

ANTICORPO DE ESPECIFICIDADE INDETERMINADA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

ARTHUR VICTOR CARDOZO DO SACRAMENTO

Introdução: A Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) é um método obrigatório nas agências transfusionais e bancos de sangue de todo o mundo. O método se baseia em incubar o plasma ou soro do paciente com hemácias-teste de no mínimo dois tipos com fenótipo conhecido para a maioria dos sistemas sanguíneos. Em casos em que a PAI seja positiva é necessário identificar o anticorpo para que seja garantido maior segurança ao paciente, porém, é muito comum que a identificação do anticorpo seja dada como indeterminada. O objetivo deste estudo foi revisar na literatura científica a prática de se caracterizar um anticorpo como indeterminado e suas abordagens. **Método:** Foi consultado o banco de dados “Pubmed” com as seguintes palavras-chave: “irregular antibody identification”, “antibodies of undetermined significance” e “antibodies of undetermined specificity”. Foram considerados os artigos que tratavam dos anticorpos de especificidade indeterminada na grande área da imunohematologia; também foram considerados artigos com publicação de 2010 até setembro de 2022. **Resultados e Discussão:** De 2416 resultados somente seis tiveram relevância no âmbito do tema proposto. Dois artigos levavam em consideração a significância clínica dos anticorpos indeterminados; um abordava a dificuldade do teste quando pacientes faziam tratamentos com imunobiológicos; outro, a técnica enzimática na elucidação de casos; outro, a técnica de *Monolayer Monocyte Assay* (MMA) para relevância clínica dos anticorpos; outro, uma abordagem computadorizada na identificação de anticorpos. **Conclusão:** Foram encontrados escassos estudos em relação à imunohematologia, porém dos estudos encontrados, todos se demonstraram possíveis na identificação de anticorpos indeterminados, mas nem sempre viáveis, necessitando de estudos maiores e mais abrangentes acerca do tema.

Palavras-chave: imunohematologia; identificação de anticorpos; aloanticorpos; testes pré-transfusionais.

INTRODUÇÃO

A Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI), ou Coombs Indireto, é um teste obrigatório para garantir uma transfusão segura.^{1,2} A PAI é um método que tem como objetivo o rastreio de anticorpos que tenham como alvo um antígeno eritrocitário dos sistemas sanguíneos, como por exemplo, o Rh, Kell, MNS, Lewis dentre outros, porque assim, caso o paciente tenha algum anticorpo de

interesse, é possível realizar uma transfusão com hemácias que não tenham o antígeno ao qual o paciente tem o anticorpo, evitando, portanto, o risco de hemólise, seja extra ou intravascular. O método se baseia em incubar o plasma ou soro do paciente com hemácias-teste de no mínimo dois tipos, ambas do grupo O (exceto em circunstâncias especiais), com fenótipo conhecido para a maioria dos sistemas sanguíneos.^{3,4} Caso a PAI tenha resultado positivo, é necessário identificar

o anticorpo, pelo método de Identificação de Anticorpo Irregular (IAI), para se realizar uma transfusão sanguínea compatível com o anticorpo identificado ou garantir uma gestação segura. Essa identificação é feita utilizando um painel com até 30 ou mais hemácias-teste; para atendimento transfusional é necessário, além da identificação do anticorpo, a fenotipagem no sangue do doador de sistemas sanguíneos compatíveis com o anticorpo identificado para garantir maior segurança para o paciente.¹⁻⁴

Utilizando-se de métodos convencionais de identificação de anticorpo, isto é, somente com o painel, dados clínicos e laboratoriais do paciente e antecedentes transfusionais e gestacionais, é possível identificar o anticorpo, porém, segundo Conrado *et al.*⁵, os anticorpos de especificidade não determinada, isto é, os anticorpo aos quais não foi possível identificar o antígeno relacionado (anti-K, anti-E ou anti-Le^a, por exemplo), fazem parte de um dos grupos mais comuns de anticorpo na rotina de um laboratório de imunohematologia. Isso pode ser devido a métodos diferentes de identificação e triagem de anticorpos, sendo hoje em dia o método em gel, o mais utilizado e também o mais sensível.⁶

Sabendo-se da importância de se identificar um anticorpo em imunohematologia, esse estudo teve como

objetivo revisar a literatura científica em relação à prática de se caracterizar um anticorpo como não determinado, bem como estratégias que ajudam a elucidar esses casos.

MÉTODO

Foi consultado o banco de dados “Pubmed” com as seguintes palavras-chave: “irregular antibody identification”, “antibodies of undetermined significance” e “antibodies of undetermined specificity”. Foram considerados os artigos que tratavam das nuances de se identificar um anticorpo que foi dado como anticorpo de especificidade indeterminada na grande área da imunohematologia; também foram considerados artigos com publicação de 2010 até setembro de 2022; caso não contemplasse esses critérios, o artigo seria desconsiderado do estudo. Foi consultado também instruções técnicas em imunohematologia e legislações vigentes, além de outros artigos complementares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das palavras-chave consultadas, foram obtidos 155 resultados para “irregular antibody identification”, 1.569 resultados para “antibodies of undetermined significance” e 692

resultados para “antibodies of undetermined specificity”. Filtrando-se os resultados para obter artigos relevantes na imunohematologia, foram obtidos dois estudos para a palavra-chave “irregular antibody identification”, um para “antibodies of undetermined significance” e três para “antibodies of undetermined specificity”.

Segundo o editorial de Tormey e Hendrickson⁷, em referência ao artigo de Liu e Grossman⁶, os métodos em gel ou em fase sólida aumentam drasticamente a sensibilidade de detecção de anticorpos circulantes, porém, muitas vezes os resultados positivos podem levar a resultados caracterizados como insignificantes, e, em muitos casos (15%, segundo Liu e Grossman⁶), essas reações não específicas na verdade podem ser uma etapa inicial na formação de novos aloanticorpos ou um anticorpo que o indivíduo já possuía antes mas que os títulos caíram rapidamente; por isso no momento da identificação do anticorpo não é possível caracterizá-lo, sendo assim, muitas vezes é chegado a um resultado de anticorpo de especificidade indeterminada. Na maioria dos casos os anticorpos indeterminados persistiram por até 60 dias, mas em 16% dos casos estudados por Liu e Grossman⁶ os anticorpos indeterminados tiveram rápido desaparecimento e sua especificidade posteriormente definida

(exceto em um caso) para vários tipos, como anti-Jk^b, -C, -D, -s, -E, sendo o anti-E o mais comum. Portanto, na maioria dos casos os anticorpos de especificidade indeterminada podem ser clinicamente não significativos, porém, em outros casos, podem ser indícios de futuros aloanticorpos.

Pode ser que no início da aloimunização os linfócitos B produtores de anticorpos ainda os estejam modificando, como por exemplo, promovendo mutações somáticas na região variável do anticorpo, e por isso seja mais difícil de caracterizar a especificidade do anticorpo no início da aloimunização, sendo necessário repetir a identificação algum tempo depois. É importante notar, também, que o estímulo antigênico é extremamente crucial para a cinética de um aloanticorpo, tal qual acontece para doenças infecciosas, ou seja, se em um primeiro momento acontece a aloimunização com hemácias transfundidas e posteriormente essa aloimunização não é detectada (em uma prova de compatibilidade negativa, por exemplo), não significa necessariamente que o plasma esteja livre de anticorpos circulantes, uma vez que não houve estímulo antigênico suficiente para dado anticorpo ser detectado nos testes de rotina da agência transfusional, porém logo após o estímulo antigênico com uma transfusão

de hemácias há produção de altos títulos de anticorpos em 48 horas ou 72 horas após tal estímulo, por isso é necessário: a) saber o histórico transfusional e de exames imunohematológicos do paciente e b) repetir os testes após esse período, com alguns serviços repetindo os testes com nova amostra imediatamente após transfusão, para maior margem de detecção de anticorpos.^{1,3,6}

Tormey e Hendrickson⁷ defendem que a natureza itinerante de certos pacientes, aliada a uma falta de banco de dados único para esse tipo de exame laboratorial tornam o acesso ao histórico transfusional mais dispendioso, senão impraticável; eles propõem, também, que um banco de dados centralizado de aloimunizações junto de uma rotina de realização de PAI pós-transfusional obrigatória ajudariam a detectar casos em que os anticorpos indeterminados passaram despercebidos.

O uso de enzimas proteolíticas pode ser considerado rotineiro em laboratórios de imunohematologia de referência para resolver casos em que a PAI tenha resultado inespecífico ou com intensidade muito fraca. As principais enzimas utilizadas são a bromelina, papaína, ficina e tripsina. A lógica no uso dessas enzimas para IAI é que as enzimas acabam desnaturando proteínas na superfície das membranas dos eritrócitos,

bem como antígenos do sistema Duffy (Fy^a e Fy^b), MNS e XG, e acabam expondo os sítios antigênicos aos quais os anticorpos de interesse se ligam, aumentando a reatividade do teste, sendo possível, então, identificar o anticorpo.^{3,8}

Hill *et al.*⁸ abordaram o uso de ficina para resolver resultados inespecíficos de IAI. No estudo, de 97 casos em que foi necessário o uso de ficina para ajudar na identificação de anticorpo dado como indeterminado, foram identificados 25 novos anticorpos e sete anticorpos já conhecidos foram confirmados com o auxílio da enzima, porém 75 anticorpos continuaram caracterizados como anticorpos de especificidade indeterminada, demonstrando que são necessárias outras estratégias ou a combinação destas para identificação certa, como a aloadsorção, autoadsorção, temperaturas diferentes de reação e *Monocyte Monolayer Assay* (MMA - Ensaio de Monocamada de Monócitos, em tradução livre), por exemplo.

Foi encontrado um estudo⁵ que trazia à tona o teste de MMA quando foi feito o levantamento bibliográfico. Neste estudo o MMA foi protagonizado como ferramenta para elucidar se o anticorpo de especificidade indeterminada era clinicamente significativo ou não. Após avaliação de pacientes, todos com PAI

positiva, e uma criteriosa seleção de pacientes com anticorpo indeterminado (tendo associação ou não com anticorpos já identificados, por exemplo dos sistemas Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS), o teste de MMA demonstrou que de 32 amostras, 12 (37,5%) tiveram *Monocyte Index* (MI - Índice de Monócitos, em tradução livre) maior do que 5%, o que caracteriza como clinicamente significativo, e 20 (62,5%) tiveram MI menor do que 5%, o que caracteriza como anticorpo não significativo clinicamente; entretanto o estudo não avaliou se transfusões realizadas nesses dois grupos levariam a reações transfusionais (por exemplo, reação hemolítica tardia ou aguda) ou não. Sendo assim, o teste de MMA auxilia pelo menos na classificação de significância clínica de um anticorpo de especificidade indeterminada.

Liu e Grossman⁶ mencionaram que a maioria dos anticorpos de especificidade indeterminada tinham reações fracas, ao nível de 1+ ou *weak* (pó), que poderiam ser características de anticorpos em baixo título ou anticorpos com baixa avidéz, entretanto é importante realçar que os padrões de reatividade em testes com Antiglobulina Humana (AGH) não necessariamente refletem o comportamento *in vivo*, como demonstrado por testes de MMA (ainda que estes sejam executados *in vitro*), isto é, mesmo em

situações que haja uma preferência por transfusões de hemácias com provas de compatibilidade “menos incompatíveis”, não necessariamente quer dizer que uma baixa reatividade nas provas cruzadas leve a uma consequência clínica menos grave.⁹

Oostendorp *et al.*¹⁰ levantaram a questão da interferência de anticorpos monoclonais utilizados em terapias para doenças como Mieloma Múltiplo (MM), leucemias, tumores sólidos, infecções, dentre outros nos testes imunohematológicos de rotina em bancos de sangue e agências transfusionais.

Um desses anticorpos é o anti-CD38, conhecido como daratumumabe, um imunobiológico utilizado no tratamento do MM, que causa grandes interferências nos testes de PAI na rotina transfusional. A molécula CD38 é uma glicoproteína transmembrana expressa em inúmeras células como linfócitos T e B, células mieloides, plaquetas, hemácias, plasmócitos e está expressa em grandes quantidades em células de MM, daí o tratamento com o anti-CD38; como a proteína CD38 também é expressa nos eritrócitos, esses anticorpos se ligam nessas células, causando um resultado falso-positivo no teste de PAI. Caso o laboratório não tenha o histórico clínico e terapêutico dos pacientes que são atendidos, é bem capaz que o teste de PAI, inespecificamente positivo, tenha como

resultado um anticorpo de especificidade indeterminada, sendo que na verdade era apenas um tratamento imunobiológico interferindo no teste; outros anticorpos que interferem nos testes são Isatuximabe e MOR202, ambos anti-CD38.^{10,11}

Há várias estratégias para se acabar com a interferência de anti-CD38 na PAI, como explorado no estudo de Subramaniyan *et al.*¹¹, uma delas é utilizar reagentes a base de tiol - sendo o ditiotreitól (DTT) o mais acessível para bancos de sangue - ou outros agentes redutores como o 2-mercaptoetanol para desnaturar CD38, porém esses reagentes também acabam desnaturando outras proteínas de interesse como os antígenos dos sistemas Kell, Dombrock (DO), Indian (IN), John Milton Hagen (JMH), Knops (KN) e Landsteiner-Wiener (LW), por isso, deve-se transfundir hemácias com fenótipo estendido compatível com o fenótipo do paciente nesses casos; outras estratégias, que não interferem nos antígenos estudados, são: neutralizar o daratumumabe com CD 38 solúvel ou anti-daratumumabe e genotipagem.

O método de identificação de anticorpos consiste praticamente de uma análise manual das reações apresentadas no painel de hemácias, geralmente 11 hemácias-teste, porém, quanto mais células mais complexo é de se analisar o painel e chegar a identificação de um anticorpo.

Não pode ser ignorado que às vezes a inexperiência e/ou a imperícia técnica de um profissional na identificação de anticorpo pode chegar a uma conclusão errônea de anticorpo de especificidade indeterminada. Muitas vezes quando um paciente tem um autoanticorpo junto de um aloanticorpo, ou uma combinação de dois ou mais aloanticorpos, ou a combinação desses com uma positividade no Teste da Antiglobulina Direto (TAD), também conhecido como Coombs Direto, ocasiona em uma demora na análise mesmo por especialistas na área.

Um estudo elaborado por Tiwari *et al.*¹² abordou a análise de IAI por meio de *software* de computador. Os autores utilizaram um programa de computador chamado *Resolvigen* para revisar resultados de anticorpos já identificados, de modo a testar sua eficácia. Foram avaliados 238 casos de aloanticorpos identificados manualmente. Desses 238, sete foram discordantes, isto é, a análise de computador identificou um ou mais anticorpos diferentes daqueles identificados manualmente; em 210 casos foram identificados um só aloanticorpo, desses, somente um caso foi discordante: foi identificado um anti-E por método manual, e por método informatizado foram identificados três anticorpos, anti-E, anti-c e anti-Le^a, nesse caso o *software* se mostrou correto após uma segunda análise,

de acordo com o estudo. Em relação aos 28 casos com dois anticorpos, houve concordância em 65% ($p=0.000$) dos casos, e dos nove casos com múltiplos anticorpos, não houve concordância. A análise manual se demonstrou decisiva nos casos com dois ou mais anticorpos, em um deles estava claramente identificado um anti-C, porém a análise por computador não conseguiu identificá-lo, provavelmente pela complexidade de se interpretar os resultados. Sendo assim, os pesquisadores se demonstraram confiantes em usar *Resolvigen* para pelo menos ajudar na identificação de anticorpos tanto para usuários menos experientes quanto para mais experientes, já que a maioria dos casos de PAI positivo se dá pela presença de um ou dois anticorpos, entretanto o mesmo não pode ser dito para casos com múltiplos anticorpos.

CONCLUSÃO

Em suma, pode ser inferido que a elucidação de casos com anticorpo de especificidade indeterminada pode ser bastante complexa, mas não impossível, já que estratégias para ajudar na identificação se mostram plausíveis, desde repetir a identificação após algum tempo, até o uso de técnicas auxiliares, como enzimas, adsorção, MMA ou até mesmo ajuda por computador.

Por ser um tema pouco abordado, encontrar estudos que relacionassem anticorpos de especificidade indeterminada e a grande área da imunohematologia demonstrou-se escasso, de milhares de trabalhos foram encontrados somente seis que se encaixavam no tema.

Sabendo disso, conclui-se que: a prevalência de anticorpos de especificidade indeterminada é considerada uma das maiores, segundo os estudos; há técnicas auxiliares relevantes para identificação dos anticorpos; ainda há casos em que não se sabe a especificidade do anticorpo, mesmo com as técnicas auxiliares; são necessários mais estudos abrangentes abordando aspectos clínicos de transfusões em pacientes com anticorpos indeterminados e condutas laboratoriais e/ou tecnológicas, novas ou não, na elucidação de casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRASIL. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, 2017;
2. BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 34, de 11 de junho de 2014. Dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. Diário Oficial da União, 2014;
3. GIRELLO, Ana Lúcia. Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares. In: GIRELLO, Ana Lúcia; KÜHN, Telma

Ingrid Borges de Bellis. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. 4. ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2016. Cap. 5. p. 121-147;

4. HAMILTON, Janis R.; BAILEY, Debra J. Identification of Antibodies to Red Cell Antigens. In: FUNG, Mark K. et al. **Technical Manual**. 19. ed. Chicago: American Association Of Blood Banks, 2017. Cap. 13. p. 349-384;

5. CONRADO, Marina Cavalcanti de Albuquerque da Veiga et al. Prevalence and laboratorial determinants of the clinical relevance of antibodies of undetermined specificity. **Vox Sanguinis**, [S.I.], v. 6, n. 114, p. 616-621, abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31183870/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

6. LIU, Chang; GROSSMAN, Brenda J. Antibody of undetermined specificity: frequency, laboratory features, and natural history. **Transfusion**, [S.I.], v. 53, n. 5, p. 931-938, 11 jan. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.12070>. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23305295/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

7. TORMEY, Christopher A.; HENDRICKSON, Jeanne E. Antibodies of undetermined significance: nuisance or near miss?. **Transfusion**, [S.I.], v. 5, n. 53, p. 926-928, maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23659526/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

8. HILL, Ben C. et al. Ficin-Treated Red Cells Help Identify Clinically Significant Alloantibodies Masked as Reactions of Undetermined Specificity in Gel Microtubes. **Laboratory Medicine**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 24-28, 22 dez. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/labmed/lmw062>. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28007780/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

9. NOUMSI, G. T.; BILLINGSLEY, K. L.; MOULDS, J. M. Successful transfusion of antigen positive blood to alloimmunised patients using a monocyte monolayer assay. **Transfusion Medicine**, [S.I.], v. 2, n. 25, p. 92-100, 31 mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25828731/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

10. OOSTENDORP, Marlies et al. When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. **Transfusion**, [S.I.], v. 6, n. 55, p. 1555-1562, 18 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988285/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

11. SUBRAMANIYAN, Rajeswari; SATHESHKUMAR, Ramaprabahari; PEREIRA, Karishma Rosann. Role of daratumumab in transfusion medicine: a must know entity. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.I.], v. 39, n. 4, p. 375-378, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.07.002>. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29150115/>>. Acesso em: 08 set. 2022;

12. TIWARI, Aseem Kumar et al. Allo-antibody identification: a software approach!. **Transfusion And Apheresis Science**, [S.I.], v. 51, n. 2, p. 197-202, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2014.08.020>. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217458/>>. Acesso em: 08 set. 2022.