UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Avaliação de diferentes metodologias laboratoriais para detecção de aloanticorpos plaquetários. Determinação da prevalência e importância clínica destes aloanticorpos em pacientes transfundidos.

Rita de Cássia Legaspe Fontão Wendel

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Primavera Borelli

São Paulo
2008

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto de Químicas da USP

Wendel, Rita de Cássia Legaspe Fontão

W469a Avaliação de diferentes metodologias laboratoriais para detecção de aloanticorpos plaquetários. Determinação da prevalência e importância clínica destes aloanticorpos em pacientes transfundidos / Rita de Cássia Legaspe Fontão Wendel. -- São Paulo, 2008.
157p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo . Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Borelli, Primavera

1. Diagnóstico de laboratório: Medicina 2. Plaqueta: Sistema Sanguíneo : Fisiologia Humana I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.0756-9 CDD

Rita de Cássia Legaspe Fontão Wendel

Avaliação de diferentes metodologias laboratoriais para detecção de aloanticorpos plaquetários. Determinação da prevalência e importância clínica destes aloanticorpos em pacientes transfundidos.

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Primavera Borelli
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes que participaram deste estudo, pelo desprendimento e pelo carinho
que demonstraram.

Ao meu filho Ricardo, que promete ser um dos meus mais raros doador de plaquetas.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes e seus familiares que nos receberam com muito carinho e atenção.

A todos os doadores de plaquetas, pelo altruísmo e amor dedicado ao próximo.

À equipe do Serviço de Hemoterapia do Hospital Nove de Julho, pela participação no estudo.

À Professora Doutora Primavera Borelli que me recebeu de braços abertos como sua aluna, e que nestes anos de convívio, mostrou-se uma pessoa amiga e generosa.

À equipe médica do Hospital Sírio Libanês que permitiu que seus pacientes entrassem neste estudo.

À toda equipe de enfermagem (auxiliares e enfermeiras) do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês que me ajudaram na coleta das amostras.

À equipe médica do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, Dra Silvana Biagini, Dra Arlette Lazar, Dr Fausto Trigo e Dra Sylvia Olyntho que me ajudaram na obtenção de todos os termos de consentimento dos pacientes.

À equipe técnica laboratorial do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, que me ajudou em toda a logística do estudo.

À Cláudia Savioli, que me auxiliou nos testes de linfocitotoxicidade.

À Leandra da Silva, que dedicou grande parte do seu tempo me auxiliando nas execuções dos testes.

À equipe técnica liderada por Dr Willian Ouwehand da “University of Cambridge & National Health Service Blood” da Inglaterra, e em especial, Steve Garner que se mostrou além de um ótimo professor, um grande amigo.

Ao meu chefe, Silvano, que além de me estimular intelectualmente desafiando sempre com novos projetos, ajudou-me na elaboração e na análise estatística deste estudo de forma ativa, trazendo novos questionamentos e enriquecendo o seu conteúdo.

Ao meu **marido e companheiro** Silvano, que esteve sempre ao meu lado, me apoiando e me dando forças, especialmente nos momentos mais difíceis desta tese. Você fez a diferença.

Ao meu filho querido Ricardo que mesmo com sua inocência infantil, soube compreender meus momentos de tensão e me encheu de carinho com suas “guerrinhas” de cócegas.

Aos meus pais queridos, Marlene e José Carlos, que me deram a vida, educaram-me e me ensinaram a lutar pelos meus ideais.

Vocês, Silvano, Ricardo, e pais queridos são o meu bem mais precioso.

RESUMO

A aloimunização contra antígenos plaquetários é um dos grandes desafios no tratamento de pacientes refratários à transfusão de plaquetas.

OBJETIVOS: avaliar o desempenho de metodologias mais utilizadas em laboratórios de referência internacional para a pesquisa de anticorpos plaquetários (PAP); verificar a prevalência destes anticorpos na nossa população; avaliar se as transfusões estão causando aloimunização, e se estes aloanticorpos apresentam importância clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS: foram testadas amostras PRÉ e PÓS transfusionais em três grupos de pacientes sendo grupo 1 com patologias onco-hematológicas, grupo 2 com patologias não tumorais e grupo 3 composto dos mesmos tipos de pacientes do grupo 2 mas que não receberam transfusão (grupo controle). Numa primeira fase foi realizado estudo retrospectivo com amostras de soro congeladas no período de 1996 a 2001. A segunda fase consistiu em estudo prospectivo com amostras coletadas dos pacientes durante sua internação, no período de 2004 a 2006. Quatro diferentes metodologias foram testadas: imunofluorescência indireta por citometria de fluxo (PIFT), imobilização de antígenos plaquetários utilizando anticorpos monoclonais (MAIPA), teste de microlinfocitotoxicidade (LCT) e uma nova metodologia, conhecida como FLOW PRA™. Na fase 1 foram analisados 87 pacientes, e na fase 2, 96 pacientes, separados nos três grupos respectivamente. Na segunda fase do estudo, foi realizado o incremento da contagem corrigida de plaquetas (ICCp) para todos os pacientes que receberam transfusão de plaquetas. Para esta avaliação um novo grupo de pacientes (n=40) foi adicionado ao estudo, devido ao pequeno número encontrado na segunda fase.

RESULTADOS: as metodologias testadas apresentaram diferenças nas frequências dos anticorpos detectados, porém as metodologias MAIPA, PIFT e FLOW PRA™ foram as mais concordantes entre si. A qualidade dos soros utilizados na fase 1 afetou os resultados encontrados devido ao seu prolongado tempo de armazenamento. Porém, este fato foi eliminado na fase 2, quando foram utilizados soros mais recentes. A prevalência de anticorpos encontrada foi de 22,6% nos pacientes do grupo 1 e 31,4% nos pacientes do grupo 2. Para o grupo 3 nenhum novo anticorpo foi detectado. A especificidade dos anticorpos encontrados foi na grande maioria HLA classe I (84%) seguido de anticorpos pan reativos com as glicoproteínas plaquetárias (8%) e anticorpos contra antígenos humanos plaquetários (HPA - 8%). A transfusão sanguínea apresentou associação significativa ($p<0,05$) com a presença de aloanticorpos somente nos pacientes do grupo 2. Os ICCp dos pacientes que apresentaram PAP reativa foram significativamente menores ($p<0,05$) que os ICCp dos pacientes que apresentaram PAP não reativas. Os pacientes com PAP reativas, ao receberam transfusões de plaquetas compatíveis passaram a apresentar ICCp semelhantes aos pacientes com PAP não reativa. Ao utilizar-se a refratariedade plaquetária como padrão-ouro para comparar as metodologias testadas verificou-se que não houve diferença entre as mesmas ($p<0,05$).

CONCLUSÕES: A prevalência de anticorpos plaquetários é semelhante à encontrada na literatura. A transfusão estimulou a produção de anticorpos no grupo 2. Os anticorpos identificados apresentam importância clínica afetando o rendimento da transfusão de plaquetas. Devido a maior praticidade da técnica PIFT e dos bons resultados encontrados, sugerimos que esta deva ser utilizada como rotina para PAP em pacientes refratários.

Palavras-chave: plaquetas, refratariedade plaquetária, aloanticorpos, MAIPA, PIFT, Flow PRA™, Linfocitotoxicidade, incremento plaquetário.

ABSTRACT

The alloimmunization against platelet antigens is one of the great challenges in the treatment of platelet refractory patients.

OBJECTIVES: To evaluate the performance of the most used methodologies for platelet antibodies screening (PAS); to verify the prevalence of these antibodies in our population; to evaluate if transfusions are causing alloimmunization, and if these alloantibodies present clinical importance.

MATERIALS AND METHODS: samples were tested before and after transfusions in three groups of patients, Group 1 having onco-hematologic diseases, Group 2 having non-oncologic diseases, and Group 3 consisted of the same type of patients as Group 2 but had not received a transfusion (control group). In the first phase, a retrospective study was performed using frozen sera samples from 1996 to 2001. The second phase consisted of a prospective study with samples collected from patients during their internment, from 2004 to 2006. Four different methodologies were tested: the indirect Platelet Immunofluorescence Test (PIFT), the Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen (MAIPA), the standard Lymphocytotoxicity Test (LCT) and a new methodology, known as FLOW PRA[™]. In Phase 1 87 patients were analyzed, and in Phase 2, 96 patients, separated into three groups respectively. In the second phase of the study, the Corrected Count Increment (CCI) was carried out for all patients who had received a platelet transfusion. For this evaluation a new group of patients (n=40) was added to the study, due to the low number found in the second phase.

RESULTS: the methodologies presented differences in the frequencies of the detected antibodies; however MAIPA, PIFT and FLOW PRA[™] were the ones that were more concordant with each other. The quality of the sera used in Phase 1 affected the results due to long storage time. However, this event was eliminated in phase 2, when more recent sera were used. The prevalence of antibodies was 22.6% in the patients of Group 1 and 31.4% in the patients of Group 2. For Group 3 no new antibody was detected. The specificity of the antibodies was predominantly HLA class I antibodies (84%) followed by pan-reactive antibodies with platelet glycoproteins (8%) and antibodies against Human Platelet Antigen (HPA - 8%). Blood transfusion only presented a significant association ($p<0.05$) with the presence of alloantibodies in the patients of Group 2. The CCI of the patients who presented platelet antibodies was significantly less ($p<0.05$) than the CCI of the patients with non-antibodies. Patients with platelet antibodies, who received compatible platelet transfusions, showed similar CCI to the patients with non-reactive antibodies. There was no difference among the methodologies ($p>0.05$) to identify clinically significant antibodies.

CONCLUSIONS: The prevalence of platelet antibodies is similar to that found in published literature. Transfusion stimulated the production of antibodies in group 2. The identified platelet antibodies present clinical importance affecting the efficiency of platelet transfusion. Due to the widespread use of the PIFT technique and the good results found, we suggest that this should be used as routine for PAP in refractory patients.

Keywords: platelets refractoriness, alloantibodies, MAIPA, PIFT, Flow PRA, lymphocytotoxicity, platelet increment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema gráfico mostrando a recuperação na contagem plaquetária em pacientes transfundidos com uma dose padrão de plaquetas.....	5
Figura 2: Representação gráfica do complexo glicoproteico GPIIb/IIIa.....	9
Figura 3: Esquema da Técnica PIFT.....	14
Figura 4: Esquema da técnica MAIPA ("Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen").....	16
Figura 5: Desenho da glicoproteína HLA classe I.....	18
Figura 6: Esquema da reação de linfocitotoxicidade.....	21
Figura 7: Esquema da técnica Flow PRA™.....	24
Figura 8: Distribuição de 778 pacientes que receberam transfusão de plaquetas no período de 1996 a 2001 de acordo com a patologia e motivo da internação.....	28
Figura 9: Análise da proporção (%) de pacientes que receberam ou não transfusão de plaquetas dentro de cada grupo estudado.....	29
Figura 10: Distribuição dos grupos de pacientes que receberam transfusão (qualquer hemocomponente) em 6400 pacientes no período de 1996 a 2001 no Hospital Sírio Libanês.	31
Figura 11: Distribuição de idade entre os grupos nas duas fases estudadas.....	38
Figura 12: Distribuição dos pesos entre grupos nas duas fases estudadas.....	39
Figura 13 : Distribuição das transfusões nos grupos 1 estudados, separados nas respectivas fases.....	40
Figura 14: Distribuição das transfusões nos grupos 2 estudados, separados nas respectivas fases.....	40
Figura 15: Combinações possíveis dos resultados das amostra PRÉ e PÓS transfusional de cada paciente (%) separados para cada metodologia avaliada (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT) e de acordo com a fase estudada.....	60,61
Figura 16: Distribuição das amostras PRÉ (16A) e PÓS (16B) transfusionais reativas, de acordo com o número de testes positivos (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT).....	66
Figura 17: Curvas ROC para as amostras PRÉ do grupo 1 utilizando diferentes padrão-ouro ("Gold Standard") para análise.....	76
Figura 18: Curvas ROC para as amostras PRÉ do grupo 2 utilizando diferentes padrão-ouro ("Gold Standard") para análise.....	77

Figuras 19: Curvas ROC para amostras PÓS do grupo 1 utilizando diferentes padrão-ouro ("Gold Standard") para análise.....	78
Figuras 20: Curvas ROC para amostras PÓS do grupo 2 utilizando diferentes padrão-ouro ("Gold Standard") para análise.....	79
Figura 21: Fluxograma do acompanhamento dos ICCp – 1 hora nos pacientes estudados.....	94
Figura 22: Incrementos das contagens corrigidas com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados, separados por PAP reativa e PAP não reativa.....	96
Figura 23: Incrementos das contagens corrigidas com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados, separados por resultados de provas de compatibilidade reativas (PC+) e não reativas (PC-).....	97
Figura 24: Incrementos das contagens corrigidas com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados na fase 3, de acordo com os resultados das PAPs.....	100
Figura 25: Incrementos plaquetários dos pacientes com PAP+ antes das transfusões de plaquetas compatíveis (transfusões ao acaso) e após transfusões de plaquetas compatibilizadas	102
Figura 26: Incrementos plaquetário pós transfusão de plaquetas compatíveis (PC-) para pacientes com PAP+ e incrementos obtidos dos pacientes com PAP-.....	103
Figura 27: Análise pela curva ROC dos testes estudados utilizando como padrão-ouro a refratariedade à transfusão de plaquetas definida de acordo com ICCp apresentados.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistemas antigênicos plaquetários (HPA) e seus respectivos antígenos.....	11
Tabela 2: Frequência dos antígenos plaquetários em diferentes populações.....	13
Tabela 3: Pacientes estudados nas duas fases do estudo.....	36
Tabela 4: Distribuição de sexo dentro de cada grupo estudado.....	36
Tabela 5: Distribuição das idades nos grupos estudados.....	38
Tabela 6: Dose de hemocomponentes transfundidos nos grupos 1 das fases 1 e 2.....	41
Tabela 7: Dose de hemocomponentes transfundidos nos grupos 2 das fases 1 e 2.....	41
Tabela 8: Resultados das combinações possíveis entre as amostras PRÉ e PÓS transfusionais.....	62
Tabela 9: Razão de Probabilidade (OR) de Mantel-Haenszel para cada par de cada teste e respectivo teste de homogeneidade de OR, comparando fase 1 e 2.....	64
Tabela 10: Resultados do índice de concordância kappa (κ) entre os diversos testes utilizados para as amostras PRÉ transfusionais.....	67
Tabela 11: Resultados do índice de concordância kappa (κ) entre os diversos testes utilizados para as amostras PÓS transfusionais.....	69
Tabela 12: FASE 1: Amostras PRÉ: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.....	71
Tabela 13: FASE 1: Amostras PÓS: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.....	72
Tabela 14: FASE 2: Amostras PRÉ: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.....	74
Tabela 15: FASE 2: Amostras PÓS: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.....	75
Tabela 16: Valores do PRA (porcentagem de reatividade do painel de antígenos testado) encontrados nas amostras reativas pelo Flow PRA™, e comparadas com os resultados obtidos pelo MAIPA, PIFT e LCT.....	82
Tabelas 17: Valores de prevalência encontrados no grupo 1 para os diferentes testes realizados.....	82

Tabela 18: Valores de prevalência encontrados no grupo 2 para os diferentes testes realizados.....	84
Tabela 19: Especificidade dos anticorpos plaquetários específicos (HPA) encontrados na fase 1.....	87
Tabela 20: Especificidade dos anticorpos plaquetários específicos (HPA) encontrados na fase 2.....	89
Tabela 21: Especificidade dos anticorpos encontrados nas duas fases analisadas.....	91
Tabela 22: Valores encontrados para os incrementos plaquetários (ICCp) conforme o resultado da PAP.....	96
Tabela 23: Valores dos incrementos das contagens corrigidas com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) separados por resultados de provas de compatibilidade (PC) reativas e não reativas.....	97
Tabela 24: Classificação da refratariedade plaquetária imune de acordo com os resultados do ICCp-1 hora, e sua correlação com os testes laboratoriais avaliados.....	98
Tabela 25: Incrementos das contagens corrigidas com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados na fase 3 de acordo com os resultados das PAPs.....	100
Tabela 26: Incrementos plaquetários dos pacientes com PAP+ antes das transfusões de plaquetas compatíveis (transfusões ao acaso) e após transfusões de plaquetas compatibilizadas.....	102
Tabela 27: Valores de ICCp pós transfusão de plaquetas compatíveis para pacientes com PAP+ e para pacientes com PAP-.....	103
Tabela 28: Classificação da refratariedade plaquetária imune de acordo com os resultados do ICCp, e sua correlação com os testes laboratoriais avaliados na fase 3.....	104
Tabela 29: Cálculos de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VP+) e valor preditivo negativo (VP-) para os testes utilizados tendo como padrão-ouro a refratariedade detectada por incrementos (ICCp) eficazes e ineficazes.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μL	micro-litro (10^{-6} litros)
AA	Aminoácido
Ac	anticorpos
ACP	anticoagulante citrato-fosfato
CD	"Cluster of differentiation"
Cir. Outras	Outras cirurgias não vasculares
Cir. Vasc.	Cirurgias Vasculares
CIVD	Coagulação Intravascular Disseminada
CPD	citrato-fosfato-dextrose (solução anticoagulante)
DNA	"Deoxyribonucleic acid"
E.U.A	Estados Unidos da América
EDTA	"Ethylenediaminetetraacetic acid"
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
FL1	Fluorescência 1
FLOW	Flow PRA (reagente)
FSC	"Forward Side Scatter"
GL	Glóbulos
GLIRFI	Glóbulos Irradiados e Filtrados
GP	Glicoproteína
Hemor. Dig.	Hemorragias Digestivas
HLA	"Human Leukocyte Antigens"
HPA	"Human Platelet Antigen"
HSL	Hospital Sírio Libanês
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC 95%	Intervalo de Confidência de 95%
ICCp	Incremento Corrigido de Contagem Plaquetária
IM	Intensidade Média
ISBT	"International Society of Blood Transfusion"
Kg	Kilo
LAPA	Laparatomias
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNH	Linfoma Não Hodking
LTC	teste de Linfocitotoxicidade
MAIPA	"Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen"
MHC	"Major Histocompatibility Complex"
mL	mili-litro (10^{-3} litros)
MM	Mieloma Múltiplo
nm	nanometro (10^{-9} metro)
nn	nucleotídeo
°C	graus Celsius
OPD	"o-phenylenediamine"
PAP	Pesquisa de anticorpos plaquetários
PBS	"Phosphate-buffered saline"
PC	Prova de compatibilidade
PCR	"Polimerase Chain Reaction"

PCR-SSOP	"PCR-Sequence Specific Oligonucleotide Probe"
PCR-SSP	"PCR-Sequence Specific Primer"
PIFT	"Platelet Immunofluorescence Test"
PRA	Porcentagem de Reatividade do Anticorpo
PTQ	Prótese Total de Quadril
r.p.m.	rotações por minuto
RFNH	Reação Febril Não Hemolítica
ROC	"Receiver Operator Characteristics"
RP	Refratariedade Plaquetária
SSC	"Side Scatter"
TBS	Tampão de lavagem
TNH	Tumores Não Hematológicos
VP-	Valor preditivo negativo
VP+	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	01
2- JUSTIFICATIVA DO PROJETO E OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivos Específicos.....	23
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4- RESULTADOS.....	56
5- DISCUSSÃO.....	107
6- CONCLUSÕES.....	131
BIBLIOGRAFIA.....	134
ANEXOS.....	142

1 INTRODUÇÃO

O uso terapêutico de transfusão de plaquetas, seja proveniente de concentrado de plaquetas ou plaquetaférese, tem aumentado em diversos centros mundiais. Dentre os efeitos adversos das transfusões, a transmissão de doenças infecciosas tem recebido imensa atenção mundial em relação ao desenvolvimento de novas metodologias de triagem, minimizando assim os riscos transfusionais. Taxas como 1/1.000.000 de hemocomponentes transfundidos com risco de transmissão de HIV e 1/100.000 para hepatite C têm sido alcançados em alguns países^{1,2}. Porém, outros efeitos adversos, ainda bastante presentes na rotina dos bancos de sangue, são as reações febris não hemolíticas (RFNH) e refratariedade plaquetária (RP) em pacientes recebendo transfusão de plaquetas. Ambos podem ser mediados por resposta imune do paciente frente à infusão de células estranhas ao seu organismo, seja pela produção de anticorpos (sendo a aloimunização a causa mais comum de RP), ou reações mediadas por citocinas produzidas por leucócitos ainda presentes na unidade transfundida.

1.1 Preparo de Hemocomponentes Plaquetários

Uma dose de plaquetas para transfusão pode ser constituída de um pool de plaquetas proveniente de coleta de sangue total de doadores ou por coleta em processo automatizado conhecido por aférese.

O processo de preparo de plaquetas a partir da coleta de sangue total é realizado da seguinte forma: cada doador fornece de 405 a 495 mL de sangue total. Este sangue total é coletado em bolsa plástico conectado por duas outras bolsas plásticas vazias. É realizada uma primeira centrifugação (suave com baixa rotação) para a separação dos glóbulos vermelhos. O plasma resultante conhecido como plasma rico em plaquetas (PRP) é separado para a segunda bolsa plástica e os glóbulos vermelhos permanecem na bolsa inicial. Esta segunda bolsa plástica contendo o PRP é novamente centrifugada

(rotação mais forte) para as plaquetas sedimentarem. Após esta segunda centrifugação o excedente de plasma é transferido para a terceira bolsa e as plaquetas que foram sedimentadas na segunda bolsa, são resuspensas em aproximadamente 50,0 mL de plasma. Cada unidade de sangue total coletado do doador (em média 450 mL) rende um concentrado de plaquetas que contém ao redor de $5,5 - 6,0 \times 10^{10}$ plaquetas. Uma dose adequada para um adulto pesando ao redor de 60 kg (em geral 1 unidade/10kg de peso do receptor) é constituída de no mínimo 6 concentrados de plaquetas (totalizando $3,3 - 3,6 \times 10^{11}$ plaquetas), que podem ser reunidos em uma única bolsa plástica (pool) para a transfusão. Com este processo de separação do sangue total, não ocorre separação total das hemáceas, plaquetas e leucócitos. Após a separação dos glóbulos vermelhos uma percentagem residual de plaquetas e leucócitos ainda fica presente na unidade contendo as hemáceas, sendo que plaquetas permanecem na ordem de 10^9 e leucócitos na ordem de 10^8 por unidade. Para o concentrado de plaquetas também ocorre o mesmo. Uma pequena percentagem de leucócitos (na ordem de 10^7) e hemáceas (na ordem de 10^8) ainda ficam presentes na unidade separada.

A coleta de plaquetas por processo automatizado (conhecido como aférese) consiste na coleta de sangue de um único doador. Durante a coleta do sangue, este é imediatamente transferido para uma máquina de aférese que centrifuga o sangue coletado desviando as plaquetas para uma bolsa plástica externa e retornando os glóbulos vermelhos para o próprio doador. Atualmente as máquinas de aférese já retiram também os leucócitos, de forma a restar menos de $1,0 \times 10^6$ leucócitos por aférese (considerada, portanto leuco-reduzida). Cada unidade coletada por aférese rende ao redor de $3,5 \times 10^{11}$ plaquetas, dose adequada para um paciente pesando ao redor de 70 kg. Tanto as unidades coletadas por sangue total, como a coleta por aférese, são processos realizados em condições assépticas, que mantêm o produto válido por 5 dias, e devem ser conservados entre $20 - 24^\circ\text{C}$ sob agitação constante.

Muita discussão ainda existe em relação à indicação de transfusão de plaquetas. Não há dúvidas de sua indicação em casos clínicos comprovados de sangramento, porém atualmente o mais utilizado é a indicação de transfusões profiláticas para evitar-se possíveis sangramentos. O parâmetro utilizado para indicação da transfusão de plaquetas é o número de plaquetas no sangue periférico do paciente. Em casos de pacientes oncológicos indica-se em geral a transfusão de plaquetas quando se atinge a contagem de 20.000 plaquetas/ μL . Para pacientes cirúrgicos este valor gira em torno de 50.000/ μL (varia dependendo do tipo de cirurgia)^{3,4}.

Conforme o “Guia de Condutas Hemoterápicas” do Hospital Sírio Libanês³ pacientes com doenças hematológicas graves e/ou com leucemia mieloide aguda recebem todos os hemocomponentes celulares (glóbulos vermelhos e plaquetas) leucoreduzidos (ou seja, os leucócitos são removidos por processo de filtração do hemocomponente a ser transfundido, cuja finalidade é a prevenção de complicações relacionados à exposição do receptor aos leucócitos do doador).

1.2 Refratariedade Plaquetária

A Refratariedade Plaquetária (RP) é um fenômeno que se caracteriza por resposta ineficaz da transfusão de plaquetas⁵. A resposta ineficaz se caracteriza por ausência de elevação na contagem plaquetária do paciente que recebeu a transfusão em pelo menos dois episódios transfusionais consecutivos. Esta resposta ineficaz da transfusão pode ser determinada pelo índice de Incremento Corrigido de Contagem plaquetária (ICCP), uma fórmula na qual se leva em conta a contagem plaquetária do paciente, o número de plaquetas transfundidas e o volume corpóreo do paciente⁵. Em geral considera-se que se o ICCP for inferior a 5.000/ μL com contagem plaquetária do paciente realizada após 1 hora do término da transfusão, a RP deve ser devida a causas imunes; se este valor

(<5.000/ μ L) for alcançado somente após 24 horas da transfusão considera-se a RP por causas não-imunes^{6,7,8} (vide figura 1).

Entre os pacientes que apresentam RP estima-se que aproximadamente 60% seja por causas não imunes, e, 40% por causas imunes^{6,9}.

1.2.1 Fisiopatologia da Refratariedade Plaquetária por Causas Não Imunes

As causas para RP devida a fatores não imunes são ocasionadas, na grande maioria dos casos, por consumo excessivo das plaquetas transfundidas como em patologias apresentando sangramentos graves, perdas plaquetárias causadas por seqüestro (esplenomegalia e/ou hepatomegalia), consumo plaquetário secundário a infecções, ou como em patologias apresentando CIVD (coagulação intravascular disseminada). Outras complicações clínicas também têm sido descritas como fator de consumo acelerado das plaquetas transfundidas tais como febre e uso de algumas drogas (por ex.: anfotericina B)¹⁰. O tratamento dos pacientes apresentando RP por causas não imunes é feito pelo tratamento direto da causa^{9,11,12}. Uma vez tratada a causa, a transfusão plaquetária volta a ser eficaz.

1.2.2 Fisiopatologia da Refratariedade Plaquetária por Causas Imunes

Em cerca de 40% dos pacientes que apresentam baixa eficácia da transfusão de plaquetas, as causas são de natureza imune^{6,9}, ou seja, ocorre a formação de anticorpos pelos pacientes contra as plaquetas transfundidas (aloimunização). O mecanismo imune que resulta em aloimunização para os componentes sangüíneos ainda não está bem esclarecido porém, sabe-se que está relacionado com a composição celular do componente transfundido e com o “status” imune do paciente¹³. Basicamente dois mecanismos têm sido definidos como iniciador da resposta aloimune:

Figura 1: Esquema gráfico mostrando a recuperação na contagem plaquetária em pacientes transfundidos com uma dose padrão de plaquetas. (Adaptado de Benson K⁶).

Legenda: resposta normal esperada em pacientes transfundidos com plaquetas: a contagem no sangue periférico do paciente eleva-se rapidamente após a transfusão, com decréscimo pequeno e lento nas primeiras 24 horas (-----). Se o paciente apresenta fatores não imunes, pode ocorrer aumento rápido na primeira hora após a transfusão com queda acentuada nas primeiras 24 horas (—). Em pacientes com fatores imunes (na presença ou ausência de fatores não-imunes) ocorre um rápido sequestro das plaquetas transfundidas não ocorrendo quase nenhuma elevação na contagem plaquetária do sangue periférico do paciente (—).

- Reconhecimento direto, no qual os linfócitos T auxiliares do paciente interagem diretamente com moléculas HLA classe II presentes nas células apresentadoras de antígenos do doador. As células T auxiliares do paciente, após interação com as células apresentadoras do doador, 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 transfundido¹³.
- Reconhecimento indireto em que as células transfundidas são fagocitadas e processadas pelas células apresentadoras de antígenos 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 células apresentadoras de antígenos do receptor, diferentemente do reconhecimento direto, quando a apresentação é feita diretamente pelas células do doador¹³.

Caso a unidade contendo as plaquetas a serem infundidas não seja leuco-reduzida, ou seja, que não se faça previamente à remoção dos leucócitos do doador, é possível ativar o mecanismo direto da resposta aloimune.

Dentre os tipos de pacientes que mais frequentemente apresentam o processo de aloimunização, encontram-se aqueles sob tratamentos imunossupressores (tratamento com quimioterápicos ou radioterapia) e que devido à imunossupressão recebem em geral, uma maior dose de hemocomponentes durante o tratamento, tornando-se pacientes poli-transfundidos. Apesar destes pacientes estarem com seu sistema imune comprometido, eles ainda apresentam aloimunização com taxas que variam de 30 a 50% de aloimunização para antígenos plaquetários^{11,12}.

Na década de 80, foi introduzida a utilização de filtros para remoção dos leucócitos ainda presentes nos concentrados de plaquetas e plaquetaféreses. Este procedimento

reduziu em aproximadamente 50% os casos de aloimunização plaquetária em pacientes poli-transfundidos^{9,12}, pois ao reduzir o número de leucócitos no componente transfundido, reduziu-se a possibilidade de ocorrer o mecanismo direto da aloimunização. Porém, recentes estudos clínicos com pacientes que receberam componentes sanguíneos leuco-reduzidos, ainda mostram aloimunização variando de 10 a 40% dos casos estudados^{14,15,16,17,18}. Acredita-se que nestes casos o mecanismo indireto seja o responsável pela aloimunização¹³. Os anticorpos mais comumente envolvidos nestes casos são anticorpos contra antígenos do sistema HLA (“Human Leucocyte Antigens”) e anticorpos plaquetários específicos pertencentes aos sistemas HPA (“Human Platelet Antigens”)^{15,16,17,18}.

O tratamento geralmente utilizado para pacientes apresentando RP de causas imunes é a identificação do(s) anticorpo(s) envolvido(s) para a seleção de plaquetas compatíveis com o paciente^{11,12,14,19,20}. Porém, existem ainda dificuldades para definir-se a verdadeira especificidade do(s) anticorpo(s) envolvido(s), seja em função das metodologias usadas para identificação destes anticorpos^{15,16,17,18,21,22}, seja por problemas de disponibilidade de doadores compatíveis²⁰.

1.3 Antígenos e Anticorpos Envolvidos na Aloimunização Plaquetária

Atualmente, sabe-se que as plaquetas podem expressar na sua membrana citoplasmática três tipos distintos de antígenos²³:

- antígenos de natureza glicolipídica tais como antígenos dos sistemas ABO, P, e Lewis;
- antígenos de natureza glicoprotéica tais como os pertencentes ao Sistema HLA classe I, locus A, B, C, antígenos presentes nas glicoproteínas IIb-IIIa, Ia-IIa, Ib-IX, CD109, entre outros;

- haptenos, formados após a administração de alguns medicamentos como quinina, heparina e diversos antibióticos, que se ligam à membrana plaquetária durante administração destes medicamentos. Diferentemente dos anteriores, estes haptenos desaparecem tão logo estes medicamentos deixam de ser administrados.

Os antígenos conhecidos como plaquetários “específicos” são os antígenos glicoprotéicos presentes nas glicoproteínas IIb-IIIa (figura 2), Ia-IIa, Ib-IX e CD109²⁴.

Os demais antígenos também estão presentes em outras células sanguíneas como hemácias (sistema ABO, P, Lewis) e leucócitos (Sistema HLA).

1.3.1 Antígenos plaquetários “específicos”

A maioria dos antígenos plaquetários “específicos” pertence a sistemas bi-alélicos codominantes sendo caracterizados por um alelo de alta frequência e outro de baixa frequência²⁵. Inicialmente, estes antígenos receberam o nome de seu descobridor ou do paciente com o referido anticorpo (ex.: Zw^a, Zw^b). Em 1990 a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) definiu critérios para a classificação e nomenclatura para estes antígenos²⁵. Assim, os sistemas foram denominados HPA (Human Platelet Antigen: Antígenos Plaquetários Humanos) e numerados conforme a data de sua descrição, recebendo em geral, a letra “a” o alelo de alta frequência e a letra “b” o de baixa frequência. Para os sistemas que foram descritos apenas o antígeno de baixa frequência com a consequente detecção do anticorpo correspondente, e a não detecção do seu correspondente de alta frequência, recebe a letra w e o sistema ainda não recebe a numeração correspondente até que se identifique o anticorpo que caracteriza o antígeno de alta frequência.

A base molecular do aparecimento dos diferentes antígenos destes sistemas é a troca de um único nucleotídeo no DNA, causando a troca de um único aminoácido na glicoproteína envolvida²⁶, caracterizando o antígeno correspondente.

Figura 2: Representação gráfica do complexo glicoprotéico GPIIb/IIIa (gentilmente cedida pelo *National Institute of Biological Standards and Controls* - NIBSC, Inglaterra).

Legenda: as plaquetas possuem aproximadamente 80.000 moléculas deste imunocomplexo (GPIIbIIIa) em sua membrana. Na GPIIIa (CD61) estão localizados os sistemas antigênicos plaquetários conhecidos como HPA-1; 4; 6; 7; 8; 10; 11. Na GP IIb (CD41) estão localizados os sistemas HPA-3 e HPA-9. Este complexo também está presente em células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas. —: receptor para fibrinogênio. —: receptor para fator von Willebrand, fibronectina, vitronectina, trombospodina.

Por exemplo: para o HPA-1, se na posição 33 da glicoproteína encontra-se leucina forma-se o antígeno HPA-1a, se se encontra a prolina, forma-se o antígeno HPA-1b. Para os restantes sistemas, vide a figura 2 e tabela 1.

Com a larga divulgação e disponibilidade das técnicas moleculares (Reações em cadeia da Polimerase: PCR) houve considerável aumento de estudos sobre genotipagem de antígenos plaquetários em diferentes populações^{26,27,28}. Os estudos utilizando PCR possibilitaram aumento na disponibilidade de plaquetas genotipadas para elaboração de painéis de células para identificação de anticorpos plaquetários específicos, fato até então limitado devido à escassez de soros com adequada potência e sensibilidade para fenotipagem destas plaquetas.

Assim, com o desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais^{21,29,30} como a imobilização de antígenos plaquetários por anticorpos monoclonais (conhecido como MAIPA) para detecção de anticorpos plaquetários específicos²⁹, aliados aos novos conhecimentos obtidos com a genotipagem plaquetária, novas especificidades de anticorpos diferentes de HLA (apesar de ainda serem os anticorpos mais comumente envolvidos com aloimunização plaquetária) têm sido observadas (como, por exemplo, anticorpos contra antígenos HPA), possibilitando melhor identificação do(s) anticorpo(s) envolvido(s) com a aloimunização e, portanto, oferecendo uma melhor escolha terapêutica^{31,32,33} para os pacientes poli-transfundidos apresentando refratariedade plaquetária.

Porém, uma grande variação de frequência e especificidade destes anticorpos é encontrada^{15,16,17,18}. Alguns autores sugerem a própria diversidade de métodos utilizados na identificação destes anticorpos, bem como a variabilidade inerentes a diferenças genéticas populacionais, como responsáveis pelas variações observadas^{17,34,35}.

Tabela 1: Sistemas antigênicos plaquetários (HPA) e seus respectivos antígenos.

Sistema	Antígeno	Outros nomes	Glicoproteína	CD	Subst nn	Subst AA	Aloimunização
HPA-1	HPA-1a	Zw ^a , Pl ^{A1}	GPIIIa	CD61	T 196	Leu 33	x
	HPA-1b	Zw ^b , Pl ^{A2}			C 196	Pro 33	x
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b	GPIb α	CD42b	C 524	Thr 145	?
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a			T 524	Met 145	x
HPA-3	HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	GPIIb	CD41	T 2622	Ile 843	x
	HPA-3b	Bak ^b			G 2622	Se 843	x
HPA-4	HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	GPIIIa	CD61	G 526	Arg 143	x
	HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b			A 526	Gln 143	o
HPA-5	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	CD49b	G 1648	Glu 505	x
	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a			A 1648	Lys 505	x
	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	CD61	G 1564 A 1564	Arg 489 Gln 489	
	HPA-7bw	Mo ^a	GPIIIa	CD61	C 1317 G 1317	Pro 407 Ala 407	
	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	CD61	T 2004 C 2004	Arg 636 Cys 636	
	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	CD41	G 2603 A 2603	Val 837 Met 837	
	HPA10bw	La ^a	GPIIIa	CD61	G 281 A 281	Arg 62 Gln 62	
	HPA11bw	Gro ^a	GPIIIa	CD61	G 1996 A 1996	Arg 633 His 633	
	HPA12bw	ly ^a	GPIb β	CD42c	G 141 A 141	Gly 15 Glu 15	
	HPA13bw	Sit ^a	GPIa	CD49b	C 2531 T 2531	Thr 799 Met 799	
	HPA14bw	Oe ^a	GPIIIa	CD61			
HPA-15	HPA-15a	Gov ^b	CD109	CD109			x
	HPA-15b	Gov ^a					x
	HPA-16bw	Duv ^a	GPIIIa	CD61			

Legenda: dos HPA-6 ao 14, e 16, apenas o antígeno de baixa frequência foi descrito e por isto recebem a letra w. Na coluna de “outros nomes” encontram-se os nomes originalmente dados aos antígenos antes da nomenclatura da ISBT. Na coluna seguinte aos sinônimos, encontra-se a glicoproteína carreadora do sistema, seguida do respectivo CD (“Cluster of Differentiation”). Após, segue a posição e substituição do nucleotídeo (nn) no DNA codificador da glicoproteína, seguido da coluna explicativa sobre qual aminoácido (AA) está presente na referida glicoproteína (GP). Na última coluna apresenta-se o envolvimento em aloimunização (x: presença; o: ausência; ?: sem certeza de seu envolvimento; em branco: ainda nenhum relato descrito).

Na tabela 2 encontram-se descritas algumas frequências populacionais. A frequência de alguns genótipos varia com a população estudada, geralmente devido a diferenças raciais. Em estudos realizados na população de doadores da raça branca do Hospital Sírio Libanês (HSL), em São Paulo, no período de 2002 a 2004, verificamos algumas diferenças gênicas quando comparado com outros grupos brasileiros, europeus e asiáticos (tabela 2). Estes dados talvez reflitam a alta miscigenação que ocorre com os indivíduos moradores da cidade de São Paulo.

1.3.2 Identificação de Anticorpos Plaquetários “Específicos”

Para a detecção dos anticorpos que reagem contra estes antígenos plaquetários “específicos”, algumas técnicas^{39,40} têm sido utilizadas, como a Imunofluorescência⁴¹, ELISA²¹ e técnicas em fase sólida como MAIPA²⁹ (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen).

Por muitos anos, a técnica considerada como padrão foi a imunofluorescência (PIFT: platelet immunofluorescence test: teste de imunofluorescência plaquetária) (Figura 3), desenvolvida por von dem Borne⁴¹ em 1978. Como esta técnica utiliza suspensão de plaquetas íntegras como “antígenos” para detecção dos anticorpos plaquetários, existe a possibilidade de se detectar tanto anticorpos HPA como HLA e mesmo ABO. Recentes melhorias na metodologia (como utilização de citômetro de fluxo para leitura da reação) permitiram um aumento na sua sensibilidade, e portanto, a mesma ainda é utilizada em diversos centros internacionais^{30,42}. É uma metodologia de fácil realização que pode ser realizada entre três a quatro horas de trabalho, sendo, portanto, útil quando há necessidade urgente de resultado. Sua desvantagem é que na presença de anticorpos HLA, fica difícil a discriminação de outros anticorpos, como os HPAs, e para maior sensibilidade necessita da utilização de citômetro de fluxo, um aparelho de alto custo, nem sempre disponível nos serviços de hemoterapia.

Tabela 2: Frequência dos antígenos plaquetários em diferentes populações^{26,36,37,38}.

Antígeno	Holanda ²⁵	Finlândia ²⁵	Americanos Caucasianos ²⁵	Japoneses ²⁵	Coreanos ²⁵	Chineses ²⁵	Brasileiros Castro ³⁶	Caucasianos Torales-Pereira ³⁷	Doadores HSL ³⁵
HPA-1a	97,9	99	98	100	99,5	>99,9	99	96,1	97,6
HPA-1b	28,8	26,5	20	0,3	2	<0,15	14	28,8	31,5
HPA-2a	100	99	97	99,2	99		97	97,8	99,5
HPA-2b	13,5	16,5	15	19,7	14		27	20,5	21,8
HPA-3a	81	83,5	88	85,1	82,5	78,54	83	41,9	83,8
HPA-3b	69,8	66,5	54	66,2	71,5	71,85	47,7	52,8	58,8
HPA-4a	100		100	100	100	>99,99	100	100	100
HPA-4b	0		0	2	2	<0,17	0	0	0
HPA-5a	100	99,5	98	99	100	99,29	99	99,6	99,4
HPA-5b	19,7	10	21	7	4,5	17,73	15	16,6	21,6
HPA-6a		100		99,7	100				100
HPA-6b		2,4		4,8	4				0
HPA-15a									79,3
HPA-15b									91

Legenda: HPA: Antígenos Plaquetários Humanos; HSL: Hospital Sírio Libanês.

Figura 3: Esquema da técnica de PIFT (“Platelet Immunofluorescence Test”).

Legenda: uma suspensão de plaquetas é incubada com o soro do paciente e após lavagens com solução tampão apropriado, é incubada com anti-IgG marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A leitura da fluorescência pode ser feita por microscopia de fluorescência ou citômetro de fluxo (maior sensibilidade). Reação positiva: presença de fluorescência na membrana plaquetária.

Em 1987 Kiefel e colaboradores²⁹ desenvolveram a técnica de imobilização de anticorpos monoclonais contra antígenos plaquetários – MAIPA (Figura 4) que tem se mostrado a técnica de melhor sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos plaquetários^{24,35,43,44}. Esta metodologia permite a detecção e a discriminação (diferentemente do PIFT) de diversas especificidades de anticorpos incluindo os HPA e HLA no mesmo ensaio laboratorial. A especificidade desta metodologia dá-se pela utilização de anticorpos monoclonais específicos contra a glicoproteína carreadora dos antígenos que se deseja estudar. Assim, ao usarmos um anticorpo monoclonal contra a glicoproteína IIbIIIa, estuda-se a presença dos anticorpos contra os antígenos presentes somente neste complexo como, por exemplo, o HPA-1 e o HPA-3. Se utilizarmos um anticorpo monoclonal contra a glicoproteína HLA da classe I, estudaremos anticorpos contra antígenos localizados na glicoproteína HLA classe I. E assim sucessivamente, para a glicoproteína Ialla (carreadora do HPA-5) e glicoproteína IbIX (carreadora do HPA-2). A utilização desta combinação de anticorpos monoclonais conjuntamente com painel de plaquetas de doadores com genotipagem conhecida faz com que esta técnica tenha uma boa especificidade e sensibilidade. A escolha do anticorpo monoclonal a ser utilizado é de extrema importância para a sensibilidade desta metodologia, pois diferentes clones apresentaram diferentes graus de reatividade em experimentos anteriores⁴⁵.

Em relação aos problemas para sua implantação, teríamos o alto custo financeiro para obtenção destes anticorpos monoclonais e a limitação de sua sensibilidade caso o soro do paciente possua algum anticorpo plaquetário contra um antígeno presente em outra proteína que não foi estudada (por exemplo, o CD109 que carrega o sistema HPA-15). Outras desvantagens desta metodologia seriam tratar-se de uma técnica totalmente “in house”, ou seja, deve ser muito bem padronizada com controles internos e externos, e de ser muito trabalhosa, com vários passos de incubação e lavagens, perfazendo o tempo total de 8 a 9 horas.

Figura 4: Esquema da técnica MAIPA ("Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen") .

Legenda: um concentrado plaquetário é incubado com o soro do paciente. Após lavagens com solução tampão apropriado, é feita nova incubação com anticorpo monoclonal específico para a glicoproteína plaquetária que se deseja estudar. Após incubação e lavagens, as plaquetas sensibilizadas são lisadas para liberação do imune-complexo formado. Este lisado é adicionado a placas previamente sensibilizadas com IgG caprina anti-murina que irá fixar o anticorpo monoclonal utilizado. Adiciona-se então IgG anti-humana marcada com peroxidase que se ligará ao anticorpo humano, e a revelação é feita com adição da 1,2 fenilenediamina dihidroclorida (OPD, 2 HCl). A leitura da absorbância do teste é realizada a 492 nm. A reação positiva é definida pelas absorbâncias acima do "cut-off" definido com o controle negativo.

1.3.3 Antígenos e Anticorpos HLA em Plaquetas

Como já mencionado, anticorpos com especificidade **para o sistema HLA são os anticorpos mais comumente encontrados em soros de pacientes aloimunizados**^{15,16,17,18}.

O sistema HLA pertencente ao MHC (“Major Histocompatibility Complex”: Complexo Principal de Histocompatibilidade), que consiste em um complexo e diversos grupos de proteínas envolvidas diretamente na estimulação da resposta imune. O Sistema HLA, em particular, tem como função principal, a apresentação de peptídeos antigênicos para as células T auxiliaadoras (CD4+) e citotóxicas (CD8+) mediadoras da resposta imune. Este sistema caracteriza-se por segregar seus alelos de forma desequilibrada (“linkage disequilibrium”: desequilíbrio de ligação) apresentando assim, alto grau de polimorfismo, diferentemente expressos de acordo com a população estudada⁴⁶.

O sistema HLA está classificado em três classes de acordo com diferenças estruturais e funcionais:

- Classe I: consiste em antígenos presentes em glicoproteínas trans-membrana (Figura 5). Estas glicoproteínas são formadas por uma cadeia pesada α (consistindo três domínios: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) e uma cadeia leve β . As cadeias α são codificadas pelos “locus” A, B e C (HLA Clássicos) e “locus” E, F, G (HLA não clássicos). A maior parte das diferenças antigênicas reside nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ onde, inclusive, encontra-se o local de ligação do peptídeo a ser apresentado ao sistema imune. A cadeia β é codificada por um gene no cromossomo 15, diferentemente das cadeias α que são codificadas pelo cromossomo 6.

Figura 5: Desenho da glicoproteína HLA classe I⁴⁶.

Legenda: a molécula HLA classe I é composta por duas cadeias (α e β) sendo três domínios na cadeia α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) onde localizam-se os antígenos HLA "locus" A, B, C.

- Classe II: também são glicoproteínas trans-membrana, porém formadas por duas cadeias α e duas cadeias β . Ambas são codificadas por genes HLA do locus DR, DQ, DP. A maioria das especificidades antigênicas se localiza nos domínios β 1 das moléculas DR, e α 1 e β 1 nas moléculas DQ e DP. Todas as cadeias são codificadas no cromossomo 6.
- Classe III: Grupo diverso de proteínas, incluindo complemento (C4, Bf) , fator de necrose tumoral (TNF), entre outras.

A função básica dos antígenos da Classe I é a apresentação de peptídeos originários de proteínas endógenas de aproximadamente 8 a 9 aminoácidos para as células T citotóxicas (CD8+), enquanto a classe II apresenta peptídeos maiores (13 a 25 aminoácidos), principalmente originários de proteínas exógenas para células T auxiliaadoras (CD4+).

Os antígenos da Classe I estão expressos na maioria dos tecidos e células, incluindo linfócitos T e B, células dendríticas, granulócitos e **plaquetas**. Os antígenos da Classe II estão expressos em linfócitos B, monócitos, células dendríticas, linfócitos T ativados e granulócitos ativados.

As plaquetas apresentam, em média, 100.000 moléculas HLA classe I (variando de 50.000 a 180.000 moléculas por plaqueta). Devido a seu tamanho reduzido em comparação com as outras células sanguíneas, as plaquetas apresentam a maior densidade de moléculas HLA classe I⁵¹.

Para identificação dos antígenos HLA, as técnicas sorológicas foram amplamente utilizadas porém, diversos fatores dificultavam a sua utilização como: dificuldade na obtenção de soros específicos e de altos títulos, necessidade de células viáveis, alteração nos antígenos em pacientes que estivessem sob intenso tratamento quimioterápico, etc⁴⁷.

Com as técnicas de biologia molecular alguns destes problemas foram solucionados, como a não necessidade de soros específicos e a utilização de DNA (material de fácil obtenção e maior estabilidade) no lugar de linfócitos viáveis. Diversas técnicas moleculares como “PCR-SSP” (PCR utilizando determinadas seqüências específicas para amplificação), “PCR-SSOP” (hibridização com oligonucleotídeo seqüência específico), e mesmo técnicas de sequenciamento de DNA, podem ser utilizadas para determinação do genótipo HLA do indivíduo^{48,49}. Porém, devido à sua rapidez e facilidade de interpretação e validação, a técnica PCR utilizando seqüências específicas de “primers” (PCR-SSP) tem sido a mais utilizada até o momento.

1.5.1 Identificação de Anticorpos HLA

Para identificação de anticorpos, a microlinfocitotoxicidade (LCT) (figura 6) foi considerada por muitos anos a técnica de escolha, porém, possui diversas limitações como o reconhecimento apenas de anticorpos citotóxicos, ser dependente de células viáveis e leitura em microscopia (dependente do grau de treinamento do operador)⁴⁷. Novas metodologias têm demonstrado maior sensibilidade que a LCT como a técnicas utilizando a citometria de fluxo^{51,50}, técnicas em ELISA e mesmo o MAIPA⁴³ quando a finalidade for a identificação de anticorpos HLA classe I para pacientes refratários a transfusão de plaquetas. Estas técnicas não necessitam de células viáveis, detectam anticorpos linfocitotóxicos ou não, e possuem leitura mais objetiva.

Figura 6: Esquema da reação de linfocitotoxicidade

Legenda: uma suspensão de linfócitos é incubada com soro do paciente. Após incubação é adicionado complemento de coelho ocorrendo lise da membrana linfocitária na presença de anticorpo dependente de complemento (linfocitotóxico). Adiciona-se então um corante vital que será incorporado à célula devido a lise da membrana. A leitura da placa é feita em microscópio com contraste de fase, observando-se as células lisadas (coradas) e não lisadas (não coradas). Quando ocorre a lise significa presença de anticorpos citotóxicos.

2.0 JUSTIFICATIVA DO PROJETO E OBJETIVOS

Frente ao exposto e considerando os problemas apresentados como:

- a grande variação de frequência e especificidade dos anticorpos envolvidos na refratariedade plaquetária por causas imunes^{15,16,17,18,}
- não haver consenso sobre qual metodologia é a ideal para identificação dos anticorpos plaquetários^{20,21,34,39,42,40,22,52,}
- o tratamento de pacientes refratários à transfusão de plaquetas ainda é motivo de investigações, inclusive em centros internacionais, devido às dificuldades na compreensão da fisiopatologia da aloimunização e da refratariedade plaquetária^{6,9,11,12,13,}
- o tratamento destes pacientes é feito, de um modo geral, de forma aleatória, podendo comprometer a evolução e a própria cura dos pacientes. Adicionalmente, estes problemas conduzem à elevação nos custos hospitalares^{52,}
- verificação de importantes diferenças populacionais seja devido a raças ou variabilidade no grau de miscigenação da população estudada^{17,27,28,} que influenciam na especificidade e na frequência dos anticorpos encontrados;
- ausência de dados de prevalência de aloanticorpos plaquetários em pacientes transfundidos na população brasileira;
- Os dados sobre RP na população brasileira ainda são bastante restritos^{54.} Neste estudo, o autor conclui que não foi possível avaliar estatisticamente os elementos laboratoriais devido a baixa variabilidade na população estudada (n = 15 pacientes estudados).

Diante destas informações, propomos estudar a presença de aloimunização contra antígenos plaquetários e sua influência clínica no tratamento transfusional, em grupo de pacientes considerados imunodeprimidos e em grupo considerado não imunodeprimidos. Para tal projeto testaremos diversas metodologias de pesquisa de

anticorpos plaquetários para, inclusive, verificarmos qual metodologia seria a mais adequada à realidade brasileira.

2.1 Objetivos Específicos

2.1.1 Avaliar e comparar as metodologias para pesquisa e identificação de aloanticorpos plaquetários mais utilizadas como:

- ♣ MAIPA - atualmente considerada a técnica mais específica e sensível para identificação de anticorpos plaquetários.
- ♣ PIFT - com leitura por citômetro de fluxo, por ser uma técnica prática e ainda utilizada em diversos centros internacionais.
- ♣ MICROLINFOCITOTOXICIDADE (LCT) - por razões históricas e por ainda ser considerada uma técnica de rotina para identificação de anticorpos HLA em alguns laboratórios brasileiros.
- ♣ Flow PRA™ - kit comercial utilizando o citômetro de fluxo e que está sendo mais utilizado para seleção de pacientes para transplante renal com pouca ênfase quanto a sua utilização em pacientes transfundidos. Acreditamos que ela possa ser um recurso importante na identificação de anticorpos devido à sua alta sensibilidade. (Vide figura 7).

2.1.2 Estudar, em pacientes do Hospital Sírio Libanês, em São Paulo, a incidência e prevalência de aloanticorpos plaquetários em pacientes sob tratamentos imunossupressores e não imunossupressores.

2.1.3 Verificar se transfusões de hemocomponentes nestes pacientes causaram ou não aloimunização para antígenos plaquetários.

2.1.4 Verificar a importância clínica destes anticorpos, utilizando a avaliação do cálculo do incremento plaquetário (ICCP) após uma hora da transfusão de plaquetas nestes pacientes.

Figura 7: Esquema da técnica Flow PRA™

Legenda: micropartículas não fluorescentes (“beads”) recobertas com diferentes antígenos HLA classe I purificados são incubadas com o soro do paciente. Após lavagens com tampão apropriado, é adicionado anti-IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após nova lavagem com tampão que acompanha o kit, as micropartículas são resuspensas em tampão e analisadas em citômetro de fluxo. A presença de fluorescência captada pelo citômetro é característico da ligação do anticorpo anti-HLA nas micropartículas (reação positiva) e ausência de fluorescência é característico de ausência de anticorpos anti-HLA.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO GERAL:

Inicialmente, o projeto foi separado em duas fases:

FASE 1: foi realizado um estudo retrospectivo com painel de soros já existentes no banco de sangue do Hospital Sírio Libanês, constituído por aproximadamente 44.000 amostras de soro de pacientes (~19.000 pacientes), atendidos de 1996 a 2001, que receberam ou não transfusão. Todas as amostras estavam congeladas abaixo de -20°C e catalogadas em banco de dados informatizado. Nesta fase, o objetivo primário foi comparar o desempenho de cada técnica laboratorial na detecção e identificação dos anticorpos mencionados. O segundo objetivo foi verificar a prevalência de aloanticorpos plaquetários em pacientes considerados imunodeprimidos e não imunodeprimidos. Este estudo inicial forneceu dados laboratoriais e epidemiológicos, para que acertemos qual o número ideal de amostras de pacientes a serem estudadas na fase 2 do projeto.

FASE 2: foi realizado estudo prospectivo para verificarmos a real influência na resposta à eficácia da transfusão plaquetária. Verificaremos a incidência dos aloanticorpos encontrados e qual, ou quais, a(s) metodologia(s) laboratorial(is) mais específica(s) e sensível(is) para detecção dos anticorpos que efetivamente alteram a eficácia transfusional. Nesta fase foram coletadas amostras de pacientes semelhantes aos estudados na fase 1 (mesmo diagnóstico) para a realização da pesquisa de anticorpos plaquetários (PAP) e todas as transfusões de plaquetas foram monitoradas para cálculos dos incrementos plaquetários (ICCP) pós transfusionais. As amostras pré e pós transfusionais (período máximo de acompanhamento de 3 meses) foram coletadas e congeladas a -30°C para posteriores testes laboratoriais utilizando as mesmas metodologias utilizadas na fase 1. Após um ano de coletas somente com pacientes do

Hospital Sírio Libanês, verificou-se que para o período estipulado de coleta (2 anos) seria insuficiente para conseguir o número mínimo para o estudo ($n=29$) para o grupo 1. Portanto, foram incorporados pacientes do Hospital 9 de Julho, desde que seguissem os mesmos critérios de seleção e todas as amostras necessárias fossem coletadas.

FASE 3: após término da fase 1 do projeto (dados utilizados na qualificação desta tese) e com 75% da coleta de amostras da fase 2 já realizada, verificou-se que o número de pacientes em potencial para análise dos Incrementos plaquetários (ICCp) seria insuficiente para conclusão da importância clínica ou não dos anticorpos detectados pelas técnicas utilizadas. Portanto, foi realizada uma terceira fase, de forma a aumentar o número de pacientes que pudessem ser acompanhados por seus ICCp após transfusões de plaquetas. Para tal fato ocorrer, foi proposta a utilização dos pacientes atendidos pelo Hospital Sírio Libanês desde 2003 que tivessem realizado a pesquisa de anticorpos plaquetários (PAP) na rotina deste serviço, e não tivessem participado da fase 1 e 2 deste projeto. Estes pacientes tiveram suas PAPs realizadas na época de sua internação pelas metodologias MAIPA e PIFT, devido à apresentação de baixos ICCp e/ou por suspeita clínica de refratariedade por causas imunes. Caso tivessem apresentado algum teste reativo (presença de anticorpos plaquetários), estes pacientes passaram a receber apenas transfusões de plaquetas compatíveis, ou seja, antes da transfusão foi realizada a prova de compatibilidade entre o soro do paciente com a plaqueta a ser transfundida, pelas técnicas MAIPA e PIFT, sendo transfundidas somente as plaquetas que apresentaram resultado não reativo com o soro do paciente (compatível).

Esta fase foi adicionada unicamente para auxílio na análise da importância clínica do anticorpo detectado, e não para comparação entre as metodologias.

3.2 Estratégia Usada para Seleção dos Pacientes

Entre 1996 e 2001, cerca de 19.000 pacientes foram atendidos no Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, sendo que 6.400 (34%) foram transfundidos. Dentre os pacientes transfundidos, 4.630 (72%) possuíam mais de 18 anos de idade, dos quais 778 (17%) foram transfundidos com plaquetas.

Os pacientes com idade superior a 18 anos e transfundidos com plaquetas foram classificados de acordo com o seu diagnóstico/motivo de internação (vide figura 8).

Se considerarmos os critérios de diagnóstico e tratamento, chamaremos de grupo de imunodeprimidos aqueles pacientes apresentando diagnósticos de doenças cuja fisiopatologia afeta o sistema imunológico de uma forma mais grave, e o motivo da internação foi para um tratamento imunossupressor (como quimioterapia e/ou radioterapia). Nos grupos formados verificou-se que tumores não hematológicos (TNH), Leucemias, Linfomas e Mielomas foram os grupos que mais receberam plaquetas dentro desta categoria de imunodeprimidos (figura 8). Além disto, verificou-se também a proporção de pacientes que receberam transfusões de plaquetas, dentro de cada grupo formado (Figura 9). Os grupos de Leucemias, Mielomas e Linfomas foram os que mais utilizaram plaquetas neste período (1996-2001), assim, foram os escolhidos para serem estudados dentro da categoria “imunodeprimidos”. O grupo de TNH foi excluído devido à grande variabilidade dos tumores (mama, pulmão, próstata, ovário, melanoma, cólon e outros) e cada um destes sub-grupos apresentou pequeno número de pacientes, o que dificultaria a adequada seleção de casos.

Figura 8: Distribuição de 778 pacientes que receberam transfusão de plaquetas no período de 1996 a 2001 de acordo com a patologia e motivo da internação. Todos são maiores de 18 anos de idade.

Legenda: *Grupos < 18 pac.:* grupos de diversas patologias contendo menos de 18 indivíduos por patologia; *TNH:* tumores não hematológicos; *Outros:* diagnósticos diversos que não foram incluídos nas outras categorias; *LEUCEMIAS:* englobando leucemias mielóide agudas e crônicas, e leucemias linfóide agudas e crônicas; *LAPA:* laparotomias; *LINFOMAS:* englobando linfomas de Hodgkin e não Hodgkin; *MM:* mieloma múltiplo; *IAM:* infarto agudo do miocárdio; *Cir. Vasc.:* cirurgias vasculares; *Cir. Outras:* outras cirurgias; *Hemor. Dig.:* hemorragias digestivas; *PRÓTESE:* prótese total de quadril; *FRATURAS:* fraturas de membros superiores e inferiores; n: número de pacientes.

Figura 9: Análise da proporção (%) de pacientes que receberam ou não transfusão de plaquetas dentro de cada grupo estudado.

Legenda: *LEUCEMIAS*: englobando leucemias mielóide agudas e crônicas, e leucemias linfóide agudas e crônicas; *MM*: mieloma múltiplo; *LINFOMAS*: englobando linfomas de Hodgkin e não Hodgkin; *TNH*: tumores não hematológicos; *Cir. Vasc.*: cirurgias vasculares; *IAM*: infarto agudo do miocárdio; *Cir. Outras*: outras cirurgias; *LAPA*: laparotomias; *Hemor. Dig.*: hemorragias digestivas.

Para a categoria “não imunodeprimidos” optou-se por pacientes pertencentes ao grupo de infarto agudo do miocárdio, prótese total de quadril e fraturas de membros inferiores e/ou superiores. Estas patologias não foram consideradas imunossupressoras por si só quando comparadas a outros diagnósticos tumorais. Além disto, seu tratamento também não causa nenhuma imunossupressão importante como a causada por quimioterapia e radioterapia.

Devido a estes fatores, este grupo não recebe muitas transfusões de plaquetas (quando comparado ao grupo de imunodeprimidos), portanto, para sua seleção foi considerada a transfusão de hemocomponentes de forma geral (englobando transfusão de glóbulos, plaquetas, plasma fresco e crioprecipitado (vide figura 10).

Para a categoria de “não imunodeprimidos”, outros grupos como LAPA e Hemorragia digestiva foram excluídos devido à dificuldade de exclusão de pacientes com algum tipo de neoplasia, encaixando-se dentro da categoria de “imunodeprimido”.

Dose mínima transfusional que pode acarretar aloimunização: de acordo com trabalhos realizados^{55,56,57}, a dose mínima necessária de leucócitos para provocar a aloimunização para anticorpos HLA é na ordem de 10^7 leucócitos infundidos em três momentos distintos (intervalos de 2 semanas). Sendo assim, no nosso estudo, para os pacientes pertencentes à categoria de “não imunodeprimidos”, consideramos a dose mínima capaz de causar aloimunização igual a três unidades de glóbulos vermelhos **não leuco-reduzidos**, pois cada unidade possui cerca de 10^8 leucócitos.

Para a categoria de “imunodeprimidos”, consideramos a dose mínima três doses de transfusão de plaquetas, sendo que cada dose possui cerca de 3×10^{11} plaquetas que possuem antígenos do sistema HLA classe I, HPAs e outros antígenos plaquetários.

Figura 10: Distribuição dos grupos de pacientes que receberam transfusão (qualquer hemocomponente) em 6400 pacientes no período de 1996 a 2001 no Hospital Sírio Libanês.

Legenda: *Outros:* diagnósticos diversos que não entraram nas outras categorias; *TNH:* tumores não hematológicos; *LAPA:* laparotomias; *Hemorr. Dig.:* hemorragias digestivas; *INFARTO:* infarto agudo do miocárdio; *Cirurgias:* outras cirurgias; *FRATURAS:* fraturas de membros superiores e inferiores; *PRÓTESE:* prótese total de quadril; *Cir. Vasc.:* cirurgias vasculares; *LINFOMAS:* englobando linfomas de Hodgkin e não Hodgkin; *LEUCEMIAS:* englobando leucemias mielóide agudas e crônicas, e leucemias linfóide agudas e crônicas; *MM:* Mieloma Múltiplo. Foram excluídos deste gráfico o grupo dos pequenos grupos (inferiores a 50 pacientes).

Assim, em resumo, os pacientes estão separados da seguinte forma:

- ❖ **Grupo “imunodeprimido”**: constituído de pacientes em tratamento imunossupressor para: leucemias, linfomas, e mieloma múltiplo. Além disso, estes pacientes devem ter recebido, no mínimo, três transfusões de plaquetas leuco-reduzidas durante o período estudado. Foram excluídos os pacientes que realizaram transplante de medula óssea. De agora em diante, este grupo será chamado de grupo 1;
- ❖ **Grupo não imunodeprimido**: constituído de pacientes em tratamento não imunossupressor para: doenças cardíacas (Infarto e/ou revascularização do miocárdio), fraturas de membros superiores e/ou inferiores, e pacientes internados para colocação de prótese total de quadril. Como este grupo geralmente recebe menor número de transfusões de plaquetas, escolhemos pacientes que tenham recebido, no mínimo três unidades de glóbulos vermelhos não leuco-reduzidos, e terem ou não recebido transfusão de plaquetas durante o período estudado. Foram excluídos deste grupo quaisquer pacientes que apresentassem algum tipo de neoplasia. De agora em diante, este grupo será chamado grupo 2;
- ❖ **Grupo controle**: pacientes não imunodeprimidos, com os mesmos diagnósticos do grupo acima mencionado (não imunodeprimido), que foram internados no mínimo em dois períodos distintos, mas que não receberam transfusão de qualquer hemocomponentes. De agora em diante, este grupo será chamado de grupo 3.

Para comparação mais adequada entre a dose infundida de hemocomponentes para cada paciente, a seguinte normatização foi efetuada:

- **para glóbulos vermelhos**: o total das unidades de glóbulos infundidas no período do estudo dividido pelo peso total do paciente e multiplicado por 10 (dose por 10 Kg de peso do paciente).

- para plaquetas: nos casos em que o paciente recebeu “pool” de plaquetas, cada seis unidades que formam um “pool” foi equiparado a uma plaquetaférese, que por sua vez foi considerada uma dose de plaquetas. Sendo assim, este número total de “doses” de plaquetas transfundidas no período de estudo foi dividido pelo peso do paciente e depois multiplicado por 10 (dose de plaquetas por 10 kg de peso do paciente).

Todos os pacientes selecionados responderam afirmativamente ao termo de consentimento (anexo 1 – FASE 1 e FASE 3, e anexo 2 para FASE 2) para participação neste projeto.

Portanto, para fase 1 os pacientes foram selecionados de forma retrospectiva, do banco de dados do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês e através de seus prontuários médicos, e suas amostras retiradas do arquivo congelado de amostras. Para a fase 2 (de maio de 2004 a agosto de 2006) todos os pacientes que deram entrada para provável transfusão de sangue, foram avaliados sobre o tipo de diagnóstico que apresentavam durante a internação. Caso o paciente apresentasse algum dos diagnósticos escolhidos para o estudo (leucemia, ou linfoma ou mieloma; revascularização do miocárdio ou infarto, ou colocação de prótese de quadril ou alguma fratura), este foi abordado para participar do estudo e solicitada a assinatura do termo de consentimento. O paciente que aceitou participar do estudo foi então acompanhado por três meses para número de transfusões recebidas e coleta de amostras. Caso recebesse alguma transfusão de plaquetas, era realizado o ICCp de uma hora para cada transfusão. Estes pacientes foram acompanhados por período máximo de 3 meses.

3.2.1 Cálculo do número de pacientes a serem estudados

A “priori”, consideramos para a fase 1 do projeto, a taxa de sensibilização de 18%. Este valor baseia-se no estudo multicêntrico realizado nos E.U.A. em 1997 conhecido

como estudo TRAP (*Trial to Reduce Aloimmunization to Platelets*)⁵⁸. Assim, como estudamos amostras obtidas de pacientes imunodeprimidos recebendo produtos leucorreduzidos, usamos esta taxa de sensibilização para cálculo do número mínimo necessário a ser estudado. Levando-se em consideração a frequência de pacientes internados no Hospital Sírio Libanês no período de 1996 a 2001 que preencheram os critérios de inclusão no grupo 1, estimou-se como sendo 29 o número aproximado necessário ao estudo. Para o cálculo foi usado o software Epi info 6, versão 6.04⁵⁹. O grupo não imunodeprimido, assim como o grupo controle (pacientes não transfundidos), tiveram o mesmo número de casos (29 pacientes para cada grupo), totalizando ao redor de 90 pacientes a serem estudados em cada fase do projeto.

3.3 Pacientes Selecionados na Fase 1 e 2

Fase 1: Para o grupo 1, foram selecionados 33 pacientes distribuídos nos seguintes diagnósticos: 11 pacientes portadores de LMA, dois pacientes com LLC, dois pacientes com LMC, 12 pacientes com LNH e seis pacientes com MM. No grupo 2 foram 31 pacientes sendo 11 pacientes apresentando problemas cardíacos (revascularização do miocárdio ou infarto agudo do miocárdio), 11 pacientes com fraturas de membros superiores e/ou inferiores, nove pacientes que realizaram prótese total de quadril.

O grupo 3 constituiu-se de oito pacientes apresentando problemas cardíacos, oito pacientes com fraturas de membros e sete pacientes que realizaram prótese total de quadril, totalizando 23 pacientes.

Fase 2: Para esta fase o grupo 1 constituiu-se de 32 pacientes (26 pacientes do Hospital Sírio Libanês e seis pacientes do Hospital 9 de Julho) distribuídos nos seguintes diagnósticos: 20 pacientes portadores de LMA, um paciente com LLC, um paciente com LLA, um paciente com LMC, cinco pacientes com LNH, um paciente com LH, e três

pacientes com MM. No grupo 2 foram 35 pacientes sendo 18 pacientes apresentando problemas cardíacos (revascularização do miocárdio ou infarto agudo do miocárdio), nove pacientes com fraturas de membros superiores e/ou inferiores, oito pacientes que realizaram prótese total de quadril. O grupo 3 constituiu-se de cinco pacientes apresentando problemas cardíacos, 11 pacientes com fraturas de membros e 13 pacientes que realizaram prótese total de quadril, totalizando 29 pacientes.

Para cada paciente estudado, o seu prontuário foi revisto dentro do período de estudo e os seguintes critérios foram anotados, quando disponíveis no prontuário: história de gravidez, idade e peso de cada paciente. Todo o histórico das transfusões que estes pacientes receberam também foi verificado, assim como toda história imunohematológica para antígenos eritrocitários.

A distribuição dos diagnósticos nos grupos estudados encontram-se na tabela 3.

O tratamento quimioterápico do grupo 1 de ambas as fases encontra-se descrito no anexo 3 (fase 1) e 4 (fase 2). Mais detalhes dos pacientes do grupo 2 encontram-se nos anexos 5 e 6 (fase 1 e 2 respectivamente), e dos pacientes do grupo 3 encontram-se nos anexos 7 e 8 (fase 1 e 2 respectivamente).

A distribuição dos sexos em cada grupo encontra-se na tabela 4.

Comparando-se a distribuição de sexos entre a fase 1 e 2, verificou-se possível diferença estatística ($p=0,063$) somente para o grupo 1. Na fase 2 houve uma tendência de frequência maior de sexo feminino quando comparado com fase 1 para este grupo. Nos outros grupos, não foi verificada diferença significativa (tabela 4).

Tabela 3: Pacientes estudados nas duas fases do estudo.

Pacientes estudados	Grupo	Fase	N total	Diagnósticos (n)
Imunodeprimidos e transfundidos	1	1	33	LMA (11); LMC (2); LLC (2); LNH (12); MM (6)
		2	32	LMA (20); LMC (1); LLC (1); LLA (1); LNH (5); LH (1);MM(3)
Não Imunodeprimidos e transfundidos	2	1	31	Cardíacos (11); Fraturas (11); PTQ (9)
		2	35	Cardíacos (18); Fraturas (9); PTQ (8)
Não Imunodeprimidos e não transfundidos	3	1	23	Cardíacos (8); Fraturas (8); PTQ (7)
		2	29	Cardíacos (5); Fraturas (11); PTQ (13)

Legenda: LMA: leucemia mielóide aguda; LMC: leucemia mielóide crônica; LLC: leucemia linfóide crônica; LLA: leucemia linfóide aguda; LNH: Linfoma não-Hodgkin; LH: linfoma de Hodgkin; MM: mieloma múltiplo;PTQ: prótese total de quadril.

Tabela 4: Distribuição de sexo dentro de cada grupo estudado.

Grupos	Fase 1			Fase 2			Fase 1 X Fase 2
	Masculino	Feminino	Total (100%)	Masculino	Feminino	Total (100%)	Teste Qui-quadrado
1	21 (64%)	12 (36%)	33	13 (41%)	19 (59%)	32	p= 0,063
2	16 (52%)	15 (48%)	31	16 (46%)	19 (54%)	35	p= 0,632
3	14 (61%)	9 (39%)	23	15 (52%)	14 (47%)	29	p= 0,680
Total	51 (59%)	36 (41%)	87	44 (46%)	52 (54%)	96	p= 0,620

Legenda: Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os sexos nas fases 1 e 2 apenas no grupo 1 da fase 2 verificou-se uma tendência maior de sexo feminino em relação à fase 1.

Para a distribuição de idade entre os grupos, verificou-se diferença significativa nas idades entre os grupos estudados ($p < 0,001$). O grupo 1 (fase 2) apresentou idade menor que o outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 11, tabela 5). Esta diferença ($p < 0,05$) está presente somente na população feminina no grupo 1 (fase 2), não apresentando diferença quando analisado somente os pacientes do sexo masculino ($p > 0,05$).

Em relação aos pesos dos pacientes, não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), mesmo quando separado por sexo feminino e por sexo masculino ($p > 0,05$) (Figura 12).

3.3.1 Doses Transfundidas

Como verificado e já mencionado anteriormente, os pacientes do grupo 1 receberam transfusões de glóbulos e plaquetas leuco-reduzidos, enquanto os pacientes do grupo 2 em geral, receberam apenas glóbulos não leuco-reduzidos. Na figura 13 encontra-se a distribuição dos hemocomponentes transfundidos nos grupos 1 separados pelas fases avaliadas e a figura 14 demonstra a distribuição para os grupos 2. Nas tabelas 6 e 7 encontram-se as médias, desvio-padrões, medianas e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das doses infundidas nos grupos 1 e 2, respectivamente, separados pelas fases estudadas.

Não houve diferença significativa nas transfusões de Glóbulos e Plaquetas entre as fases 1 e 2 para o grupo 1 ($p > 0,05$), porém, houve diferença significativa nas transfusões de glóbulos entre as fases 1 e 2 para o grupo 2 ($p = 0,03$). Os pacientes pertencentes ao grupo 2 da fase 2 receberam menor número de transfusões de glóbulos do que os pacientes do grupo 2 na fase 1 (Figura 14, tabela 7).

Tabela 5: Distribuição das idades nos grupos estudados:

Grupo	Fase	Média $\pm$ desvio padrão	Mediana	Intervalo de Confiança 95%	N
1*	1	67,9 $\pm$ 8,1	66,00	65,04 – 70,78	33
	2	58,5 $\pm$ 15,9*	62,00*	52,72 – 64,21	32
2	1	69,9 $\pm$ 8,1	73,00	66,99 – 72,95	31
	2	74,4 $\pm$ 9,6	73,00	71,10 – 77,70	35
3	1	66,8 $\pm$ 8,4	69,00	63,20 – 70,45	23
	2	63,6 $\pm$ 12,1	64,00	59,07 – 68,24	29
Total		67,0 $\pm$ 11,9	68,00	65,31 – 68,77	183

Legenda: Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle; N: número de pacientes estudados. *: houve diferença significativa entre as idades na fase 1 e 2 somente para o grupo 1 ($p < 0,05$).

Figura 11: Distribuição de Idade entre os grupos nas duas fases estudadas.

Legenda: Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle. Houve diferença significativa nas idades entre as fase 1 e 2 somente para o grupo 1 ($p < 0,05$).

Figura 12: Distribuição dos pesos entre os grupos nas duas fases estudadas.

Legenda: Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle. Não houve diferença significativa nos pesos dos pacientes estudados nas fase 1 e 2 ($p > 0,05$).

Figura 13: Distribuição das transfusões nos grupos 1 estudados, separados nas respectivas fases.

Legenda: Grupo 1: pacientes imunodeprimidos. Glóbulos: unidades de glóbulos vermelhos transfundidos. Plaquetas: dose de plaquetas transfundidas. Não houve diferença significativa nas doses infundidas de glóbulos e plaquetas quando comparado as fase 1 e 2 ($p > 0,05$).

Figura 14: Distribuição das transfusões nos grupos 2 estudados, separados nas respectivas fases.

Legenda: Grupo 2: pacientes não imunodeprimidos. Glóbulos: unidades de glóbulos vermelhos transfundidos. Plaquetas: dose de plaquetas transfundidas. Houve diferença significativa nas transfusões de glóbulos quando comparado a fase 1 e 2 ($p < 0,05$). Pouquíssimas plaquetas foram transfundidas neste grupo, não havendo diferença significativa.

Tabela 6: Dose de hemocomponentes transfundidos nos grupos 1 (pacientes imunodeprimidos) das fases 1 e 2.

Fases	Glóbulos			Plaquetas		
	Média ± dp	Mediana	IC (95%)	Média ± dp	Mediana	IC (95%)
Fase 1						
(n=33)	12,7 ± 6,7	12,5	10,3 – 15,1	10,5 ± 8,0	8,5	7,6 – 13,4
Fase 2						
(n=32)	13,4 ± 17,3	11,0	7,1 – 19,6	15,2 ± 17,3	10,5	9,0 – 21,5

Legenda: Grupo 1: pacientes imunodeprimidos. Glóbulos: unidades de glóbulos vermelhos transfundidos. Plaquetas: dose de plaquetas transfundidas. Médias, desvio-padrões (dp), medianas e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das doses infundidas no grupo 1 nas fase 1 e 2 do estudo. Não houve diferença significativa entre as fases ($p>0,05$).

Tabela 7- Dose de hemocomponentes transfundidos no grupo 2 (não imunodeprimidos) nas respectivas fase 1 e 2.

Fases	Glóbulos		
	Média ± dp	Mediana	IC (95%)
Fase 1			
(n=31)	8,3 ± 4,8	8,0	6,5 – 10,1
Fase 2			
(n=35)	5,7 ± 5,0*	4,0*	4,0 – 7,4

Legenda: Grupo 2: pacientes não imunodeprimidos. Glóbulos: unidades de glóbulos vermelhos transfundidos. Plaquetas: dose de plaquetas transfundidas. Médias, desvio-padrões (dp), medianas e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) das doses infundidas separadas por diagnóstico do grupo 2. *: diferença significativa entre a fase 1 e 2 ($p<0,05$). Na fase 2, o grupo 2 recebeu menor número de transfusões quando comparado com a fase 1.

3.4 Amostras Testadas dos Pacientes Selecionados

3.4.1 FASE 1: as amostras estudadas (coletadas no período de 1996 a 2001, durante a internação do paciente) foram mantidas em "freezers" -20°C, armazenadas em forma de soro em tubos plásticos ("Nunc®" Pittsburgh, USA). Estas amostras foram inicialmente descongeladas e separadas em pequenas alíquotas de 200 µL e recongeladas a -30°C, para posterior realização dos diferentes testes (período entre agosto de 2005 a dezembro de 2005).

3.4.2 FASE 2: as amostras dos pacientes foram coletadas durante a internação do paciente. Para as amostras PRÉ transfusionais foram coletadas amostra de 10,0 mL de sangue total sem anticoagulante e 5,0 mL de sangue total com anticoagulante (EDTA). Caso o paciente tivesse tido alta hospitalar antes do momento da coleta das próximas amostras (somente 10,0 mL de sangue total sem anticoagulante e após 30, 60 e 90 dias em relação à PRÉ transfusional), foi deslocado um funcionário do banco de sangue até a residência do paciente para que a mesma fosse coletada (período de coletas: maio de 2004 a agosto de 2006). As amostras de sangue total sem anticoagulante foram centrifugadas a 2000 g por 10 minutos, e o soro separado e congelado em pequenas alíquotas (100 µL) em temperaturas inferiores a 30°C (-30°C) até o momento da realização dos testes (outubro de 2006 a fevereiro de 2007). À amostra PRÉ transfusional contendo 5,0 mL de sangue total com anticoagulante foi adicionado hidroxietilamido 6% (Halex-Istar®, Goiânia – GO) e deixado à temperatura ambiente por 1 hora para sedimentação das hemácias. Após esta sedimentação, foi separada por centrifugação (1000 g, 10 minutos) a camada leuco-plaquetária e congelada a -30°C para futura extração de DNA.

Para todos os pacientes que receberam transfusão de plaquetas durante o período do estudo, também foi coletada uma amostra de sangue total (5,0 mL) em tubo contendo anticoagulante (EDTA) imediatamente antes da transfusão de plaquetas e outra amostra aproximadamente uma hora após a transfusão. Estas amostras foram imediatamente enviadas ao banco de sangue para realização da contagem de plaquetas. Portanto, foram realizadas as PAPs em todas as metodologias selecionadas (Flow PRA™, MAIPA, PIFT e LCT) nas seguintes amostras para ambas as fases:

- ❖ **Amostras do grupo “imunodeprimido” (grupo 1):** amostras pré transfusionais e uma amostra obtida aproximadamente após 3 meses da primeira transfusão.
- ❖ **Amostras do grupo “não imunodeprimido” (grupo 2):** para a FASE 1 foram realizadas as PAPs nas amostras pré transfusionais e uma amostra após 10 a 12 meses da primeira transfusão (em geral, os pacientes do grupo não imunodeprimidos apresentam gravidade menor no comprometimento de sua saúde durante os respectivos tratamentos, portanto, a taxa de re-internação hospitalar é menor. Sendo assim, as amostras disponíveis do grupo não imunodeprimido têm um intervalo maior quando comparado ao grupo imunodeprimido). Para a FASE 2, como as coletas foram agendadas, foi possível fazer com que o intervalo entre a amostra PRÉ e PÓS fosse aproximadamente três meses.
- ❖ **Amostras do grupo controle (grupo 3):** duas coletas de amostras de cada paciente que foi internado para tratamento, mas que neste período não recebeu transfusão. Na FASE 1 obteve-se intervalo mínimo de 15 dias e máximo de 12 meses. Na FASE 2 foi possível controlar o intervalo entre a amostra PRÉ e PÓS, como já mencionado no grupo 2, fazendo portanto, com que o intervalo entre as amostras fosse de três meses.

3.5 FASE 3

Como mencionado no delineamento geral (item 3.1), foi adicionado ao estudo um novo grupo de pacientes. Este grupo foi formado por 40 pacientes que foram submetidos ao protocolo de investigação de pesquisa de anticorpos plaquetários (PAP) do Hospital Sírio Libanês, devido a má resposta à transfusão de plaquetas avaliado por baixos incrementos plaquetários pós transfusionais ou suspeita clínica do médico responsável.

Estes 40 pacientes estão divididos nos seguintes diagnósticos:

- Pacientes onco-hematológicos (n=26 ou 65%) composto de 15 pacientes com diagnóstico de leucemia (LLA= dois pacientes / LLC= dois pacientes / LMA= nove pacientes / LMC= dois pacientes), linfoma não Hodking (dois pacientes), Mieloma múltiplo (um paciente), mielodisplasia (oito pacientes);
- Pacientes oncológicos com diagnóstico de tumor sólido (n=8 ou 20%) composto de câncer de mama= três pacientes/ câncer de cólon= um paciente/ tumor de bexiga= um paciente / melanoma= dois pacientes / tumor de ovário= um paciente;
- Pacientes não oncológicos (n=6 ou 15%) com diagnóstico de insuficiência renal (um paciente), cirurgia cardíaca (um paciente), acidente vascular cerebral (um paciente), pancreatectomia (um paciente), prostatectomia (um paciente), hepatite C (um paciente) .

Os sexos estavam igualmente divididos, sendo 20 pacientes do sexo masculino, e 20 pacientes do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi $62,2 \pm 14,3$ anos.

As amostras (soro) destes pacientes encontravam-se armazenadas em freezer -30°C . Estas amostras foram descongeladas e testadas adicionalmente pelas técnicas Flow PRA™ e LCT. Para o MAIPA e PIFT foram utilizados os resultados obtidos pela rotina do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês.

Os ICCp utilizados para análise foram retrospectivamente levantados nas planilhas de acompanhamento dos pacientes que recebem transfusão de plaquetas, elaborada pela

equipe do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês (anexo 9). Diferentemente da fase 2, nem sempre neste grupo foi possível realizar ICCp após uma hora da transfusão. Portanto para análise de ICCp neste grupo foi considerado como ICCp de uma hora inferior a 5.000/ μ L, ou ICCp acima de uma hora (em média de 18–20 horas) após a transfusão, inferior a 2.300/ μ L, característicos de ineficácia transfusional⁶⁰.

3.6 ENSAIOS LABORATORIAIS

3.6.1 Painel de plaquetas de doadores com genótipo HPA e HLA conhecidos

Plaquetas, provenientes de amostras de sangue total coletadas em citrato, fosfato e dextrose (CPD) de doadores do grupo O com genotipagens prévias conhecidas para HPA 1, 2, 3, 4, 5, 6 e HLA classe I (locus A, B, C), foram separadas por processo de centrifugação a 600 g por 10 minutos. Após separação do sangue total, as plaquetas foram lavadas com solução de PBS/EDTA 0,1% (solução tamponada de fosfato acrescido de 0,1% de EDTA) por três vezes, centrifugando-se a 2.000 g por 5 minutos. Após a última lavagem, as concentrações foram normatizadas para 100.000 plaquetas/ μ L para uso em PIFT e 200.000 plaquetas/ μ L para uso no MAIPA.

Para o teste PIFT foram selecionados seis doadores para utilização na triagem e para o MAIPA, devido à limitação de soro na fase 1 (volume máximo total disponível de 1,2 mL) e limitação de recursos para aquisição de reagentes monoclonais utilizados, foram selecionados quatro destes doadores (vide fenótipos no anexo 10).

3.6.2 Técnica de PIFT (figura 3) - Detecção de anticorpos HPA e HLA:

Um total de $5,0 \times 10^6$ plaquetas (conforme item 3.6.1) foi incubado a 37°C por 30 minutos com 50 μ L do soro do paciente em microplacas de fundo em U. Após 3 lavagens com PBS/EDTA 0,1%, centrifugando-se por 5 minutos a 2500 g a 22°C e desprezando o sobrenadante, adicionou-se 50 μ L de anti-IgG humana marcada com isotiocianato de

fluoresceína diluída 1/80 em PBS (solução tampão fosfato, pH 7,4) e incubou-se por 30 minutos a 22°C ao abrigo da luz. Após esta incubação as plaquetas foram lavadas mais 3 vezes com PBS/EDTA 0,1% (centrifugando por cinco minutos a 2.500 g a 22°C e desprezando-se o sobrenadante). Após as lavagens, as plaquetas foram resuspensas em 400µL de paraformaldeído 1%. A leitura das plaquetas sensibilizadas foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson), equipado com laser de argônio cujo espectro de emissão é de 488 nm. A aquisição e análise das células foi realizada com auxílio do software CellQuest® (Becton Dickinson). Na aquisição, foi gerado um gráfico de pontos tendo em escala logarítmica o detector “forward side scatter” (FSC) por “side scatter” (SSC) onde foi desenhado uma região ao redor dos eventos considerados como plaquetas isoladas, eliminando possíveis “debris” celulares e possíveis aglutinados plaquetários. Foram adquiridos 10.000 eventos por teste. A análise foi realizada verificando-se a intensidade de fluorescência emitida que foi captada no detector FL1, que capta fluorescência com espectro de emissão inferior a 530 nm, como é o caso do isotiocianato de fluoresceína.

Critério de Interpretação do teste: foi desenhado um histograma no qual se verificou a intensidade média (IM) da fluorescência emitida pelas amostras dos pacientes, e comparada com controles positivos e negativos (vide anexo 11). As amostras que apresentam IM 2,5 vezes maior que a IM dos controles negativos são consideradas positivas. Abaixo deste valor são consideradas negativas. Este valor de corte entre os negativos e positivos (“cut-off”), foi por nós padronizado com 100 amostras de doadores de sangue aleatórios, que não apresentavam nenhuma história previa de sensibilização e foram testados contra quatro tipos de plaquetas com genótipos conhecidos.

3.6.3 Técnica MAIPA (figura 4) - Detecção de anticorpos HPA e HLA classe I:

Um total de $2,0 \times 10^7$ plaquetas (conforme item 3.6.1) foi incubado a 37°C por 30 minutos com 50 µL do soro do paciente em microplacas de fundo em U. Após 2 lavagens com tampão PBS/EDTA 0,1%, centrifugando-se a 1.200 g por 3 minutos e desprezando-se o sobrenadante, as plaquetas lavadas foram incubadas a 37°C por 30 minutos com 40 µL do anticorpo monoclonal (previamente diluído 1/10 em PBS) específico para a glicoproteína plaquetária que se deseja estudar: anti-GP IIb/IIIa (CD61, clone Y2/51, Dakocytomation®, EUA) ; anti- HLA ABC (clone W6/32, Dakocytomation®, EUA); anti- GP Ialla (CD49b, clone Gi9, Immunotech®, França); anti-GP Ib (CD42b, clone CLB-MB45, Fitzgerald®, EUA) (lembrando que cada anticorpo monoclonal deve ser testado com plaquetas incubadas com soros controles negativos e positivos, além do soro teste; foram utilizados anticorpos monoclonais aprovados e utilizados na rotina do laboratório de imunologia plaquetária do “National Blood Service Cambridge Centre” localizados em Cambridge, Inglaterra, e do 12º Workshop Internacional de Imunologia Plaquetária organizado pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea -ISBT⁴⁴ ocorrido em 2004). Após incubação com os anticorpos monoclonais, lavou-se mais 3 vezes com PBS/EDTA 0,1%, e adicionou-se 130 µL de tampão solubilizante incubando-se por 12 horas a 4°C. A seguir, a placa foi centrifugada por 2.500 g por 15 minutos a 22°C e transferiu-se 100 µL do lisado para placas de fundo reto previamente sensibilizadas com IgG caprina anti-murina (Jackson ImmunoResearch®, EUA), (que irá fixar o Ac monoclonal utilizado) incubando-se por 90 minutos a 4°C. Em seguida lavou-se seis vezes com tampão de lavagem (TBS) somente adicionando o tampão nos poços da placa e desprezando-se o sobrenadante. Após última lavagem, adicionou-se 100 µL de anticorpo caprino contra IgG humana, marcado com peroxidase (Jackson ImmunoResearch®, EUA) (diluída 1/5.000) em cada poço e incubou-se por 90 minutos a 4°C. Novamente, foram realizadas seis lavagens com tampão TBS e após a última lavagem, adicionou-se 100 µL

da solução de 1,2 orto-fenilenediamina dihidroclorida (OPD, 2 HCl – Dakocytomation[®], EUA) com água oxigenada 30%, e incubou-se durante 9 minutos a 22°C ao abrigo da luz. Imediatamente após a incubação, adicionou-se mais 100 µL de ácido sulfúrico 1M. Foi realizada a leitura da absorbância da placa a 492 nm em leitora própria de reações do tipo ELISA. A reação positiva foi por nós padronizada como sendo as reações que apresentarem absorbâncias acima da média dos controles negativos, acrescido de dois desvios-padrões da média (vide anexo 12).

Uma das limitações que encontramos, especialmente na primeira fase do estudo, foi a quantidade de soro do paciente necessária para se testar com todas as glicoproteínas escolhidas pela técnica MAIPA. São necessários 50 µL de soro do paciente para cada doador testado por glicoproteína, ou seja, para cada glicoproteína foram utilizados 4 suspensões de plaquetas provenientes de quatro doadores distintos com genotipagem plaquetária conhecida. Como testamos 4 glicoproteínas, somente para o MAIPA foram necessários 800 µL de soro do paciente. Como se trabalhou com soros coletados no período de 1996 a 2001, anterior a este estudo, tinha-se uma limitação no volume dos soros disponíveis. Alguns pacientes apresentavam somente 1,2 mL disponíveis para a realização de todos os testes. Este foi também um dos motivos que nos levou a testar somente quatro doadores para o HLA nesta metodologia, diferentemente da técnica PIFT, na qual testamos 6 doadores.

3.6.4 Técnica de Linfocitotoxicidade (figura 6). - Detecção de anticorpos HLA

3.6.4.1 Preparação dos linfócitos (vide no anexo 10 os fenótipos dos doadores utilizados)

Foram coletados 10,0 mL de sangue total de cada doador em anticoagulante citrato (ACD) ou EDTA. Este sangue foi diluído, volume a volume, com PBS (tampão fosfato, pH 7,4) e 10 mL desta diluição foram adicionados cuidadosamente sobre 4,0 mL do gradiente de concentração FICOLL-PAQUE[®] (Amersham Biosciences[®], EUA) com

densidade de 1,077 g/mL. Este tubo foi centrifugado a 1.500 g por 15 minutos, e após centrifugação, a camada central onde se localiza a camada leuco-plaquetária foi retirada cuidadosamente com pipetas do tipo Pasteur. As células presentes nesta camada foram transferidas para outro tubo e lavadas duas vezes com meio McCoy 5A (Biosource®, EUA) centrifugando-se por 700 g por oito minutos. Após as lavagens, as células foram resuspensas em 2,0 mL e foi adicionada 50 µL de trombina bovina para remoção das plaquetas “contaminantes”. O agregado plaquetário formado foi removido por centrifugação a 700 g por 10 segundos. O sobrenadante (contendo os linfócitos) foi transferido para outro tubo e mais uma lavagem com meio McCoy 5A (Biosource®, EUA) foi realizada. A concentração celular foi acertada para $3,0 \times 10^6$ /mL e a viabilidade avaliada pelo teste com corante Azul de Trypan (0,4% em PBS). Este teste consiste em misturar 50 µL do corante com 50 µL da suspensão celular, deixar a temperatura ambiente por três minutos e realizar a leitura das células viáveis em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico. As células viáveis são as células não coradas enquanto as células mortas são coradas. Para uso no teste de linfocitotoxicidade foram utilizadas as suspensões apresentando viabilidade acima de 90%.

3.6.4.2 Teste

Em placas do tipo “Terasaki”, 1 µL da suspensão de linfócitos (tipados para HLA classe I, vide anexo 10) preparados conforme item 3.6.4.1, foi incubado a 22°C por 30 minutos, com 1 µL do soro a ser analisado. Após incubação, adicionou-se 5 µL de soro contendo complemento de coelho e incubou-se por uma hora a 22°C. A seguir foi adicionado 10 µL de corante STAIN-FIX® (One Lambda, Inc). Após no mínimo 30 minutos da adição do corante foi realizada a leitura das placas em microscópio com contraste de fase. Na presença de anticorpos citotóxicos no soro testado ocorrerá a entrada do corante nas células (linfócitos) testadas devido à lise causada pelo anticorpo na membrana linfocitária. As células viáveis (não afetadas) são pequenas e refrateis e não absorvem o

corante, enquanto as células mortas absorvem o corante, são maiores e coram-se azul escuro. O resultado é dado conforme o “score” abaixo:

Score	Interpretação	% células mortas
0	Sem leitura	
1	Negativo	0-10
2	Negativo duvidoso	11-20
4	Fraco Positivo	21-50
6	Positivo	51-80
8	Fortemente Positivo	81-100

Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram no mínimo “score” 4 em pelo menos dois doadores testados ou “score 8” com no mínimo um doador testado.

3.6.5 Teste de Citometria com micropartículas marcadas (Flow PRA™, One Lambda, Inc., EUA) - Detecção de anticorpos HLA (figura 7).

Um total de 5 µL de um “pool” de 30 diferentes micropartículas não fluorescentes (2 a 4 µm de diâmetro) recobertas com diferentes antígenos HLA classe I purificados (para a composição vide anexo 10) foi adicionado com 20 µL do soro do paciente e incubou-se por 30 minutos a 20-25°C com suave agitação. Após duas lavagens (centrifugando-se a 1.600 g por 10 minutos a 22°C e desprezando o sobrenadante) com tampão que acompanha o reagente, foram adicionados 100 µL do soro anti-IgG humana marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (que também acompanha o kit). Incubou-se por 30 minutos a 22°C e ao abrigo da luz. Nova lavagem com tampão que acompanha o reagente foi realizada e as micropartículas foram resuspensas em 0,5 mL de tampão PBS. A análise das micropartículas foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton Dickinson) equipado com laser de argônio cujo espectro de emissão é de 488 nm. A aquisição e análise dos resultados foram realizadas com auxílio

do software CellQuest[®] (Becton Dickinson). Selecionou-se a população das micropartículas através da análise de gráfico de pontos com o detector “FSC” pelo detector “SSC”, conforme descrição do fabricante. Foi desenhada uma região ao redor das micropartículas e 10.000 eventos foram adquiridos para esta região. Os resultados das reações dos soros testes foram definidas através de histogramas de intensidade de fluorescência (captados no detector FL1) e comparados com soros controles positivos e negativos. (Vide Anexo 13).

As metodologias testadas, como MAIPA e PIFT, não estão disponíveis comercialmente, mas foram por nós desenvolvidas e validadas com controles internos e externos e participação nos Workshops Internacionais realizados em 2000, 2002, 2004 e 2006 pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT)^{30,42,44}. Durante estes workshops, recebemos diversas amostras de soro para identificação de variadas especificidades de anticorpos como anti-HLA classe I, anti-HPA-1a, anti-HPA-1b, anti-HPA-5b entre outros, assim como exercícios de titulação de algumas amostras de referência. Nossos testes sempre demonstraram alto percentual de acerto em todos os workshops, assim como alta reprodutibilidade nos testes de titulação. Para os controles internos, foram utilizados soros de pacientes contendo anticorpos conhecidos (anti-HLA classe I, anti-HPA-1a) que foram devidamente titulados e resultados comparados periodicamente para determinação de sensibilidade. Para controle de especificidade, soros controles não reativos provenientes de doadores de sangue do sexo masculino foram testados para cada metodologia. Para todo teste realizado durante este estudo, controles internos positivos e negativos foram corridos em paralelo aos soros dos pacientes. Caso houvesse alguma falha nestes controles, novo teste seria realizado (fato não concretizado, pois os controles foram sempre concordantes com o resultado apresentado).

As técnicas LCT e Flow PRA™ foram validadas com os mesmos controles internos e externos utilizados na validação das técnicas MAIPA e PIFT.

3.6.6 Provas de Compatibilidade

Para a realização de provas de compatibilidade, o soro do paciente é testado com a plaqueta transfundida. Sendo assim, toda vez que algum paciente da FASE 2 recebeu transfusão de plaquetas, uma pequena alíquota destas plaquetas foi removida, foi adicionado o dimetilsulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10%, volume a volume, e colocado em container de nitrogênio (N₂) líquido para congelamento. No momento do teste, estas plaquetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, lavadas três vezes com solução de PBS contendo EDTA 0,01 M e Albumina bovina 0,2% e acertada sua concentração de acordo com item 3.6.1. O soro do paciente foi testado então com estas plaquetas pela técnica de PIFT e MAIPA (item 3.6.2 e item 3.6.3).

3.6.7 Realização do ICCp pós transfusional

Para a realização do cálculo do ICCp, foi coletada de cada paciente que recebeu transfusão de plaquetas (somente FASE 2), uma amostra de 5,0 mL de sangue total em tubo contendo anticoagulante imediatamente antes da transfusão, e outra amostra de sangue total (2,0 mL) após uma hora da transfusão de plaquetas (tempo máximo de tolerância: duas horas). Estas amostras foram utilizadas para contagem de plaquetas PRÉ e PÓS transfusional. A contagem de plaquetas foi feita em aparelho hematológico COBAS ABX-Diagnóstica conforme instruções do IHSL.POP.PR.024. Caso a contagem ficasse fora da faixa de sensibilidade do aparelho (abaixo de 40.000/ μ L), foi realizada a contagem microscópica em câmara de Neubauer, conforme instruções padronizadas no IHSL.POP.PR.025-01. Após as contagens, foi realizado então o cálculo do ICCp conforme a fórmula a seguir:

Fórmula 1: Cálculo do Incremento plaquetário corrigido (ICCp):

$$\frac{(\text{Contagem de plaquetas Pós} - \text{Pré do paciente})}{\text{número de plaquetas transfundidas (x10}^{11}\text{)}} \times \text{Volume corpóreo do paciente}$$

*: valor fornecido pelo controle de qualidade do banco de sangue onde é feita a contagem em aparelho hematológico COBAS ABX-Diagnóstica de todas as plaquetas coletadas neste Serviço.

O volume corpóreo do paciente foi calculado conforme critério de Du Bois & Du Bois⁶¹, baseado no peso e altura do paciente.

Se ICCp (com coleta após uma hora da transfusão) inferior a 5.000/ μ L, no mínimo após dois eventos transfusionais, considerou-se que a transfusão foi ineficaz e o paciente apresenta refratariedade plaquetária de causa imune^{58,62} e, portanto, se na presença de aloanticorpo plaquetário, o mesmo foi considerado de importância clínica e causador da ineficácia da transfusão de plaquetas.

Se ICCp (com coleta após uma hora da transfusão) superior ou igual a 5.000/ μ L considerou-se a transfusão eficaz e paciente sem refratariedade plaquetária de causa imune, independente da presença ou não de anticorpos. Se anticorpo presente, não apresentou importância clínica para a transfusão.

3.6.8 Genotipagem para alelos HPAs

A camada leuco-plaquetária do paciente que foi congelada a -30°C (item 3.4.2) foi descongelada em banho maria a 37°C e o DNA foi extraído dos leucócitos presentes pelo reagente DNAzol[®] (Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA) . Após extração este DNA foi testado pela técnica de PCR (protein chain reaction) por seqüência específica de “primer” (SSP) para os HPA-1, 2, 3, 4, 5, 6 utilizando os “primers” e condições de reação de acordo com Meyer e colaboradores²⁸ e, para o HPA-15 de acordo com Schuh e colaboradores⁶³.

3.7 Análise Estatística

A análise das idades, peso, dose infundida entre os grupos estudados foi feita pelo teste ANOVA “oneway” (incluindo teste de Bartlett para testar igualdade entre as variâncias. Se o teste de Bartlett apresentou $p < 0,05$, foi realizado adicionalmente o teste de Kruskal-Wallis para confirmar a significância encontrada). Também foi utilizado o teste t de Student para comparação das idades, peso e dose infundida entre sexos. Para demonstração dos dados foram utilizados gráficos do tipo “Box-Plot” no qual calcula-se os dados de mediana e os valores de inter-quartil (IQ) de 25 e 75%, além dos limites mínimos e máximos dados pela fórmula: valor do 1º IQ (25%) – $1,5 \times (3^\circ \text{ IQ} - 1^\circ \text{ IQ})$ para o valor mínimo e a fórmula: valor do 3º IQ + $1,5 \times (3^\circ \text{ IQ} - 1^\circ \text{ IQ})$ para o valor máximo. Pontos acima ou abaixo dos limites indicam “outlier”.

Para verificar semelhança entre as frequências dos anticorpos encontrados, nas diversas combinações propostas entre as amostras PRÉ e PÓS, na fase 1 e 2 do estudo, foi realizado o teste de Qui-Quadrado e o teste exato de Fisher⁶⁴.

Para análise da influência do sexo na relação dos resultados dos testes e a fase do estudo foi realizado o teste de Mantel-Haenszel (Mantel e Haenszel 1959) comparando o resultado de cada par (PRÉ e PÓS) de cada teste controlado por sexo e testado as homogeneidades dos “Odds-ratio” (OR) entre os sexos (Breslow e Day, 1993).

Para a comparação do desempenho entre as metodologias utilizadas (PIFT, Flow PRATM, MAIPA e LCT) foram empregadas duas técnicas estatísticas: o índice Kappa de Cohen⁶⁵ que verifica o grau de concordância entre as metodologias utilizando uma tabela comparativa baseada nos seguintes valores: índice kappa: $< 0,20$ = concordância pobre; de 0,21 a 0,40 = concordância fraca; de 0,41 a 0,60 = concordância moderada; de 0,61 a 0,80 = concordância boa; de 0,81 a 1,0 = concordância muito boa; e a análise da curva ROC (Receiver Operator Characteristics)⁶⁶ que é usada para quantificar a acurácia de testes diagnósticos. A acurácia discriminatória de um teste de diagnostico é medida pela

sua habilidade de corretamente classificar um indivíduo como normal e anormal (neste estudo, se paciente realmente apresenta ou não anticorpos plaquetários). Nesta análise (curva ROC), o desempenho global do teste é normalmente resumida pela área sobre a curva ROC. Quanto maior a área sobre a curva ROC, melhor o desempenho do teste diagnóstico. Inicialmente, para a avaliação da curva ROC foi utilizado cada um dos testes como sendo o padrão de referência para verificar a variação de suas associações e na fase final foi usada a refratariedade imune como padrão de referência para análise de suas associações.

Além da análise da área sobre a curva ROC, foi incluído o teste de Bonferroni⁶⁷ para avaliar o grau de associação entre as áreas das curvas e, após a definição da refratariedade imune pelo ICCp, foram realizados cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo para cada metodologia.

O teste de McNemar e simetria⁶⁴ foram realizados para verificar se houve associação entre as transfusões e presença de anticorpos plaquetários pós transfusional.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados pelo software STATA versão 8.0.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Sírio Libanês (Processo HSL 2002/09) (anexo 14) e pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (10/10/2002) (anexo 15).

4.0 RESULTADOS

4.1 Resultados dos Testes Laboratoriais

4.1.1 Descrição dos resultados encontrados

Para cada paciente estudado foram analisadas uma amostra PRÉ transfusional e outra PÓS transfusional, sendo que para a fase 1 o intervalo entre elas foi de 89 ± 44 dias (mediana = 87) para grupo 1 e 236 ± 358 dias (mediana = 82) para grupo 2 e 3 (lembrando que o grupo 3 não recebeu transfusão, e o que chamaremos de amostra PÓS, exclusivamente para este grupo, refere-se a uma segunda amostra coletada do paciente internado para tratamento). Para a fase 2, por ser um estudo prospectivo, a variação dos intervalos entre as amostras foi menor, sendo 80 ± 33 dias (mediana = 91) o intervalo entre as amostras PRÉ e PÓS, para todos os pacientes avaliados.

Foram encontradas quatro combinações de resultados entre as amostras PRÉ e PÓS transfusional de cada paciente, sendo elas: pacientes com amostra PRÉ reativa e amostra PÓS também reativa (paciente já internou apresentando anticorpos e que continuaram a ser detectados após o período do estudo); pacientes apresentando amostra PRÉ reativa com amostra PÓS não reativa (paciente internou com anticorpos que não foram detectados após o período do estudo); amostra PRÉ não reativa com amostra PÓS reativa (provável produção de anticorpos estimulada pela transfusão durante o período do estudo); ambas as amostras não reativas (ausência de produção de anticorpos). Estas quatro combinações foram detectadas para as quatro metodologias testadas (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT) nos três grupos avaliados e estão descritas na figura 15 e tabela 8.

4.1.2 Pacientes apresentando amostras PRÉ e PÓS transfusionais reativas (Figura 15^A e tabela 8):

Na fase 1, a combinação amostra PRÉ e PÓS reativas foi detectada por todas as quatro metodologias nos grupos 1 e 2, variando a sua frequência dependendo da metodologia

empregada. Para o grupo 3, apenas a técnica MAIPA e Flow PRA™ detectaram pacientes apresentando este perfil (figura 15A) sendo para o MAIPA 2 pacientes (9%), e para o Flow PRA™ um paciente (4%). Como esta combinação pode ser devido à sensibilização previa do paciente (provável transfusão ou gravidez anterior a internação e ao estudo), é justificável esta positividade detectada no grupo 3, pois estes três pacientes são do sexo feminino com história de gravidez prévia.

Já na fase 2, o grupo 1 e 2 apresentaram esta combinação em todas as técnicas numa frequência similar à fase 1 (variando com a técnica utilizada, de 6-19% para o grupo 1 e 3-17% para grupo 2). Não houve diferença significativa entre as frequências para o grupo 1 e 2 para as técnicas PIFT, MAIPA e Flow PRA™ ($p>0,05$). Porém para o teste LCT na fase 2, especialmente para o grupo 2, foi observado queda maior na frequência nesta combinação ($p=0,049$). O grupo 3 demonstrou queda na frequência, sendo detectado apenas um (3%) paciente (sexo masculino, PRA=15% na PRÉ e PÓS, sem história de transfusão previa) e somente pela técnica Flow PRA™ (porém sem significância estatística: $p>0,05$).

4.1.3 Pacientes apresentando amostra PRÉ reativa com amostra PÓS transfusional não reativa (Figura 15B e tabela 8):

A combinação de amostra PRÉ reativa com amostra PÓS não reativa demonstra o desaparecimento do anticorpos inicialmente reativos e este fenômeno já está descrito por outros autores^{68,69}. Este desaparecimento dos anticorpos após transfusão já foi descrito tanto em pacientes recebendo tratamento imunossupressor⁶⁸ como em pacientes sem este tipo de tratamento⁶⁹. Na fase 1 um pequeno número de pacientes apresentou esta combinação para as técnicas testadas, com exceção da técnica PIFT, que detectou 13% no grupo 2. O restante ficou entre 3 a 7%, que equivale a um e dois pacientes, respectivamente. O grupo 3 não apresentou nenhum paciente com este perfil. Na fase 2 também poucos pacientes apresentaram este perfil (de 0 a 9%, dependendo da técnica

utilizada), porém houve uma queda significativa para o grupo 2 pela técnica PIFT ($p<0,05$) demonstrando que provavelmente houve reações inespecíficas da técnica PIFT na fase 1 do estudo. Verificou-se também um aumento pela técnica Flow PRA™ no grupo 1 (de 3% na fase 1 para 9% na fase 2), porém sem significância estatística ($p>0,05$).

4.1.4 Pacientes apresentando amostra PRÉ não reativa com amostra PÓS transfusional reativa (Figura 15C e tabela 8):

A combinação amostra PRÉ não reativa com amostra PÓS reativa demonstraria o efeito da transfusão (no grupo 1 e 2) como estimulador da produção dos anticorpos detectados, e o grupo 3, como não recebeu transfusão, não deveria apresentar reatividade, sendo portanto, a combinação que mais nos interessa para verificar o efeito da transfusão na aloimunização dos pacientes. Houve uma grande variação na frequência encontrada com as diferentes técnicas utilizadas. Em ambas as fases, o grupo 1, independente da técnica utilizada, demonstrou sempre uma frequência menor de positividade quando comparado com o grupo 2, justificável pela sua imunossupressão já mencionada. Na fase 1 a técnica Flow PRA™ foi a que detectou o maior número de pacientes com anticorpos (30%) no grupo 2, demonstrando talvez uma maior sensibilidade, fato este que não se repetiu com o grupo 1 (PIFT foi o que mais detectou na fase 1: 12%). Ainda na fase 1 a técnica PIFT foi a única que detectou uma positividade em dois (9%) pacientes do grupo 3. Destes 2 pacientes, um apresentou reatividade nas amostra PRÉ e PÓS pela técnica MAIPA, Flow PRA™ e LCT, demonstrando que a técnica PIFT falhou na amostra PRÉ transfusional. O outro paciente (pertencente ao sexo feminino, porém sem história de gravidez prévia) apresentou positividade somente pela técnica PIFT na amostra PÓS transfusional. Já na fase 2 o grupo 1 continuou com frequência pequena de 0-6% sendo que novamente houve uma queda para a técnica PIFT (de 12% na fase 1 para 0% na fase 2, $p=0,055$). Já para o grupo 2 o MAIPA

detectou mais pacientes nesta combinação do que o Flow PRA™ (MAIPA 23% e Flow PRA™ 14%) porém sem significância estatística quando comparadas as duas fases. O grupo 3 na fase 2, não apresentou pacientes nesta combinação, conforme esperado, devido à não realização de transfusão neste grupo.

4.1.5 Pacientes apresentando amostra PRÉ não reativa com amostra PÓS não reativa (Figura 15D e tabela 8):

Esta última combinação demonstra os pacientes que não apresentaram anticorpos para as técnicas avaliadas. Como a técnica Flow PRA™ foi a técnica que mais detectou anticorpos, conseqüentemente para esta combinação, apresentou os menores valores. O grupo 3, conforme esperado, apresentou 100% dos pacientes dentro desta combinação, especialmente na fase 2 do estudo pelas técnicas de PIFT, MAIPA, e LCT, enquanto que na fase 1 somente pela técnica de LCT.

Figura 15: Combinações possíveis dos resultados das amostra PRÉ e PÓS transfusional de cada paciente (%) separados para cada metodologia avaliada (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT) e de acordo com a fase estudada.

15A: Amostras PRÉ reativas (+) com amostras PÓS reativas (+)

15B: amostras PRÉ reativas (+) com amostras PÓS não reativas (-).

Legenda: Figura 15A: amostras PRÉ reativas (+) com amostras PÓS reativas (+); 15B: amostras PRÉ reativas (+) com amostras PÓS não reativas (-). No eixo x encontram-se as metodologias utilizadas: PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT. Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle. Setas vermelhas na fase 1 e 2 com diferença significativa ($p < 0,05$).

Continuação: Figura 15: Combinações possíveis dos resultados das amostra PRÉ e PÓS transfusional de cada paciente (%) separados para cada metodologia avaliada (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT) e de acordo com a fase estudada.

15C: Amostra PRÉ não reativa (-) com amostra PÓS reativa (+)

15D: Amostras PRÉ não reativas (-) com amostras PÓS não reativas (-)

Legenda: 15C: amostras PRÉ não reativas (-) com amostras PÓS reativas (+); 15D: amostras PRÉ não reativas (-) com amostras PÓS não reativas (-). No eixo x encontram-se as metodologias utilizadas: PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT. Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle. Setas vermelhas na fase 1 e 2 com diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 8: Resultados das combinações possíveis entre as amostras PRÉ e PÓS transfusionais.

Percentagem de pacientes reativos em cada combinação possível das amostras PRÉ e PÓS Transfusionais de acordo com o teste realizado							
PRÉ / PÓS	Teste	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
		Fase 1	Fase 2	Fase 1	Fase 2	Fase 1	Fase 2
Pré+ Pós+	PIFT	6%	13%	13%	6%	0%	0%
	MAIPA	10%	13%	15%	6%	9%	0%
	FLOW	9%	16%	13%	17%	4%	3%
	LCT	19%	6%	17%	3%	0%	0%
Pré+ Pós-	PIFT	3%	6%	13%	0%	0%	0%
	MAIPA	6%	6%	3%	0%	0%	0%
	FLOW	3%	9%	3%	3%	0%	3%
	LCT	3%	0%	7%	3%	0%	0%
Pré- Pós+	PIFT	12%	0%	19%	14%	9%	0%
	MAIPA	6%	3%	15%	23%	0%	0%
	FLOW	3%	6%	30%	14%	0%	0%
	LCT	9%	6%	7%	9%	0%	0%
Pré- Pós-	PIFT	79%	81%	55%	80%	91%	100%
	MAIPA	77%	78%	68%	71%	91%	100%
	FLOW	85%	66%	53%	66%	96%	94%
	LCT	69%	88%	69%	86%	100%	100%

Legenda: Pré+Pós+: pacientes com amostras PRÉ e PÓS transfusionais reativas; Pré+Pós-: pacientes com amostras PRÉ reativas e PÓS não reativas; Pré-Pós+: pacientes com amostras PRÉ não reativas e PÓS reativas; Pré-Pós-: pacientes com amostras não reativas. Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle. Grifado em amarelo: pares entre fase 1 e 2 que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

Como a distribuição entre os sexos na fase 1 e 2 não foi muito homogênea para o grupo 1 (vide tabela 4 – tendência de maior número de mulheres no grupo 1 da fase 2) foram calculados os “Odds Ratios” (OR) (razão de probabilidade) de Mantel-Haenszel (Mantel e Haenszel, 1959) do resultado de cada par (pré e pós) de cada teste, controlando por sexo e testadas as homogeneidades dos OR entre os sexos (Breslow e Day, 1993).

Pela Tabela 9, tem-se que o OR de cada par (pré e pós) para cada teste usado para verificar associação entre a positividade do teste e a fase, é estatisticamente homogêneo entre os sexos ($p > 0,05$), e que não existe associação entre a positividade do teste e a fase, pois todos os intervalos de confiança contêm o 1. Sendo assim o sexo não afetou os resultados.

Também foi testada a possível interferência das idades nos resultados encontrados pois houve diferença significativa nas idades para o grupo 1 da fase 2 (vide tabela 5). Para tal análise foram retirados do grupo 1 da fase 2 oito pacientes com idade inferior a 50 anos fazendo com que não houvesse mais diferença significativa nas idades entre os grupos (grupo 1 passou a ter 24 pacientes com idade média de $65,5 \pm 10,6$ anos e mediana de 63,5 anos). Assim, foram recalculadas as frequências de cada par de cada teste para este grupo e comparado (técnica estatística do Chi-quadrado e teste exato de Fisher) com os resultados anteriores apresentados pelos 32 pacientes do grupo 1 da fase 2. Não houve diferença para nenhum par de resultado encontrado ($p > 0,05$).

Tabela 9. Razão de Probabilidade (OR) de Mantel-Haenszel para cada par de cada teste e respectivo teste de homogeneidade de OR, comparando fase 1 e 2.

Testes	Resultado	OR (Mantel-Haenszel)	IC (95%)		Qui-quadrado	GL	p
			Inferior	Superior			
PIFT	pré+pós+	1,54	0,26	8,98	1,35	1	0,246
	pré+pós-	1,29	0,10	16,04			#
	pré-pós+						#
	pré-pós-	1,42	0,39	5,16	0,60	1	0,440
FLOW	pré+pós+	1,93	0,40	9,29	0,02	1	0,881
	pré+pós-	3,14	0,25	38,79	2,68	1	0,102
	pré-pós+	1,74	0,17	17,76	1,46	1	0,227
	pré-pós-	0,41	0,12	1,43	0,20	1	0,657
MAIPA	pré+pós+	1,12	0,22	5,68	0,11	1	0,744
	pré+pós-	1,01	0,11	9,46	2,67	1	0,103
	pré-pós+	0,37	0,03	5,10	0,36	1	0,549
	pré-pós-	1,19	0,34	4,18	0,93	1	0,336
LCT	pré+pós+	0,24	0,04	1,49	1,49	1	0,223
	pré+pós-						#
	pré-pós+	0,83	0,11	5,96	1,00	1	0,317
	pré-pós-	2,96	0,79	11,12	1,91	1	0,167

Não é possível calcular pela falta de observação de testes positivos em algum sub-estrato

Legenda: OR: "Odds-ratio" (razão de probabilidade); IC(95%): intervalo de confiança de 95%; GL: graus de liberdade; p significativo menor que 0,05; Pré+Pós+: pacientes com amostras PRÉ e PÓS transfusionais reativas; Pré+Pós-: pacientes com amostras PRÉ reativas e PÓS não reativas; Pré-Pós+: pacientes com amostras PRÉ não reativas e PÓS reativas; Pré-Pós-: pacientes com amostras não reativas.

4.1.6 Avaliação das amostras independente da relação transfusional

Houve uma grande variação entre as técnicas empregadas para a detecção dos anticorpos, conforme já descrito em outros trabalhos⁴³ sendo que em torno de 50% das amostras reativas apresentaram positividade em apenas um teste isoladamente (Figura 16). Na fase 1 (figura 16A), em relação as amostras apresentando somente um único teste positivo, 59% (n= 19) foram reativas pela LCT, 19% (n=6) pela PIFT, 16% (n=5) pelo MAIPA e 6% (n=2) pelo Flow PRA™. Porém, na fase 2 (figura 16B) houve uma queda no número de amostras apresentando reatividade em um único teste, especialmente nas amostras PÓS (46% e 15,8% respectivamente na fase 1 e 2). Nas amostras PRE a queda menor (54% e 44% respectivamente na fase 1 e 2) pode ser devido a sensibilidade do teste Flow PRA™ ao detectar amostras com baixo PRA: 7 das 8 amostras PRÉ positivas foram reativas somente por Flow PRA™. Nas amostras PÓS reativas com um único teste, 100% (n=3) foram reativas somente pelo Flow PRA™.

Esta queda no número de amostras com um único teste positivo na fase 2 pode demonstrar que possivelmente a qualidade das amostras na fase 1 pode ter acarretado reações inespecíficas nos testes utilizados.

4.2 Comparação do desempenho entre as metodologias utilizadas

4.2.1 Análise pelo índice Kappa

Quando utilizado o índice de concordância Kappa, verificou-se na fase 1 que para as amostras PRÉ transfusionais a melhor concordância encontrada foi para o teste Flow PRA™ e MAIPA quando todas as 87 amostras foram analisadas (Kappa=0,7102 = boa concordância) (tabela 10). Porém, ao separar-se as amostras pelos grupos, verificou-se que para o grupo 1 amostras PRÉ, a melhor concordância manteve-se com Flow PRA™ e MAIPA (kappa=0,8716 =muito boa concordância), mas para o grupo 2 amostras PRÉ, a melhor concordância foi para Flow PRA™ e PIFT (kappa= 0,7121 = boa concordância).

Figura 16: Distribuição das amostras PRÉ (16A) e PÓS (16B) transfusionais reativas, de acordo com o número de testes positivos (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT) nas duas fases estudadas.

Legenda: 4 testes+: as 4 técnicas utilizadas (PIFT, MAIPA, Flow PRA™, LCT) foram reativas com estas amostras; 3 testes+: 3 das 4 técnicas mencionadas foram positivas com estas amostras; 2 testes+: 2 das 4 técnicas mencionadas foram positivas com estas amostras; 1 teste+: apenas uma técnica foi positiva com estas amostras.

Tabela 10: Resultados do índice de concordância kappa (κ) entre os diversos testes utilizados para as amostras PRÉ transfusionais. Dados na tabela dispostos como: **Fase 1 / Fase 2.**

Grupo analisado	Testes	Testes			
		FLOW	MAIPA	PIFT	LCT
1,2,3 (n=87/ n=96)	FLOW	1			
	MAIPA	0,7102 / 0,5940	1		
	PIFT	0,5128 / 0,5940	0,3919 / 0,8636	1	
	LCT	0,1485 / 0,2340	0,2465 / 0,2941	0,1075 / 0,2941	1
1 (n=33 / n=32)	FLOW	1			
	MAIPA	0,8716 / 0,8182	1		
	PIFT	0,2029 / 0,8182	0,4359 / 0,7949	1	
	LCT	0,0326 / 0,3333	0,0123 / 0,4483	0,0833 / 0,4483	1
2 (n=31/ n=35)	FLOW	1			
	MAIPA	0,5862 / 0,3902	1		
	PIFT	0,7121 / 0,3902	0,3787 / 1,0000	1	
	LCT	0,1724 / 0,1463	0,4351 / 0,0606	0,0237	1

Legenda: índice de concordância kappa: pobre <0,20; fraca de 0,21 a 0,40; moderada de 0,41 a 0,60; boa de 0,61 a 0,80; muito boa de 0,81 a 1,0. Não foi possível calcular o grupo 3 isoladamente devido à baixa variabilidade dos resultados (95% não reativos). Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle.

Para o grupo 3 não foi possível realizar-se o cálculo, devido a pequena variação no desfecho (grande maioria das amostras são negativas).

Na fase 2 para as amostras PRÉ, houve uma queda na concordância, quando todos os dados foram analisados conjuntamente (grupo 1, 2 e 3 - tabela 10). Esta queda no geral ocorreu, pois houve queda na concordância no grupo 2 amostras PRÉ, mais especificamente devido à detecção de amostras com baixo PRA pela técnica Flow PRA™. Devido a este fato obteve-se a melhor concordância para PIFT e MAIPA no grupo 2 ($\kappa = 1,0000$ = muito boa concordância). Já as amostras PRÉ do grupo 1 apresentaram resultados semelhantes à fase 1, sendo a técnica MAIPA e Flow PRA™ ($\kappa = 0,8182$ = muito boa concordância) as mais concordantes para este grupo e melhora na concordância entre as técnicas PIFT e Flow PRA™ ($\kappa = 0,8182$ = muito boa concordância) não havendo distinção entre a concordância do MAIPA e PIFT com a técnica Flow PRA™ (tabela 10).

Para as amostras PÓS transfusionais (tabela 11) a fase 1 demonstrou melhor concordância entre o Flow PRA™ e MAIPA quando todas as 87 amostras foram analisadas ($\kappa = 0,6175$ = boa concordância) porém, ao analisar-se separadamente amostras PÓS do grupo 1, nenhuma boa concordância entre os testes foi verificada (melhor combinação: PIFT e MAIPA com κ de 0,5714 = moderada concordância) e para as amostras PÓS do grupo 2 manteve-se a melhor concordância para Flow PRA™ e PIFT ($\kappa = 0,7949$: boa concordância).

As amostras PÓS na fase 2 demonstraram melhora geral nas concordâncias (especialmente no grupo 1), outro fato que pode demonstrar que a qualidade das amostras na fase 1 pode ter interferido nos testes da fase 1. As técnicas Flow PRA™ e MAIPA apresentaram as melhores concordâncias para as amostras PÓS quando todos os grupos são analisados conjuntamente ($\kappa = 0,8571$ = muito boa concordância), e

Tabela 11: Resultados do índice de concordância kappa (κ) entre os diversos testes utilizados para as amostras PÓS transfusionais. Dados na tabela dispostos como: **Fase 1 / Fase 2.**

Grupo analisado	Testes	Testes			
		FLOW	MAIPA	PIFT	LCT
1,2,3 (n=87/ n=96)	FLOW	1			
	MAIPA	0,6175 / 0,8571	1		
	PIFT	0,5797 / 0,6875	0,5480 / 0,8227	1	
	LCT	0,1249 / 0,5378	0,1014 / 0,5610	0,0654 / 0,5922	1
1 (n=33/ n=32)	FLOW	1			
	MAIPA	0,3515 / 0,7947	1		
	PIFT	0,0638 / 0,6737	0,5714 / 0,8710	1	
	LCT	0,1328 / 0,6737	0,0909 / 0,6129	0,1061 / 0,7143	1
2 (n=31/ n=35)	FLOW	1			
	MAIPA	0,6575 / 0,9320	1		
	PIFT	0,7947 / 0,7059	0,5714 / 0,7692	1	
	LCT	0,0201 / 0,4394	0,1671 / 0,4878	0,0680 / 0,4681	1

Legenda: índice de concordância kappa: pobre <0,20; fraca de 0,21 a 0,40; moderada de 0,41 a 0,60; boa de 0,61 a 0,80; muito boa de 0,81 a 1,0. Não foi possível calcular o grupo 3 isoladamente devido à baixa variabilidade dos resultados (95% não reativos). Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; grupo 3: grupo controle.

também para o grupo 2 ($\kappa = 0,9320$ = muito boa concordância). O grupo 1 apresentou boa concordância para Flow PRATM e MAIPA ($\kappa = 0,7947$ = boa concordância) porém a técnica MAIPA e PIFT apresentaram melhor concordância ($\kappa = 0,8710$ = muito boa concordância). Portanto, de acordo com a fase 2, não houve diferença entre PIFT, MAIPA e Flow PRATM para os grupos 1 e 2. A diferença vista na fase 1 pode ter sido devido à interferência da qualidade das amostras nos resultados da fase 1.

4.2.2 Análise pela Curva ROC

Para análise das curvas ROCs, inicialmente todos os resultados (todos os grupos) das amostras foram testados, separando-se apenas por amostras PRÉ e PÓS transfusionais. Na fase 1, para as amostras PRÉ, apenas a curva do teste Flow PRATM com MAIPA demonstrou semelhança significativa (teste de Bonferroni) ($p = 0,355$) e o Flow PRATM com PIFT ($p = 0,053$). Para as amostras PÓS, nenhuma semelhança significativa foi encontrada. Porém, ao analisarmos os grupos separadamente, verificamos que para as amostras PRÉ do grupo 1 (tabela 12 e figuras 17) na fase 1, a maior área obtida e com semelhança significativa entre as áreas (área: 0,98; $p = 0,95$) foi para Flow PRATM e MAIPA (independente se o padrão-referência foi o Flow PRATM ou MAIPA), e para as amostras PRÉ do grupo 2 (tabela 12 e figuras 18) foi Flow PRATM e PIFT (quando o padrão-referência foi Flow PRATM) (área: 0,93; $p = 0,21$). Para as amostras PÓS do grupo 1 (tabela 13 e figuras 19), houve uma redução nas áreas encontradas, sendo que a melhor área foi a combinação MAIPA e PIFT (área = 0,76; $p = 0,17$) enquanto que para o grupo 2 (tabela 13 e figuras 20) foi novamente a combinação Flow PRATM e PIFT (área=0,92; $p = 0,19$).

Tabela 12: FASE 1: Amostras PRÉ: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.

Teste de Referência	Teste	Grupo 1			Grupo 2		
		Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)	Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)
FLOW	MAIPA	0,9828	0,0172	0,9519	0,8375	0,1058	0,3734
	PIFT	0,5905	0,1273	0,0039	0,9375	0,0345	0,2097
	LCT	0,5216	0,1307	0,0008	0,5958	0,1296	0,0054
MAIPA	FLOW	0,9000	0,1000	0,9519	0,7630	0,1035	0,0662
	PIFT	0,6821	0,1238	0,0307	0,6948	0,1094	0,0159
	LCT	0,4929	0,1075	0,0000	0,7175	0,1077	0,0262
PIFT	FLOW	0,6167	0,1690	0,0699	0,8125	0,0915	0,1213
	MAIPA	0,7833	0,1690	0,5993	0,6786	0,1023	0,0050
	LCT	0,5667	0,1708	0,0335	0,5060	0,0947	0,0000
LCT	FLOW	0,5137	0,0782	0,0000	0,5747	0,0995	0,0001
	MAIPA	0,4945	0,0800	0,0000	0,7175	0,1077	0,0262
	PIFT	0,5330	0,0762	0,0000	0,5065	0,1042	0,0000

Legenda: teste de referência é o teste que foi utilizado como padrão ouro para o cálculo. Para o grupo 3 (controle) não foi possível cálculos devido à não variação no desfecho (para alguns testes 100% das amostras foram negativas). Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos. Grifado em amarelo encontram-se as curvas com melhores associações (sem diferença significativa entre as técnicas, $p > 0,05$).

Tabela 13: FASE 1: Amostras PÓS: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.

Teste de Referência	Teste	Grupo 1			Grupo 2		
		Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)	Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)
FLOW	MAIPA	0,6923	0,1478	0,1122	0,8221	0,0743	0,0500
	PIFT	0,5481	0,1301	0,0015	0,8846	0,0608	0,1733
	LCT	0,6154	0,1510	0,0326	0,4904	0,0826	0,0000
MAIPA	FLOW	0,6600	0,1256	0,0203	0,8284	0,0737	0,0596
	PIFT	0,7600	0,1256	0,1679	0,7745	0,0817	0,0173
	LCT	0,4400	0,1108	0,0000	0,5784	0,0856	0,0000
PIFT	FLOW	0,5400	0,1054	0,0000	0,9211	0,0430	0,1986
	MAIPA	0,7600	0,1256	0,1679	0,7947	0,0822	0,0375
	LCT	0,5600	0,1308	0,0023	0,4684	0,0845	0,0000
LCT	FLOW	0,5635	0,0805	0,0000	0,4870	0,1147	0,0000
	MAIPA	0,4603	0,0708	0,0000	0,6039	0,1138	0,0015
	PIFT	0,5397	0,0833	0,0000	0,4610	0,1061	0,0000

Legenda: teste de referência é o teste que foi utilizado como padrão ouro para o cálculo. Para o grupo 3 (controle) não foi possível cálculos devido à não variação no desfecho (para alguns testes 100% das amostras foram negativas). Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos. Grifado em amarelo encontram-se as curvas com melhores associações (sem diferença significativa entre as técnicas, $p>0,05$).

Porém na fase 2, ao analisarmos todas as amostras PRÉ transfusionais, apenas a técnica MAIPA com PIFT demonstraram semelhança significativa ($p>0,05$). Devido ao fato do Flow PRA™ ter detectado maior número de amostras com baixo PRA (especialmente no grupo 2) fez com que diminuísse a concordância com o MAIPA e PIFT (fato também observado na análise com o método kappa). Ao separarmos os grupos, para o grupo 1 nas amostras PRÉ (tabela 14 e figuras 17) encontrou-se que tanto o MAIPA como o PIFT apresentaram idêntica concordância com Flow PRA™ (área= 0,96; $p=0,44$). E nas amostras PÓS deste grupo houve uma melhora significativa nas concordâncias quando comparado com o grupo 1 da fase 1. Esta melhora na concordância ocorreu entre todos os testes, inclusive com o teste de LCT (tabela 15 e figuras 19). Nas amostras PÓS do grupo 1 a melhor área obtida foi com a combinação PIFT e MAIPA (área: 0,98; $p=0,95$) seguido do MAIPA e Flow PRA™ (área: 0,96; $p=0,44$). Para o grupo 2, mais uma vez, devido ao alto número de amostras com baixo PRA detectado pelo Flow PRA™, a semelhança entre as curvas caiu em relação ao Flow PRA™, sendo que a melhor semelhança encontrada foi para PIFT e MAIPA (área=1,00) nas amostras PRÉ e para as amostras PÓS foi a combinação Flow PRA™ e MAIPA (área=0,98; $p=0,95$) seguido do PIFT e MAIPA (área=0,94; $p=0,21$) (tabelas 14 e 15, figuras 18 e 20).

Tabela 14: FASE 2; Amostras PRÉ: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.

Teste de Referência	Teste	Grupo 1			Grupo 2		
		Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)	Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)
FLOW	MAIPA	0,8750	0,818	0,3799	0,6429	0,0922	0,0003
	PIFT	0,8750	0,0818	0,3799	0,6429	0,0922	0,0003
	LCT	0,6250	0,0818	0,0000	0,5536	0,0736	0,0000
MAIPA	FLOW	0,9615	0,0266	0,4467	0,9242	0,0317	0,0505
	PIFT	0,8974	0,0855	0,6913	1,0000	0,0000	#
	LCT	0,6667	0,1054	0,0047	0,4697	0,0211	0,0000
PIFT	FLOW	0,9615	0,0266	0,4467	0,9242	0,0317	0,0505
	MAIPA	0,8974	0,0855	0,6913	1,0000	0,0000	#
	LCT	0,6667	0,1054	0,0047	0,4697	0,0211	0,0000
LCT	FLOW	0,9000	0,0371	0,0213	0,6591	0,2523	0,5300
	MAIPA	0,9333	0,0316	0,1040	0,4697	0,0211	0,0000
	PIFT	0,9333	0,0316	0,1040	0,4697	0,0211	0,0000

Legenda: teste de referência é o teste que foi utilizado como padrão ouro para o cálculo.

Para o grupo 3 (controle) não foi possível cálculos devido à não variação no desfecho (para alguns testes 100% das amostras foram negativas). Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos. Grifado em amarelo encontram-se as curvas com melhores associações (sem diferença significativa entre as técnicas, $p > 0,05$). #: não foi possível realizar cálculos devido à valores idênticos.

Tabela 15: FASE 2: Amostras PÓS: valores da curva ROC com cálculo do erro-padrão e teste de hipótese de Bonferroni para determinar diferença significativa entre as curvas.

Teste de Referência	Teste	Grupo 1			Grupo 2		
		Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)	Área ROC	Erro padrão	P(Bonferroni)
FLOW	MAIPA	0,8571	0,0922	0,3640	0,9545	0,0455	0,9519
	PIFT	0,7857	0,1010	0,1017	0,8182	0,0761	0,0505
	LCT	0,7857	0,1010	0,1017	0,6818	0,0761	0,0001
MAIPA	FLOW	0,9615	0,0266	0,4467	0,9800	0,0200	0,9519
	PIFT	0,9000	0,1000	0,9519	0,8500	0,0764	0,1486
	LCT	0,7808	0,1240	0,2310	0,7000	0,0816	0,0007
PIFT	FLOW	0,9444	0,0308	0,2143	0,9286	0,0337	0,1017
	MAIPA	0,9815	0,0185	0,9519	0,9464	0,0298	0,2156
	LCT	0,8565	0,1264	0,7682	0,6964	0,1026	0,0092
LCT	FLOW	0,9444	0,0308	0,2143	0,8871	0,0382	0,0093
	MAIPA	0,8380	0,1276	0,6125	0,9032	0,0361	0,0219
	PIFT	0,8565	0,1264	0,7682	0,8105	0,1287	0,4225

Legenda: teste de referência é o teste que foi utilizado como padrão ouro para o cálculo. Para o grupo 3 (controle) não foi possível cálculos devido à não variação no desfecho (para alguns testes 100% das amostras foram negativas). Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos. Grifado em amarelo encontram-se as curvas com melhores associações (sem diferença significativa entre as técnicas, $p > 0,05$).

Figura 17: Curvas ROC para as amostras PRÉ do grupo 1 utilizando diferentes padrão-ouro (“Gold Standard”) para análise.

FASE 2

Figura 17A e 17E: utilizando Flow PRA™ como a técnica de referência; 17B e 17F: PIFT como técnica de referência; 17C e 17G: MAIPA como técnica de referência; 17D e 17H: LCT como técnica de referência.

Figura 18: Curvas ROC para as amostras PRÉ do grupo 2 utilizando diferentes padrão-ouro (“Gold Standard”) para análise.

FASE 2

Figura 18A e 18E: utilizando Flow PRA™ como a técnica de referência; 18B e 18F: PIFT como técnica de referência; 18C e 18G: MAIPA como técnica de referência; 18D e 18H: LCT como técnica de referência.

Figuras 19: Curvas ROC para amostras PÓS do grupo 1 utilizando diferentes padrão-ouro ("Gold Standard") para análise.

Figura 19A e 19E: utilizando Flow PRA™ como a técnica de referência; 19B e 19F: PIFT como técnica de referência; 19C e 19G: MAIPA como técnica de referência; 19D e 19H: LCT como técnica de referência.

Figuras 20: Curvas ROC para amostras PÓS do grupo 2 utilizando diferentes padrão-ouro ("Gold Standard") para análise.

Figura 20A e 20E: utilizando Flow PRA™ como a técnica de referência; 20B e 20F: PIFT como técnica de referência; 20C e 20G: MAIPA como técnica de referência; 20D e 20H: LCT como técnica de referência.

Portanto, baseado nestas duas análises (kappa e curva ROC) verificamos que **na fase 1**:

- Houve diferença no desempenho dos testes entre os grupos 1 e 2 analisados.
- Para o grupo 1 as metodologias mais semelhantes foram o MAIPA e Flow PRA™, especialmente para as amostras PRÉ. Surpreendentemente, quando utilizado as amostras PÓS, as metodologias não apresentaram a mesma semelhança. Para as amostras PÓS deste grupo, a melhor concordância encontrada foi entre o MAIPA e PIFT.
- Para o grupo 2 o PIFT e o Flow PRA™ foram as metodologias mais semelhantes, sendo que neste grupo, não verificamos diferença entre as amostras PRÉ e PÓS.

Porém, **na fase 2**, verificamos que:

- Deixou de existir diferença entre os grupos em relação à melhor semelhança entre os testes. Houve uma melhora geral nas concordâncias entre os testes, inclusive para LCT.
- Para o grupo 1: houve boa concordância tanto para o Flow PRA™ e MAIPA, assim como Flow PRA™ e PIFT. Diferentemente da fase 1, as amostras PÓS apresentaram boa concordância entre os testes, sendo o MAIPA e PIFT a melhor concordância, seguidos por MAIPA e Flow PRA™ e PIFT e Flow PRA™.
- Para o grupo 2: como já mencionado, o Flow PRA™ detectou mais amostras com PRA baixos, que não foram detectados por MAIPA e PIFT, fato este que fez com que caíssem as concordâncias entre os testes com Flow PRA™, especialmente nas amostras PRÉ, porém para as amostras PÓS, houve boa concordância entre Flow PRA™, MAIPA e PIFT.
- Para o grupo 3, independente da fase do estudo, não foi possível comparar as metodologias devido à baixa variabilidade dos resultados, pois, independente da metodologia utilizada, acima de 90% dos resultados foram negativos, (conforme

esperava-se), pois este foi o grupo controle que não recebeu transfusões de sangue durante o período do estudo.

Se considerarmos o Flow PRA™ como sendo a técnica que demonstrou maior sensibilidade, seja pelo maior número de testes reativos, seja pela sua maior representatividade dos antígenos HLA (anexo 10), e analisarmos o grau de reatividade apresentado nas amostras positivas por intermédio da análise do PRA (% de reatividade do painel de antígenos testados) verificou-se que quanto menor o PRA nas amostras Flow PRA™ reativas, menor também a concordância entre os outros testes (tabela 16). Ao verificar os resultados apresentados pelo MAIPA, PIFT e LCT para estas mesmas amostras verificamos que as maiores discordâncias encontram-se justamente nas amostras com menor grau de reatividade (PRA inferior a 20%) sendo que o MAIPA (60% de concordância na fase 1; 31% na fase 2) foi o mais concordante, seguido do PIFT (44,4% na fase 1 e 15% na fase 2) e por último o LCT (12,5% na fase 1 e 7,7% na fase 2).

4.2.3 Determinação da Prevalência dos Anticorpos HLA encontrados

Nas tabelas 17 (17A e 17 B) encontram-se as prevalências encontradas para os grupos 1 estudados (fase 1 e 2), variando de acordo com o teste utilizado. Na fase 1, as amostras PRÉ transfusionais demonstraram prevalência média de 9 a 21% e na fase 2, de 6 a 25%, dependendo da metodologia aplicada. Avaliando cada metodologia separadamente, não houve diferença significativa nas prevalências nas amostras PRÉ na fase 1 e 2 (teste Chi-quadrado, $p > 0,05$). Nas amostras PÓS na fase 1, as prevalências variaram de 12 a 28% e na fase 2, de 13 a 26%, também sem diferença significativa entre as fases.

Tabela 16: Valores do PRA (porcentagem de reatividade do painel de antígenos testado) encontrados nas amostras reativas pelo Flow PRA™, e comparadas com os resultados obtidos pelo MAIPA, PIFT e LCT.

	Valores do PRA no teste FLOW PRA							
	< 20%		21-40%		41 – 60%		>60%	
FASE	1	2	1	2	1	2	1	2
N total Flow PRA+	16	13	4	9	2	2	6	12
PIFT + / Flow PRA+ (%)	7 (44,4%)	2 (15%)	3 (75%)	5 (55,5%)	2 (100%)	1 (50%)	6 (100%)	11 (92%)
MAIPA +/- Flow PRA+ (%)	10 (60%)	4 (31%)	3 (75%)	4 (44,4%)	2 (100%)	1 (50%)	6 (100%)	11 (92%)
LCT + / Flow PRA+ (%)	2 (12,5%)	1 (7,7%)	0	0	0	2 (22,2%)	6 (100%)	8 (67%)

Legenda: PRA: porcentagem de reatividade contra o painel de antígenos testado; N: número encontrado.

Tabelas 17: Valores de prevalência encontrados no grupo 1 para os diferentes testes realizados. Tabela 17A: Valores para Fase 1; Tabela 17B: valores para fase 2.

17 A: Prevalência de Anticorpos – Grupo 1 – FASE 1				
AMOSTRA	Flow PRA	MAIPA	PIFT	LCT
PRÉ	12%	15%	9,1%	21%
	(3,4 – 28,2%)	(5,1 – 31,9%)	(1,9 – 24,3%)	(9 – 38,9%)
PÓS	12%	16%	18%	28%
	(3,4 – 28,2%)	(5,5 – 33,7%)	(7,0 – 35,5%)	(14 – 46,7%)

17 B: Prevalência de Anticorpos – Grupo 1 – FASE 2				
AMOSTRA	Flow PRA	MAIPA	PIFT	LCT
PRÉ	25%	18,8%	18,8%	6,3%
	(11,5 – 43,4%)	(7,21 – 36,4%)	(7,21 – 36,4%)	(0,7 – 21%)
PÓS	22,6%	16,1%	12,9%	13%
	(9,6 – 41,1%)	(5,5 – 33,7%)	(3,6 – 29,8%)	(3,6 – 29,8%)

Legenda: Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; PRE: amostras pré transfusionais; PÓS: amostras pós transfusionais. Não houve diferença nas prevalências entre fase 1 e 2 para todos os testes avaliados ($p > 0,05$).

Nas tabelas 18 (18A e 18B) encontram-se as prevalências encontradas para os grupos 2 estudados, variando de acordo com o teste utilizado. Na fase 1, as amostras PRÉ demonstraram prevalência média de 16 a 26% e na fase 2 de 5,7 a 20% dependendo da metodologia aplicada). Houve diferença significativa nas prevalências quando comparadas fase 1 e fase 2 para o grupo 2 nas amostras PRÉ. Com exceção da técnica Flow PRA™ que não apresentou diferença significativa nas prevalências nas duas fases (16% e 20% respectivamente), houve diferença (teste chi-quadrado, $p < 0,05$) para as técnicas MAIPA, PIFT e LCT. Conforme já mencionado, na fase 2 estas técnicas deixaram de detectar amostras com baixo PRA detectados pelo Flow PRA™. Em relação às amostras PÓS do grupo 2, as prevalências variaram de 24 a 45% na fase 1 e 11 a 31,4% na fase 2 (tabelas 16A e 16B). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as fases 1 e 2 para as amostras PÓS do grupo 2.

4.2.4 Influência da Transfusão na prevalência dos anticorpos

Para verificar se a transfusão sangüínea estimulou a produção de novos anticorpos plaquetários nos pacientes estudados, foram comparadas as prevalências das amostras PRÉ com as amostras PÓS para cada teste isoladamente (teste de McNemar). Na fase 1, ao se avaliar o grupo 1, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as prevalências das amostras PRÉ e PÓS, ou seja, não houve aumento na produção de anticorpos após as transfusões, independente da técnica analisada. Porém, para o grupo 2 na fase 1 houve diferença significativa apenas para a técnica Flow PRA™, que forneceu prevalência de 45%, ou seja, detectou maior número de pacientes apresentando anticorpos após as transfusões, quando comparado com as outras técnicas, que não demonstraram diferença significativa entre as amostras PRÉ e PÓS #.

Estes dados, inclusive, já foram publicados recentemente e encontram-se no Anexo 16.

Tabelas 18: Valores de prevalência encontrados no grupo 2 para os diferentes testes realizados. Tabela 18A: Valores para Fase 1; Tabela 18B: valores para fase 2.

18 A: Prevalência de Anticorpos – Grupo 2 – FASE 1				
AMOSTRA	Flow PRA	MAIPA	PIFT	LCT
PRÉ	16%	23%	26%	23%
	(5,5 – 33,7%)	(9,9 – 42,3%)	(12 – 44,6%)	(9,9 – 42,3%)
PÓS	45%	40%	32%	24%
	(26 – 64,3%)	(23 – 59,4%)	(17 – 51,4%)	(10 – 43,5%)

18 B: Prevalência de Anticorpos – Grupo 2 – FASE 2				
AMOSTRA	Flow PRA	MAIPA	PIFT	LCT
PRÉ	20%	5,7%	5,7%	5,7
	(8,44 – 37%)	(0,7 – 19,2%)	(0,7 – 19,2%)	(0,7 – 19,2%)
PÓS	31,4%	28,6%	20%	11%
	(16,8 – 49,3%)	(14,6 – 46,3%)	(8,4 – 36,9%)	(3,2 – 26,7%)

Legenda: Grupo 2: pacientes não imunodeprimidos; PRE: amostras pré transfusionais; PÓS: amostras pós transfusionais. Grifado em amarelo: houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as prevalências nas amostras PRÉ para os testes MAIPA, PIFT e LCT. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para as amostras PÓS.

Na fase 2 continuamos a não encontrar diferença para o grupo 1 entre as amostras PRÉ e PÓS independente da técnica utilizada, porém encontramos diferença no grupo 2 para os testes PIFT e MAIPA e não para o teste Flow PRA™, diferentemente da fase 1.

Na verdade o teste Flow PRA™ detectou positividade em algumas amostras PRÉ de pacientes em que o MAIPA e o PIFT demonstraram PRÉ negativa PÓS positiva (quatro casos no MAIPA, dois casos no PIFT) aumentando então a frequência das amostras PRÉ e PÓS reativas no teste Flow PRA™ (17%) quando comparado com PIFT e MAIPA (6% em ambos) demonstrando que o Flow PRA™ detectou anticorpos mais precocemente que os outros testes utilizados (fato este corroborado com estas amostras PRÉ positivas que apresentaram PRA < 20%). Devido a este fato não foi encontrada diferença significativa entre as amostras PRÉ e PÓS no grupo 2 para o teste Flow PRA™. Porém, se considerarmos nas amostras PÓS de pacientes com amostras PRÉ+ por Flow PRA™ (combinação PRÉ+PÓS+), um aumento no PRA acima de 10% na amostra PÓS em relação à amostra PRÉ, como sendo causado pelo estímulo da transfusão, fato este já discutido por outros autores⁶⁹, encontraremos seis em 12 pacientes (50%) com aumento de PRA superior a 10%. Destes seis pacientes, quatro pertencem ao grupo 2 e dois pertencem ao grupo 1. Ao refazermos os dados para novo cálculo do teste McNemar, considerando então, estes casos como estimulados pela transfusão, verificamos que houve diferença significativa após a transfusão para grupo 2 ($p=0,01$) e não houve diferença para grupo 1 ($p=0,71$). Desta forma confirma-se também pela técnica Flow PRA™ que no grupo 2 ocorreu a estimulação da produção de anticorpos conforme detectado na fase 1. Mesmo nessas novas condições, o grupo 1 continua a não apresentar aumento de anticorpos após as transfusões.

4.2.5 Especificidade dos anticorpos HPA encontrados

De acordo com a técnica MAIPA (considerada a mais específica para anticorpos HPA), foram encontrados os seguintes resultados na fase 1, em relação a anticorpos plaquetários específicos (não-HLA) (tabela 19):

- No grupo 1 foram detectados anticorpos plaquetários específicos em dois pacientes do sexo masculino (6,1%). Na amostra PRÉ já se verificou reatividade, sendo que no primeiro paciente verificou-se reatividade com todas as plaquetas testadas (pan-reatividade) contra a GP IIbIIIa, IbIX, Ialla, e o segundo paciente apresentou anticorpos somente contra a GP IbIX. Ao analisar-se as amostras PÓS transfusionais destes dois pacientes, o primeiro continuou demonstrando pan-reatividade com todas as plaquetas testadas contra as GP IbIX e IIbIIIa enquanto que o segundo apresentou anticorpos específicos **anti-HPA-1b** e outro anticorpo pan-reativo contra a GP Ialla e IbIX.
- No grupo 2 foram detectados anticorpos plaquetários específicos em três pacientes (9,7%), sendo um paciente do sexo masculino e dois do sexo feminino. Destes três pacientes, apenas um demonstrou reatividade já na amostra PRÉ transfusional (pan reatividade contra a GP IbIX) que se tornou não reativa na amostra PÓS transfusional. Os outros dois pacientes apresentaram reatividade somente nas amostras PÓS transfusionais sendo que um apresentou um provável anti-HPA-1b (por não haver mais disponibilidade da amostra, não foi possível confirmar o resultado) e o outro apresentou pan-reatividade contra a GP Ialla, sendo que este paciente (sexo feminino) foi o único a não apresentar, conjuntamente com a presença de anticorpos plaquetários específicos, anticorpos anti-HLA.

Tabela 19: Especificidade dos anticorpos plaquetários específicos (HPA) encontrados na fase 1.

Grupo	N encontrado (%)	Amostra PRÉ	Amostra PÓS
1	2 (6,1%) (2 pacientes masculinos)	1-Pan reatividade com GP IIbIIIa, IbIX, lalla. 2-Pan reatividade com GPIbIX.	1-Pan reatividade com GPIbIX e IIbIIIa. 2- anti-HPA-1b e pan com GP lalla e IbIX.
2	3 (9,7%) (pacientes: 1 masculino, 2 femininos)	1-Pan reatividade com GP IbIX. 2-Negativa. 3- Negativa.	1- Negativa. 2- Provável anti-HPA-1b 3- Pan reatividade com GP lalla*.
3	2 (8,7%) (2 pacientes femininos)	1-Pan reatividade com GP IbIX, lalla. 2- Negativa.	# 1-Pan reatividade com GP IbIX, lalla. # 2-Pan reatividade com GP IIbIIIa, IbIX, lalla

Legenda: N: número de pacientes; GP: glicoproteína; pan reatividade: reagiu com todas as plaquetas testadas. *: único paciente que não apresentou anticorpos anti-HLA conjuntamente com anticorpos plaquetários específicos. #: não é amostra pós transfusional (grupo não transfundido), apenas uma segunda amostra coletada aproximadamente após 90 dias da primeira (vide materiais e métodos).

- No grupo 3 também foram detectados anticorpos pan-reativos em dois pacientes (8,7%) do sexo feminino, sendo que um paciente apresentou tanto na primeira amostra quanto na segunda (neste grupo não houve transfusão), anticorpos pan-reativos contra a GP IbIX e lalla. O outro paciente apresentou anticorpos pan-reativos contra a GP IIbIIIa, IbIX, lalla somente na segunda amostra. A positividade encontrada poderia ser explicada por gravidez prévia, pois trata-se de pacientes do sexo feminino com história de gravidez.

Todas as amostras que apresentaram alguma reatividade com as glicoproteínas plaquetárias específicas também apresentaram conjuntamente anticorpos HLA com exceção de uma amostra PÓS do grupo 2, do sexo feminino, com anticorpo pan reativo com GP lalla (* na tabela 19).

Já na fase 2, encontraram-se frequências similares à fase 1, porém com diferentes especificidades (tabela 20).

- Para o grupo 1 da fase 2 foram detectados anticorpos plaquetários específicos em três pacientes (9,4%), sendo que em um paciente foi detectado somente na amostra PÓS transfusional (**anti-HPA-3b**), em outro paciente em ambas amostras PRÉ e PÓS transfusionais (**anti-HPA-5b**) e no terceiro paciente detectou-se reação somente na amostra PÓS com a glicoproteína IIbIIIa porém sem especificidade para os HPAs analisados.
- Para o grupo 2 na fase 2 foram detectados 2 pacientes (6%) com anticorpos plaquetários específicos, sendo um reativo somente com a amostra PÓS transfusional cuja especificidade não pode ser determinada (reação somente com a glicoproteína IIbIIIa) e outro paciente com ambas amostras reativas para anti-HPA-5b.

Tabela 20: Especificidade dos anticorpos plaquetários específicos (HPA) encontrados na fase 2.

Grupo	N encontrado (%)	Amostra PRÉ	Amostra PÓS	Genótipo HPA
1	3 (9,4%) (3 pacientes Femininos)	1- Negativa 2- Negativa 3- Positiva: anti-HPA-5b	1-Positiva: anti-HPA-3b. 2- anti-GP IIbIIIa (inespecífico?) 3- Positiva: anti-HPA-5b	1- HPA-1a1a, 2a2b, 3a3a , 4a4a, 5a5a, 6a6a, 15a15a. 2- HPA-1a1a, 2a2b, 3b3b, 4a4a, 5a5b, 6a6a, 15b15b 3- HPA-1a1a, 2a2a, 3a3b, 4a4a, 5a5a , 6a6a, 15a15a
2	2 (6%) (1 paciente Masculino; 1 paciente feminino)	1- Negativo 2- Positivo: anti-HPA-5b	1- Positivo: anti-GP IIbIIIa (inespecífico?) 2- anti-HPA-5b	1- HPA-1a1a, 2a2a, 3b3b, 4a4a, 5a5a, 6a6a, 15a15b. 2- HPA-1a1b, 2a2a, 3a3a, 4a4a, 5a5a , 6a6a, 15b15b

Legenda: N: número de pacientes; GP: glicoproteína; HPA: Antígenos Plaquetários Humanos. Grupo 1: pacientes imunodeprimidos; grupo 2: pacientes não imunodeprimidos.

- Para o grupo 3 da fase 2 não foram detectados anticorpos plaquetários específicos diferentemente da fase 1 do estudo.

Na fase 2, das amostras que apresentaram anticorpos plaquetários específicos, todas do grupo 1 (n=3) também apresentaram anticorpos HLA classe I, porém, os dois pacientes do grupo 2 que apresentaram anticorpos plaquetários específicos não apresentaram anticorpos HLA classe I, sendo um paciente do sexo masculino que apresentou reatividade somente na amostra PÓS transfusional, e outro do sexo feminino, com história de gravidez prévia e que apresentou em ambas amostras PRÉ e PÓS transfusionais. Ainda na fase 2, foi realizada a genotipagem destes pacientes que apresentaram anticorpos plaquetários específicos para confirmação da especificidade encontrada e verificou-se que, realmente os três pacientes com anticorpos plaquetários específicos (um com anti-HPA-3b e dois com anti-HPA-5b possuíam genótipos compatíveis com a presença destes aloanticorpos, ou seja, apresentaram ausência do gene correspondente à formação do antígeno em questão (tabela 20). Em relação aos outros dois pacientes não se pode concluir nada, pois não houve especificidade HPA determinada.

Portanto, em relação às especificidades dos anticorpos encontrados (tabela 21) para as amostras PRÉ transfusionais reativas, encontrou-se 85,7% contendo somente anticorpos anti-HLA classe I na fase 1 e 89,4% na fase 2; 14,3% dos pacientes apresentaram nas suas amostras PRÉ transfusionais mistura de anticorpos anti-HLA classe I e anticorpos contra glicoproteínas plaquetárias específicas (GP IIbIIIa, GPIIaIIa, GP IbIX) na fase 1 contra 0% na fase 2; ainda nas amostras PRÉ encontramos somente na fase 2 uma amostra (5,3% das amostras PRÉ reativas) com mistura de anticorpos HLA classe I e anti-HPA-5b; e também somente na fase 2 uma única amostra (5,4%) com apenas anticorpos anti-HPA-5b.

Tabela 21: Especificidade dos anticorpos encontrados nas 2 fases analisadas. Valores expressos em porcentagem e número encontrado entre parênteses.

Especificidade dos Anticorpos	Amostras PRÉ		Amostras PÓS	
	FASE 1	FASE 2	FASE 1	FASE 2
HLA classe I somente	85,7% (24)	89,4% (17)	86,5% (32)	76,2% (16)
HLA classe I + pan-reatividade	14,3% (4)	0%	5,4% (2)	4,8% (1)
HLA classe I + anti-HPA	0%	5,3% (1)	5,4% (2)	9,5% (2)
Pan reatividade e/ou inespecífico	0%	0%	2,7% (1)	4,8% (1)
Anti-HPA somente	0%	5,3% (1)	0%	4,8% (1)

Legenda: PRÉ : amostras pré transfusionais; PÓS: amostras pós transfusionais; HLA: antígenos leucocitários humanos; HPA: antígenos plaquetários humanos. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na distribuição das especificidades encontradas nas fases 1 e 2.

Ao se analisar as amostras PÓS transfusionais reativas (tabela 21) encontrou-se 86,5% destas amostras com especificidade somente para anticorpos anti-HLA classe I na fase 1, contra 76,2% na fase 2; 5,4% das amostras apresentaram mistura de anticorpos anti-HLA classe I com pan reatividade com glicoproteínas plaquetárias específicas na fase 1, contra 4,8% na fase 2; 5,4% apresentaram mistura de anticorpos HLA classe I com anti-HPA na fase 1 (anti-HPA-1b) contra 9,5% na fase 2 (anti-HPA-3b e 5b); 2,7% dos pacientes na fase 1 apresentaram anticorpos inespecíficos contra glicoproteínas plaquetárias contra 4,8% na fase 2; e 4,8% (um paciente do sexo feminino) apresentou somente anticorpos HPA (anti-HPA-5b) na fase 2.

4.3 Análise dos Incrementos Plaquetários Pós Transfusionais

Dos 96 pacientes estudados na fase 2, 24 (25%) apresentaram algum teste reativo para pesquisa de anticorpos plaquetários (PAP) realizada e 72 (75%) apresentaram PAP não reativa.

- Em relação aos pacientes com PAP reativas (n=24), 10 (41,7%) não foram transfundidos com plaquetas, enquanto os 14 restantes (58%) receberam um total de 212 transfusões de plaquetas. Destas 212 transfusões, foram analisados 176 (83%) incrementos plaquetários pós transfusionais após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora). Considerando o ICCp-1hora abaixo de 5.000/ μ L como ineficácia da transfusão plaquetária, este grupo apresentou 12,5% dos ICCps insatisfatórios (<5.000/ μ L) e 87,5% satisfatórios. Ao analisarmos a compatibilidade de algumas destas transfusões realizadas, ou seja, ao testarmos o soro do paciente contra as plaquetas transfundidas (prova de compatibilidade = PC), verificamos que para o grupo que apresentou ICCp insatisfatórios (n=22 transfusões), 86,4% (n=19) das transfusões foram incompatíveis (PC+). Já para o grupo que apresentou bons ICCp (n=154 transfusões) verificou-se que dentre as transfusões testadas (n=65), 95,4% (n=62) das transfusões foram compatíveis (PC-). Ou seja, o grande número

de transfusões eficazes neste grupo foi devido ao fato destes pacientes com PAP reativa terem recebido transfusões compatíveis.

- Em relação aos pacientes com PAP não reativas (n= 72), 47 (65,3%) não foram transfundidos com plaquetas, enquanto 25 (34,7%) receberam um total de 296 transfusões. Destas 296 transfusões realizadas, foram analisados os ICCp-1hora de 254 (85,8%). Apenas 7 transfusões (2,7%) apresentaram ICCp insatisfatórios contra 247 (97,2%) satisfatórios. Estas 7 transfusões insatisfatórias demonstraram PC incompatível em 2 casos, PC compatível em 2 casos e 3 casos não puderam ser realizadas as PC, sendo que, elas pertencem a 3 pacientes: paciente (M.I.O.V.M.) recebeu 19 transfusões, das quais 4 apresentaram ICCp insatisfatório (2 incompatíveis, 1 compatível, 1 PC não realizada). Os outros 5 ICCp insatisfatórios foram de 2 pacientes: H.A. que recebeu 38 transfusões do qual somente 1 insatisfatória (PC compatível) e N.L. que recebeu 18 transfusões com 2 ICCp insatisfatórias. O resumo destes dados encontra-se na figura 21.

Portanto, os pacientes que apresentaram PAP reativa apresentaram ICCp insatisfatórios numa frequência aproximadamente 4 vezes maior que os pacientes com PAP não reativa (12,5% contra 2,8%). Provavelmente estes pacientes poderiam ter apresentado uma relação ainda maior (maior número de ICCp insatisfatórios nos pacientes com PAP reativa) se não tivessem recebido um grande número de plaquetas compatíveis. O pequeno número de transfusões (2,7%) com ICCp insatisfatório nos pacientes com PAP não reativa pode ser devido a erros de contagem de plaquetas devido ao tempo inadequado entre coleta de amostras e contagem, pois dois dos três pacientes que apresentaram estes ICCp insatisfatórios pertenciam ao Hospital externo ao do estudo.

Figura 21: Fluxograma do acompanhamento dos ICCp – 1 hora nos pacientes estudados.

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; +: reativa; - : não reativa; Transf. Plaq: transfusão de plaquetas realizadas; s/ : sem; ICCp: incremento corrigido da contagem plaquetária (valores dados por microlitro); N: número encontrado; PC+: prova de compatibilidade reativa; PC-: prova de compatibilidade não reativa.

Ao analisar todos os ICCp – 1 hora (n=430), separando-se apenas por PAP reativa (n=176) e PAP não reativa (n=254), verificou-se que existe diferença significativa ($p < 0,001$ – teste t amostras independentes) entre os ICCps quando separados pela PAP, ou seja os pacientes que apresentaram PAP reativa tiveram um ICCp médio inferior aos pacientes com PAP não reativa (figura 22 e tabela 22).

Como a compatibilidade entre as plaquetas transfundidas e o paciente, pode interferir no incremento plaquetário, pois apesar de PAP reativa (presença do anticorpo), o paciente pode ser transfundido com plaquetas compatíveis, analisou-se o ICCp conforme o resultado das provas de compatibilidade (PCs). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,001$) entre os ICCp com PC reativas contra os ICCp de PC não reativas (figura 23). Os ICCps com PC reativas foram significativamente menores que os ICCp com PC não reativas (Tabela 23).

4.3.1 Análise da refratariedade de acordo com os ICCp apresentados.

Na tabela 24 encontram-se os resultados dos testes laboratoriais realizados, separados acordo com as concordâncias encontradas entre as diferentes metodologias testadas, qual amostra foi reativa (se PRÉ, PÓS ou ambas), o número de pacientes em cada combinação de testes, o número de ICCp insatisfatório em relação ao total de ICCp realizados, os resultados das PCs em relação ao total realizado e a conclusão final de quais pacientes foram considerados refratários imunes baseados nos ICCp obtidos.

Figura 22: Incrementos corrigidos das contagens plaquetárias após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados, separados por PAP reativa e PAP não reativa.

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; CCI: incremento corrigido de contagem plaquetária = ICCp; PAP+: PAP reativa; PAP-: PAP não reativa. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP reativa em relação aos incrementos dos pacientes com PAP não reativa.

Tabela 22: valores encontrados para os incrementos plaquetários (ICCp) conforme o resultado da PAP.

ICCp	n	Média $\pm$ dp (/ μ L)	Mediana (/ μ L)	IC 95% (/ μ L)
PAP reativa	176	15.267 $\pm$ 10.864	14.858	13.651 – 16.883
PAP não reativa	254	20.537 $\pm$ 12.336	18.339	19.013 – 22.061

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; ICCp: incremento corrigido de contagem plaquetária corrigida; dp: desvio padrão; IC95%: intervalo de confiança de 95%. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP reativa em relação aos incrementos dos pacientes com PAP não reativa.

Figura 23: Incrementos corrigidos das contagens plaquetárias com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados, separados por resultados de provas de compatibilidade reativas (PC+) e não reativas (PC-).

Legenda: ICCp – 1 hora: Incrementos corrigidos das contagens plaquetárias com contagem após uma hora da transfusão; PC+: prova de compatibilidade reativa; PC-: prova de compatibilidade não reativa. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os incrementos dos pacientes que apresentaram PC+ quando comparados com os incrementos dos pacientes com PC-.

Tabela 23: Valores dos incrementos corrigidos das contagens plaquetárias com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) separados por resultados de provas de compatibilidade (PC) reativas e não reativas.

ICCp	n	Média $\pm$ dp (/ μ L)	Mediana (/ μ L)	IC 95% (/ μ L)
PC positiva	24	2.214 $\pm$ 9.971	1.297	-1.996 – 6.424
PC negativa	100	15.902 $\pm$ 9.255	14.749	14.066 – 17.739

Legenda: ICCp: incremento corrigido de contagem plaquetária; n: número analisado; dp: desvio-padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95%; μ L: microlitro; PC: prova de compatibilidade. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os incrementos dos pacientes que apresentaram PC+ quando comparados com os incrementos dos pacientes com PC-.

Tabela 24: Classificação da refratariedade plaquetária imune de acordo com os resultados do ICCp-1 hora, e sua correlação com os testes laboratoriais avaliados.

TESTES					AMOSTRAS		n ICCp		PC +/PC		PC-/PC		PAC. REFRACTÁRIOS?	
FLOW	MAIPA	PIFT	LCT	PRE	POS	PAC	INSATISF./ICCp (%)							
+	+	+	+	+	+	3** (21%)	17/27 (63%)		14/22 (64%)		8/22 (36%)		Sim, todos os 3.	
+	+	+	0	+	+	1 (7%)	0/7		0/7		7/7		Inconclusiva pois todas compatíveis.	
+	+	+	0	+	0	1 (7%)	2/15 (13,5%)		3/13 (23%)		10/13 (77%)		Sim. Porém Ac desapareceu.	
+	+	0	+	+	+	1 (7%)	NR		NR		NR		Inconclusiva pois recebeu apenas uma transfusão.	
+	0	+	0	+	0	1 (7%)	0/3 (0%)		0/2		2/2		Inconclusiva pois recebeu apenas plaquetas compatíveis.	
+	+	0	0	+	0	1 (7%)	2/88 (3%)		1/31 (3%)		30/11 (97%)		Não.	
+	+	0	0	0	+	2 (14%)	0/5 (0%)		0/4		4/4		1 Não; 1 inconclusivo pois recebeu apenas uma transfusão.	
+	0	0	+	0	+	1 (7%)	0/16 (0%)		2/5 (40%)		3/5 (60%)		Não.	
+	0	0	0	+	+	1 (7%)	1/12 (8%)		0/4		4/4		Não.	
+	0	0	0	+	0	1 (7%)	0/2 (0%)		NR		NR		Inconclusiva pois recebeu apenas 2 transfusões.	
+	0	0	0	0	+	1 (7%)	0/1 (0%)		NR		NR		Inconclusiva pois recebeu apenas uma transfusão.	

Legenda: ** pacientes que entraram na pesquisa de anticorpos plaquetários do Hospital Sírio Libanês e que receberam plaquetas compatíveis. Ac: antígeno; n pac: número de pacientes; ICCp insatisf./ICCp: número de incrementos plaquetários não satisfatórios sobre o número de incrementos realizados. PC: prova de compatibilidade realizadas; pac: pacientes. +: reativos; -: não reativos. Grifado em amarelo: pacientes considerados refratários por causas imunes devido baixos ICCp – 1 hora e PAP reativa; em letras vermelhas pacientes considerados não refratários por causas imunes pois não apresentaram baixos ICCp mesmo com PAP reativas.

Foi possível identificar quatro dos 14 pacientes (28,6%) com PAP reativa que claramente desenvolveram refratariedade imune, pois apresentaram incrementos insatisfatórios ao receberem plaquetas incompatíveis e passaram a apresentar incrementos plaquetários satisfatórios ao receber plaquetas compatíveis; quatro dos 14 (28,6%) pacientes com PAP reativa não desenvolveram refratariedade imune pois apesar de presença de anticorpos, os incrementos foram satisfatórios; dois dos 14 (14,3%) não foi possível ter certeza de refratariedade ou não, porque receberam somente plaquetas compatíveis; quatro dos 14 (28,6%) apresentaram somente uma ou duas transfusão sendo portanto descartados por falta de dados. Em relação aos quatro pacientes que apresentaram refratariedade imune, três pacientes reagiram com todas as técnicas (Flow PRA™, MAIPA, PIFT e LCT) e apenas um paciente não reagiu somente por LCT mas reagiu por Flow PRA™, MAIPA e PIFT. Em relação aos quatro pacientes que não apresentaram refratariedade imune, dois pacientes reagiram por Flow PRA™ e MAIPA, um paciente com Flow PRA™ e LCT e um paciente somente por Flow PRA™.

4.4 Análise dos dados da fase 3

Foram analisados 40 pacientes de diversos diagnósticos, que foram inicialmente submetidos a PAP por suspeita clínica de refratariedade por causas imunes, detectado ou não pela presença de baixos incrementos plaquetários pós transfusionais. Foram encontrados 30 pacientes com PAP reativa (75%). Esta frequência é significativamente superior ($p < 0,05$) às prevalências obtidas na fase 1 e 2 deste projeto, seja qual for o grupo considerado (grupo imunodeprimido ou não; tabelas 17 e 18).

Ao analisarmos os incrementos pós transfusionais (entre 1-2 horas após) dos pacientes que não apresentaram anticorpos (PAP-) (figura 24 – em verde) foram estatisticamente superiores ($p < 0,01$) aos incrementos dos pacientes que apresentaram anticorpos (PAP+) (figura 24 – box azul) (tabela 25).

Figura 24: Incrementos corrigidos das contagens plaquetárias com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados na fase 3, de acordo com os resultados das PAPs.

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; ICCp – 1 hora: Incremento corrigido de contagem plaquetária com contagem após uma hora da transfusão; PAP+: PAP reativa; PAP-: PAP não reativa. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP reativa em relação aos incrementos dos pacientes com PAP não reativa.

Tabela 25: Incrementos corrigidos das contagens plaquetárias com contagem após uma hora da transfusão (ICCp – 1 hora) dos pacientes estudados na fase 3 de acordo com os resultados das PAPs.

ICCp (1 h) Antes da realização da PAP	Média $\pm$ dp (/μL)	Mediana (/μL)	n
PAP+	3.675 $\pm$ 6.376	2.786	23
PAP-	9.497 $\pm$ 7.789	9.480	19

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; ICCp: incremento corrigido de contagem plaquetária; dp: desvio padrão; n: número avaliado; /μL: por microlitro. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP reativa em relação aos incrementos dos pacientes com PAP não reativa.

Para os pacientes que apresentaram PAP+, foram então selecionadas plaquetas compatibilizadas pelas técnicas MAIPA e PIFT. Os incrementos passaram a ser eficazes para estes pacientes (Figura 25 e tabela 26).

Após a seleção de plaquetas compatíveis, não houve mais diferença significativa ($p>0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP+ e PAP-. Os incrementos dos pacientes com PAP+ passaram então a ser eficazes e semelhantes aos pacientes com pesquisa negativa (Figura 26 e tabela 27).

4.4.1 Análise da refratariedade de acordo com os ICCp apresentados

Foi possível acompanhar o ICCp de 31 (77,5%) pacientes. Os ICCp foram utilizados para definir se o paciente apresentava ou não refratariedade por causas imunes (semelhante ao que foi feito na fase 2). Como nesta fase nem todo ICCp era após 1 hora da transfusão, foi considerado o ICCp de 1-2 horas abaixo de 5.000/ μ L e/ou ICCp abaixo de 2.300/ μ L para os ICCp realizado após duas horas da transfusão (em média 18 – 20 hs após)⁶⁰ como indicativos de ineficácia da transfusão de plaquetas. Os dados encontram-se na tabela 28. Foram encontrados 16 pacientes (51,6%) com ICCp característicos de refratariedade imune sendo 15/16 com PAP reativa (nove pacientes com amostras reativas em todos os testes; um paciente com amostra reativa por Flow PRA™, MAIPA e PIFT; um paciente com amostra reativa por Flow PRA™, MAIPA e LCT; um paciente com amostra reativa por Flow PRA™ e MAIPA; um paciente com amostra reativa por Flow PRA™ e LCT; um paciente com amostra reativa por Flow PRA™ apenas; um paciente com amostra reativa por PIFT apenas). Em relação aos 15 pacientes sem indicativos de refratariedade imune, seis (40%) apresentaram PAP reativa sendo dois pacientes com amostras reativas por Flow PRA™, MAIPA e PIFT; um paciente com amostra reativa em MAIPA, PIFT e LCT (porém em MAIPA reativo apenas com glicoproteína plaquetária, não HLA); um paciente com amostra reativa apenas por Flow PRA™; um paciente com amostra reativa apenas por PIFT; um paciente com amostra reativa apenas por LCT.

Figura 25: Incrementos plaquetários dos pacientes com PAP+ antes das transfusões de plaquetas compatíveis (em azul escuro) (transfusões ao acaso) e após transfusões de plaquetas compatibilizadas (em azul claro).

Legenda: PC: provas de compatibilidade; PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários. Houve diferença significativa ($p=0,000$) entre os incrementos realizados antes das PC serem realizadas e após a utilização de transfusões somente com PC realizadas e não reativas.

Tabela 26: Incrementos plaquetários dos pacientes com PAP+ antes das transfusões de plaquetas compatíveis (transfusões ao acaso) e após transfusões de plaquetas compatibilizadas.

ICCp dos pacientes	Média $\pm$ desvio	Mediana	n
com PAP+	padrão (/μL)	(/μL)	
Antes das PC	3.182 $\pm$ 6.413	1.460	93
Após PC	13.907 $\pm$ 10.644	13.054	32

Legenda: ICCp: incremento corrigido de contagem plaquetária; PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; PC: provas de compatibilidade. Houve diferença significativa ($p=0,000$) entre os incrementos realizados antes das PC serem realizadas e após a utilização de transfusões somente com PC realizadas e não reativas.

Figura 26: Incrementos plaquetário pós transfusão de plaquetas compatíveis (PC-) para pacientes com PAP+ (em azul) e incrementos obtidos dos pacientes com PAP- (em verde).

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; +: reativa; - não reativa; PC: prova de compatibilidade. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP+ mas que receberam plaquetas compatibilizadas (PC-) quando comparados com os incrementos dos pacientes com PAP -.

Tabela 27: valores de ICCp pós transfusão de plaquetas compatíveis para pacientes com PAP+ e para pacientes com PAP-.

ICCp (1 h)	Média ± desvio padrão (/μL)	Mediana (/μL)	n
PAP+ com PC-	10.704 ± 12.139	7.886	29
PAP-	9.835 ± 7.871	10.035	18

Legenda: PAP: pesquisa de anticorpos plaquetários; +: reativa; - não reativa; PC: prova de compatibilidade; ICCp (1h): Incremento corrigido de contagem plaquetária com contagem após uma hora da transfusão. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os incrementos dos pacientes com PAP+ mas que receberam plaquetas compatibilizadas (PC-) quando comparados com os incrementos dos pacientes com PAP -.

Tabela 28: Classificação da refratariedade plaquetária imune de acordo com os resultados do ICCp, e sua correlação com os testes laboratoriais avaliados na fase 3.

TESTES				n PAC	n ICCp INSATISF./ICCp (%)	PC+/PC	PC-/PC	PAC. REFRATÁRIOS?
FLOW	MAIPA	PIFT	LCT					
+	+	+	+	9 (26%)	40/82 (49%)	21/43 (49%)	22/43 (51%)	Sim, todos.
+	+	+	0	3 (9%)	7/33 (21%)	8/16 (50%)	8/16 (50%)	1 Sim, 2 Não.
+	+	0	+	1 (3%)	3/9 (33%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)	Sim
+	+	0	0	1 (3%)	5/14 (36%)	3/8 (38%)	5/8 (62%)	Sim
+	0	0	+	1 (3%)	3/10 (30%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	Sim
0	+	+	+	1 (3%)	1/11 (9%)	0/1 (100%)	1/1 (100%)	Não. (*)
+	0	0	0	2 (6%)	5/18 (28%)	NR	NR	1 Sim; 1 Não.
0	0	+	0	2 (6%)	4/13 (31%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	1 Sim; 1 Não.
0	0	0	+	2 (7%)	2/8 (25%)	NR	NR	Não. Apenas 1 ICCp insatisfatório para cada paciente.
0	0	0	0	9 (26%)	22/75 (29%)	0/17	17/17 (100%)	1 Sim, 8 Não.

Legenda: (*): No MAIPA apenas reativo com glicoproteína plaquetária específica. n pac: número de pacientes; ICCp insatisf./ICCp: número de incrementos plaquetários não satisfatórios sobre o número de incrementos realizados. PC: prova de compatibilidade realizadas; pac: pacientes. +: reativos; -: não reativos. Grifado em amarelo: pacientes considerados refratários por causas imunes devido baixos ICCp 1 hora; em letras vermelhas pacientes considerados não refratários por causas imunes pois não apresentaram baixos ICCp mesmo com PAP reativas.

4.5 Análise conjunta dos pacientes da fase 2 unidos com os pacientes da fase 3.

Se considerarmos os 8 pacientes que foi possível definir como refratários ou não de acordo com os seus ICCp apresentados (tabela 24), e unirmos com os dados dos pacientes da fase 3 (n=31, tabela 28), e utilizarmos a refratariedade dada pelo ICCp como padrão-ouro para compararmos os desempenhos dos testes, verificamos que pela análise da curva ROC (figura 27) não há diferença significativa entre os testes ($p>0,05$) sendo que o Flow PRA™, o MAIPA e o PIFT apresentaram áreas muito semelhantes (0,7658, 0,7684, 0,7697 respectivamente) seguido do LCT (área=0,7447). Os cálculos de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VP+) e valor preditivo negativo (VP-) encontram-se na tabela 29.

Figura 27: Análise pela curva ROC dos testes estudados utilizando como padrão-ouro a refratariedade à transfusão de plaquetas definida de acordo com ICCp apresentados.

Legenda: ROC: sigla para “Receiver Operator Characteristics”; ICCp: incremento corrigido de contagem plaquetária. Não houve diferença ($p>0,05$) entre as curvas quando utilizou-se a refratariedade como padrão ouro.

Tabela 29: Cálculos de sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo (VP+) e valor preditivo negativo (VP-) para os testes utilizados tendo como padrão-ouro a refratariedade detectada por incrementos (ICCp) eficazes e ineficazes.

TESTE	Sensibilidade % (IC 95%)	Especificidade % (IC 95%)	VP+ % (IC 95%)	VP- % (IC 95%)
FLOW	90 (68 - 99)	63 (38 - 84)	72 (51 - 88)	86 (57 - 98)
MAIPA	80 (56 - 94)	74 (49 - 91)	76 (53 - 92)	78 (52 - 94)
PIFT	75 (51 - 91)	79 (54 - 94)	79 (54 - 94)	75 (51 - 91)
LCT	70 (46 - 88)	79 (54 - 94)	78 (52 - 94)	71 (48 - 88)

Legenda: IC 95%: intervalo de confiança de 95%; VP+: valor preditivo positivo; VP-: valor preditivo negativo.

5.0 DISCUSSÃO

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para identificação de anticorpos plaquetários^{21,29,30,39,42,40} sem que no entanto, haja uma definição de qual seria a mais sensível e específica. Alguns trabalhos demonstraram que as metodologias disponíveis diferem tanto em relação à especificidade quanto à sensibilidade^{39,43}. Daí a dificuldade de se possuir uma metodologia única que seja consenso entre os especialistas nesta área. Para os anticorpos plaquetários “específicos” (comumente conhecidos como HPAs) a técnica MAIPA tem se mostrado a mais específica e sensível, sendo inclusive a metodologia escolhida pelos organizadores do 13th Workshop Internacional de Imunologia Plaquetária, organizado pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), realizado em setembro de 2006, como a técnica padrão para identificação destes anticorpos (HPAs). Porém, para identificação de anticorpos HLA, que são os mais freqüentes em caso de refratariedade a transfusão de plaquetas, dúvidas ainda existem^{17,43}. Diversas metodologias são disponíveis quando o objetivo é o transplante de órgãos, mas para identificação de anticorpos contra antígenos do sistema HLA classe I presentes nas plaquetas, ainda existem dúvidas de qual seria a mais adequada, seja devido ao custo ou devido à variada expressão destes antígenos nas plaquetas quando comparada aos leucócitos.

O estudo de antígenos e anticorpos plaquetários na população brasileira é muito pequeno, limitando-se a estudos populacionais de freqüência de antígenos plaquetários^{37,38} e um único estudo a respeito de anticorpos plaquetários⁵⁴, porém, o próprio autor argumenta que pouco pode ser concluído a respeito da importância clínica destes anticorpos na população estudada devido à baixa variabilidade no grupo de pacientes avaliado.

Baseados nestes fatos e no grande problema que a refratariedade à transfusão de plaquetas pode causar, tanto em termos de cuidados médicos adicionais ao paciente

como aumento no custo hospitalar⁵³, propomo-nos, na primeira fase do projeto, a investigar qual seria a frequência destes anticorpos na nossa população (pacientes do Hospital Sírio Libanês em São Paulo), qual o comportamento das técnicas mais utilizadas para identificação destes anticorpos e se as transfusões de hemocomponentes causaram aloimunização para antígenos plaquetários. Adicionalmente, numa segunda fase, avaliar qual a real importância clínica dos anticorpos detectados pelas técnicas utilizadas. As técnicas escolhidas foram as mais comumente divulgadas na literatura, como o MAIPA, PIFT, LCT e uma metodologia mais recentemente lançada, o Flow PRATM.

Em relação aos pacientes estudados, escolhemos dois tipos de pacientes: um grupo de pacientes imunodeprimidos que recebe transfusões leuco-reduzidas conhecidas por evitarem aloimunização por anticorpos HLA; e outro grupo de pacientes não imunodeprimidos, que recebe transfusões de hemocomponentes não leuco-reduzidos, portanto, sujeitos a produzirem mais anticorpos pós transfusionais. O motivo da escolha destes dois grupos foi conhecer a prevalência destes anticorpos nesta população, fato até então desconhecido, e sua real importância no tratamento destes pacientes, em especial dos pacientes do grupo imunodeprimido que são altamente dependentes de transfusões de plaquetas. Também estávamos interessados em verificar se a transfusão estava sendo causadora de aloimunização nestes pacientes, especialmente no grupo não imunodeprimido que recebe hemocomponentes não leuco-reduzidos.

Na fase 1 do estudo procuramos igualar os grupos para que não houvesse outras variáveis de confusão tais como idade, sexo, dose infundida dentro de cada grupo, de tal forma que as diferenças entre eles se limitassem ao tipo de diagnóstico, tipo de tratamento (imunossupressor ou não) e tipo de hemocomponente infundido. Fato este alcançado sem dificuldades, pois possuíamos um grande banco de dados para seleção dos pacientes (os 87 pacientes estudados foram retirados de um banco de dados de 4.630 pacientes transfundidos no período de 1996 a 2001).

Porém, na fase 2, quando realizamos coletas prospectivas no período de maio de 2004 a agosto de 2006, encontramos dificuldades na obtenção dos pacientes pois, o número de pacientes obtido ficou próximo ao esperado, mas de tal forma que não foi possível excluir pacientes para acerto de idade e sexo sem que perdêssemos em número estudado. Para neutralizar possíveis efeitos destas variáveis no resultado foram realizados testes estatísticos para verificar a possível influência destes fatores nos resultados finais. Estas variáveis (idade e sexo) não afetaram nenhum resultado encontrado .

Esta preocupação que tivemos em igualar idade, sexo e dose infundida de hemocomponentes foi devido ao fato já bem demonstrado em literatura que estes fatores podem influenciar a produção de anticorpos plaquetários em pacientes transfundidos^{58,69,70}. Slichter e colaboradores⁷⁰ verificaram que apesar da idade não ter influenciado no desenvolvimento da refratariedade plaquetária, houve influência do sexo.

Após estas considerações referentes às metodologias e aos pacientes escolhidos para este trabalho, passaremos a discutir os resultados encontrados.

5.1 Comparação das metodologias utilizadas

Em relação aos resultados das metodologias utilizadas para detecção de anticorpos plaquetários nos pacientes estudados verificou-se que pela análise da Curva ROC e índice kappa a concordância entre os testes na **fase 1** foi distinta entre o grupo 1 (imunodeprimido) e o grupo 2 (não-imunodeprimido).

- Para o **grupo 1** os testes Flow PRATM e MAIPA foram os mais semelhantes ou seja, seus resultados foram os mais concordantes quando comparados os quatro testes conjuntamente. Porém, ao separar-se as amostras PRÉ transfusionais das PÓS, houve uma diminuição nesta concordância fazendo com que os testes mais

semelhantes para as amostras PÓS fossem o MAIPA e o PIFT. Como o grupo 1 representa os pacientes com patologias tumorais cujo tratamento é realizado com medicamentos agressivos como quimioterápicos, e utilização de antibióticos potentes; adicionado ao fato de suas amostras já estarem estocadas há muitos anos (média de tempo de estocagem a -20°C : 4,4 anos, mas alguns soros tinham sido congelados há 8 anos); não se pode afastar alguma influência de estocagem nas amostras utilizadas, pois foi verificado visualmente que uma grande porcentagem das amostras deste grupo (em especial as amostras PÓS transfusionais) demonstravam coloração suspeita, com presença de agregados de fibrina. Como o Flow PRA™ é um teste comercial que utiliza reagentes tratados quimicamente, a má qualidade da conservação de alguns soros destes pacientes pode ter interferido no teste, pois o próprio fabricante sugere na sua bula, que este tipo de interferência (agregados no soro) pode causar resultados inválidos. Este fato foi comprovado na **fase 2** deste projeto, pois trabalhamos com amostras mais recentes (menor que 2 anos de estocagem a -30°C) e as concordâncias com os testes nesta fase foram muito maiores tanto na análise pelo teste kappa quanto pela curva ROC, especialmente nas amostras PÓS transfusionais do grupo 1 que apresentaram problemas na fase 1. Portanto, baseado na **fase 2** (em que os fatores de má qualidade das amostras foram afastados) para o **grupo 1** tanto nas amostras PRÉ como nas amostras PÓS transfusionais deste grupo foi verificada uma boa associação entre MAIPA, PIFT e Flow PRA™.

- Para o **grupo 2** na **fase 1** a combinação Flow PRA™ e PIFT foi a melhor combinação quando os quatro testes foram comparados, tanto para as amostras PRÉ como para as amostras PÓS. Como houve uma maior prevalência de anticorpos HLA no grupo 2 para o teste Flow PRA™, esta melhor concordância do PIFT no lugar do MAIPA, poderia ser devido a maior número de antígenos leucocitários presentes nas células

de triagem utilizadas em cada metodologia (no MAIPA foram quatro doadores enquanto no PIFT foram seis). Porém, ao se analisar os resultados isoladamente neste grupo, verificou-se que a discordância entre as metodologias não foi a não detecção pelo MAIPA dos casos positivos, mas sim, uma maior presença de reatividade do MAIPA para amostras negativas para o PIFT e Flow PRA™. Este fato (diferença entre as metodologias para o grupo 2) porém, não ocorreu na **fase 2** do estudo. Nesta fase, verificamos que o PIFT apresentou boa concordância com o MAIPA para o **grupo 2**, especialmente nas amostras PRÉ (kappa= 1,000 = muito boa concordância). Talvez a qualidade das amostras na fase **1** também tenha interferido nos resultados do MAIPA para o grupo 2.

Outros resultados que sugerem que a qualidade das amostras interferiu na fase 1 do estudo foram:

- somente as técnicas PIFT e LCT apresentaram queda nas frequências das combinações PRE+PÓS+ (somente LCT nos grupos 1 e 2), PRÉ-PÓS+ e PRÉ+PÓS- (somente PIFT nos grupos 1 e 2 respectivamente) na fase **2**, demonstrando que, provavelmente devido à menor especificidade destas técnicas, ocorreram reações inespecíficas detectadas por estas metodologias na fase 1 do estudo;
- taxas maiores de não reatividade (100% para PIFT, MAIPA e LCT) para o grupo 3 (grupo controle) na fase **2**, conforme o esperado para este grupo que não recebeu transfusão durante o estudo e que somente 7% (n=2) dos pacientes apresentaram história de transfusão previa ao estudo, salientando-se que houve uma queda nas amostras PIFT e MAIPA reativas para este grupo, demonstrando, novamente, prováveis falsas reações destes testes na fase 1 como explicado para o PIFT quando na fase 1 deixou de detectar algumas amostras PRÉ transfusionais, no qual MAIPA e Flow PRA™ haviam detectado;
- melhora na fase **2** do número de amostras apresentando reatividade em mais de um único teste (figura 16), especialmente nas amostras PÓS transfusionais.

Portanto, diante de todos estes resultados podemos concluir que na fase 1 realmente houve interferência da qualidade das amostras nos resultados encontrados, especialmente para as amostras PÓS transfusionais do grupo 1. Fato que refletiu em uma baixa concordância entre as metodologias na fase 1, ocorrendo porém, na fase 2, com a utilização de soros mais recentes, uma melhora nas concordâncias entre os testes, especialmente na concordância pela técnica PIFT nas amostras do grupo 1, melhora da concordância do MAIPA no grupo 2, e melhora geral na concordância para o teste LCT, demonstrando que estes testes LCT, PIFT e MAIPA estão mais sujeitos à interferência do que o próprio Flow PRA™, apesar de também ter sido afetado. Na fase 1 o teste que mais apresentou reações isoladas foi o LCT com 59% do total, seguido pelo PIFT com 19% e MAIPA 16%. Porém, na fase 2 houve uma significativa melhora da performance do teste LCT comparado com os demais. Houve uma melhora na sua associação de forma geral com todos os outros testes e nos diferentes grupos, excluindo-se apenas as amostras PRÉ do grupo 2 na fase 2, provavelmente devido ao grande número de amostras com baixa reatividade (baixos PRA). O fato do LCT ter sido um dos mais afetados é justificável, devido a sua leitura altamente subjetiva (feita por operador) e que pode ser afetada por má qualidade da preparação como presença de fibrinas e/ou agregados. Sugerimos que se pondere sobre este fato ao se utilizar estes testes em estudos retrospectivos (amostras estocadas há mais de 4 anos). No levantamento de literatura realizado, não verificamos nenhum relato anterior sobre interferência nos resultados devido à qualidade de amostras estocadas a -20°C , porém, nos trabalhos sobre pesquisa de anticorpos plaquetários, normalmente o tempo entre a coleta das amostras e a realização dos testes, ou foi inferior a quatro anos^{17,52,58}, ou então se tratava de estudos prospectivos^{15,16,18,43,71}. Todavia sabemos que a qualidade do material a ser testado pode interferir de forma direta em diversos testes laboratoriais e que, portanto, isto pode ter ocorrido com nossos testes na fase 1.

Fato novo que ocorreu na fase 2 foi a maior sensibilidade do Flow PRA™ em detectar maior número de amostras fracamente reativas (baixos PRA), em especial nas amostras PRÉ transfusionais, fazendo com que a sua concordância entre MAIPA e PIFT diminuí-se nestas amostras. Sato e colaboradores também reportaram recentemente, em uma carta ao editor⁷², dois casos de pacientes transfundidos apresentando anticorpos HLA detectados mais precocemente pela técnica Flow PRA™ quando comparado com LCT (neste relato não foram avaliados PIFT e MAIPA). Ao analisarmos o PRA (% de reatividade do painel de antígenos testados) dos soros reativos pelo Flow PRA™, verificamos que conforme esperado, quanto menor o PRA, menor a concordância entre as metodologias (tabela 16). O MAIPA foi o teste que mais detectou amostras de baixo PRA (60% na fase 1 e 31% na fase 2) seguido do PIFT (44,4% na fase 1 e 15% na fase 2) e por último a LCT (12,5% na fase 1 e 7,7% na fase 2). Surpreendentemente, na fase 2 tivemos uma em 12 amostras com alto PRA (60%) que não foi detectada nem por MAIPA, nem por PIFT. Sendo assim, diante deste critério de análise dos PRAs das amostras, em termos de sensibilidade, o MAIPA demonstrou ser o mais próximo do Flow PRA™ seguido pelo PIFT e por último o LCT. Estes dados corroboram relatos iniciais^{51,73,72} de que o Flow PRA™ seria uma técnica mais sensível que as atuais para pesquisa de anticorpos HLA e, que o MAIPA⁴³ também tem demonstrado ser uma técnica sensível para estes anticorpos relacionados à refratariedade plaquetária.

Em conclusão, baseados na fase 2, em que não houve interferência da qualidade das amostras (amostras armazenadas < 2 anos), não houve distinção entre os grupos, sendo que as técnicas Flow PRA™, MAIPA e PIFT demonstraram boa concordância entre si tanto para o grupo 1, como para o grupo 2 e 3. Apesar da melhora nas concordâncias do LCT na fase 2, ele continuou a apresentar índices menores de concordância com as outras técnicas, sendo considerado, portanto, o de menor sensibilidade. Com algumas exceções (por exemplo MAIPA e PIFT na fase 2) não houve

100% de concordância entre as metodologias testadas. Uma certa discordância entre as técnicas era até compreensível e esperada, pois os testes utilizam diferentes tipos biológicos como antígenos como a plaqueta íntegra para o teste PIFT, a glicoproteína plaquetária para a técnica MAIPA, linfócitos na técnica LCT e peptídeos de HLA fixados em micropartículas, no Flow PRA™. Poucos são os estudos realizados comparando diferentes metodologias para a pesquisa e identificação de anticorpos plaquetários. Foram realizados comparações do PIFT com MAIPA⁷⁴, MAIPA com LCT^{17,43}, e um estudo comparando LCT, PIFT, um teste de imunofluorescência utilizando linfócitos como células alvo e um teste do tipo ELISA⁵². Nos estudos^{17,43,52} comparando o teste LCT com MAIPA e PIFT, o mesmo sempre apresentou uma sensibilidade inferior aos outros testes. Quando comparou-se PIFT com MAIPA⁷⁴, este demonstrou maior sensibilidade que PIFT. Dentro do nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho utilizando estas quatro metodologias combinadas (Flow PRA™, MAIPA, PIFT, LCT) para pesquisa de anticorpos plaquetários e nossos resultados foram semelhantes aos encontrados isoladamente.

Assim, poderíamos classificar os testes na seguinte ordem decrescente em relação à sensibilidade: de Flow PRA™ para MAIPA para PIFT para LCT.

Também foram realizados alguns estudos comparando-se diferentes técnicas laboratoriais^{75,76,77,78,79}, porém para realização de provas de compatibilidade (ou seja, ao invés de utilizar-se painéis de células conhecidas para identificação do anticorpo plaquetário, simplesmente as células do doador são testadas contra o sangue do paciente para verificar se são compatíveis). Nestes estudos, realizados na grande maioria na década de 80 e início da década de 90, foram comparados metodologias utilizadas na época como LCT, PIFT (MAIPA apesar de ter sido desenvolvido em 1987 ainda era de difícil realização e Flow PRA™ ainda não estava disponível), e outras já não tão utilizadas atualmente como técnicas de adesão⁷⁸, uso de radioisótopos⁷⁶ e mesmo algumas técnicas em ELISA^{76,77}. Na maioria dos estudos^{75,77,78,79}, a técnica PIFT e as tipo ELISA mostraram-

se as mais adequadas, apresentando maiores correlações com sucesso da transfusão. Apenas um dos estudos⁷⁶ encontrou que a técnica LCT foi mais adequada em prever o sucesso da transfusão que a técnica PIFT. Este fato já demonstrava a dificuldade em se encontrar total concordância entre as diferentes metodologias na época, seja por variações técnicas, seja por variações clínicas dos pacientes analisados. Acreditamos que a melhor escolha deve ser baseada na experiência previa da maioria dos autores conjuntamente com a realização de uma validação interna de cada serviço para verificar qual a técnica se adequa melhor a sua realidade.

5.2 Prevalências dos Anticorpos Plaquetários

As prevalências dos anticorpos plaquetários encontrados nos grupos 1 e 2 variaram dependendo da técnica empregada (tabelas 17 e 18). Como não houve diferença significativa nas prevalências entre a fase 1 e 2 para as amostras PRÉ e PÓS (foi verificada diferença nas prevalências das amostras PRÉ do grupo 2 para MAIPA, PIFT e LCT mas não para o Flow PRA™) e a técnica Flow PRA™ foi a mais sensível (vide discussão acima), consideraremos as prevalências dadas pelo Flow PRA™ para facilitar a discussão.

Assim, a prevalência para o **grupo 1** (baseados na fase 2, em que o fator da qualidade das amostras foi afastado, conforme também já discutido acima) nas amostras PRÉ transfusionais foi de 25% (IC95%: 11,5 – 43,4%) e das amostras PÓS foi de 22,6% (IC 95%: 9,6 – 41,1%). Esta taxa de prevalência ficou um pouco acima do trabalho referência¹⁹, trabalho multicêntrico realizado em 1997 e coordenado por Slichter e colaboradores, em que se verificou a taxa de sensibilização em pacientes imunodeprimidos de 18% para pacientes recebendo hemocomponentes leuco-reduzidos (transfusão de glóbulos vermelhos e/ou plaquetas). Porém, vale ressaltar que neste trabalho os pacientes eram recém-diagnosticados e não haviam recebido grande número

de transfusões prévias, além de serem exclusivamente portadores de LMA. No nosso caso, 60% de nossos pacientes já tinham recebido transfusões previamente, 84% das mulheres apresentaram gravidez anterior, e o grupo era composto além de LMA, por pacientes portadores de outras patologias como LNH e MM. Em outros estudos com diferentes grupos de pacientes recebendo hemocomponentes leuco-reduzidos⁸⁰, foram encontrados prevalências variando de 7 a 44%, dependendo do tipo de paciente estudado (um único tipo de patologia comparado com várias patologias), da técnica de detecção dos anticorpos, entre outros motivos apresentados. Sendo assim, a nossa prevalência para este grupo está dentro das taxas descritas na literatura, taxa esta com número significativo de pacientes com potencial para desenvolver refratariedade aloimune a transfusões de plaquetas. Como alguns destes pacientes do grupo 1 podem vir a necessitar de transplante de células progenitoras, e assim ficarem mais dependentes de transfusões de plaquetas, seria interessante realizar a PAP no início do tratamento para já identificar os pacientes em potencial para desenvolver refratariedade aloimune e já fornecer somente plaquetas compatíveis (nos casos de PAP reativa), de tal forma que se evitasse o aumento da reatividade do anticorpo envolvido.

A prevalência de anticorpos no **grupo 2** (fase 2, utilizando o Flow PRATM) foi de 20% (IC95%: 8,4 – 37%) nas amostras PRÉ transfusionais e 31,4% (IC95%: 16,8 – 49,3%) nas amostras PÓS transfusionais. As taxas de prevalência encontradas nas amostras PÓS transfusionais para o grupo 2 foram maiores do que as taxas de prevalência do grupo 1. Este fato era esperado pois os pacientes do grupo 2 receberam hemocomponentes não leuco-reduzidos e não estavam em tratamento imunossupressor^{68,69,71}. Estudos anteriores⁶⁸ demonstraram uma taxa de aloimunização de 33,6% e 64,3% em homens e mulheres cardíacos respectivamente, portanto, nossa taxa encontrada para este grupo também está de acordo com estudos prévios realizados em grupos semelhantes de pacientes.

Vale ressaltar que nos pacientes estudados já se verificou uma alta taxa de amostras PRÉ transfusionais reativas (25% para o grupo 1 e 20% para o grupo 2). Esta taxa significa que, em cada quatro ou cinco pacientes destas patologias que internam em nosso Hospital, ao menos um apresenta anticorpos plaquetários do tipo HLA. Este fato, de alta taxa de testes positivos nas amostras PRÉ também pode justificar-se pelo fato do Hospital Sírio Libanês ser considerado um hospital terciário, sendo grande parte de seus pacientes já tratados previamente em outros hospitais e que o buscam em casos mais graves. A taxa de aloimunização para anticorpos eritrocitários nas amostras PRÉ transfusionais também é alta nos pacientes atendidos em nossa instituição (65% dos pacientes que apresentam anticorpos contra antígenos eritrocitários, já apresentam anticorpos na amostra PRÉ transfusional), e como tem-se verificado forte correlação entre taxas de aloimunização para hemácias e antígenos HLA⁶⁹, é provável que esta alta frequência de anticorpos nas amostras PRÉ seja explicada por estes fatos.

Em estudos anteriores⁶⁹ utilizando pacientes cardíacos transfundidos com glóbulos vermelhos não leuco-reduzidos, verificou-se uma taxa de 10% de reatividade nas amostras PRÉ transfusionais para anticorpos HLA, e estes pacientes não apresentavam nenhuma história previa de contato alogênico, seja por gravidez ou transfusão.

5.3 Influência das transfusões nas prevalências dos anticorpos encontrados

Em relação à influência da transfusão na incidência de aloimunização, foi verificado que apenas o **grupo 2** demonstrou um aumento na aloimunização após a transfusão (teste McNemar, $p < 0,05$). Como já bem descrito e discutido na literatura, o uso de hemocomponentes leuco-reduzidos diminui a sensibilização de pacientes contra antígenos HLA^{58,80}. Nossos dados, tanto na fase 1, como na fase 2 para o grupo 1 corroboram esta afirmação. Não foi detectado aumento na sensibilização de nossos pacientes do grupo 1 após as transfusões realizadas dentro do período do estudo (média

de 3 meses). Porém, para o grupo 2 que recebeu hemocomponentes não leuco-reduzidos houve aumento na sensibilização de nossos pacientes, fato também já bem definido na literatura^{58,80}. Vale ressaltar que observamos na fase 2 nos pacientes do grupo 2, uma queda na taxa de sensibilização quando comparada com a fase 1. Este fato ocorreu provavelmente devido à diminuição da quantidade de hemocomponentes transfundidos na fase 2. A taxa de sensibilização dos pacientes transfundidos é diretamente proporcional ao número de transfusões, ou seja, quanto maior o número de transfusões recebidas, maior o número de pacientes sensibilizados⁶⁹. O que ocorreu no nosso estudo foi que a partir de 2005 uma nova política de indicação de transfusões foi introduzida em nosso Hospital, consistindo em maior divulgação das reais necessidades transfusionais dos pacientes. Assim, houve um melhor aproveitamento das transfusões, fazendo com que diminuísse o número de transfusões realizadas em pacientes, especialmente do grupo 2 (cardíacos, PTQ e fraturas). Este fato fez com que o grupo 2 na fase 2, tenha recebido menor número de transfusões que o grupo 2 da fase 1 (mediana de 4 versus 8 unidades de glóbulos respectivamente, $p < 0,05$), refletindo-se na taxa de aloimunização, que também caiu (de 45% na fase 1 para 31,4% na fase 2). Porém, mesmo assim pudemos verificar que ainda estamos sensibilizando nossos pacientes, pois além de aumento na prevalência das amostras PÓS transfusionais em relação às amostras PRÉ transfusionais (31,4% em relação a 20%), também verificamos aumento no número de anticorpos apresentados (análise do PRA) após as transfusões recebidas em relação às amostras PRÉ transfusionais (lembrando que já 20% das amostras PRÉ eram reativas). Vale ressaltar que apesar destes pacientes (cardíacos, PTQ e fraturas) não necessitarem de muitas transfusões de plaquetas, portanto, não tão sujeitos a desenvolver refratariedade imune, estes anticorpos detectados (HLA) também estão envolvidos em reações febris não hemolíticas^{4,46}, podem causar rejeições em transplantes de órgãos (os pacientes cardíacos podem no futuro vir a necessitar de transplantes)⁴⁶, e reações mais raras porém

severas como TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injury) no qual 5 a 15% dos casos são fatais⁴.

A utilização da leuco-redução nos hemocomponentes que estes pacientes recebem poderia ser utilizada como forma de prevenção desta aloimunização observada (fato já bem evidenciado para pacientes onco-hematológicos^{58,80}). Porém, em estudo recente feito com pacientes cardíacos recebendo hemocomponentes leuco-reduzidos e não leuco-reduzidos⁶⁹, não foi verificada diferença significativa para aloimunização de anticorpos HLA nestes pacientes. A frequência da aloimunização foi semelhante para ambos os grupos. Todavia, este estudo utilizou como hemocomponentes não leuco-reduzidos glóbulos preparados com a remoção da camada leuco-plaquetária (“buffy-coat”), que significa hemocomponentes com número menor de leucócitos (na ordem de 10^7 leucócitos) quando comparados com hemocomponentes padrão (sem a remoção da camada leuco-plaquetária – ordem de 10^8 leucócitos). Este fato (menor número de leucócitos no hemocomponente) poderia ter minimizado alguma diferença entre os grupos.

5.4 Prevalência dos Anticorpos HPA

Para os anticorpos HPA, verificou-se uma taxa de prevalência similar ao estudo referência com pacientes onco-hematológicos (taxas ao redor de 6-7%)⁵⁸, tanto na fase 1 (6,1% para o grupo 1 e 9,7% para o grupo 2) quanto na fase 2 (9,4% para o grupo 1 e 6% para o grupo 2). O que variou entre as fases foi a especificidade dos anticorpos HPAs encontrados. Na fase 1, os anticorpos foram mais caracterizados por anticorpos pan-reativos com as glicoproteínas testadas do que específicos para os sistemas HPAs. Este tipo de pan-reatividade com as glicoproteínas plaquetárias tem sido descrito anteriormente¹⁷, em taxas de 4 até 26% de pacientes politransfundidos. Porém, ainda não se conhece sua real importância clínica em transfusões de plaquetas¹⁷. Na fase 2 não

verificamos tantos anticorpos com pan-reatividade como na fase 1. Enquanto na fase 1 apenas um paciente apresentou anti-HPA-1b e outro paciente um provável anti-HPA-1b (não pôde ser confirmada devido à indisponibilidade de mais soro), na fase 2 verificamos anticorpos específicos como anti-HPA-3b em um paciente e dois pacientes com anti-HPA-5b. Anticorpos estes que puderam ser confirmados com a genotipagem dos pacientes envolvidos, confirmando assim a sua origem alogênica, ao demonstrar a ausência do gene respectivo para sua expressão. Em estudo anterior realizado por Kiefel e colaboradores¹⁷ verificou-se uma prevalência de 8% de anticorpos HPA em pacientes onco-hematológicos, sendo que anti-HPA-5b foi o mais freqüente (4%) seguido do anti-HPA-1b (1,6%). Sanz e colaboradores¹⁶ também encontraram anti-HPA-5b (1,9%) em seus pacientes hematológicos aloimunizados com anticorpos HLA. No nosso estudo, encontramos taxa de prevalência semelhante à literatura em ambas as fases, e com especificidades semelhantes aos autores citados porém, as especificidades foram distintas nas duas fases realizadas (anti-HPA-1b foi o mais freqüente na fase 1 e anti-HPA-5b foi o mais freqüente na fase 2). Surpreendentemente, identificamos um paciente com anti-HPA-3b, um anticorpo incomum considerado de difícil identificação laboratorial⁴⁴, fato este que não ocorreu em nossa experiência. Além disto, este paciente apresentou este anticorpo somente na amostra PÓS transfusional, demonstrando que a transfusão pode ter sido o agente causal desta aloimunização. Talvez esta diferença na especificidade dos anticorpos encontrados seja devido à variabilidade genética de nossa população, porém, para maiores conclusões talvez fosse interessante aumentar o número de pacientes estudados, pois o número encontrado (dois pacientes na fase 1 e três pacientes na fase 2) ainda é baixo. Para aumentar o número de pacientes, seria indicado um estudo multicêntrico, pois como já comentado, verificamos dificuldade em encontrar o número adequado de pacientes em dois anos de coleta utilizando um único hospital. Estes

anticorpos HPA causam refratariedade plaquetária e estão também envolvidos em reações febris não hemolíticas^{17,81}.

Interessante ressaltar que uma das pacientes (com história de gravidez prévia) apresentando anti-HPA-5b pertencia ao grupo 2 da fase 2 e este anticorpo reagiu nas amostras PRÉ e PÓS transfusionais. Em estudo prévio⁸², no qual foram estudadas as prevalências de anticorpos HPAs em mulheres doadoras de sangue com história de gravidez prévia, foi verificado que dentre os anticorpos HPAs mais encontrados (presente em 4,2% das doadoras), o anti-HPA-5b foi o mais freqüente (3,2%) entre as doadoras apresentando anticorpos HPA.

5.5 Especificidade dos Anticorpos Plaquetários Encontrados

A distribuição das especificidades dos anticorpos encontradas (tabela 21) neste estudo está de acordo com a literatura^{15,16,17,18}, tendo a grande maioria (> 90%) presença de anticorpos HLA tanto nas amostras PRÉ como PÓS transfusionais, seja somente HLA (84% em média para fase 1 e 2), ou em mistura com anticorpos pan-reativos com glicoproteínas plaquetárias (8% em média para fase 1 e 2), ou em misturas com anticorpos HPA (7%). Uma única amostra PÓS apresentou apenas anticorpos contra glicoproteína plaquetária (IaIIa) sem a presença de anticorpos HLA na fase 1 (1,5% das amostras reativas da fase 1) e dois pacientes da fase 2 do grupo 2 não apresentaram anticorpos HLA: a paciente com anti-HPA-5b nas amostras PRÉ e PÓS, e outro inespecífico contra GP IIbIIIa (5% das amostras reativas na fase 2). Esta frequência de anticorpos plaquetários específicos sem a presença de anticorpos HLA em pacientes transfundidos não está discordante de outros autores, que encontraram uma prevalência ao redor 2%^{17,52}.

5.6 Análise da Importância Clínica dos Anticorpos Encontrados

Apesar da falta de evidências sobre a utilização do incremento na contagem plaquetária no sangue periférico do paciente como forma de checar-se a efetividade das transfusões de plaquetas, este é o método mais recomendado por especialistas e entidades médicas transfusionais^{4,19,83,84}. Espera-se, em média, um aumento de 20.000 – 40.000 plaquetas/ μ L na contagem plaquetária do sangue periférico do paciente (após 1 hora da transfusão), após uma dose padrão de plaquetas⁶. Vários outros fatores podem interferir neste rendimento como o tamanho (peso e altura) do paciente, a quantidade de plaquetas na dose padrão, entre outros⁶. Para reduzir o efeito destas variáveis, alguns cálculos são utilizados em que se leva em conta o tamanho do paciente e a quantidade de plaquetas infundidas como o cálculo utilizado no ICCp (incremento corrigido de contagem plaquetária)^{3,6}. No nosso estudo utilizamos o ICCp por ser, atualmente, o método mais citado nos trabalhos em que se analisa o rendimento plaquetário da transfusão⁵⁸. Outro fator importante que deve ser lembrado é o momento da coleta do sangue do paciente para a realização da contagem de plaquetas. Existe uma forte associação entre a contagem PÓS 1-2 horas da transfusão com causas imunes^{7,8}, demonstrando que, quando há destruição plaquetária por causas imunes (presença de anticorpos anti-plaquetas na circulação do paciente), esta destruição é rápida, pois o anticorpo reage com a plaqueta e ela é rapidamente removida da circulação pelo sistema retículo-endotelial, refletindo-se em baixas contagem plaquetárias pós transfusão no sangue periférico do paciente. Caso a amostra pós transfusional seja coletada mais tarde (18 – 24 hs pós transfusão), e apresente baixos incrementos, outros fatores podem estar envolvidos como febre, sangramento, uso de alguns antibióticos, etc^{6,10}. Também é importante lembrar que a amostra pré transfusional deve ser a mais recente possível antes da transfusão, para realmente refletir a contagem plaquetária no sangue periférico do paciente imediatamente antes da transfusão. Estes fatores de tempo influenciam muito nas coletas das amostras e

é um fator limitante em estudos em que o ICCp é utilizado pois, em grandes hospitais em que muitos pacientes são acompanhados, fica difícil para o grupo de enfermagem cumprir com estes horários⁸⁴.

No nosso estudo, optamos por utilizar o ICCp com contagens após uma hora da transfusão (máximo permitido: 2 horas) e contagem pré imediatamente antes da transfusão, pois estávamos interessados em verificar a importância clínica do anticorpo, em outras palavras, se aquele anticorpo (PAP reativa) está realmente retirando as plaquetas de circulação. Caso por algum motivo os tempos estipulados para as coletas não foram alcançados, os respectivos ICCp foram descartados. O valor de corte de ICCp $\leq 5.000/\mu\text{L}$ foi utilizado baseado em diversos estudos realizados sobre a influência dos anticorpos na resposta aloimune à transfusão de plaquetas^{58,60} e é o mais utilizado por diversos especialistas da área^{19,58,62}.

Assim, analisamos 176 ICCp – 1 hora (83% das transfusões) dos pacientes que apresentaram algum teste (Flow PRA™, MAIPA, PIFT ou LCT) reativo (PAP reativa) e 254 ICCp – 1 hora (85,8% das transfusões) dos pacientes com PAP não reativa. Nos pacientes com PAP reativa, verificamos ICCp insatisfatórios em 12,5% dos ICCps analisados, enquanto que, nos pacientes com PAP não reativa verificamos um índice igual a 2,8%. Sendo assim, os pacientes com PAP reativa apresentaram uma frequência de ICCp insatisfatórios **quatro** vezes maior que os pacientes com PAP não reativa (teste do chi-quadrado, $p < 0,001$). Porém, este número poderia ser maior ainda, pois verificamos que ao realizar as provas de compatibilidade, os ICCp dos pacientes apresentando PAP reativa estavam super-estimados por transfusões compatíveis que ocorreram ao acaso (dependente do grau de reatividade do anticorpo - PRA), ou mesmo de pacientes que estariam sendo acompanhados pela rotina do hospital e estariam recebendo plaquetas selecionadas e compatibilizadas. Fato este comprovado, pois 95,4% das PC realizadas no

grupo de pacientes com PAP reativa apresentaram ICCp eficaz ($\geq 5.000/\mu\text{L}$) , ou seja, foram compatíveis.

Todavia, mesmo com este fato, ao analisarmos todos os incrementos plaquetários dos pacientes separando-os apenas pela reatividade das PAPs (pacientes com PAP reativa e pacientes com PAP não reativa) verificamos que os pacientes com PAP reativas apresentaram ICCp inferiores aos pacientes com PAP não reativa ($p < 0,001$ – figura 22). Diversos trabalhos já demonstraram esta correlação de baixos incrementos com presença de anticorpos plaquetários^{7,8, 58,60,62,70}.

Os pacientes com PAP reativa apresentaram uma queda média de 5.200 plaquetas/ μL no seu ICCp, quando comparado com os pacientes com PAP não reativa (tabela 22) demonstrando que, de alguma forma, os anticorpos estavam afetando os ICCp – 1 hora. Slichter e colaboradores⁷⁰ verificaram que pacientes apresentando anticorpos anti-HLA apresentaram uma queda em seu ICCp de aproximadamente 4.300/ μL quando comparados com pacientes que não apresentavam anticorpos linfocitotóxicos, portanto, bem semelhante aos nossos resultados.

Como mencionado acima, nem todo paciente com PAP reativa apresentou 100% de PRA (100% de reatividade com o painel de células testado), e este fato significa que o paciente apresenta anticorpos mas pode ter sido transfundido com alguma plaqueta que não apresenta o antígeno correspondente à sua especificidade (plaqueta compatível), e então não pudemos mensurar a importância clínica do anticorpo, pois forneceu assim um ICCp satisfatório. Para afastar este fato das nossas análises sobre a importância clínica dos anticorpos, separamos os ICCp dos pacientes que tinham provas de compatibilidade (PC) realizadas. Assim, verificamos que os pacientes que apresentaram PC incompatível, ou seja tinham anticorpos que reagem com as plaquetas infundidas, apresentaram ICCp significativamente inferiores ($p < 0,001$) aos pacientes que tinham anticorpos mas não reagem com as plaquetas transfundidas (PC compatível) (Figura 23). A melhora nos

incrementos plaquetários de pacientes refratários à transfusão de plaquetas com a utilização de provas de compatibilidade já está bem estabelecida^{78,79,83,84,85,86}. Gates e colaboradores⁷⁸ verificaram incremento médio de 9.195/ μ L para pacientes recebendo plaquetas compatíveis contra incremento médio de 2.269/ μ L para pacientes recebendo plaquetas incompatíveis. O ICCp dos pacientes que receberam plaquetas compatíveis foi, em média, 13.700/ μ L superior, aos pacientes que receberam plaquetas incompatíveis (tabela 23). No estudo de Gelb⁸⁶ e colaboradores verificou-se aumento médio no ICCp de 8.000/ μ L para pacientes recebendo plaquetas compatíveis. Nossos resultados de ICCp são ligeiramente superiores (tabela 23) que os anteriormente apresentados na literatura. Este fato pode ser devido a melhor acompanhamento dos ICCp dos pacientes (rigor na hora da coleta das amostras) e mesmo melhorias na metodologia utilizada para as PC, pois como já demonstrado, o MAIPA (que também foi utilizado, além do PIFT) tem apresentado resultados mais sensíveis que as técnicas utilizadas nos estudos anteriores. Sendo assim, pudemos confirmar que a presença de anticorpos plaquetários no soro do paciente faz com que os incrementos plaquetários sejam afetados de forma a comprometer o aproveitamento da transfusão de plaquetas pelos pacientes.

No estudo recente realizado por Slichter e colaboradores⁷⁰ diversos fatores foram analisados que poderiam causar refratariedade às transfusões de plaquetas em pacientes leucêmicos. Foram analisados fatores imunes (presença de anticorpos plaquetários) e não imunes, como febre, uso de anfotericina B, esplenomegalia, sangramentos, infecções, gravidez prévia e outros. Entre todos estes fatores analisados, a presença de anticorpos plaquetários (linfocitotóxicos) foi o fator que apresentou o maior risco de refratariedade plaquetária. Este risco foi mensurado pelos incrementos plaquetários dos pacientes. Portanto, nossos dados confirmam mais uma vez que a presença destes anticorpos na circulação do paciente afeta o incremento plaquetário pós transfusional.

5.7 Análise de qual metodologia apresenta maior correlação com a importância clínica do anticorpo

Resta verificar qual dos testes utilizados para PAP (Flow PRA™, MAIPA, PIFT e LCT) está melhor correlacionado com a queda nos ICCp. Para tal, separamos os pacientes que apresentaram PAP reativa (n=14) e destes, definimos quais realmente apresentaram refratariedade plaquetária por causas imunes (definido por no mínimo duas transfusões consecutivas, ABO compatível e com ICCp – 1 hora inferior a 5.000/ μ L^{58,62} e apresentaram baixos ICCp quando transfundidos com plaquetas incompatíveis e altos ICCp quando transfundidos com plaquetas compatíveis). Desta forma, foi possível encontrar com certeza somente quatro pacientes (28,6% dos pacientes com PAP reativa) que desenvolveram refratariedade por causas imunes e quatro pacientes (28,4%) que não desenvolveram refratariedade por causas imunes, número insuficiente para chegar a alguma conclusão. Assim, tivemos que realizar a fase 3 deste estudo para podermos aumentar o número de pacientes acompanhados.

Na fase 3 utilizamos pacientes que se submeteram a PAP pelo protocolo realizado pelo Hospital Sírio Libanês em casos de suspeita clínica de refratariedade ou porquê apresentaram incrementos insatisfatórios após a transfusão. Estes pacientes foram submetidos a PAP e quando apresentaram reatividade, receberam somente transfusões de plaquetas compatíveis. Inicialmente, verificamos para estes pacientes dados semelhantes aos observados para os pacientes da fase 2 em relação aos ICCp, tais como, baixos ICCp para os pacientes que apresentaram PAP reativa (figura 24), com uma queda média no ICCp de 5.800 plaquetas/ μ L em relação aos pacientes com PAP não reativa. Os pacientes desta fase também demonstraram que após receberem plaquetas compatibilizadas, isto é, sem a presença do antígeno correspondente à especificidade do anticorpo, passaram a apresentar bons ICCp (Figura 25) e melhor ainda, passaram a apresentar ICCp semelhantes aos pacientes que apresentaram PAP não reativa (Figura

26), demonstrando que ao se fornecer plaquetas compatíveis para estes pacientes, retirou-se o agente causal dos baixos ICCp apresentados, fazendo com que a transfusão de plaquetas, de ineficaz, passasse a ser eficaz. Desta forma, demonstramos mais uma vez que a presença de anticorpos plaquetários realmente afetou a eficácia da transfusão de plaquetas.

Um fato que nos chamou atenção nesta fase foi a alta taxa de frequência de PAP reativas observada: 75% (30/40) dos pacientes apresentaram PAP reativa. Esta taxa foi significativamente maior que a taxa apresentada na fase 1 e 2 do estudo (12% e 22,6% respectivamente, para o grupo 1). O grande motivo desta diferença é a forma de seleção destes pacientes. Na fase 3 os pacientes foram selecionados por que apresentaram alguma suspeita de refratariedade à transfusão de plaquetas, enquanto nas fase 1 e 2 foram selecionados exclusivamente devido ao seu diagnóstico. Alguns autores⁸⁷ sugerem que se faça a pesquisa de anticorpos plaquetários para todos os pacientes que recebem transfusões de plaquetas com frequência. Porém, como demonstrado em nosso estudo, especialmente na fase 2, este procedimento não se mostrou satisfatório para pacientes apresentando dependência a transfusões de plaquetas pois, as taxas de prevalência foram menores e alguns não desenvolveram refratariedade, apesar da presença de anticorpos no seu sangue. Este fato demonstra que verificar o acompanhamento de incrementos plaquetários pós transfusionais antes da realização da PAP, e indicá-la somente em casos de baixos incrementos, é mais eficiente e reduz custos laboratoriais desnecessários para diagnosticar refratariedade plaquetária por causas imunes.

O único grupo de pacientes que achamos que seria interessante a pesquisa de anticorpos plaquetários de forma rotineira seria os que se submeterão ao transplante de medula óssea, devido ao alto suporte hemoterápico necessário para este grupo, e que quando em caso de PAP positiva, poderíamos já separar doadores compatíveis para os mesmos, facilitando o gerenciamento das transfusões.

Entre os 40 pacientes estudados na fase 3 foi possível acompanhar 31 pacientes com seus incrementos pós transfusionais. Utilizando estes 31 pacientes da fase 3 (tabela 28) com os oito pacientes da fase 2 (tabela 24), totalizando 39 pacientes, analisamos os resultados dos testes utilizados para a PAP. Pela análise da curva ROC utilizando os resultados obtidos pelos ICCp (eficazes ou ineficazes) como padrão-ouro, verificamos que não houve diferença significativa entre as áreas apresentadas, ou seja, todos os testes apresentaram resultados semelhantes quando comparado com os valores de ICCp. Calculou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo de cada teste (tabela 29), e verificou-se, que o Flow PRATM apresentou maior sensibilidade que o MAIPA, seguido do PIFT e por fim, pela LCT. Os resultados foram muito similares à primeira e segunda fase do estudo, quando verificou-se a concordância entre as técnicas e conclui-se que o Flow PRATM era a técnica mais sensível seguida do MAIPA, PIFT e LCT. O fato que sobressai com esta nova comparação utilizando a refratariedade imune como padrão ouro é a menor especificidade do Flow PRATM (média de 63%). Apesar do Flow PRATM ter detectado mais anticorpos que as outras técnicas, estes anticorpos nem sempre apresentaram importância clínica para o paciente e portanto não causaram refratariedade imune. Novotny e colaboradores⁸⁸ encontraram uma associação maior de refratariedade plaquetária em pacientes apresentando anticorpos anti-HLA de alto PRA (acima de 40%), quando comparado com pacientes apresentando anticorpos de baixo PRA (abaixo de 40%). Talvez isto pudesse explicar a menor especificidade do Flow PRATM com a refratariedade, pois o mesmo foi o teste que detectou número maior de amostras com baixo PRA (tabela 16). Surpreendentemente, a LCT não ficou muito atrás da técnica PIFT. Na verdade, seus valores foram bem semelhantes. Freedman e colaboradores⁷⁶ também encontraram resultados superiores para a LCT quando comparado com PIFT em relação à melhora no incremento plaquetário.

Poucos são os trabalhos na literatura sobre a comparação de testes de detecção de anticorpos plaquetários (HLA e HPAs) e sua influência clínica nas transfusões medida pelos incrementos plaquetários pós transfusionais. Recentemente Kurz M. e colaboradores⁴³ compararam a técnica MAIPA e LCT com incrementos plaquetários pós transfusionais e verificaram que o MAIPA foi mais sensível que a LCT, e que estes anticorpos detectados pelo MAIPA e não detectados pela LCT influenciaram o incremento pós transfusional do paciente. Outros autores também demonstraram correlação entre anticorpos detectados pela técnica PIFT^{79,85,89} e queda nos incrementos plaquetários, assim como também para a técnica LCT^{7,76,90}. Porém, nestes trabalhos os testes foram utilizados isoladamente ou apenas em pares (MAIPA e LCT ou PIFT e LCT). Nosso estudo utilizou as mesmas amostras com os quatro diferentes testes (Flow PRATM, MAIPA, PIFT e LCT) para compará-los com os incrementos plaquetários obtidos, e especialmente para o Flow PRATM, não havia até então nenhum trabalho demonstrando a correlação clínica para os anticorpos por ele detectados, apenas relato de dois casos recentemente publicado em que o Flow PRATM detectou anticorpos mais precocemente quando comparado com LCT⁷².

Nosso estudo demonstra que, apesar das melhorias em sensibilidade nas técnicas mais recentemente lançadas como Flow PRATM e MAIPA, nenhuma das técnicas conseguiu detectar todos os anticorpos causadores de baixos incrementos plaquetários. Porém, realmente, o Flow PRATM foi a técnica mais sensível em prever refratariedade aloimune seguida da técnica MAIPA, PIFT e LCT respectivamente. Além disso nem sempre os anticorpos detectados por estas técnicas causaram refratariedade. Como o que nos interessa é a detecção de anticorpos que efetivamente apresentam importância clínica, em outras palavras, causam refratariedade imune, e devido à perda da especificidade pelo Flow PRATM (63%) apesar de sua maior sensibilidade (90%), optaríamos pela técnica MAIPA (sensibilidade média de 80% e especificidade de 74%)

para utilização na rotina de um serviço. Apesar desta técnica ter sido desenvolvida especificamente para identificação de anticorpos HPA, mostrou-se altamente efetiva em detectar anticorpos HLA, mesmo com número menor de células de triagem. Porém, como se trata de uma técnica demorada e algumas vezes o paciente não pode esperar muito tempo, a técnica PIFT poderia ser usada como alternativa, pois também apresentou sensibilidade média de 74% e especificidade de 79% e é mais rápida (tempo de execução: 3 – 4 horas). Mas mesmo a técnica LCT poderia ser utilizada com certa garantia de sucesso nas transfusões, pois apresentou sensibilidade e especificidade bem semelhantes à técnica PIFT porém, tem a desvantagem de utilizar um painel de células (mínimo 20 doadores) apresentando boa viabilidade, tipadas para HLA classe I para sua execução, o que dificultaria a sua instalação em rotinas de serviços de hemoterapia. O PIFT, assim como o MAIPA, podem ser realizados com plaquetas congeladas de doadores previamente conhecidos para os antígenos HLA mais freqüentes na nossa população, facilitando assim a sua implantação rotineira.

6.0 CONCLUSÕES

- ❖ Foram identificados anticorpos plaquetários nos pacientes estudados, sendo que as metodologias laboratoriais testadas (Flow PRA™, MAIPA, PIFT e LCT) apresentaram boa concordância nos seus resultados, porém, não apresentaram 100% de concordância.
- ❖ O Flow PRA™ foi a técnica mais sensível para detecção de anticorpos, seguida do MAIPA, PIFT e por último a LCT.
- ❖ Todas as técnicas foram afetadas na fase 1 pelo fato de terem sido utilizadas amostras congeladas por muitos anos (em média mais de quatro anos em freezer a – 20°C). Este fato deve ser levado em consideração na realização de futuros estudos retrospectivos utilizando estas técnicas.
- ❖ Apesar da menor concordância entre as técnicas na fase 1, não houve diferença significativa entre as frequências dos anticorpos na fase 1 e 2. A prevalência de anticorpos plaquetários para o grupo 1 foi de 22,6% nas amostras PÓS transfusionais e para o grupo 2 foi de 31,4%. Estas prevalências estão de acordo com outros grupos estudados^{68,80}.
- ❖ Os pacientes apresentaram prevalências altas já nas amostras PRÉ transfusionais, tanto para o grupo 1 (25%), como para o grupo 2 (20%).
- ❖ Nosso protocolo transfusional para o grupo 1 está sendo efetivo em diminuir a aloimunização em nossos pacientes, pois não verificamos aumento na taxa de

sensibilização destes pacientes. Já para o grupo 2, apesar da diminuição no número de transfusões realizadas na fase 2 quando comparado com a fase 1, ainda assim estamos sensibilizando estes pacientes para anticorpos HLA.

- ❖ A grande maioria dos anticorpos plaquetários identificados foi do tipo HLA classe I (presente em mais de 90% das amostras reativas). A prevalência de anticorpos HPA ficou ao redor de 9% para grupo 1 e 6% para grupo 2. Estas prevalências estão de acordo com prevalências estudadas em outras populações^{16, 17, 58}.
- ❖ O anticorpo HPA mais freqüente foi o anti-HPA-5b, seguido do anti-HPA-1b, também encontrado em outras populações^{16,17}. O fato de encontrarmos um anti-HPA-3b, anticorpo incomum em outras populações, pode ser devido à variabilidade genética de nossa população, mas ainda assim este número é pequeno para maiores conclusões .
- ❖ Os anticorpos identificados apresentaram importância clínica, pois afetaram os incrementos plaquetários dos pacientes, são, portanto, causadores de refratariedade aloimune.
- ❖ Ao utilizar-se a refratariedade aloimune medida através dos ICCp dos pacientes como padrão ouro para comparação de qual técnica seria a melhor para detecção de anticorpos clinicamente significativos, verificou-se que não houve diferença estatística entre elas, ou seja, apresentaram resultados semelhantes. O Flow PRA™ apresentou sensibilidade maior que as outras, porém sua especificidade foi menor, demonstrando que nem todos os anticorpos detectados pelo Flow PRA™ foram causadores de refratariedade aloimune. O mesmo ocorreu para as outras técnicas.

Atualmente em nosso país, pouquíssimos hospitais realizam em sua rotina algum teste de pesquisa de anticorpos plaquetários em seus pacientes com suspeita de refratariedade plaquetária após a transfusão⁹¹. Na legislação vigente⁹² (<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662&word=>) não existe nenhuma recomendação do que fazer com pacientes que não respondem bem à transfusão de plaquetas. Nossos estudos comprovam que nossos pacientes apresentam anticorpos plaquetários e que os mesmos afetam a eficácia das transfusões plaquetárias por eles recebidas. Além disto, comprovamos que ao fornecer plaquetas compatíveis para estes pacientes, estas passam a ser eficazes. Portanto, baseados nestes fatos recomendamos que na próxima revisão de nossa legislação, seja revista a seção de transfusão de plaquetas e que se recomende a utilização de pesquisa de anticorpos plaquetários, aos pacientes com indicação continuada de transfusão de plaquetas, e que tenham apresentado alguma refratariedade plaquetária, medida pelos incrementos plaquetários pós transfusionais. Ainda em casos de pesquisa de anticorpos reativa, que também se recomende a utilização de plaquetas compatíveis para estes pacientes.

Sugerimos ainda que devido à maior perda de especificidade do Flow PRATM, o tempo e custo de execução do MAIPA, a dificuldade técnica de obtenção de células de triagem para o LCT, que a técnica PIFT seja utilizada em rotina de pesquisa de anticorpos plaquetários para pacientes refratários.

BIBLIOGRAFIA

- 1 SCHREIBER G.B.; BUSCH M.P.; KLEINMAN S.H.; KORELITZ J.J. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *New England Journal of Medicine*, v.334, p. 1685-1690, 1996.
- 2 GOONOUGH L.T.; BRECHER M.E.; KANTER M.H.; AUBUCHON J.P. Transfusion Medicine – Blood Transfusion. *New England Journal of Medicine*, v.340, p.438-447, 1999.
- 3 Comitê Transfusional Multidisciplinar. *Guia de Condutas Hemoterápicas*, 1ª ed., Hospital Sírio-Libanês, 2005.
- 4 STRONCEK D.F.; REBULLA P. Platelet Transfusion. *Lancet*, v. 370, p.427-438, 2007.
- 5 FRIEDBERG R.C.; GAUPP B. Platelet Transfusion: Indications, Considerations, and Specific Clinical Settings. In: KICKLER T.; HERMAN J.H. *Current Issues in Platelet Transfusion Therapy and Platelet Alloimmunity* AABB press: Bethesda, Maryland, 1999, cap.1, p.1-32.
- 6 BENSON K. Criteria for diagnosing refractoriness to platelet transfusions. In: KICKLER T.; HERMAN J.H. *Current Issues in Platelet Transfusion Therapy and Platelet Alloimmunity* AABB press: Bethesda, Maryland, 1999, cap. 2, p.33-61.
- 7 DALY P.A.; SCHIFFER C.A.; AISNER J.; WIERNIK P.H. One-hour postransfusion Increments are valuable in predicting the need for HLA-Matched preparations. *Journal of the American Medical Association*, v. 243, p.435-438, 1980.
- 8 BRUBAKER D.B.; MARCUS C.; HOLMES E. Intravascular and Total body platelet equilibrium in healthy volunteers and in thrombocytopenic patients transfused with single donor platelets. *American Journal of Hematology*, v. 58, p.165-176, 1998.
- 9 REBULLA P. Platelet Therapy for patients refractory to random donor platelets. In: SEGATCHIAN J.; SNYDER E.L.; KRAILADSIRI P. *Platelet Therapy*. Elsevier Science: Amsterdam, 2000, cap. 22, p.485-502.
- 10 HUSSEIN M.A.; FLETCHER R.; LONG T.J.; ZUCCARO K.; BOLWELL B.J.; HOELTGE G.A. Transfusing platelets 2 h after the completion of amphotericin-B decreases its detrimental effect on transfused platelet recovery and survival. *Transfusion Medicine*, v. 8(1), p.43-47, 1998.
- 11 MURPHY M. Haematological Disease. In: MURPHY M.F.; PAMPHILON D.H. *Practical Transfusion Medicine*. Blackwell Science: Oxford, 2001, cap.9, p.108-118.
- 12 NOVOTNY V.M.J. Prevention and Management of Platelet Transfusion Refractoriness. *Vox Sanguinis*, v.76, p.1-13, 1999.
- 13 SEMPLE J.W.; FREEDMAN J. The basic Immunology of Platelet-Induced Alloimmunization. In: KICKLER T.; HERMAN J.H. *Current Issues in Platelet Transfusion Therapy and Platelet Alloimmunity* AABB press: Bethesda, Maryland, 1999, cap. 4, p.77-102.

- 14 KEKOMAKI R. Use of HLA and HPA-matched platelets in alloimmunized patients. *Vox Sanguinis*, v.74, suppl.2, p.359-363, 1998.
- 15 SCHNAIDT M.; NORTHOFF H.; WERNET D. Frequency and specificity of platelet-specific alloantibodies in HLA –immunized haematologic-oncologic patients. *Transfusion Medicine*, v.6, p.111-114, 1996.
- 16 SANZ C.; FREIRE C.; INAKI A; ORDINAS A.; PEREIRA A. Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. *Transfusion*, v.41, p.762-770, 2001.
- 17 KIEFEL V.; KONIG C.; HARTMUT K.; SANTOSO S. Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*, v.41, p.766-770, 2001.
- 18 LO S.C.; LIN D.T.; LIN S.W.S.; CHANG J-S. Frequency and Characterization of platelet specific antibodies in patients who received multiple platelet transfusions *J Formos Med Assoc*, v.99, p.902-905, 2000.
- 19 SCHIFFER C.A.; ANDERSEN K.C.; BENNETT C.L.; BERNSTEIN S.; GOLDSMITH M.; GOLDSTEIN M.; HUME H.; McCULLOUGH J.J.; McINTYRE R.E.; POWELL B.L.; RAINEY J.M.; ROWLEY S.D. REBULLA P.; TRONER M.B; WAGNON A. H.; AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Platelet Transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, v.19, p.1519-1538, 2001.
- 20 PETZ L.D.; GARRATY G.; CALHOUN L.; CLARK B.D. TERASAKI P.I.; GRESENS C.;GORNBEIN J.A.; LANDAW E.M.; SMITH R.; CECKA J.M. Selecting donors of platelets for refractory patients on the basis of HLA antibody specificity. *Transfusion*, v.40, p.1446-1456, 2000.
- 21 LUCAS G.F.; ROGERS S.E. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit (GTI PakPlus) for the detection of antibodies against human platelet antigens. *Transfusion Medicine*, v.9, p.63-67, 1999.
- 22 NANCE S.T.; HSU S.; VASSALO R.R. MURPHY S. Review: platelet matching for alloimmunized patients – room for improvement. *Immunohematology*, v.20, p.80-88, 2004.
- 23 OUWEHAND W.H.; MURPHY M.F.; ALLEN D.L. Human platelet and neutrophil antigens. In MURPHY M.F.; PAMPHILON D.H. *Practical Transfusion Medicine*. Oxford: Blackwell Science, 2001. cap.5, p.51-62.
- 24 BERRY J.E.; MURPHY C.M.; SMITH G.A. Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals na immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *British Journal of Haematology*, v. 110, p.1-9, 2000.
- 25 VON DEM BORNE A.E.G.K.; DECARY. ICSH/ISBT working party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sanguinis*, v.58, p.176, 1990.
- 26 LUCAS G.F.; METCALF P. Platelet and Granulocyte glycoprotein polymorphisms. *Transfusion Medicine*, v.10, p.157-174, 2000.

- 27 KROLL H.; KIEFEL V.; SANTOSO S. Clinical Aspects and Typing of Platelet Alloantigens. *Vox Sanguinis*, v. 74, suppl.2, p.345-354, 1998.
- 28 MEYER O.; HILDEBRANDT M.; SCHULZ B.; BLASCZYK R.; SALAMA A. Simultaneous genotyping of human platelet antigen (HPA) 1 through 6 using new sequence specific primer for HPA-5. *Transfusion*, v.39, p.1256-1258, 1999.
- 29 KIEFEL V.; SANTOSO S.; WEISHEIT M.; MUELLER-ECKHARDT. C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, v.70, p. 1722-1726, 1987.
- 30 PANZER S. Report on the Tenth International Platelet genotyping and Serology Workshop on behalf of the International Society of Blood Transfusion. *Vox Sanguinis*, v.80, p.72-78, 2001.
- 31 SIREN M.K.; KOPONEN A.; KEKOMAKI R. Serious adverse events after HPA-incompatible platelet transfusion in an alloimmunized patient with leukaemia. *Transfusion Medicine*, v.8, p.221-224, 1998.
- 32 MASTERS R.; TAANING E. Three cases of platelet refractoriness associated with the presence of a novel platelet-specific antibody. *Vox Sanguinis*, v.75, p.242-246, 1998.
- 33 PAPPALARDO P.A., SECORD A.R., QUITEVIS P.; HAIMOWITZ M.D.; GOLDFINGER D. Platelet transfusion refractoriness associated with HPA-1a alloantibody without co-existent HLA antibodies successfully treated with antigen-negative platelet transfusion. *Transfusion*, v.41, p.984-987, 2001.
- 34 BRAND A. Alloimmune platelet refractoriness: incidence declines, unsolved problems persist. *Transfusion*, v.41, p.724-726, 2001.
- 35 LEE K.; GODEAU B.; FROMONT P. CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion*, v.39, p. 873-879, 1999.
- 36 EMBL-EBI European Bioinformatics Institute – IPD- HPA Database Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freq_1.html. Acesso em 15 de maio de 2006.
- 37 CASTRO V.; ORIGA A.F.; ANNICHINO-BIZZACCHI J.M.; SOARES M.; MENEZES R.C.; GONÇALVES M.S.; ARRUDA V.R. Frequencies of platelet-specific alloantigen systems 1-5 in three distinct ethnic groups in Brazil. *European Journal Of Immunogenetics*, v. 26, p.335-360, 1999.
- 38 TORALLES PEREIRA C. O POLIMORFISMO DOS ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS TESE DE MESTRADO– UNESP-BOTUCATU, 2001
- 39 KAPLAN C. Evaluation of Serological Platelet Antibody Assays. *Vox Sanguinis*, v.74, Suppl.2, p. 355-358, 1998.
- 40 ENGELFRIET C.P.; REESINK H.W. International Forum: Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusion, and the selection of compatible donors. *Vox Sanguinis*, v.84, p.73-88, 2003.

- 41 VON DEM BORNE, A.E.G.; VERHEUGHT F.W.A.; OOSTERHOF F.; VON RIESZ E.; DE LA RIVIERE A.B.; ENGELFRIET C.P. A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *British Journal of Haematology*, v.39, p.195-207, 1978.
- 42 GOLDMAN M.; TRUDEL E.; RICHARD L. Report on the Eleventh International Society of Blood Transfusion Platelet Genotyping and Serology Workshop. *Vox Sanguinis*, v.85, p.149-155, 2003.
- 43 KURZ M.; KNOBL P.; KALHS P. Platelet-reactive HLA antibodies associated with low posttransfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test. *Transfusion*, v. 41, p.771-774, 2001.
- 44 BESSOS H.; WILSON D.W.L.; METCALFE P.; ALLEN D.; URBANIAK S.J. Report on the 12th International Society of Blood Transfusion platelet immunology workshop. *Vox Sanguinis*, v.89, p.105-113, 2005.
- 45 MOREL-KOPP M.C.; DAVIET L.; MCGREGOR J.; KAPLAN C. Drawbacks of the MAIPA technique in characterising human antiplatelet antibodies. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v.7, p.144-146, 1996.
- 46 NAVARRETE C.V. Human leukocyte antigens. In MURPHY M.F.; PAMPHILON D.H. *Practical Transfusion Medicine*. Oxford: Blackwell Science, 2001. cap.4, p.36-50.
- 47 BROWN C.; NAVARRETE C. Screening for HLA-specific antibodies. In BIDWELL J.L.; Navarrete C. *Histocompatibility Testing*. London: Imperial College Press, 2001. Cap.2, p.65-98.
- 48 BRUNCE M. PCR-SSP Typing. In BIDWELL J.L.; Navarrete C. *Histocompatibility Testing*. London: Imperial College Press, 2001. Cap.5, p.149-186.
- 49 MIDDLETON D. PCR-SSOP Typing. In BIDWELL J.L.; Navarrete C. *Histocompatibility Testing*. London: Imperial College Press, 2001. Cap.6, p.187-212.
- 50 MOSES L.A.; STRONCEK D.F.; CIPOLONE K.M.; MARINCOLA F.M. Detection of HLA antibodies by using flow cytometry and latex beads coated with HLA antigens. *Transfusion*; v.40, p.861-866, 2000.
- 51 BRAY R.A. Flow Cytometry in Human Leukocyte Antigen Testing. *Seminars in Hematology*; v.38, p.194-200, 2001.
- 52 LEVIN M.D.; VELD J.C.; HOLT B.; VEER M.B. Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions: a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. *Transfusion*, v. 43, p.72-77, 2003.
- 53 MEEHAN K.R.; MATIAS C.O.; RATHORE S.S.; SANDLER S.G.; KALLICH J.; LABRECQUE J.; ERDER H.; SCHULMAN K.A. Platelet Transfusions: Utilization and associated costs in a tertiary care hospital. *American Journal of Hematology*; v.64, p.251-256, 2000.

- 54 PAULA G.G.; NOVARETTI M.; POZZI D.H.B.; CHAMONE D. Estudo da refratariedade plaquetária do dia 0 ao dia 50, em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.26, p.3-12, 2004.
- 55 FISHER M.; CHAPMAN J.R.; TING ^a; MORRIS P.J. Alloimmunization to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelet suspensions. *Vox Sanguinis*, v.49, p.331-335, 1985.
- 56 PETRANYI G.G.; PADANUI A.; HORUZSKO A.; RETHY M.; GYODI E.; PERNER F. Mixed lymphocyte culture-evidence that pretransplant transfusion with platelets induces FcR and blocking antibody production similar to that induced by leukocyte transfusion. *Transplantation*, v. 45, p.823-4, 1988.
- 57 VAN MARWIJK KOOY M.; VAN PROOIJEN H.C.; MOES M.; BOSMA-STANTS I.; AKKERMAN J.W. Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunization: a prospective, randomized trail. *Blood*, v.77, p.201-205, 1991.
- 58 SLICHTER S.J. The trial to reduce alloimmunization to platelets study group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelets transfusion. *New England Journal of Medicine*, v.337, p.1861-1869, 1997.
- 59 EPI INFO, versão 6.0. Produzido por "The Division of Surveillance and epidemiology – epidemiology program office, USA. May 1996.
- 60 BISHOP J. F.; MATTHEWS J.P.; YUEN K.; McGRATH K.; WOLF M.M.; SZER J. The definition of refractoriness to platelet transfusion. *Transfusion Medicine*, v.2, p. 35-41, 1992.
- 61 DuBOIS D.; DuBOIS E.F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. *Archives International of Medicine*. v. 17, p. 863-871, 1916.
- 62 REBULLA P. A mini-review on platelet refractoriness. *Haematologica / the hematology Journal*, v.90, p.247-253, 2005.
- 63 SCHUH A.C.; WATKINS N.A.; NGUYEN Q.; HARMER N.J.; LIN M.; PROSPER J.Y.A.; CAMPBELL K.; SUTHERLAND R.; METCALFE P.; HORSFALL W.; OUWEHAND W.H. A tyrosine703serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*, v.99, p.1692-1698, 2002.
- 64 ALTMAN D.G. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman & Hall, London, UK, 1991, cap.10, p.240-259.
- 65 ALTMAN D.G. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman & Hall, London, UK, 1991, cap.14, p.403-408.
- 66 KRAEMER H.C. Evaluating Medical tests. Objective e quantitative guidelines. Sage publications, Newbury PaRK, Califórnia, USA. 1992, cap.6, p.71-91.
- 67 ALTMAN D.G. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman & Hall, London, UK, 1991, cap.9, p.211-212.

- 68 FAUCHET R.; GENETET B.; GUEGUEN M.; LEGUERRIER A.; RIOUX C.; LOGEAS Y. Transfusion therapy and HLA antibody response in patients undergoing open heart surgery. *Transfusion*, v.22, p.320-322, 1982.
- 69 VAN DE WATERING L.; HERMANS J.; WITVLIET M.; VERSTEEGH M.; BRAND A. HLA and RBC immunization after filtered and buffy coat-depleted blood transfusion in cardiac surgery: a randomized controlled trial. *Transfusion*, v.43, p.765-771, 2003.
- 70 SLICHTER S.J.; DAVIS K.; ENRIGHT H.; BRAINE H.; GERNESHEIMER T.; KAO K.J.; KICKLER T.; LEE E.; MCFARLAND J.; MCCULLOUGH J.; RODEY G.; SCHIFFER C.A.; WODDSON R. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood*, v.105, p.4106-4114, 2005.
- 71 TAANING E.; SIMONSEN A.C.; HJELMS E.; SVEJGAARD A.; MORLING N. Platelet alloimmunization after transfusion: a prospective study in 117 heart surgery patients. *Vox Sanguinis*, v.72, p.238-241, 1997.
- 72 SATO SHINICHIRO S.; SAKURAI T.; YAMAMOTO Y.; MAEKAWA I.; IKEDA H. Earlier detection of HLA alloimmunization in platelet transfusion refractoriness by flow cytometric analysis. *Transfusion*, v.45, p.1399-1400, 2005.
- 73 PEI R.; LEE J.H.; CHEN T.; ROJO S.; TERASAKI P.I. Flow cytometry detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Human Immunology*, v.60, p.1293-1302, 1999.
- 74 ALLEN D.L.; CHAPMAN J.; PHILLIPS P.K.; OUWEHAND W.H. Sensitivity of the platelet immunofluorescence test (PIFT) and the MAIPA assay for the detection of platelet-reactive alloantibodies: a report on two U.K. national Platelet Workshop Exercises. *Transfusion Medicine*, v.4, p.157-164, 1994.
- 75 KAKAYA R.M.; GUDINO M.D.; MILLER W.V.; SHERMAN L.A.; KATZ A.J.; WAKEM C.J.; KRUGMAN D.J.; KLATSKY A.U.; KIRALY T.R. Four crossmatch methods to select platelet donors. *Transfusion*, v.24, p.35-41, 1984.
- 76 FREEDMAN J.; GARVEY M.B.; SALOMON DE FRIEDBERG Z.; HORNSTEIN A.; BLACHETTE V. Random donor platelet crossmatching: comparison of four platelet antibody detection methods. *American Journal of Hematology*, v.28, p.1-7, 1988.
- 77 SINTNICOLAAS K.; VAN DER STEUIJT K.J.; VAN PUTTEN W.L.; BOLHUIS R.L. A microplate ELISA for the detection of platelet alloantibodies: comparison with the platelet immunofluorescence test. *British Journal of Haematology*, v.66, p.363-367, 1987.
- 78 GATES K.; MACPHERSON B.R. Retrospective evaluation of flow cytometry as a platelet crossmatching procedure. *Cytometry*, v.18, p.123-128, 1994.
- 79 SINTNICOLAAS K.; LOWENBERG B. A flow cytometry platelet immunofluorescence crossmatch for predicting successful HLA matched platelet transfusion. *British Journal of Haematology*, v.92, p.1005-1010, 1996.

- 80 VAMVAKAS E.C. Meta-analysis of randomized controlled trials of the efficacy of white cell reduction in preventing HLA-alloimmunization and refractoriness to random-donor platelet transfusions. *Transfusión Medicine Reviews*, v.12, p.258-270, 1998.
- 81 TAZZARI P.L.; BONTADINI A.; ZAMAGNI C.; RICCI F.; FRUET F.; IANNELLI S.; CONTE R. Febrile nonhaemolytic transfusion reaction caused by antibodies against human platelet antigen 5a. *Transfusion Medicine*, v.15, p.443-444, 2005.
- 82 SCHNAIDT M.; WERNET D. Platelet-specific antibodies in female blood donors after pregnancy. *Transfusion Medicine*, v. 10, p.77-80, 2000.
- 83 FRENCH GUIDELINES, Platelet transfusion: products, indications. Agence Française de securite sanitaire des produits de santé. June 2003.
- 84 GUIDELINES FOR THE USE OF PLATELET TRANSFUSIONS. British Committee for standards in haematology, Blood Transfusion Task Force. *British Journal of Haematology*, v.122, p.10-23, 2003.
- 85 SKOGEN B.; CHRISTIANSEN D.; HUSEBEKK A. Flow cytometry analysis in platelet crossmatching using a platelet suspension immunofluorescence test. *Transfusion*, v.35, p.832-836, 1995.
- 86 GELB A.B.; LEAVITT A.D. Crossmatch-compatible platelets improve corrected count increments in patients who are refractory to randomly selected platelets. *Transfusion*, v.37, p.624-630, 1997.
- 87 TASAKI T.; FUJII K.; GOTOH K.; SATOH S.; TAKADATE J.; SASAKI S.; TABHIBANA M.; YAMAMOTO K. Significance of platelet-reactive antibody screening for patients facing frequent platelet transfusion. *Immunohematology*, v.18, p.104-108, 2002.
- 88 NOVOTNY V.M.J.; DOORN R.; WITVLIET M.D.; CLAAS F.H.J.; BRAND A. Occurrence of Allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study. *Blood*, v. 85, p. 1736-174, 1995.
- 89 ROSENFELD C.S.; BODENSTEINER C. Detection of Platelet Alloantibodies by Flow Cytometry – Characterization and Clinical Significance. *American Journal Clinical Pathology*, v.85, p. 207-212, 1986.
- 90 McFARLAND J.G.; ANDERSON A.J.; SLICHTER S.J. Factors influencing the transfusion response to HLA-selected apheresis donor platelets in patients refractory to random platelet concentrates. *British Journal of Haematology*, v.73, p. 380-386, 1989.
- 91 FONTÃO-WENDEL, R. ; LAZAR A ; SILVA L. ; WENDEL S. . Platelet Antibody Screening in Refractory Patients and Selection of Crossmatch-compatible Platelets. In: 58th AABB Annual Meeting. *Transfusion*, v. 45. p. 115A-116A, 2005.
- 92 BRASIL. Resolução RDC no 153, de 14 de junho de 2004. A ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos incluindo coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e

seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. *Diários Oficial da União*, Poder Executivo, 24 junho 2004.

Anexo 1 - Termo de Consentimento para Utilização de Amostra Congelada

Prezado Sr (a)

Estamos realizando uma pesquisa sobre transfusão de sangue e precisaremos de sua ajuda. A seguir explicaremos o motivo da pesquisa e qual seria a sua participação. É importante salientar que em nenhum momento haverá custo financeiro de sua parte ou risco a sua saúde.

A proposta da nossa pesquisa é investigar o aparecimento de anticorpos contra plaquetas em sangue de pacientes que receberam transfusão de sangue. Plaquetas são fragmentos celulares que auxiliam na coagulação do sangue. Nosso interesse é investigar a presença ou não destes anticorpos em pacientes que já receberam transfusão e compará-los com pacientes que não receberam transfusão, verificando assim, a frequência destes anticorpos na população estudada. Pouco se conhece no Brasil, sobre o aparecimento destes anticorpos que podem comprometer a eficácia da transfusão de plaquetas.

Queremos esclarecer que esta pesquisa não investigará problemas relacionados à saúde dos participantes, tratando-se apenas de um dado investigacional relacionado a biologia das plaquetas.

Durante sua internação no Hospital Sírio Libanês tivemos oportunidade de colher amostra do seu sangue para tipagem sanguínea, a qual ainda se encontra armazenada e congelada no Banco de Sangue. Sendo assim, gostaríamos de solicitar a sua colaboração na execução desta pesquisa e, para tanto, necessitamos do seu **consentimento** para utilização da(s) sua(s) amostra(s) já coletada(s) no passado e congelada(s) em nosso serviço. A identidade das amostras estudadas ficará sob sigilo absoluto e em nenhum momento a identidade dos participantes será divulgada.

Diante do exposto solicitamos o obséquio de preencher (em letra de forma) o campo abaixo e devolvê-lo no envelope anexo:

Nome Completo:.....

RG:.....

Endereço:.....

.....

Telefones:.....

Assinatura:..... Data: ____/____/____

Favor marcar com X sua resposta:

☐

Sim, declaro que entendi o texto acima e concordo na utilização da minha amostra para a pesquisa acima citada.

☐

Não concordo em participar da pesquisa acima mencionada.

Caso necessite de maiores explicações favor entrar em contato com:

Rita Fontão Wendel

Farmacêutica – Supervisora do Banco de Sangue do Hospital Sirio Libanês

R. Adma Jafet, 91 São Paulo – S.P.

Telefone: 3155-0350 / 3155-0352.

Anexo 2 - Informações para o paciente e termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado Sr (a)

Estamos elaborando uma pesquisa sobre transfusão de sangue e precisaremos de sua ajuda. A seguir explicaremos o motivo da pesquisa e qual seria a sua participação. É importante salientar que em nenhum momento haverá custo financeiro de sua parte ou risco a sua saúde.

A proposta da nossa pesquisa é investigar o aparecimento de anticorpos contra “plaquetas” no sangue de pacientes que receberam transfusão de sangue. Plaquetas são fragmentos celulares sangüíneos que auxiliam na coagulação do sangue. Nosso interesse é investigar a presença ou não destes anticorpos em pacientes que já receberam transfusão e compará-los com pacientes que não receberam transfusão, verificando assim, a frequência destes anticorpos na população estudada. Pouco se conhece no Brasil, sobre o aparecimento destes anticorpos que podem comprometer a eficácia da transfusão de plaquetas.

Queremos esclarecer que esta pesquisa não investigará problemas relacionados à saúde dos participantes, tratando-se apenas de um dado investigacional relacionado a biologia das plaquetas.

Selecionaremos dois grupos de pacientes: um grupo controle que nunca recebeu transfusão de sangue, e um grupo de estudo que recebeu transfusão e será acompanhado por três meses.

Dos pacientes pertencentes ao grupo controle (não recebeu transfusão de hemocomponentes) precisaremos apenas de três amostras de sangue. Estas amostras serão coletadas por punção venosa no braço do paciente, usando-se seringa e agulha descartáveis, totalizando um volume final de 10 ml de sangue. Será necessário a coleta no primeiro dia de internação, após 45 e 90 dias. Também precisaremos ter acesso ao histórico médico do paciente.

Para os pacientes pertencentes ao grupo de estudo precisaremos de amostras de sangue coletadas ANTES de qualquer transfusão e após 30, 60 e 90 dias da data inicial da internação hospitalar. Em casos de transfusão de plaquetas, também precisaremos de amostras de sangue coletadas pré e após (entre 1 e 2 horas após) TODA transfusão de plaquetas. Estas amostras serão coletadas por punção venosa no braço do paciente, (usando-se seringa e agulha descartáveis) ou por catéter central, totalizando um volume final de 10 ml de sangue. Estas coletas ocorrerão durante a internação do paciente.

Em casos de alta hospitalar, poderemos enviar uma pessoa (auxiliar de enfermagem) para coletar o sangue na residência do paciente, caso este não possa comparecer ao hospital para coletar a amostra no período mencionado.

As coletas podem ser executadas conjuntamente com outros exames que o paciente possa necessitar durante o seu tratamento.

Eventualmente, em decorrência da punção venosa poderá ocorrer formação de hematomas.

Estas amostras serão congeladas até o término de todas as coletas, quando então iniciaremos os testes laboratoriais.

Precisaremos também ter acesso ao prontuário do paciente para coleta de dados referentes à patologia e tratamento.

É importante frisar que esta pesquisa não interferirá no tratamento de nenhum paciente.

A identidade das amostras estudadas ficará sob sigilo absoluto e em nenhum momento a identidade dos participantes será divulgada.

Diante do exposto solicitamos o obséquio de preencher (em letra de forma) o campo abaixo:

Nome Completo:.....

Data de Nascimento:.....RG:.....

Endereço:.....

.....

Telefones:.....

Assinatura:..... Data: ____/____/____

Anexo 2 - continuação

Favor marcar com X sua resposta:

☐

Sim, declaro que entendi o texto acima e concordo em participar do estudo acima mencionado.

☐

Não concordo em participar da pesquisa acima mencionada.

Caso necessite de maiores explicações favor entrar em contato com:

Rita Fontão Wendel

Farmacêutica – Supervisora do Banco de Sangue do Hospital Sirio Libanês

R. Adma Jafet, 91

São Paulo – S.P.

Telefone: 3155-0350 / 3155-0352.

Anexo 3 - Dados dos pacientes pertencentes ao grupo 1 FASE 1 e esquema quimioterápico utilizado.

PAC_ID	DIAGNOS- TICO	Grupo	SEXO	GRAVIDEZ	IDADE	PESO (KG)	ÓBITO	QUIMIOTERAPIA	História prévia de internação	Diagnóstico recente
3000266794	LLC	1	F	sim	78	57	sim	RITUXIMABE	sim	não
25662	LLC	1	F	sim	82	47	sim	CHOP+RITUXIMABE	sim	não
17649	LMA	1	F	Não consta	61	51	sim	DAUNORUBICINA+ARA-C	Não consta	Não consta
14426	LMA	1	M	não	80	62	sim	IDARRUBICINA+ARA-C	sim	não
13577	LMA	1	M	não	60	90	não	IDA+ARA-C	sim	não
23484	LMA	1	F	Não consta	60	75	não	IDA + ARA-C	Não consta	Não consta
24270	LMA	1	M	não	66	85	não	IDARRUBICINA + CITARABINA	Não consta	Não consta
3000526058	LMA	1	M	não	63	80	sim	TOPOTECANO+ARA-C	Não consta	Não consta
26596	LMA	1	F	sim	62	80	sim	GENTUZUMABE	Não consta	Não consta
3000504852	LMA	1	F	sim	64	61	sim	IDA+ARA-C	sim	não
21656	LMA	1	M	não	58	76	não	IDA + CITARABINA	sim	não
3000515762	LMA	1	M	não	62	93	sim	GENTUZUMABE	Não consta	sim
3000265097	LMA	1	F	Não consta	78	62	sim	GENTUZUMABE	Não consta	Não consta
3000506583	LMC	1	M	não	73	56	sim	CISPLATINA	Não consta	não
17092	LMC	1	F	sim	68	86	sim	Não consta	sim	não
3000362030	LNH	1	M	não	82	81,6	sim	RITUXIMAB+CHOP+MABTHERA	sim	sim
26425	LNH	1	M	não	76	82	sim	HYPER-CVAD	sim	não
22366	LNH	1	M	não	73	75	sim	INTERFERON ALFA, ETOPOSIDA.	sim	Não consta
17499	LNH	1	M	não	59	73,8	sim	VAD	sim	não
26172	LNH	1	M	não	62	65,7	sim	MABTHERA	sim	não
3000524618	LNH	1	M	não	59	66	sim	REFRATÁRIO A CHOP, ATUAL: R-ESHAP.	Não consta	sim
23119	LNH	1	M	não	74	59	sim	Só fez radioterapia.	sim	não
21041	LNH	1	M	não	68	74	sim	ETOPOSIDA+CISPLATINA+ARA-C	sim	não
25452	LNH	1	M	não	75	83	sim	MABTHERA	sim	não
22691	LNH	1	F	sim	58	56	não	Não consta	sim	não
3000523308	LNH	1	F	sim	61	51	sim	Não consta	sim	não
25799	LNH	1	M	não	76	80	sim	MABTHERA + CHOP	Não consta	sim
23497	MM	1	M	não	63	84	sim	Não consta	sim	não
3000500958	MM	1	F	sim	74	79,1	sim	VAD após radio.	sim	não
23645	MM	1	M	não	80	78,8	sim	Quimio em outro hospital	sim	não
3000524466	MM	1	F	sim	58	64	sim	MELFALAN+DEXAMETAZONA; ADRIAMICINA/VINCRISTINA	sim	não
20703	MM	1	M	não	67	66	sim	DAUNOXONE/DECADRON e radio.	sim	não
22934	MM	1	M	não	61	87	sim	VAD, Radioterapia externa.	Não consta	sim

Anexo 4- Dados dos pacientes pertencentes ao grupo 1 FASE 2 e esquema quimioterápico utilizado.

PAC_ID	DIAGNOS- TICO	Grupo	SEXO	GRAVIDEZ	IDADE	PESO (KG)	ÓBITO	QUIMIOTERAPIA	História prévia de Transfusão	Quimioterapia previa
3000364407	LH	1	M	não	31	79	não	Não consta	sim	sim
300055602-	LLA	1	F	sim	49	61	não	Doxorrubicina + Vinorelbine	sim	sim
HNJ6	LLC	1	F	sim	51	49	não	Não consta	sim	sim
3000547959	LMA	1	M	não	68	78	não	IDA+ARA-C	sim	sim
3000551202	LMA	1	M	não	64	82	não	IDA+ARA-C	sim	não
3000551878	LMA	1	F	não	34	78	não	GENTUZUMABE	sim	sim
3000554921	LMA	1	F	sim	61	63	não	IDA+ARA-C	sim	sim
3000563510	LMA	1	F	sim	64	101	não	GENTUZUMABE	sim	não
3000572230	LMA	1	F	sim	35	64	não	IDA+ARA-C	não	não
HNJ1	LMA	1	F	sim	52	64	não	IDA+ARA-C	sim	sim
HNJ2	LMA	1	F	sim	77	67	não	Não consta	sim	não
3000573532	LMA	1	F	sim	58	74	não	IDA+ARA-C	sim	sim
HNJ3	LMA	1	F	sim	78	69	não	IDA+ARA-C	sim	sim
HNJ4	LMA	1	F	sim	53	62	não	IDA+ARA-C	sim	não
HNJ5	LMA	1	M	não	45	94	não	Mylotarg	sim	sim
3000582228	LMA	1	F	sim	50	88	não	GENTUZUMABE	sim	não
3000586624	LMA	1	F	não	29	60	não	GENTUZUMABE	sim	não
300023520-	LMA	1	F	sim	63	62	não	IDA+ARA-C	sim	sim
3000591917	LMA	1	M	não	77	81	não	IDA + CITARABINA	não	não
3000597032	LMA	1	M	não	63	71	não	GENTUZUMABE	sim	sim
3000597526	LMA	1	M	não	74	93	não	Mylotarg	sim	não
3000603738	LMA	1	F	sim	51	67	sim	Metotrexato	sim	não
3000605370	LMA	1	M	não	77	70	não	IDA+ARA-C	não	não
3000559239	LMC	1	M	não	86	Não consta	não	Não consta	Não consta	Não consta
3000137431	LNH	1	M	não	63	75	não	VAD	sim	sim
3000558850	LNH	1	M	não	48	98	não	Mabthera	não	sim
3000563908	LNH	1	M	não	63	65	não	Mabthera	sim	sim
3000572679	LNH	1	F	sim	57	89	não	Rituximab + Gencitabina + Oxaliplatina	não	sim
300058168-	LNH	1	M	não	28	72	não	Ciclofosfamida + Mesna	não	sim
3000584047	MM	1	F	sim	84	72	não	Não consta	não	não
3000595926	MM	1	F	não	67	44	sim	VAD após radio.	não	sim
3000583386	MM	1	F	sim	71	71	sim	MELFALAN+DEXAMETAZONA; ADRIAMICINA/VINCRISTINA	sim	sim

Anexo 5 - Dados dos pacientes pertencentes ao grupo 2 FASE 1.

PAC_ID	DIAGNOSTICO	Grupo	SEXO	GRAVIDEZ	IDADE	PESO (KG)	ÓBITO	QUIMIOTERAPIA	História prévia de internação
3000502195	CARDÍACO	2	M	não	68	81	não	Não se aplica	Não consta
26581	CARDÍACO	2	M	não	74	63,9	sim	Não se aplica	sim
21079	CARDÍACO	2	M	não	55	64,7	não	Não se aplica	sim
19499	CARDÍACO	2	F	sim	73	65	sim	Não se aplica	Não consta
19758	CARDÍACO	2	M	não	65	74,3	sim	Não se aplica	Não consta
21743	CARDÍACO	2	M	não	69	78	não	Não se aplica	sim
27889	CARDÍACO	2	F	sim	76	67	não	Não se aplica	sim
26281	CARDÍACO	2	M	não	75	58,2	não	Não se aplica	Não consta
300052577	CARDÍACO	2	M	não	76	71	sim	Não se aplica	sim
3000507092	CARDÍACO	2	F	sim	78	59,2	sim	Não se aplica	sim
25493	CARDÍACO	2	M	não	60	70	não	Não se aplica	Não consta
15459	FRATURA	2	F	sim	73	65	não	Não se aplica	sim
20998	FRATURA	2	F	sim	79	45	sim	Não se aplica	sim
15888	FRATURA	2	F	Não consta	78	46	sim	Não se aplica	Não consta
14521	FRATURA	2	M	não	67	75	sim	Não se aplica	sim
21133	FRATURA	2	F	sim	75		não	Não se aplica	sim
20504	FRATURA	2	F	sim	74	68	não	Não se aplica	sim
25309	FRATURA	2	F	Não consta	73	76	não	Não se aplica	sim
3000058856	FRATURA	2	M	não	67	68	sim	Não se aplica	sim
3000125908	FRATURA	2	M	não	77	72	não	Não se aplica	sim
3000502793	FRATURA	2	F	sim	74	98	não	Não se aplica	sim
13445	FRATURA	2	F	sim	67		sim	Não se aplica	sim
27283	PROTESE	2	M	não	76	90	não	Não se aplica	sim
14114	PROTESE	2	M	não	65	102	não	Não se aplica	sim
23811	PROTESE	2	F	sim	51	81	não	Não se aplica	sim
27451	PROTESE	2	M	não	70	70	não	Não se aplica	Não consta
16912	PROTESE	2	F	Não consta	79	45	sim	Não se aplica	sim
24498	PROTESE	2	F	sim	50	75	não	Não se aplica	sim
3000502363	PROTESE	2	F	sim	56	75	não	Não se aplica	sim
3000165221	PROTESE	2	M	não	74	78	não	Não se aplica	sim
18478	PROTESE	2	M	não	75	94	não	Não se aplica	sim

Anexo 6 - Dados dos pacientes pertencentes ao grupo 2 FASE 2.

PAC_ID	DIAGNOSTICO	Grupo	SEXO	GRAVIDEZ	IDADE	PESO (KG)	ÓBITO	QUIMIOTERAPIA	História prévia de Transfusão
3000555633	CARDÍACO	2	M	não	71	81,5	não	Não se aplica	não
3000563086	CARDÍACO	2	M	não	71	69,3	não	Não se aplica	não
3000568274	CARDÍACO	2	M	não	74	69,8	não	Não se aplica	não
3000571115	CARDÍACO	2	M	não	73	106	não	Não se aplica	não consta
3000588718	CARDÍACO	2	M	não	79	70,5	não	Não se aplica	não
3000550189	CARDÍACO	2	M	não	61	68	não	Não se aplica	não
3000550648	CARDÍACO	2	M	não	77	96	não	Não se aplica	não
3000551464	CARDÍACO	2	M	não	64	65	não	Não se aplica	não
3000553662	CARDÍACO	2	F	não	56	80	não	Não se aplica	não
300055370-	CARDÍACO	2	F	sim	69	51	não	Não se aplica	não
3000568514	CARDÍACO	2	M	não	73	79	não	Não se aplica	não
3000571617	CARDÍACO	2	M	não	59	89	não	Não se aplica	não
3000572900	CARDÍACO	2	M	não	73	75	não	Não se aplica	não
3000572943	CARDÍACO	2	F	não consta	69	82	não	Não se aplica	não consta
3000573209	CARDÍACO	2	M	não	87	56,6	não	Não se aplica	não
3000575626	CARDÍACO	2	M	não	69	80	não	Não se aplica	não
3000588427	CARDÍACO	2	F	sim	61	89	não	Não se aplica	não
3000599919	CARDÍACO	2	F	sim	76	54	não	Não se aplica	não
3000555123	FRATURA	2	M	não	87	100	não	Não se aplica	não
3000570681	FRATURA	2	F	sim	90	46	sim	Não se aplica	não
3000584493	FRATURA	2	F	sim	75	64	não	Não se aplica	não
300058512-	FRATURA	2	M	não	75	64	não	Não se aplica	não
3000587897	FRATURA	2	F	não	74	64	não	Não se aplica	sim
3000589526	FRATURA	2	F	sim	85	76	não	Não se aplica	não
3000591159	FRATURA	2	F	sim	99	55	não	Não se aplica	não
3000344983	FRATURA	2	F	sim	72	64	não	Não se aplica	não
3000596902	FRATURA	2	F	sim	76	69	não	Não se aplica	sim
3000138055	PROTESE	2	M	não	61	95	não	Não se aplica	não
3000556249	PROTESE	2	F	sim	80	72	não	Não se aplica	não
3000563027	PROTESE	2	F	sim	68	72	não	Não se aplica	não
3000564345	PROTESE	2	F	sim	91	52	não	Não se aplica	sim

Anexo 7 - Dados dos pacientes pertencentes ao grupo 3 FASE 1.

PAC_ID	DIAGNOSTICO	Grupo	SEXO	GRAVIDEZ	IDADE	PESO (KG)	ÓBITO	QUIMIOTERAPIA	História prévia de internação
15799	CARDÍACO	3	M	não	64	112	não	Não se aplica	Não consta
18407	CARDÍACO	3	M	não	63	75	não	Não se aplica	Não consta
20991	CARDÍACO	3	M	não	69	95	não	Não se aplica	sim
16620	CARDÍACO	3	M	não	62	70	não	Não se aplica	Não consta
15008	CARDÍACO	3	M	não	69	86	não	Não se aplica	sim
19796	CARDÍACO	3	M	não	56	83	não	Não se aplica	sim
19418	CARDÍACO	3	M	não	64	64	não	Não se aplica	sim
16759	CARDÍACO	3	M	não	74	85	não	Não se aplica	Não consta
12997	FRATURA	3	M	não	52	91	não	Não se aplica	Não consta
16801	FRATURA	3	F	não	72	61	não	Não se aplica	sim
266854	FRATURA	3	F	sim	74	65.5	não	Não se aplica	sim
15046	FRATURA	3	F	sim	66	54	não	Não se aplica	sim
17986	FRATURA	3	F	sim	64	60	não	Não se aplica	sim
17928	FRATURA	3	F	sim	76	58	não	Não se aplica	sim
19386	FRATURA	3	M	não	82	78	não	Não se aplica	Não consta
23386	FRATURA	3	M	não	78	72	não	Não se aplica	sim
11030	PROTESE	3	M	não	72	111	não	Não se aplica	sim
24148	PROTESE	3	F	sim	52	65	não	Não se aplica	Não consta
20647	PROTESE	3	F	sim	64	64	não	Não se aplica	Não consta
20769	PROTESE	3	F	sim	70	74	não	Não se aplica	Não consta
24318	PROTESE	3	M	não	74	87	não	Não se aplica	sim
13833	PROTESE	3	M	não	51	89	não	Não se aplica	Não consta
23437	PROTESE	3	F	sim	69	82	não	Não se aplica	sim

Anexo 8 - Dados dos pacientes pertencentes ao grupo 3 FASE 2.

PAC_ID	DIAGNOSTICO	Grupo	SEXO	GRAVIDEZ	IDADE	PESO (KG)	ÓBITO	QUIMIOTERAPIA	História prévia de transfusão
3000568565	CARDÍACO	3	M	não	61	88,0	não	Não se aplica	não
3000590367	CARDÍACO	3	M	não	63	74,0	não	Não se aplica	não
3000591271	CARDÍACO	3	M	não	62	114,0	não	Não se aplica	não
3000594966	CARDÍACO	3	M	não	44	71,0	não	Não se aplica	não
3000596996	CARDÍACO	3	M	não	62	70,0	não	Não se aplica	não
3000549997	FRATURA	3	F	sim	83	57,0	não	Não se aplica	não
3000552627	FRATURA	3	F	não	61	52,0	não	Não se aplica	não
3000552643	FRATURA	3	M	não	47	85,0	não	Não se aplica	não
300055434-	FRATURA	3	M	não	66	79,0	não	Não se aplica	não
3000556898	FRATURA	3	F	não	37	60,0	não	Não se aplica	não
3000568856	FRATURA	3	F		88	62,0	não	Não se aplica	não
3000571967	FRATURA	3	F	sim	64	63,0	não	Não se aplica	não
3000572740	FRATURA	3	M	não	78	91,0	não	Não se aplica	não
3000585365	FRATURA	3	M	não	40	76,0	não	Não se aplica	não
300058619-	FRATURA	3	F	sim	66	70,0	não	Não se aplica	não
3000590551	FRATURA	3	F	sim	65	63,0	não	Não se aplica	não
3000114205	PROTESE	3	F	sim	71	72,0	não	Não se aplica	não
3000551421	PROTESE	3	M	não	51	72,0	não	Não se aplica	não
3000359202	PROTESE	3	F	sim	73	55,0	não	Não se aplica	não
3000205887	PROTESE	3	F	sim	68	72,0	não	Não se aplica	não
3000572783	PROTESE	3	F	sim	79	110,0	não	Não se aplica	não
3000574295	PROTESE	3	F	não	76	72,0	não	Não se aplica	sim
3000581903	PROTESE	3	F	não	54	66,0	não	Não se aplica	sim

anexo 9 - Planilha de acompanhamento das Transfusões de Plaquetas do HSL

NOME	SAME	ABO RH	DIAGNÓSTICO	PESO	ALTURA	SC	No BOLSA	PLAQ	ABO RH		Doad	Plaq prod (x10E11)	PLAQ PRÉ	PLAQ POS	POS- PRE	ICC		PC Cito	PC MAIPA
																> 2H	(1 A 2 h)		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148436	O +	4,26	21/01/2004 15:01	11000	6000	-5000	-2124	NR	1			
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148470	O +	4	22/01/2004 10:06	6000	5000	-1000	-453	NR	1			
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148571	O +	3,86	23/01/2004 09:25	0	0	0	NR	1	NR			
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148567	O +	3,84	24/01/2004 13:27	0	0	0	NR	1	NR			
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148602	O +	3,96	25/01/2004 13:47	0	0	0	NR	0	1			
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148652	B +	3,89	26/01/2004 10:23	9000	18000	9000	-	4188	0	1		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148686	B +	4,11	28/01/2004 12:54	15000	10000	-5000	-	-2202	0	0		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148754	B -	4,33	30/01/2004 14:44	6000	16000	10000	-	4180	0	fraca		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148784	B +	4,19	31/01/2004 10:17	28000	32000	4000	1728	NR	0	0		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148812	B +	3,06	03/02/2004 14:02	17000	35000	18000	-	10647	fraca	fraca		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148879	B +	2,32	07/02/2004 16:30	11000	28000	17000	-	13263	0	fraca		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148926	B +	4,15	09/02/2004 13:08	20000	58000	38000	-	16573	0	NR		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148973	O +	4,59	10/02/2004 19:29	24000	64000	40000	15773	-	0	NR		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004148973	O +	4,59	11/02/2004 11:57	24000	85000	61000	24054	-	0	NR		
K.K.	153,264	B+	LMA	70,00	1,70	1,81	B300004149040	B +	4,85	12/02/2004 19:18	43000	67000	154000	57472	-	0	NR		

Legenda: SC: superfície corpórea; No: número; Doad: doador; PLAQ: plaquetas; prod: produto; TX: transfusão; ICC: incremento da contagem corrigida; PC: prova de compatibilidade; 1: positiva; 0: negativa; NR: não realizado

Anexo 10- Fenotipagem das células dos doadores utilizadas como células de triagem.

Tabela 10.1 : Fenotipagem das plaquetas dos doadores utilizados como células de triagem para os testes PIFT e MAIPA.

Doador	SISTEMAS													
	HPA-1		HPA-2		HPA-3		HPA-4		HPA-5		HPA-6		HLA- A	HLA- B
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b		
1	+	o	+	+	o	+	+	o	+	+	+	o	A23,29	B44,57
2	+	o	+	o	+	+	+	o	o	+	+	o	A03,11	B52,55
3	+	+	+	+	o	+	+	o	+	o	+	o	A01,32	B08,63
4	+	+	+	o	+	o	+	o	+	+	+	o	A02,68	B18,62
5	+	+	+	+	+	o	+	o	+	o	+	o	A02,29	B64,39
6	o	+	+	o	+	o	+	o	+	o	+	o	A32,34	B07,41

Legenda: +: presença do antígeno; o: ausência do antígeno.

Para o MAIPA foram utilizados os doadores 2,3,4,5. Para o PIFT todos foram utilizados.

Tabela 10.2: Tipagem dos linfócitos utilizados na técnica de LCT

Doadores	HLA-A	HLA-B
1	A01, 11	B07, 35
2	A01, 32	B08, 63
3	A01,23	B44, 72
4	A02, 11	B55, 61
5	A02, 24	B44, 63
6	A02, 29	B44, 38
7	A02, 31	B39, 51
8	A02, 68	B18, 62
9	A02,00	B44, 49
10	A02,29	B39, 64
11	A03, 11	B52, 55
12	A03, 24	B44, 54
13	A03,26	B52, 50
14	A23, 26	B07, 45
15	A23, 29	B44, 57
16	A24, 74	B07, 72
17	A29, 30	B65, 81
18	A30,74	B07, 35
19	A31, 00	B44, 00
20	A32, 34	B07, 41

10.3: Antígenos HLA classe I presentes nas micropartículas do FLOW PRA :

HLA-A: A1; A2; A3; A11; A23; A24; A25; A26; A29; A30; A31; A32; A33; A34; A36; A66; A68; A69; A74; A80.

HLA-B: B7; B8; B13; B18; B27; B35; B37; B38; B39; B41; B42; B44; B45; B46; B47; B48; B49; B50; B51; B52; B53; B54; B55; B56; B57; B58; B59; B60; B61; B62; B63; B64; B65; B67; B71; B72; B73; B75; B7801;B8101; Bw4; Bw6.

HLA-C: Cw1; Cw2; Cw4; Cw6; Cw7; Cw8; Cw9; Cw10; Cw12; Cw14; Cw15; Cw16; Cw17; Cw18.

Anexo 11- resultado do PIFT

Após o teste (vide materiais e métodos), a suspensão de plaquetas é analisada pelo citômetro de fluxo. Primeiramente é desenhado uma região em FSC por SSC (detectores de tamanho e granulosidade das células em escala logarítmica) na posição típica para plaquetas (gráfico 1, região em vermelho). Estas plaquetas selecionadas nesta região, são então analisadas para intensidade de fluorescência (detector FL1). É desenhado um marcador (M1) na região considerada positiva para a presença de fluorescência (gráfico 2) e as suspensões que apresentarem fluorescência dentro desta região são consideradas positivas (gráfico azul e laranja).

Anexo 12 - exemplo de identificação de anticorpos pelo MAIPA.

Monoclonal utilizado:	GP IIbIIIa			HLA-ABC			GP IaIIa			GP IbIX		
	CN	CP	T	CN	CP	T	CN	CP	T	CN	CP	T
Soros utilizados:
1- HPA 1a1a, 2a2a, 3a3b, 5b5b												
2- HPA 1a1b, 2a2b, 3b3b, 5a5a												
3- HPA 1b1b, 2a2a, 3a3a, 5a5a												
4- HPA 1b1b, 2b2b, 3a3a, 5a5a												
5- HPA 1a1a, 2a2a, 3a3a, 5a5b												
6- HPA-1a1a, 2a2a, 3a3a, 5a5a												
7-0160114												
8-0160139												

Exemplo de resultado do MAIPA: após o término do teste (vide materiais e métodos), a presença de coloração amarela denota positividade (reação da peroxidase com conjugado OPD), ou seja presença de anticorpos. No exemplo dado verificou-se a presença no soro teste (coluna T) apenas de anticorpos contra o sistema HLA-ABC. CN: coluna do controle negativo; CP: colunas dos controles positivos sendo que para a GP IIbIIIa foi utilizado anti-HPA-1a, para GP Ialla anti-HPA-5b, para GPIbIX soro apresentando pan-reatividade com todos plaquetas testadas. No quadro à esquerda, fenótipos das plaquetas utilizadas em cada linha da placa. A absorbância de cada poço é analisada por leitora de ELISA. O “cut-off” é definido pela média de absorbância dos soros negativos mais dois desvios-padrões.

Anexo 13 - exemplo de resultado do Flow PRA®

Após a definição da região R1 (micropartículas marcadas com peptídeos de HLA) no gráfico de pontos de FSC por SSC (escala linear), realiza-se o histograma de FL1 (detector de fluorescência para emissões abaixo de 530 nm) para os eventos (10.000) definidos em R1 para os controles negativos (histograma — e —). Desenha-se um marcador (M1) à partir do final do histograma do controle negativo. O soroteste que apresentar fluorescência dentro desta região definida pelo M1, é considerado positivo (histograma ■). O software também calcula a % de positividade dentro da região estudada (círculo vermelho) sendo portanto possível calcular-se o PRA(% de reatividade do painel) de cada soroteste.

**Anexo 14 – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa
da Sociedade Beneficente Hospital Sírio Libanês**

**HOSPITAL
SírioLibanês**

Sociedade Beneficente de Senhoras
HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS
CEPesq - Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Data da Aprovação: 02 de junho de 2004

Título do Protocolo: *"Determinação da Incidência de Aloanticorpos Plaquetários e sua importância clínica na resposta terapêutica em pacientes transfundidos: Avaliação de diferentes metodológicas, laboratoriais de detecção"*

Nome do Investigador: Dra. Rita Fontão

O Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio Libanês, avaliou e **APROVOU** o Protocolo de Estudo nº: HSL 2002/09, estando de acordo com as Resoluções nºs 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde.

Lembramos, que de acordo com o cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEPesq), deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo.

Atenciosamente,

Dr. Orlando Parise Jr.
Coordenador do CEPesq
Comitê de Ética em Pesquisa

Dr. Orlando Parise Junior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - CEPesq
Sociedade Beneficente Hospital Sírio Libanês

Anexo 15– Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP nº 85

São Paulo, 10 de outubro de 2002.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de setembro do corrente ano, **aprovou** o projeto "Determinação da Incidência de Aloanticorpos Plaquetários e sua Importância Clínica na Resposta Terapêutica em Pacientes Transfundidos: Avaliação de Diferentes Metodologias Laboratoriais de Detecção", apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que a idade mínima para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é de 21 anos, idade em que se reconhece a maioridade civil.

Lembramos, ainda, que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Rita de Cássia Legaspe Fontão Wendel
Orientador: Prof. Primavera Borelli
FBC

Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assays for the detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies

R. Fontão-Wendel,^{1,2} L. C. N. Silva,¹ C. B. R. Saviolo,³ B. Primavera² & S. Wendel¹

¹Banco de Sangue, Hospital Sírio Libanês, São Paulo, SP, Brazil

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

³Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Vox Sanguinis

Background and Objectives The aim of this work was to study the incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies in a selective patient population and evaluate different methodologies for platelet antibody screening (PAS).

Materials and Methods The patients were retrospectively selected and divided into three separate groups: haematological malignancies (Group 1: $n = 33$); cardiac and orthopaedic patients (Group 2: $n = 31$) and a control group (Group 3: $n = 23$) selected with the same diagnoses of Group 2. PRE- and POST-transfusion samples were tested for PAS by the following tests: PIFT (platelet immunofluorescence test), MAIPA (monoclonal antibody immobilization of platelet antigen), Flow PRA[®] and LCT (lymphocytotoxicity test).

Results There was not a 100% concordance among the methodologies used. PIFT, MAIPA and Flow PRA presented very similar results whereas that of LCT differed from the other methods. A high rate of positive results (32%) was found in the PRE samples followed by an increase of almost 50% after blood transfusion (POST samples: 42.5% of positivity), but there was a statistical difference ($P < 0.05$) between the PRE and POST transfusion sample only for the Flow PRA[®] technique tested on Group 2. Human leucocyte antigen (HLA) class I antibodies were present on 97.4% of POST positive samples, 5.4% presented anti-human platelet antigen (HPA)-1b antibodies and 8.1% presented a mix of panreactive antibodies against glycoprotein IIb/IIIa, IaIIa and IbIX.

Conclusions Blood transfusion did not increase the rate of alloimmunization in our haematological patients (Group 1); however, the patients were already admitted with a high rate of alloimmunization (12%). Group 2 patients are being immunized and the impact of this procedure remains to be studied as these patients may eventually undergo further hospitalization and receive more blood transfusion.

Key words: blood transfusion, HLA, HPA, platelet antibodies.

Received: 22 March 2007,
revised 9 June 2007,
accepted 18 June 2007,
published online 16 August 2007

Introduction

In spite of the advances in platelet transfusion therapy achieved during the past several years, we still face many

problems to transfuse platelets into thrombocytopenic patients presenting platelet refractoriness [1]. Among the principal causes of platelet refractoriness is the immune response of the patient against platelet antigens, especially the production of antibodies against human leucocyte antigen (HLA) class I and human platelet antigens (HPA) [2]. The widespread use of leucocyte-depleted cellular blood components has decreased significantly the rate of immunological platelet refractoriness,

Correspondence: Rita Fontão-Wendel, Banco de Sangue, Hospital Sírio Libanês, Rua Dona Adma Jafet, 91, São Paulo, SP 01308-050, Brazil
E-mail: rswendel@uninet.com.br

Table 1 Patients' characteristics

Group	1 (haematological)	2 (non-haematological)	3 (controls)	All
Patients (<i>n</i>)	33	31	23	87
Diagnoses (<i>n</i>)	AML (11); CLL (2); CML (2); MM (6); LNH (12)	Cardiac (11); Orthopaedic (21)	Cardiac (8); Orthopaedic (15)	
Gender	21 (64%) M; 12 (36%) F	16 (52%) M; 5 (48%) F	14 (61%) M; 9 (39%) F	51 (59%) M; 36 (41%) F
Age (year) (95% CI)	61–76	66–76	62–74	61–76

AML, acute myeloid leukaemia; CLL, chronic lymphoid leukaemia; CML, chronic myeloid leukaemia; MM, multiple myeloma; LNH, lymphoma non-Hodgkin; M, male; F, female.

but this problem is far from being eliminated [3]. A patient presenting this problem becomes a transfusional challenge because of the accelerated destruction of transfused platelets by the respective alloantibodies. The ideal approach, once the cause of refractoriness is identified, is to select antigen-compatible donors, either by HLA-matched platelets or by compatibility test [4]. To identify these antibodies involved in platelet refractoriness, several methods have been used, such as lymphocytotoxicity test (LCT), immunofluorescence tests, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), antigenic capture assays (i.e. MAIPA; monoclonal antibody immobilization of platelet antigen), mixed passive haemagglutination, with no consensus about which one of them would be more effective for these patients. There are no studies on the characterization of platelet antibodies in Brazilian transfused patients. Brazil's population is a *mélange* of several ethnic groups, particularly Europeans, Africans and Native Americans and could thus present a different profile of antibody specificity when compared with other populations on which studies have been carried out.

The aim of this work was to study the incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies in two different groups of patients: one group was composed of transfused patients being treated for haematological malignancies [leukaemia, lymphomas and multiple myeloma (MM)] and another group was composed of patients with non-haematological diseases (orthopaedic with upper/lower limb bone fractures and total hip replacement, and cardiac patients who underwent coronary artery bypass surgery). These two groups were chosen because they receive different types of blood transfusion in our institution. According to our transfusion committee guidelines [5], the oncohaematological patients must receive only leucocyte-depleted cellular blood components whereas this situation is not required for cardiac and orthopaedic patients. Due to absence of a gold standard methodology for platelet antibody screening (PAS), we evaluated four different methodologies selected as being optimal for detecting HLA and HPA antibodies in transfused patients.

Materials and methods

Patients

The patients participating in this study were retrospectively selected and divided into three separate groups (Groups 1–3). Group 1 was composed of patients previously diagnosed with haematological malignancies ($n = 33$), being 13 leukaemia patients [11 acute myeloid leukaemia (AML), two chronic lymphoid leukaemia (CLL)], 12 non-Hodgkin's lymphoma (NHL), and six MM patients. Group 2 was composed of patients previously diagnosed with non-haematological diseases ($n = 31$) being 11 diagnosed with cardiac diseases and 20 orthopaedic patients (11 patients with upper/lower limb bone fractures and nine patients with total hip replacement).

A control group (Group 3) was selected based on the same diagnoses of Group 2, cardiac patients ($n = 8$) and orthopaedic patients (eight patients with upper/lower limb bone fractures and seven patients with total hip replacement). The patients' characteristics are shown in Table 1. Patients information were obtained from their respective medical records.

Group 1 patients were transfused with leucocyte-depleted blood components (blood red cells, plateletpheresis and/or by pool of six platelet units obtained from whole blood centrifugation by plasma rich in platelets method) [6] bedside filtered (Pall Corporation, East Hills, NY, USA). All blood components transfused had less than 10^6 leucocytes per unit.

Group 2 patients were transfused with non-filtered blood components (with approximately 10^9 leucocytes per unit). Group 3 patients did not receive transfusions during the study.

Additionally, only patients who had received at least three platelet transfusions (each one containing more than 3.0×10^{11} platelets) were included in Group 1 and only patients who received at least three red cell transfusions (each red cell component containing more than 10^8 leucocytes) were included in Group 2. These criteria were based on previous studies that took into consideration the minimum leucocyte dose necessary to stimulate an immune response [7,8]. As Group 1

patients received only leucocyte-depleted blood components the platelets themselves were considered as being potentially immunogenic after at least three transfusional events. All patients were older than 18 years and signed an informed consent document approved by the ethics committee at our hospital.

Samples

An archival serum aliquot from all patients transfused or when a cross-match is requested is normally stored frozen at -30°C . For Groups 1 and 2 patients, PRE- and POST-transfusion samples (POST sample collected approximately 3 months after the first transfusional episode) were retrieved from this sample archive. For Group 3 patients, two samples within the same time interval as the other groups (approximately 3 months) were also selected.

After being selected, the samples were thawed and divided into small aliquots (50 μl each) and were refrozen at -30°C . They were only thawed again immediately before analysis.

All samples (PRE and POST) were tested by the following assays: PIFT (platelet immunofluorescence test), MAIPA, Flow PRA[®] and LCT. All assays were carried out during a 4-month period.

PIFT

The PIFT technique was carried out as previously described [9]. Briefly, a platelet suspension (100 000 per μl) was incubated with the patient serum at 37°C for 30 min. After three washes with 0.01 M phosphate-buffered saline containing 10 mM EDTA (PBS-EDTA), anti-immunoglobulin G (IgG) labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Jackson ImmunoResearch[®], West Grove, PA, USA) was added. After another two washes with PBS-EDTA, the platelet suspension was read by flow cytometry (FACScalibur[®], Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) with an air-cooled argon laser emitting 488 nm at 15 mW. For acquisition and analyses, 10 000 events were evaluated according to their forward and sideways light scatter characteristics. For analyses, a graph of fluorescence intensity was plotted. When platelet antibody is present, a histogram appears to the right of the graph (presence of fluorescence), whereas in the absence of platelet antibody, the histogram appears to the left of the graph (no fluorescence). The cut-off threshold separating the negative from the positive histogram was defined using 100 negative controls.

MAIPA

The MAIPA assay [10] was carried out with some minor modifications: 100 μl of platelet suspension (200 000 per μl) were incubated with 50 μl of the patient's serum, washed three times with PBS-EDTA and then allowed to react with

monoclonal antibodies against glycoprotein (GP) IIb/IIIa (CD61, clone Y2/51; DakoCytomation[®], Carpinteria, CA, USA), GP Ia/IIa (CD49b clone Gi9; Immunotech[®], Marseille, France), GP Ib/IX (CD42b, clone CLB-MB45; Fitzgerald[®], Concord, MA, USA), and HLA class I antigen (clone W6/32, DakoCytomation[®]). A detergent buffer containing Triton-X-100 was added in order to solubilize the immunocomplex formed (platelet antigen + patient antibody + monoclonal antibody) from the platelet membrane. The immunocomplex was incubated in a microplate presensitized with a goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch[®]), which would bind with the immunocomplex. Human antibodies fixed to the immobilized GPs were detected by conventional ELISA technology by the use of horseradish peroxidase-labelled goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch[®]) and o-henylendiamine (OPD; DakoCytomation[®]).

For the PIFT and MAIPA assays, six platelet donors were selected as screening cells, according to their HLA phenotype in order to encompass at least one antigen within each of the major cross-reactive groups (CREG): A1/A3/A10/A11; A2/A28; B5/B35/B51/B52/B53; B7/B13/B40/B27/B22; B8/B14/B18; B12/B21; B15; and B17, as previously described [11]. These platelet donors were also selected for HPAs including platelets homozygous for HPA-1b, -2b and -5b.

Flow PRA[®]

This commercial kit (Flow PRA[®] Class I, One Lambda, Canoga Park, CA, USA) is designed for flow cytometry detection of antibodies against HLA class I antigens by using a panel of Flow PRA beads. These beads are coated with purified HLA class I antigen representing almost all antigens HLA class I ABC locus. Briefly, 5 μl of Flow PRA beads were incubated with 20 μl of patient serum in the dark for 30 min at $20-25^{\circ}\text{C}$. After two washes with the buffer provided in the kit, a FITC-conjugated F(ab')₂ fragment of goat anti-human IgG (also provided in the kit) was added and incubated for 30 min in the dark at $20-25^{\circ}\text{C}$. After two washes, the samples were ready for flow cytometry (FACScalibur[®]) analyses equipped with an air-cooled argon laser emitting 488 nm at 15 mW. A total of 10 000 events were collected for each sample. The R1 gate was set for the major population of Flow PRA[®] beads on forward-scatter vs. side-scatter dot plot and an FL1 histogram was obtained for each sample, according to manufacturer's instructions. After analysis of the FL1 histogram of the negative and positive controls, each sample's histogram was compared with controls to determine the presence or absence of an HLA class I antibody.

LCT

All sera were tested by LCT as described previously [12]. A panel of 20 donors typed for HLA class I antigens were tested.

These 20 donors were selected to represent the major HLA class I antigens present in our population. Briefly, 1 µl of donor lymphocytes were incubated for 1 h at 20–22 °C with 1 µl of patient serum and then incubated with 5 µl of rabbit complement for an additional 1 h at 20–22 °C. Dye exclusion (Stain-Fix®, One Lambda) was used to detect the cytotoxic effect. The plates were read using an inverted contrast phase microscope.

Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) 'one-way' test was performed to compare patients' age, weight, and number of transfusions received between and within the groups. The Bartlett's test was also performed to check for the equality of variances and when they differed, the Kruskal–Wallis test was performed.

For evaluation of the assays used for PAS, two statistical analyses were used: the Cohen's κ analysis [13] and ROC (receiver operating characteristics) curve [14] including the Bonferroni test, to check for significance between the curve areas.

The McNemar's test was carried out to check for association between a transfusion and the presence of platelet antibodies in Groups 1 and 2.

All analyses were carried out using the software STATA® (StataCorp®, College Station, TX, USA, version 8.0).

Results

All patients were paired for age, weight and sex. No significant difference of the transfused dose was observed (test ANOVA, $P > 0.05$) among the different diagnoses inside each group (Tables 2 and 3).

Four different combinations of the tested samples could be analysed: (i) PRE and POST positive samples (probably due

to previous patient exposition as pregnancy and/or blood transfusion); (ii) PRE positive and POST negative samples (probably due to disappearance of previous antibodies, as already described before) [15,16]; (iii) PRE negative and POST positive samples (probably due to production of platelet antibodies stimulated by blood transfusion); and (iv) PRE and POST negative samples (absence of platelet antibodies). Figure 1 displays all results found for each group and methodology. In Fig. 1a (PRE positive and POST positive sample), Group 1 presented a frequency range from 6 to 19% depending on the technique tested, while Group 2 ranged from 13 to 17%. Three patients in Group 3 (range 4–9%) presented reactivity in PRE and POST samples (two patients reacted only by MAIPA and one only by Flow PRA®). All of these three patients were women, which had gone through pregnancies. In Fig. 1b (PRE positive and POST negative sample), Groups 1 and 2 presented similar frequencies (3–7%), with the exception of the PIFT technique, which detected 13% of reactivity in Group 2. Figure 1c (PRE negative and POST positive samples) displays the most convenient combination to analyse the effect of blood transfusion on platelet antibody production. Group 1 presented a lower frequency (3–12%) than Group 2 (7–30%). Group 3 presented two patients (9%) in this combination only by PIFT but they were the same patients observed with PRE and POST positive samples by MAIPA (Fig. 1a), probably a false-negative reaction on their PRE sample by PIFT. Figure 1d displays all negative patients in each group.

Of the 37 POST positive samples, three (8.1%) samples presented a positive reaction in all of the four assays (PIFT, MAIPA, Flow PRA® and LCT), eight (21.6%) reacted positively in three assays, nine (24.3%) reacted positively in two assays, and 17 (46%) reacted positively in only one assay.

Considering all samples from 87 patients, a high rate of positive results (32%) was found in the PRE samples (collected before any transfusion), followed by an increase of almost 50% after blood transfusion (POST samples: 42.5% of

Table 2 Blood components transfused in Group 1 patients (all leucocyte depleted)

Diagnoses	Red blood cells transfusion per 10 kg patient weight		Platelets transfusion per 10 kg patient weight	
	mean $\pm$ SD	95% CI	mean $\pm$ SD	95% CI
Leukaemias	1.99 $\pm$ 0.98	1.45–2.54	1.98 $\pm$ 1.34	1.23–2.72
NHL	1.49 $\pm$ 1.06	0.81–2.16	1.03 $\pm$ 0.69	0.58–1.46
MM	1.85 $\pm$ 0.68	1.13–2.56	1.03 $\pm$ 0.48	0.53–1.53
Total	1.78 $\pm$ 0.97	1.44–2.13	1.46 $\pm$ 1.10	1.07–1.85

Data are displayed in mean, standard deviation (SD), 95% confidence interval (95% CI) of blood components transfused per 10 kg of patient weight. For platelet transfusion, a pool of six units was considered as 1.0 platelet transfusion dose. No significant dose difference was observed for the different diagnoses ($P > 0.05$) either for red cells or for platelet transfusion.

Table 3 Blood components transfused in Group 2 patients (non-leucocyte depleted)

Diagnoses	Red blood cell transfused per 10 kg patient weight	
	mean $\pm$ SD	CI 95%
Cardiac	1.37 $\pm$ 0.65	0.94–1.80
Total hip replacement	1.32 $\pm$ 0.73	0.75–1.87
Bone fractures	0.95 $\pm$ 0.70	0.42–1.43
Total	1.21 $\pm$ 0.69	0.90–1.43

Data are displayed in mean, standard deviation (SD), 95% confidence interval (95% CI) of blood components transfused per 10 kg of patient weight. No significant dose difference was observed for the different diagnoses ($P > 0.05$).

Fig. 1 Results obtained for each technique evaluated (PIFT, MAIPA, Flow PRA®, LCT) according to combinations of sample collected at hospital admission (PRE) and sample collected after transfusion (POST). (a) Percentage of patients (for each group tested) presenting a positive result for both samples. (b) Percentage of patients with positive PRE sample and negative POST sample. (c) Percentage of patients presenting PRE negative sample and POST positive. (d) Percentage of patients with both negative samples. Group 1, haematological patients; Group 2, non-haematological patients; Group 3, controls (non-haematological patients).

Table 4 Platelet antibodies specificity found in the patients analysed

Antibody specificity	PRE sample ^a	POST sample ^b
HLA class I	24 (85.7%)	32 (86.5%)
HLA class I + panglycoprotein IIb/IIIa; IbIX, IaIIa	4 (14.3%)	2 (5.4%)
HLA class I + HPA-1b	–	2 (5.4%)
Panglycoprotein IaIIa	–	1 (2.7%)
Total	28 (100%)	37 (100%)

^aPRE sample: blood sample collected at hospital admission.

^bPOST sample: blood sample collected approximately 3 months after the first transfusional episode.

positivity). The McNemar's test was used to analyse the impact of blood transfusion in the formation of new platelet antibodies, considering the combination of PRE negative and POST positive sample as the most convenient for that purpose (Fig. 1c). There was a statistical difference between the PRE and POST transfusion sample ($P < 0.05$) only for the Flow PRA® technique tested on Group 2. Group 1 did not show any association between blood transfusion and an increase in the positive tests.

For the combination of PRE and POST positive samples, we did not observe an increase in the number of antibodies present (translated as an increase in panel reactive antibody – PRA test) in the POST samples after blood transfusion.

The specificities of the antibodies (Table 4) in the PRE samples (32% of patients) were: 85.7% ($n = 24$) only HLA class I antibodies and 14.3% ($n = 4$) a mixture of HLA class I antibodies and panreactive antibodies against GP IIb/IIIa (1/4), IbIX (4/4) and IaIIa (1/4). For the POST samples (42.5%

Table 5 Cohen's κ index for PRE/POST samples analysed in all groups, in Group 1 only, and Group 2 only

Groups	Tests				
	Tests	Flow PRA	MAIPA	PIFT	LCT
1, 2, 3 ($n = 87$)	Flow PRA	1			
	MAIPA	0.710/0.617	1		
	PIFT	0.512/0.580	0.392/0.548	1	
	LCT	0.148/0.125	0.247/0.101	0.108/0.065	1
1 ($n = 33$)	Flow PRA	1			
	MAIPA	0.872/0.351	1		
	PIFT	0.203/0.064	0.436/0.571	1	
	LCT	0.033/0.133	0.012/0.090	0.083/0.106	1
2 ($n = 31$)	Flow PRA	1			
	MAIPA	0.586/0.657	1		
	PIFT	0.712/0.795	0.379/0.571	1	
	LCT	0.172/0.020	0.435/0.167	0.024/0.068	1

Group 3 was not performed due to low variability of the data ($> 92\%$ were negative). Poor concordance, < 0.20 ; weak concordance, $0.21-0.40$; moderate concordance, $0.41-0.60$; good concordance, $0.61-0.80$; very good concordance, $0.81-1.00$.

of patients): 86.5% ($n = 32$) were only HLA class I antibodies; 5.4% ($n = 2$) HLA class I antibodies plus panreactive antibodies against GP IIbIIIa (1/2), IbIX (2/2) and IaIIa (1/2); and 5.4% ($n = 2$) HLA class I plus anti-HPA-1b antibodies. There was only one sample (2.7%) with a panreactive antibody against GP IaIIa and no HLA class I antibody. Of the nine samples presenting GP reactivity (PRE: $n = 4$; POST: $n = 5$), five (55.5%) samples (PRE: $n = 2$; POST: $n = 3$) also presented reactivity by PIFT; however, this reactivity could be also due to the presence of HLA antibodies, so much so that all samples but one (which was PIFT negative) presented HLA antibodies.

As there was not a 100% concordance among the methodologies used for PAS, we analysed which methods were the most coincident using the Cohen's κ index (Table 5) and ROC curve (Fig. 2). The performances of MAIPA, PIFT and Flow PRA® were very similar whereas that of LCT differed from the other methods. When analysing all patient samples together ($n = 87$), Flow PRA® and MAIPA were the most concordant techniques (κ : 0.710 and 0.617 for PRE and POST samples, respectively); however, when the groups were analysed separately, Group 1 continued to present the best concordance with MAIPA and Flow PRA only in PRE samples (κ : 0.872), whereas for POST samples a significant decline in concordance between MAIPA and Flow PRA® was observed, even though PIFT and MAIPA remained unchanged (moderate concordance). We believe the quality (interference of drugs received by these patients due to the intense treatment) and age of the samples of Group 1 patients (some had been frozen for more

Table 6 Prevalence and predictive values (PV) for Groups 1 and 2, considering the most similar techniques for each group

Reference	Test	Group	Sample	Prevalence (%)	PV+ (%)	PV- (%)
Flow PRA	MAIPA	1	PRE	12	80	100
			POST	16	50	92
Flow PRA	PIFT	2	PRE	16	80	100
			POST	32	77	100

than 6 years) interfered with the assays, especially with Flow PRA®. As a matter of fact, the manufacturer of the Flow PRA® kit states that the quality of the samples may interfere with the results of this assay.

For Group 2, PIFT and Flow PRA® (κ : 0.712 and 0.795 for PRE and POST sample, respectively) presented the best concordance.

The ROC analyses presented similar conclusions to the κ index. Again, when all patients were analysed, MAIPA and Flow PRA® presented a better area under the curve: 0.950, $P = 0.355$ than the other tests. When only Group 1 was analysed, again MAIPA and Flow PRA® were better (Fig. 2a, area under the curve: 0.983, $P = 0.952$) than the other combinations for the PRE samples while for POST samples MAIPA and PIFT were more concordant (Fig. 2b, area under the curve: 0.760, $P = 0.168$). For Group 2, PIFT and Flow PRA® presented the best area under the curve (Fig. 2c,d). Based on these concordances, we estimated the prevalence and predictive values for both groups (Table 6).

Discussion

The blood transfusion committee in our institution has defined that all patients presenting severe oncohaematological diseases must receive only leucocyte-depleted blood components whereas other patients, such as cardiac and orthopaedic patients, receive non-leucocyte-depleted blood components [5]. We were interested in evaluating whether these measures were effective to prevent alloimmunization against platelet antigens. The proper identification of platelet antibodies involved in immune refractoriness has also been a challenge in many centres, as there is no consensus as to which would be the best technique to identify such antibodies. MAIPA has been considered as a gold standard for detection of HPA antibodies [17], but most antibodies involved in platelet immune refractoriness are HLA class I. LCT has been used for many years as the gold standard for HLA antibody identification; however, several recent publications have proven that it is not as sensitive as other techniques more recently developed [18–20]. PIFT has been chosen for its speed and ease of execution when a flow cytometry is available, and Flow PRA®, which is a new commercial technique, has been used in the

Fig. 2 ROC (receiver operating characteristic) curves. (a) Group 1 on PRE samples using as a reference Flow PRA® test. Area under Flow PRA® and MAIPA: 0.983, $P = 0.952$; other areas $P < 0.05$. (b) Group 1, POST samples, using as a gold standard PIFT test: area under MAIPA and PIFT: 0.760, $P = 0.168$; other areas $P < 0.05$. (c) Group 2 PRE samples using Flow PRA® as gold standard: area under Flow PRA® and PIFT: 0.9375, $P = 0.209$; area under Flow PRA® and MAIPA: 0.837, $P = 0.373$; other areas $P < 0.05$. (d) Group 2 POST samples: area under Flow PRA® and PIFT: 0.885, $P = 0.173$; other areas $P < 0.05$.

selection of donors for renal transplants with great success [21,22] and could be useful for the identification of HLA antibodies involved with immune refractoriness. Even though these assays are based on different approaches and use different targets for screening, namely, lymphocytes for LCT, GP for MAIPA, platelets for PIFT and HLA peptides for Flow PRA®, albeit extensively used to detect platelet-reactive antibodies as a single or paired analysis [4,17,19,20,23–25], we chose all of them in order to evaluate their performance on the same samples as a single procedure, which, to our understanding, have not been described so far.

Our data showed that Flow PRA®, MAIPA and PIFT demonstrated a very similar performance. LCT was the most discordant methodology when compared with the others. Kiefel *et al.* [24] also found a high rate (27%) of discordant results when comparing LCT and MAIPA, and Kurz *et al.* [19] found 50% more patients with platelet antibodies detected by

MAIPA than detected by LCT. Kurz *et al.* [19] also observed that the MAIPA assay detected antibodies at an earlier stage when compared with LCT. Other authors [20,22,25] testing flow cytometry assays reported that they were more sensitive than LCT for detection of HLA antibodies.

MAIPA and Flow PRA® had the best concordance for Group 1 (haematological patients) and PIFT and Flow PRA® presented the best concordance for Group 2 (cardiac and orthopaedic patients). The reason for this difference could not be determined, but we think that it is not relevant as MAIPA and Flow PRA® also presented a good concordance for Group 2 (κ : 0.657; ROC area: 0.828; $P = 0.06$). Although MAIPA has been developed for HPAs antibodies, it has been shown to be a good technique for HLA class I antibodies [19,24], and our data corroborate this.

We observed a high prevalence of platelet antibodies already in the PRE samples (Group 1: 12%; Group 2: 16%;

and Group 3: 9% – Table 6). This high prevalence observed in PRE samples could be due to our hospital characteristics. Ours is a tertiary hospital of high complexity and most patients had been previously treated in another hospital. Also, 40% of the patients were women with history of previous pregnancies.

We observed an association ($P < 0.05$) between blood transfusion and alloimmunization only for Group 2 patients. The frequency of platelet antibodies in PRE samples rose from 16 to 32% after blood transfusion, but no difference ($P > 0.05$) was observed in Group 1, where this frequency changed only from 12 to 16% (Table 6). Blood transfusion did not increase the rate of alloimmunization in our haematological patients; however, the patients were already admitted with a high rate of alloimmunization (12%) and had to be followed up with care in order to prevent immune refractoriness. Group 2 patients are thus being immunized and the impact of this procedure remains to be studied as these patients may eventually undergo further hospitalization and receive more blood components and such antibodies may be involved in transfusion reactions such as non-haemolytic [26,27] and haemolytic [28] transfusion reactions and even reactions as severe as TRALI (transfusion-related acute lung injury) [29]. As expected, the prevalence of platelet antibodies was higher in Group 2 (32%) than that in Group 1 due to the use of non-leucocyte-depleted red cells regimens and also because the clinical conditions and treatments associated with this group were not so immune suppressive as in Group 1. Fauchet *et al.* [15] in a previous study demonstrated HLA prevalence of 45–7% for cardiac patients transfused with non-leucocyte-depleted red cells while other authors [16,23] demonstrated lower prevalence (12–15%) when using buffy-coat-depleted or filtered red cells.

We found antibody specificities similar to those described by other authors [20,22,24], being anti-HLA class I the main antibodies involved (present in 97.3% of the POST samples). We found several (9.1%) patients with panreactive antibodies against platelet GPs (GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa and GPIb/IX). Such antibodies have been observed before [24,30] and their frequency ranged from 2 to 26% of patients but their significance in platelet transfusion remains unclear. We were not able to test autologous platelets to characterize them as autoantibodies as some authors interpret them to be [24]. The HPA antibodies presented a low prevalence (5.4%) and they were only specific to HPA-1b. Even though we found a low prevalence of HPA antibodies as other authors have already described [24,30], they were detected only in the POST samples showing that they were probably stimulated by blood transfusion, either by non-leucocyte-depleted red cell transfusion (one patient belonged to Group 2) or by platelet transfusions (another patient belonged to Group 1).

Now we are evaluating the clinical importance of these antibodies detected by these four methodologies in a prospective study. The same kinds of patients were chosen and

we are monitoring all transfusions to evaluate if they affect the transfusion efficacy and/or caused any transfusion reaction.

Acknowledgements

We thank Willian Ouwehand's group (Cambridge, UK) for all technical support and provision of rare HPAs sera for positive controls, and especially thank Stephen Garner for his encouragement and invaluable comments.

References

- 1 Friedberg RC, Gaupp B: Platelet transfusion: indications, considerations, and specific clinical settings; in Kickler T, Herman JH (eds): *Current Issues in Platelet Transfusion Therapy and Platelet Alloimmunity*. Bethesda, MD, USA, AABB Press, 1999
- 2 Benson K: Criteria for diagnosing refractoriness to platelet transfusions; in Kickler T, Herman JH (eds): *Current Issues in Platelet Transfusion Therapy and Platelet Alloimmunity*. Bethesda, MD, AABB Press, 1999
- 3 Slichter S: The trial to reduce alloimmunization to platelets study group. Leukocyte reduction and ultraviolet B irradiation of platelets to prevent alloimmunization and refractoriness to platelets transfusion. *N Engl J Med* 1997; **337**:1861–1869
- 4 Engelfriet CP, Reesink HW: International Forum: Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusion, and the selection of compatible donors. *Vox Sang* 2003; **84**:73–88
- 5 Comitê Transfusional Multidisciplinar: *Guia de Condutas Hemoterápicas*, 1st edn. São Paulo, Brazil, Hospital Sírio-Libanês, 2005
- 6 Combs MR, Denomme G, Grossman B: Preparation of Platelets from whole blood; in Brecher ME, Leger RM, Linden JV, Roseff SD (eds): *Technical Manual*, 15th edn. Bethesda, MD, USA, AABB, 2005
- 7 Fisher M, Chapman JR, Ting A, Morris PJ: Alloimmunisation to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelet suspensions. *Vox Sang* 1985; **49**:331–335
- 8 Petranyi GG, Padanui A, Horuzsko A, Rethy M, Gyodi E, Perner F: Mixed lymphocyte culture-evidence that pretransplant transfusion with platelets induces FcR and blocking antibody production similar to that induced by leukocyte transfusion. *Transplantation* 1988; **45**:823–824
- 9 von dem Borne AEG, Verheugt FWA, Oosterhof F, Von Riesz E, De La Riviere AB, Engelfriet CP: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol* 1978; **39**:195–207
- 10 Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C: Monoclonal antibody-specific immobilisation of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987; **70**:1722–1726
- 11 Lubenko A, Rodi MK, Johnson AC: Screening for WBC antibodies by lymphocyte indirect immunofluorescence flow cytometry: superior to cytotoxicity and ELISA? *Transfusion* 2001; **41**:1147–1153
- 12 Brown C, Navarrete C: Screening for HLA-specific antibodies; in Bidwell JL, Navarrete C (eds): *Histocompatibility Testing*. London: Imperial College Press, 2001

- 13 Altman DG: *Practical Statistics for Medical Research*. London, UK, Chapman & Hall, 1991
- 14 Kraemer HC: *Evaluating Medical tests. Objective e quantitative guidelines*. Newbury PaRK, CA, USA, Sage Publications 1992
- 15 Fauchet RG, Genetet B, Gueguen M, Leguerrier A, Rioux C, Logeais Y: Transfusion therapy and HLA antibody response in patients undergoing open heart surgery. *Transfusion* 1982; 22:320–322
- 16 van de Watering L, Hermans J, Witvliet M, Versteegh M, Brand A: HLA and RBC immunization after filtered and buffy coat-depleted blood transfusion in cardiac surgery: a randomized controlled trial. *Transfusion* 2003; 43:765–771
- 17 Bessos H, Wilson DWL, Metcalfe P, Allen D, Urbaniak SJ: Report on the 12th International Society of Blood Transfusion platelet immunology workshop. *Vox Sang* 2005; 89:105–113
- 18 Garner SF, Petrochilos J, Brown CJ, Cavanna S, Chanarin I, Navarrete C: A clinically significant anti-HLA-A2 detectable by extended incubation cytotoxicity and flow cytometric techniques but not by a standard NIH lymphocytotoxicity test. *Immunohematology* 1997; 13:49–53
- 19 Kurz M, Knobl P, Kalhs P: Platelet-reactive HLA antibodies associated with low post-transfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific immobilisation of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test. *Transfusion* 2001; 41:771–774
- 20 Levin MD, Veld JC, Holt B, Veer MB: Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions. a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. *Transfusion* 2003; 43:72–77
- 21 Bray RA: Flow cytometry in human leukocyte antigen testing. *Semin Hematol* 2001; 38:194–200
- 22 Moses LA, Stroncek DF, Cipolone KM, Marincola FM: Detection of HLA antibodies by using flow cytometry and latex beads coated with HLA antigens. *Transfusion* 2000; 40:861–866
- 23 Taaning E, Simonsen AC, Hjelm E, Svejgaard A, Morling N: Platelet alloimmunization after transfusion: a prospective study in 117 heart surgery patients. *Vox Sang* 1997; 72:238–241
- 24 Kiefel V, Konig C, Hartmut K, Santoso S: Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion* 2001; 41:766–770
- 25 Sato S, Sakurai T, Yamamoto Y, Maekawa I, Ikeda H: Earlier detection of HLA alloimmunization in platelet transfusion refractoriness by flow cytometric analysis. *Transfusion* 2005; 45:1399–1401
- 26 Heddle NM, Kelton JG: Febrile non-hemolytic transfusion reactions; in: Popovsky MA (ed.): *Transfusion Reactions*, Bethesda, MD, AABB Press, 1996
- 27 Heddle NM: Universal leukoreduction and acute transfusion reactions: putting the puzzle together. *Transfusion* 2004; 44:1–4
- 28 Benson K, Agosti SJ, Latoni-Benedetti GE, Leparo GF: Acute and delayed hemolytic transfusion reactions secondary to HLA alloimmunization. *Transfusion* 2003; 43:753–757
- 29 Curtis BR, McFarland JG: Mechanisms of transfusion-related acute lung injury (TRALI): anti-leukocyte antibodies. *Crit Care Med* 2006; 34:S118–S123
- 30 Sanz C, Freire C, Alcorta I, Ordinas A, Pereira A: Platelet-specific antibodies in HLA-immunized patients receiving chronic platelet support. *Transfusion* 2001; 41:762–765