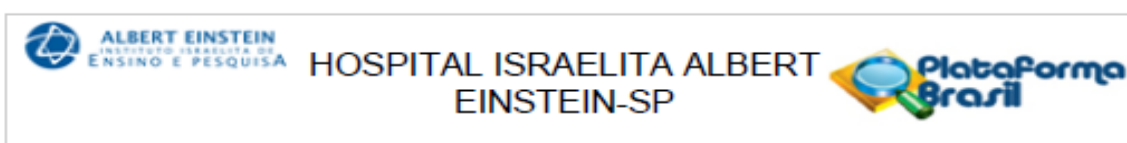
UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



Continuação do Parecer: 5.052.493

Declaração de concordância	gestor.pdf	20/07/2021 08:21:13	Thiago Henrique Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	compromisso.pdf	20/07/2021 08:20:57	Thiago Henrique Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	compromisso.doc	20/07/2021 08:20:40	Thiago Henrique Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia.pdf	20/07/2021 08:20:13	Thiago Henrique Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia.doc	20/07/2021 08:20:00	Thiago Henrique Costa	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	RegistroCEP.pdf	20/07/2021 08:15:40	Thiago Henrique Costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Outubro de 2021

Assinado por:
Fabio Pires de Souza Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
 Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

7 REFERÊNCIAS

1. Fagundes IS, Franz JM, Jobim MS, Arend A, Merzoni J, Cardone JM, et al. Diagnosis and treatment of immunological platelet refractoriness by histocompatibility. *Hum Immunol*. 2020;81(5):197–201.
2. Fontão-Wendel R, Silva LC, Saviolo CB, Primavera B, Wendel S. Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang*. 2007;93(3):241–9.
3. Wang J, Xia W, Deng J, Xu X, Shao Y, Ding H, et al. Analysis of platelet-reactive alloantibodies and evaluation of cross-match-compatible platelets for the management of patients with transfusion refractoriness. *Transfus Med*. 2018;28(1):40–6.
4. Ainley LI, Hewitt PE. Haematology patients and the risk of transfusion transmitted infection. *Br J Haematol*. 2018;180(4):473–83.
5. Panch SR, Guo L, Vassallo R. Platelet transfusion refractoriness due to HLA alloimmunization: evolving paradigms in mechanisms and management. *Blood Rev*. 2023;62:101135.
6. Heuft HG, Mende W, Blasczyk R. A general change of the platelet transfusion policy from apheresis platelet concentrates to pooled platelet concentrates is associated with a sharp increase in donor exposure and infection rates. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(2):106–13.
7. Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol*. 2012;210:3–22.
8. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195–8.
9. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang*. 2014;106(2):93–102.
10. Curtis BR. Platelet and neutrophil antigens. In: Murphy MF, Roberts DJ, Yazer MH. *Practical transfusion medicine*. 5th ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2017. p. 45–61.
11. Bub CB, Gonçalves AC, Barjas-Castro ML, Sousa LC, do Monte SJ, Castro V. The use of a potential novel tool in virtual crossmatching for platelet transfusion in platelet refractoriness. *Vox Sang*. 2016;110(1):70–8.
12. Jia Y, Li W, Liu N, Zhang K, Gong Z, Li D, et al. Prevalence of platelet-specific antibodies and efficacy of crossmatch-compatible platelet transfusions in refractory patients. *Transfus Med*. 2014;24(6):406–10.
13. Bub CB, Martinelli BM, Avelino TM, Gonçalves AC, Barjas-Castro ML, Castro V. Platelet antibody detection by flow cytometry: an effective method to evaluate and give transfusional support in platelet refractoriness. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(4):252–5.
14. Delaflor-Weiss E, Mintz PD. The evaluation and management of platelet refractoriness and alloimmunization. *Transfus Med Rev*. 2000;14(2):180–96.
15. Cohn CS. Platelet transfusion refractoriness: how do I diagnose and manage? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2020;2020(1):527–32.
16. Hussein MA, Fletcher R, Long TJ, Zuccaro K, Bolwell BJ, Hoeltge A. Transfusing platelets 2 h after the completion of amphotericin-B decreases its detrimental effect on transfused platelet recovery and survival. *Transfus Med*. 1998;8(1):43–7.
17. Sensebé L. [Factors affecting posttransfusion platelet efficiency “close relationship between patient and product”]. *Transfus Clin Biol*. 2007;14(1):90–3. French.
18. Waterman HR, Kapp LM, Munday A, Odem-Davis K, Zimring JC. Transfusion-induced alloimmunization and platelet refractoriness in a mouse model: mechanisms and interventions.

Transfusion. 2016;56(1):91–100.

19. Garraud O, Cognasse F, Moncharmont P. Immunological features in the process of blood platelet-induced alloimmunisation, with a focus on platelet component transfusion. *Diseases*. 2019;7(1):7.

20. Lochowicz AJ, Curtis BR. Clinical applications of platelet antibody and antigen testing. *Lab Med*. 2011;42(11):687–92.

21. Heikal NM, Smock KJ. Laboratory testing for platelet antibodies. *Am J Hematol*. 2013;88(9):818–21.

22. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, de la Rivière AB, Engelfriet CP. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol*. 1978;39(2):195–207.

23. Kiefel V. The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfus Med*. 1992;2(3):181–8.

24. Nguyen XD, Goebel M, Schober M, Klüter H, Panzer S. The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens: an interlaboratory comparison. *Transfusion*. 2010;50(7):1429–34.

25. Tao S, Chen S, Hong X, He J, Zhu F. Novel method for simultaneously detecting HPA and HLA antibodies using Luminex microbeads. *J Transl Med*. 2019;17(1):249.

26. Dutra VF, Bub CB, Costa TH, Santos LD, Bastos EP, Aravechia MG, et al. Allele and haplotype frequencies of human platelet and leukocyte antigens in platelet donors. *einstein (São Paulo)*. 2019;17(1):eAO4477.

27. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Müller-Eckhardt C. Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*. 1987;70(6):1722–6.

28. Porcelijn L, Huiskes E, de Haas M. Progress and development of platelet antibody detection. *Transfus Apher Sci*. 2020;59(1):102705.

29. Cooper N, Bein G, Heidinger K, Santoso S, Sachs UJ. A bead-based assay in the work-up of suspected platelet alloimmunization. *Transfusion*. 2016;56(1):115–8.

30. Porcelijn L, Huiskes E, Comijs-van Osselen I, Chhatta A, Rathore V, Meyers M, et al. A new bead-based human platelet antigen antibodies detection assay versus the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay. *Transfusion*. 2014;54(6):1486–92.

31. Kaplan C, Freedman J, Foxcroft Z, Husebekk A, Metcalfe P, Muniz-Diaz E, et al.; International Society of Blood Transfusion—working party on platelet immunology. Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: a statement. *Vox Sang*. 2007;93(4):298–9.

32. Ameri Z, Vahidi R, Khaleghi M, Dehesh T, Sheikhbardsiri A, Farsinejad A. Slot blotting and flow cytometry: two efficient assays for platelet antibody screening among patients with platelet refractoriness. *Vox Sang*. 2021;116(1):106–15.

33. Campbell K, Rishi K, Howkins G, Gilby D, Mushens R, Ghevaert C, et al. A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. *Vox Sang*. 2007;93(4):289–97.

34. Dutra VF, Costa TH, Santos LD, Sirianni MF, Aravechia MG, Kutner JM, et al. Platelet antibodies identification: comparison between two laboratory tests. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2022;44(3):365–8.

35. Lachmann N, Todorova K, Schulze H, Schönemann C. Luminex® and its applications for solid organ transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, and transfusion. *Transfus*

Med Hemother. 2013;40(3):182–9.

36. Rockenbauer L, Eichelberger B, Panzer S. Comparison of the bead-based simultaneous analysis of specific platelet antibodies assay (SASPA) and Pak Lx Luminex technology with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay (MAIPA) to detect platelet alloantibodies. Clin Chem Lab Med. 2015;53(11):1779–83.

Abstract

Introduction: The detection and identification of platelet antibodies play a crucial role in the patient's therapeutic choices. **Purposes:** To compare the effectiveness of the three serological techniques used in the detection and identification of platelet antibodies in 100 samples from patients with a suspected diagnosis of platelet antibodies. **Methods:** Serum from 100 patients suspected of having antibodies against platelets was tested against Glycoprotein Ia/IIa, Ib/IX, IIb/IIIa, Cluster of Differentiation -109, and Human Leukocyte Antigen class I by the monoclonal antibody immobilization of platelet antigen, platelet immunofluorescence test, and Luminex bead assay techniques. **Results:** Comparisons between the methodologies showed (monoclonal antibody immobilization of platelet antigen vs. platelet immunofluorescence test sensitivity: 97.73%, specificity: 78.57%), (monoclonal antibody immobilization of platelet antigen vs. Luminex bead assay, sensitivity 90.91%, specificity: 96.43%), and Luminex bead assay vs. platelet immunofluorescence test sensitivity 76.37%, specificity: 100%. **Conclusions:** In this comparative study of methodologies for detecting antibodies against human leukocyte antigens and human platelet antigens, the immobilization of monoclonal antibodies against platelet antigens yielded results similar to those obtained in the Luminex bead assay and platelet immunofluorescence test. However, limited sensitivity was observed for antibodies directed against human leukocyte antigens, both in the Luminex bead assay and in the immobilization of monoclonal antibodies against platelet antigens.

Keywords: Enzyme-linked immunosorbent assay; Fluorescent antibody technique, indirect; Antigens, human platelet; HLA antigens

Apêndice

Apêndice 1. Reagentes e insumos utilizados neste estudo

Item	Descrição	Qtde.	Preço unitário (R\$)	Total (R\$)
1	F(ab') ₂ -Goat Anti-Human IgG Fc Secondary Antibody, FITC	2	1.270,63	2.541,26
2	D-PBS 5 Litros	1	1.603,12	1.603,12
3	Albumina Bovina 30%	1	1,160.00	1.160. 00
4	Pak-Lx Assay	1	15.000,00	15.000,00
5	Lifecodes LifeScreen Deluxe	1	11.000,00	11.00,00
Total				31.304,38