UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA ACEDO MORETTO GONÇALVES

**Padronização da investigação laboratorial de anticorpos dirigidos
contra fármacos em doadores de sangue e pacientes com anemia
hemolítica imune**

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA ACEDO MORETTO GONÇALVES

**Padronização da investigação laboratorial de anticorpos dirigidos
contra fármacos em doadores de sangue e pacientes com anemia
hemolítica imune**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Mestrado Profissional em
Hemoterapia e Biotecnologia.
Área de Concentração: Hemoterapia e
Medicina Transfusional.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Traina

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Gonçalves, Fernanda Acedo Moretto

Padronização da investigação laboratorial de anemia hemolítica induzida por fármacos em doadores de sangue e pacientes com anemia hemolítica imune

- Ribeirão Preto, 2018.

77 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientadora: Traina, Fabíola

1. anemia 2. hemólise 3. fármaco 4. anticorpo

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP) e Ministério da Saúde (Conv. 798370/2013).
- Centro de Hematologia e Hemoterapia de Campinas
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCT Sangue/CNPq) (projeto 2008/57895-1)

Nome: GONÇALVES, Fernanda Acedo Moretto

Título: Padronização da investigação laboratorial de anticorpos dirigidos contra fármacos em doadores de sangue e pacientes com anemia hemolítica imune

*Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Programa de Mestrado
Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, Área de
Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.*

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho a minha família: meus pais, Vera Lia e Robson, meus avós André e Oléia, minha irmã Sônia, meu marido Alberto e aos meus filhos Gabriela, Felipe e Alice que estiveram ao meu lado durante esta jornada, trazendo apoio e incentivo e fazendo a caminhada mais leve.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus pensamentos nas horas mais difíceis, me dar saúde e coragem para viver plenamente todas as fases da minha vida, sempre me protegendo e me guiando pelos melhores caminhos.

Especialmente à minha mãe, Vera Lia, pelo apoio incessante, encorajamento, amor incondicional e por não medir esforços na realização dos meus sonhos. Você é meu maior orgulho, a base da minha vida.

À minha querida irmã Sônia, pela amizade, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, me escutando e me aconselhando sempre com muito amor e paciência.

Ao meu marido Alberto, por todo amor, apoio, dedicação e paciência ao longo dessa trajetória que me levou à concretização deste sonho. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar em todos os momentos. Agradeço por cuidar com todo amor dos nossos filhos na minha ausência, necessária para a realização desse trabalho.

Aos meus amados filhos Gabriela, Felipe e Alice, por serem minha razão de viver, de evoluir e de tentar ser uma pessoa melhor todos os dias.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Fabíola Traina, meus agradecimentos pela, dedicação, compreensão e contribuição para evolução do meu conhecimento científico. Obrigada pela confiança e exemplo de profissionalismo.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Barjas Castro, pela grande dedicação, disponibilidade, colaboração, sugestões e ajuda imprescindíveis desde o início desse projeto.

À minha supervisora Maria de Fátima Locatelli, pelo carinho, compreensão, por me encorajar e me apoiar desde o primeiro dia para realização desse sonho.

Aos colegas-amigos do Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro da Unicamp, agradeço a amizade e pela disposição em me ajudar sempre, Magda Vicente e Polyana

Bastoni com muita paciência me ajudaram a separar as amostras dos doadores de sangue, Heloise Pockel pelos conselhos e pela disposição em me ajudar sempre, desde a criação do pré-projeto, Ana Carolina Mascarenhas, Fabiana Novaes, Alini Tucunduva e Silvia Trevini obrigada pelas dicas e paciência que sempre tiveram comigo, me escutando e me aconselhando.

Às minhas amigas Edilaine Corradine e Fernanda Araujo, muito obrigada pelo carinho, pelos conselhos, pelo companheirismo, por me escutarem e me apoiarem sempre. Vocês são muito especiais!

Aos funcionários da coleta do Hemocentro da Unicamp, principalmente ao Marcio Pinto pela abertura e disponibilidade em me ajudar na coleta das amostras de doadores de sangue e aos triadores que me ajudaram na aplicação do questionário clínico e na coleta dos termos de consentimento livre e esclarecido.

À Andreia Damiani e ao Vitor Costa do Laboratório de Sorologia pela amizade, conselhos, paciência e ajuda na realização desse projeto.

À amiga Liliane Roldão e a Dra. Katia Borgia pela ajuda e disponibilidade.

A todos meus amigos e colegas do Mestrado Profissional em Hemoterapia do Hemocentro e Ribeirão Preto, pela maravilhosa experiência de compartilhar momentos únicos e inesquecíveis, além da grande amizade que nasceu nessa convivência.

À Profa. Dra. Maria Carolina de Oliveira Rodrigues e à Profa. Dra. Ana Cristina Silva Pinto pela disponibilidade na correção da dissertação e pelas valiosas sugestões.

*“Bom mesmo é ir a luta com
determinação, abraçar a vida com
paixão, perder com classe e vencer
com ousadia, pois o triunfo pertence
a quem se atreve.*

Charles Chaplin

RESUMO

GONÇALVES, A. C. M. **Padronização da investigação laboratorial de anticorpos dirigidos contra fármacos em doadores de sangue e pacientes com anemia hemolítica imune.** 2018, 77f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: Anemias hemolíticas induzidas por fármacos (AHIF) são caracterizadas por uma anemia hemolítica imune após exposição a um fármaco. Testes sorológicos têm o potencial de confirmar a presença de anticorpo contra fármacos, mas a realização destes testes ainda é um desafio. Os anticorpos IgM e IgG envolvidos na AHIF são principalmente de dois tipos: fármaco-dependentes e fármaco-independentes. Os anticorpos fármaco-independentes reagem com os eritrócitos "*in vitro*" sem a presença do fármaco, e os resultados imunohematológicos são idênticos aos encontrados nas anemias hemolíticas autoimunes idiopáticas. Anticorpos fármaco-dependentes resultam em teste da antiglobulina direto (TAD) positivo e eluato negativo, os anticorpos só reagem "*in vitro*" com os eritrócitos na presença do fármaco. Indivíduos saudáveis podem desenvolver anticorpos contra fármacos, mesmo na ausência de anemia hemolítica. Os indivíduos podem ser sensibilizados durante exposição prévia a fármacos, exposição a antibióticos usados em ração animal, tanques de piscicultura, berçários de criação de suínos ou tratamento de mastite em bovinos. Estes indivíduos apresentam um maior risco de desenvolvimento de AHIF grave na ocasião de uma segunda exposição ao fármaco. **Objetivos:** Padronizar testes imunohematológicos para a detecção de anticorpos dirigidos contra fármaco-dependentes. **Materiais e métodos:** Amostras de 162 doadores de sangue foram submetidas a pesquisa de anticorpos fármaco-dependentes anti-cefalexina, anti-rifampicina e anti-diclofenaco de sódio. Amostra de um doador de plaquetas colhidas por aférese com TAD positivo foi investigada para detecção de anticorpos fármaco-dependentes anti-valsartana. Amostras de 8 pacientes com suspeita diagnóstica de AHIF foram investigadas para a presença de anticorpos contra os fármacos que foram prescritos ao paciente no período de duas semanas prévias ou até o momento em que a hemólise aguda foi constatada. Anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco ligado covalentemente à membrana da hemácia, ou na presença do fármaco em solução, foram investigados em doadores de sangue (técnicas em gel) e em pacientes (técnicas em tubo e em gel).

Resultados: Os testes laboratoriais detectaram a presença de anticorpo anti-valsartana no eluato de um doador de plaquetas colhidas por aférese com TAD positivo e a presença de anticorpo anti-ceftazidima no soro de um paciente com suspeita clínica de AHIF. A investigação de anticorpo anti-cefalexina e anti-rifampicina foi negativa em amostras de doadores de sangue. O teste laboratorial para investigação de anticorpo anti-diclofenaco de sódio não foi finalizado devido a presença de hemólise em hemácias sensibilizadas com o fármaco e após a adição do fármaco na solução de hemácias.

Conclusão: A detecção de anticorpo anti-valsartana em um doador de plaquetas colhidas por aférese evidenciou a presença de anticorpo anti-fármaco na ausência de hemólise. A detecção de anticorpo anti-ceftazidima em amostra de um paciente com anemia hemolítica confirmou a suspeita clínica de AHIF. Reconhecer os sinais clínicos da AHIF precocemente e a disponibilidade de testes sorológicos é essencial para confirmação diagnóstica, orientação terapêutica e prevenção de uma hemólise potencialmente fatal.

Palavras-chave: anemia, hemólise, fármaco, anticorpo

ABSTRACT

GONÇALVES, A. C. M. **Standardization and laboratory investigation of anti-drug antibodies in blood donors and patients with immune hemolytic anemia**. 2018, 77f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: Drug-induced immune hemolytic anemia (DIHA) is characterized by immune hemolytic anemia following exposure to a drug. Serological testing has the potential to confirm the presence of anti-drug antibodies, but the testing is still a challenge. The IgM and IgG antibodies involved in DIHA comprise mainly two types: drug-dependent and drug-independent. Drug-independent antibodies react with erythrocytes *in vitro* without the presence of the drug, and the immunohematologic results are identical to those found in idiopathic autoimmune hemolytic anemias. Drug-dependent antibodies induce positive direct antiglobulin tests (DAT) and negative eluates, and *in vitro* antibody reactions with erythrocytes are only detected in presence of the drug. Healthy individuals can develop antibodies against drugs even in the absence of hemolytic anemia. Individuals may be sensitized during previous exposure to drugs, exposure to antibiotics used in animal feed, fish culture ponds, swine nurseries or mastitis treatment in bovines. These individuals present higher risk of developing severe DIHA on the second exposition. **Aims:** To standardize immunohematological tests for detection of anti-drug dependent antibodies. **Materials and methods:** Samples from 162 blood donors were tested for anti-cephalexin, anti-rifampicin and anti-diclofenac antibodies. Sample from one platelet apheresis donor with positive DAT was investigated for anti-valsartan drug-dependent antibody. Samples from 8 patients with suspected DIHA were investigated for the presence of antibodies directed against the drugs that were prescribed to the patient in the period of two weeks prior to or until the time when acute hemolysis was detected. Drug-dependent antibodies that react in presence of the drug covalently attached to the erythrocyte membrane, or in presence of the drug in solution were investigated in samples from blood donors (gel techniques) and from patients (tube and gel techniques). **Results:** Laboratory tests detected anti-valsartan antibody in the eluate of an platelet apheresis donor with positive TAD and anti-ceftazidime antibody in the serum of a patient with clinical suspicion of DIHA. Investigation of anti-cephalexin and anti-rifampicin antibody was negative in blood

donor samples. The laboratory test for anti-diclofenac antibody was not possible due to the presence of hemolysis in erythrocytes sensitized with the drug and when the drug in solution was added to the erythrocyte. **Conclusion:** The detection of anti-valsartan antibody in an platelet apheresis donor revealed the presence of an anti-drug antibody in the absence of hemolysis. Detection of anti-ceftazidime antibody in a patient with hemolytic anemia confirmed the clinical suspicion of DIHA. It is essential to recognizing early clinical signs of DIHA and have serological tests available for diagnostic confirmation, therapeutic guidance and prevention of potentially fatal hemolysis.

Palavras-chave: anemia, hemolysis, drug, antibody

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Trituração do comprimido de rifampicina utilizando gral e pistilo	35
Figura 2: Medicamentos citados no questionário clínico aplicado aos doadores de sangue	40
Figura 3: Testes realizados com plasmas de doadores de sangue no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-cefalexina.....	42
Figura 4: Testes realizados com plasmas de doadores de sangue no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-rifampicina, quando o fármaco foi adicionado à solução	42
Figura 5: Testes realizados com plasmas de doadores de sangue no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-diclofenaco de sódio, quando o fármaco foi adicionado à solução	43
Figura 6: Testes realizados com o eluato e o soro do doador de plaquetas colhidas por aférese e o controle negativo no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-valsartana, quando a hemácia foi sensibilizada com o fármaco na concentração de 40mg/mL (o fármaco se liga covalentemente com a membrana da hemácia	44
Figura 7: Resultados dos níveis de hemoglobina do paciente 3 com suspeita diagnóstica de AHIF pelo tiomazol.....	45
Figura 8: Resultado positivo do teste direto da antiglobulina no cartão monoespecífico com soro anti-IgG do paciente 8 com AHIF por ceftazidima	47
Figura 9: Resultados dos testes realizados para o paciente 8 com anemia hemolítica induzida pela ceftazidima em gel e em tubo	48
Figura 10: Níveis de hemoglobina do paciente 8, com anemia hemolítica induzida pela ceftazimida	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1A: Fármacos associados com anemia hemolítica induzida por fármaco por mecanismo de imunocomplexo ou adsorção do fármaco por anticorpos fármaco-dependentes..... 25

Tabela 1B: Fármacos associados com anemia hemolítica induzida por fármaco por mecanismo de anemia hemolítica autoimune por anticorpos fármaco-independentes... 26

Tabela 1C: Fármacos associados com anemia hemolítica induzida por fármaco por mecanismo de adsorção de proteínas não imunológicas 26

Tabela 2: Questionário clínico aplicado aos doadores de sangue 32

Tabela 3: Pacientes com suspeita de anemia hemolítica induzida por fármaco (idade, diagnóstico e fármacos testados) 33

Tabela 4: Formulações dos medicamentos utilizados nos testes 38

Tabela 5: Resultados de testes imunohematológicos para pesquisa de anticorpo contra fármaco em pacientes com suspeita de anemia hemolítica induzida por fármaco 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGH	Antiglobulina humana poliespecífica
AHAI	Anemia hemolítica autoimune
AHIF	Anemia hemolítica induzida por fármaco
CEP	Comitê de ética em pesquisa
C3	Complemento C3
C3c	Complemento C3c
C3d	Complemento C3d
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraacetic acid)
FDA	Food and drug administration
<i>G</i>	Força gravitacional
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilodalton
LLC	Leucemia linfoide crônica
LLC-B	Leucemia linfoide crônica por células B
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
NIPA	Nonimmunologic protein adsorption
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
TAD	Teste da antiglobulina direto

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Anemias hemolíticas induzidas por fármacos	18
1.1.1. Formação de imunocomplexo	20
1.1.2. Adsorção do fármaco	20
1.1.3. Anemia hemolítica autoimune	21
1.1.4. Adsorção de proteínas não imunológicas	21
1.1.5. Anticorpos contra fármacos em indivíduos saudáveis.....	22
1.2. Respostas imunes aos fármacos	24
1.3. Histórico clínico de pacientes com anemia hemolítica induzida por fármaco.....	24
1.4. Justificativa	28
2. Objetivos	30
2.1. Geral.....	30
2.2. Específicos	30
3. Material e Métodos.....	32
3.1. Casuística	32
3.1.1. Aspectos Éticos.....	32
3.1.2. Doadores de sangue	32
3.1.3. Pacientes com anemia hemolítica imune.....	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Preparação dos fármacos utilizados para os testes	34
3.2.2. Detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco ligado covalentemente à membrana da hemácia em doadores de sangue.....	34
3.2.3. Detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução em doadores de sangue	35
3.2.4. Testes com amostras de pacientes com suspeita de anemia hemolítica induzida por fármacos	36
3.2.5. Técnica em tubo para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução ou se ligam covalentemente a membrana das hemácias em amostras de pacientes.....	37
4. Resultados	40
4.1. Dados demográficos dos doadores de sangue	40
4.2. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra cefalexina e rifampicina em doadores de sangue.....	41
4.3. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra o diclofenaco de sódio em doadores de sangue.....	43
4.4. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra valsartana em doador de plaquetas colhidas por aférese	43
4.5. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra fármacos em pacientes com suspeita de AHIF	44
5. Discussão	51
6. Conclusões	63
7. Referências Bibliográficas	65
8. Anexos	72

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Anemias hemolíticas induzidas por fármacos

Anemias hemolíticas induzidas por fármacos (AHIF) são raras, podendo apresentar quadro clínico hemolítico leve ou grave, incluindo casos fatais, contudo, o diagnóstico laboratorial é um desafio. A incidência da AHIF é desconhecida, Dr. Garratty sugere que seja em torno de 1 em 1 milhão de indivíduos [1]. Atualmente, cerca de 130 fármacos estão associados às anemias hemolíticas imunes [2]. A primeira suspeita de AHIF foi em 1953 quando Snapper e colaboradores descreveram um paciente que desenvolveu pancitopenia com anemia hemolítica, associada com um teste da antiglobulina direto (TAD) positivo, em sequência de uma investigação de mefenitoína [3].

Harris foi o primeiro a documentar cuidadosamente a história clínica e a sorologia de um caso de anemia hemolítica imune devido a um fármaco, em 1956. O fármaco estibofeno, era usado no tratamento de esquistossomose, o paciente tinha recebido estibofeno previamente por 10 anos sem apresentar problemas. Em um segundo momento, o paciente desenvolveu uma hemólise intravascular aguda, o TAD apresentou resultado positivo e o soro do paciente demonstrava positividade com células vermelhas alogênicas somente quando o fármaco estava presente. O estibofeno foi suspenso e a hemoglobina do paciente voltou ao normal em 20 dias, a sorologia tornou-se negativa após aproximadamente 60 dias [4].

Em 1967, Dausset e Contu revisaram a literatura em relação à AHIF, encontraram 34 publicações relacionadas e 15 fármacos envolvidos [5]. Em 1980, foram descritos 33 fármacos relacionados à AHIF. Em 1989, a lista cresceu para mais de 50 fármacos [6] e, em 2007, foram relatados 125 fármacos [7].

Historicamente, a alfa-metildopa e altas doses de penicilina eram responsáveis pela maioria dos casos de anemia hemolítica induzidas por fármacos. Estudos publicados no início de 1980, quando esses dois medicamentos eram muito utilizados, indicavam que 12 a 18% dos casos de anemias hemolíticas imunes eram induzidas por fármacos. Enquanto a incidência de anemias hemolíticas induzidas por alfa-metildopa e penicilina teve uma provável diminuição desde 1980, a segunda e a terceira geração das cefalosporinas, especialmente o cefotetano e a ceftriaxona, foram associadas a um novo aumento de incidência dessas anemias [8].

Cefotetano parece ser muito mais imunogênico do que outros fármacos, títulos dos seus anticorpos são mais altos do que qualquer outro anticorpo contra fármacos

observado nos últimos trinta anos. Isso é provavelmente a explicação do cefotetano ser o medicamento que mais causa AHIF (ceftriaxona é a segunda causa mais comum). As anemias hemolíticas nesses casos são muito mais graves e há mais mortes associadas do que é observado com a alfa-metildopa [9].

As AHIF são caracterizadas por uma queda brusca da hemoglobina seguindo a exposição a um fármaco, e são identificadas por evidências clínicas de hemólise associadas ao fármaco e confirmadas por testes sorológicos. O TAD positivo é o primeiro indício de se tratar de uma AHIF, mas necessita da ajuda laboratorial experiente nessa área para confirmar que é um evento imune a um fármaco específico [10]. Classicamente, o TAD apresenta forte intensidade de aglutinação (de 3 a 4 cruzes) devido à reação com anticorpos da classe IgG ou IgM e C3d. As pesquisas dos anticorpos irregulares no soro e no eluato apresentam resultados negativos [11]. Eluato é o produto da reação de eluição, um procedimento caracterizado pela remoção de anticorpos da membrana das hemácias sensibilizadas através de diferentes técnicas como calor, congelamento, solventes orgânicos e meio ácido [12].

Os anticorpos IgM e IgG envolvidos nas AHIF são principalmente de dois tipos: fármaco-dependentes e fármaco-independentes. Os anticorpos fármaco-dependentes só reagem "*in vitro*" com os eritrócitos na presença do fármaco. Esses anticorpos podem reagir "*in vitro*" com hemácias sensibilizados com o fármaco, se esse fármaco fizer uma ligação covalente com a membrana da hemácia, ou quando as hemácias são expostas ao fármaco por meio de uma solução. Os anticorpos fármaco-independentes reagem com os eritrócitos "*in vitro*" sem a presença do fármaco, esses anticorpos têm as mesmas características dos autoanticorpos, os resultados hematológicos e sorológicos são idênticos aos encontrados nas anemias hemolíticas autoimunes quentes idiopáticas. Não existem testes "*in vitro*" para definir que um medicamento causou a AHAI, o diagnóstico é feito quando o medicamento é interrompido e a anemia se resolve, mas os testes sorológicos como o TAD podem permanecer positivos por algum tempo [10,13,14].

O primeiro caso reportado de anticorpo fármaco-depende foi o anticorpo estibofeno (um fármaco anti-helmíntico) em 1956 [4], e os primeiros anticorpos fármaco-independentes descritos foram autoanticorpos induzidos por alfa-metildopa (um fármaco anti-hipertensivo) em 1966 [15,16].

Nas anemias hemolíticas causadas por anticorpos fármaco-dependentes após a retirada do fármaco a hemólise desaparece e o TAD permanece positivo por duas ou três

semanas. Nas anemias hemolíticas causadas por anticorpos fármaco-independentes, a remissão hematológica ocorre em aproximadamente duas semanas após a retirada do fármaco e o TAD pode demorar meses para ter alterações [10].

Atualmente, são descritos quatro mecanismos responsáveis pelas AHIF: formação de imunocomplexo, adsorção do fármaco, adsorção de proteína não imunológica (NIPA; nonimmunologic protein adsorption) e anemia hemolítica autoimune [17].

Foram descritos pacientes com anticorpos que reagem em mais de um mecanismo, por exemplo, autoanticorpos fármaco-independentes mais anticorpos fármaco-dependentes que reagem pelo método de adsorção do fármaco ou imunocomplexo [10,18].

1.1.1. Formação de imunocomplexo

O mecanismo de imunocomplexo ocorre quando o fármaco e os anticorpos contra o fármaco (IgG ou IgM) se combinam e formam complexos imunes que são adsorvidos às hemácias e ativam complemento. A maioria dos fármacos que causam AHIF reagem por esse mecanismo, a quinidina (antiarrítmico) e a fenacetina (anti-inflamatório não esteroide) são protótipos de fármacos que reagem formando imunocomplexos. Algumas características desse mecanismo são: os pacientes previamente sensibilizados precisam tomar uma pequena quantidade do fármaco; como resultado da ativação do complemento, os pacientes apresentam hemólise intravascular aguda com hemoglobinemia e hemoglobinúria, podendo acarretar em falência renal; o TAD é positivo geralmente com C3; reações “*in vitro*” de aglutinação, hemólise e sensibilização só podem ser demonstradas incubando uma mistura do soro do paciente, do fármaco e das hemácias, formando o imunocomplexo [17,19,20].

1.1.2. Adsorção do fármaco

O mecanismo de adsorção do fármaco foi utilizado para descrever os fármacos que se ligavam fortemente à membrana das hemácias, anticorpos contra esses fármacos reagem com o fármaco ligado covalentemente à hemácia. A penicilina foi o protótipo desse mecanismo. As características típicas das AHIF induzida pela penicilina são: os pacientes tinham recebido altas doses de penicilina por via intravenosa (por exemplo, 10 milhões de unidades diariamente durante uma ou mais semanas); a hemólise extravascular se desenvolve entre 7 a 10 dias, a hemólise é decrescente e pode persistir

por várias semanas após a suspensão da penicilina; o TAD é fortemente positivo com soro anti-IgG e algumas vezes o C3 também pode estar presente; os testes “*in vitro*” do soro do paciente e do eluato com as hemácias tratada com o fármaco são positivos, e o título do anticorpo no soro é geralmente ≥ 1000 [13,17].

1.1.3. Anemia hemolítica autoimune

O mecanismo de anemia hemolítica autoimune, previamente denominado de anemias hemolíticas autoimunes fármaco-independentes, ocorre quando o fármaco induz um autoanticorpo que reage com as hemácias normais sem a presença do fármaco, a reatividade é semelhante aos autoanticorpos encontrados nas anemias hemolíticas autoimunes a quente. O protótipo de fármaco para este mecanismo é a alfa-metildopa, que forma anticorpos fármaco-independentes [18]. Algumas características dos autoanticorpos induzidos pela alfa-metildopa são: de 10 a 36% dos pacientes desenvolvem TAD fortemente positivo com anti-IgG e anti-C3 após tomarem alfa-metildopa durante 3 a 6 meses; cerca de 0,8% dos pacientes desenvolvem gradualmente anemia hemolítica extravascular, que se resolve após a suspensão da alfa-metildopa; o soro e o eluato do paciente apresentam um autoanticorpo que sorologicamente é indistinguível dos outros autoanticorpos quentes IgG. Um mecanismo proposto é que a alfa-metildopa causa uma alteração no sistema imunológico [21]. A prova de que a anemia hemolítica é causada pela alfa-metildopa é apenas pelas observações clínicas [17].

1.1.4. Adsorção de proteínas não imunológicas

Algumas AHIF ocorrem através de um mecanismo denominado “mecanismo de modificação da membrana” ou “adsorção de proteínas não imunológicas”. Nestes casos, o TAD é positivo, mas a anemia hemolítica ocorre sem que anticorpos contra fármacos estejam envolvidos, os glóbulos vermelhos com modificação na membrana são destruídos por macrófagos no baço e no fígado. A interação do fármaco com os glóbulos vermelhos não envolve anticorpos induzidos por fármacos, mas a vida dos glóbulos vermelhos é reduzida por um mecanismo imune celular [22]. Fármacos podem alterar a membrana do eritrócito de modo que as proteínas (por exemplo, imunoglobulinas, complemento, albumina) se liguem aos eritrócitos e resultam em TAD positivo [23]. Isso pode envolver os eritrócitos do paciente “*in vivo*”, ou pode ocorrer “*in vitro*” (PAI positivo) quando o soro ou plasma do paciente é incubado com

hemácias revestidas com o fármaco. Este fenômeno foi observado pela primeira vez com a cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração, em 1967 [24,25]. Por muitos anos foi considerado como um fenômeno interessante que poderia interferir nos exames laboratoriais, mas não tinha significância clínica, até que os inibidores de beta-lactamase, que causam adsorção de proteínas não imunológicas, mostraram que poderiam causar AHIF [23,26]. Os medicamentos que podem estar envolvidos neste mecanismo são: cefotetano, cefaloridina, cefalotina, cisplatina, clavulanato de potássio, diglicolaldeído, oxaliplatina, sulbactam, suramina e tazobactam [22]. Deve-se suspeitar de adsorção de proteínas não imunológicas quando o soro ou plasma do paciente reagem contra hemácias tratadas com o fármaco, mas o eluato do paciente não é reativo com as hemácias tratadas com o fármaco, pois os níveis de proteína no eluato geralmente são muito baixos [17].

1.1.5. Anticorpos contra fármacos em indivíduos saudáveis

Sabe-se, há muitos anos, que humanos saudáveis podem ter anticorpos contra fármacos em seu plasma ou soro. Anticorpos de baixa densidade, frequentemente IgM, contra penicilina foram detectados em doadores de sangue (5%) [22]. Em 2008, Garratty and Arndt relataram que 91% dos soros dos doadores de sangue e 49% dos soros de pacientes aleatórios, continham anticorpos reativos contra hemácias sensibilizadas com piperacilina [27]. Os autores determinaram que os anticorpos contra piperacilina (ao contrário dos anticorpos contra as outras penicilinas) reagem fortemente quando a solução do fármaco era adicionada ao soro dos indivíduos [27]. Outros anticorpos contra fármacos foram detectados em indivíduos saudáveis e em doentes sem AHIF, como oxaliplatina, cisplatina e meropenem [28].

Não se sabe por que alguns anticorpos contra fármacos são encontrados em doadores saudáveis ou porque aparecem mais frequentemente do que em pacientes aleatórios. Por exemplo, foi descrito que 91% de doadores e apenas 49% de pacientes aleatórios tem anticorpos contra piperacilina [27], 16% dos doadores e apenas 4% dos pacientes têm anticorpos contra oxaliplatina [28]. Foi sugerido que fatores ambientais podem ser responsáveis pela produção de anticorpos. Por exemplo, conversores catalíticos de automóveis liberam platina para a atmosfera e podem explicar a produção de anticorpos contra medicamentos que pertencem à família platina (oxaliplatina, carboplatina e cisplatina) [22]. Outro conceito que explica a produção de anticorpos contra antibióticos em indivíduos sem AHIF é que, nos Estados Unidos, os antibióticos

são rotineiramente utilizados na alimentação de gado e galinhas, com isso, estamos rotineiramente expostos a fármacos como cefalosporinas e penicilinas [18,27]. Muitos países da Europa proibiram esta prática principalmente para prevenir problemas de resistência ao tratamento de muitos organismos [22].

Conforme descrito por vários autores, o uso de antibióticos que potencialmente podem causar AHIF em ração animal, tanques de piscicultura, berçários de criação de suínos, tratamento de mastite em bovinos, podem levar ao aparecimento de anticorpos contra fármacos em indivíduos saudáveis. Os indivíduos previamente sensibilizados apresentam maior risco de desenvolvimento de AHIF grave na ocasião de uma segunda exposição ao fármaco durante um tratamento medicamentoso [13,29,30]. O controle de fármacos utilizados na pecuária, como profilaxia ou tratamento de animais, tem um controle de resíduos incipiente no Brasil. Foram identificados resíduos de antibiótico beta-lactâmicos em leite comercializados no Brasil e presença de resíduo de antibióticos em carnes [23].

Foi relatada a presença de platínio no solo e também no ar (poluição), como subproduto de conversores catalíticos de automóveis e produtos farmacêuticos, contaminando a água e a cadeia alimentar, o platínio é utilizado como quimioterápico, a oxaliplatina no tratamento de neoplasias [28].

Lenger realizou um estudo e identificou soros de doadores e pacientes que reagem com hemácias revestidas com antibióticos beta-lactâmicos (por exemplo, penicilina, cefotetano, piperacilina). Isso sugere que todos nós estamos expostos à beta-lactâmicos ou produtos químicos relacionados no nosso meio ambiente [27].

Pequenas quantidades de fármacos também podem ser detectadas na água de torneira porque os medicamentos podem ser descartados pelo dreno ou esgoto ou excretados na urina dos pacientes e, infelizmente, o tratamento da água não remove resíduos de fármacos [27].

Ainda podem existir outras fontes ambientais e todos nós podemos estar expostos a fármacos por décadas sem saber disso. A presença de anticorpos contra fármacos em doadores normais e pacientes aleatórios é uma razão pela qual é importante testar soros normais como controle ao testar hemácias tratadas com fármacos [27].

1.2. Respostas imunes aos fármacos

Para ser imunogênica, a substância química geralmente deve ter peso molecular superior a 1.000 kDa, preferencialmente maior que 10.000 kDa. Os fármacos têm pesos moleculares inferiores a 1.000 kDa e são considerados "haptenos", que são antigênicos, mas não imunogênicos, ao menos que conjugados com uma grande molécula transportadora (geralmente uma proteína). Para provocar uma resposta imune o hapteno precisa formar ligações covalentes estáveis com uma proteína. Esses conjugados podem provocar uma resposta imune composta por anticorpos contra o fármaco [31,32,33]. Alguns fármacos como, por exemplo, a maioria das penicilinas e cefalosporinas, são capazes de se ligar covalentemente às proteínas nas membranas dos eritrócitos formando glóbulos vermelhos revestidos, por exemplo, pela penicilina, com isso, é possível a detecção desses anticorpos "*in vitro*". Muitos medicamentos, especialmente aqueles que provocam hemólise intravascular aguda, como a ceftriaxona, têm uma baixa afinidade a proteínas e não se ligam covalentemente aos eritrócitos, assim não é possível sensibilizar os eritrócitos pelo fármaco "*in vitro*", pois o fármaco é facilmente removido da membrana da hemácia no processo de lavagem. Tais fármacos podem ligar-se fracamente aos eritrócitos e as plaquetas "*in vivo*", proporcionando a formação de novos epítomos que podem induzir uma resposta imune. Desta forma, pensa-se que independente da habilidade de formar ligações covalentes, muitos fármacos podem se ligar, embora fracamente, aos eritrócitos e as plaquetas. Além disso, os anticorpos podem ser dirigidos aos metabólitos do fármaco, e podem, ou não, reagir com o fármaco [34,35]. Isso é importante na investigação sorológica de anticorpos induzidos por fármacos. Se resultados negativos são obtidos por métodos sorológicos de rotina, mas a história clínica é convincente, é importante realizar testes para identificação de anticorpos contra metabólitos do fármaco. A urina é uma boa fonte de metabólitos e pode ser obtida de um paciente ou de um voluntário que está recebendo o fármaco [10].

1.3. Histórico clínico de pacientes com anemia hemolítica induzida por fármaco

A história clínica do paciente é crucial quando se avalia uma suspeita de anemia hemolítica imune induzida por fármacos. Qualquer medicação recebida nas últimas duas semanas ou no momento da hemólise aguda deve ser considerada [11,36].

Os fármacos mais comuns relacionados à AHIF, de acordo com George Garratty, nos últimos 32 anos de estudos do seu laboratório, são os antimicrobianos,

como o cefotetano (53%), ceftriaxona (16%), piperacilina (9%), e os inibidores de beta-lactamase (5%). O fármaco mais comumente associado à anemia hemolítica fatal foi o cefotetano (8%), seguido pela ceftriaxona (6%), principalmente em crianças. O fármaco mais comum nas últimas duas décadas, que produz anticorpos fármaco-independentes e AHAI é a fludarabina [7,10].

Atualmente, cerca de 130 fármacos estão associados com AHIF, sendo que a maioria dos fármacos está associada à AHIF por mecanismo de imunocomplexo ou adsorção do fármaco, ambos os mecanismos causados por anticorpos fármaco-dependentes (Tabela 1A). Alguns fármacos estão associados com AHIF através de formação de anticorpos fármaco-independentes, ou autoanticorpos, que causam anemia hemolítica imune (Tabela 1B), e outros fármacos estão associados com AHIF através do mecanismo de adsorção de proteínas não imunológicas (Tabela 1C) [22].

Tabela 1A. Fármacos associados com anemia hemolítica induzida por fármaco por mecanismo de imunocomplexo ou adsorção do fármaco por anticorpos fármaco-dependentes.

Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco
Acetaminofeno ²	Cefalotina ¹	Estreptomicina ¹	Levofloxacina ¹	Quinidina ²⁴
Aciclovir ³	Cloranfenicol ¹⁶	Fenitoína ^{23, 24}	Melphalan ¹¹	Quinina ¹
Amoxicilina ¹	Clorpromazina ^{13, 22}	Fenoprofeno ²	6-mercaptopurina ¹¹	Ranitidina ¹⁵
AnfotericinaB ¹	Clorpropamide ¹⁴	Fluconazol ¹⁸	Metadona ⁵	Rifampicina ¹⁶
Ampicilina ¹	Cimetidina ¹⁵	Fluorouracil ¹¹	Metotrexato ^{11, 21}	Sulfassalazina ⁷
Aspirina ^{5, 6, 7}	Ciprofloxacina ¹⁶	Furosemida ⁸	Napronexo ^{7, 5, 6}	Teicoplanina ¹
Butizide ^{8, 9}	Cisplatina ¹¹	Hidralazina ⁹	Nitrofurantoina ¹⁶	Teniposide ¹¹
Carboplatina ¹¹	Ciclosporina ¹⁷	Hidroclorotiazida ⁸	Norflorxacina ¹	Tetraciclina ¹
Cefazolina ¹	Clorfeniramina ⁴	Hidrocortisona ¹⁹	Oxaliplatina ¹¹	Tiopental ²⁷
Cefixima ¹	Diclofenaco ²	Ibuprofeno ²	Penicilina G ¹	Ticarcilina ¹
Cefotetano ¹	Dipirona ²	Imantinibe ¹¹	Piperacilina ¹	Tolbutamida ¹⁴
Ceftazidima ¹	Eritromicina ¹	Insulina ¹⁴	Probenecida ²⁵	Trianterene ⁸
Ceftriaxona ¹	Estibofeno ¹	Iomeprol ²⁰	Pirazinamida ¹⁶	Trimetoprima ¹⁶
Cefalexina ¹	Estreptoquinase ²⁶	Izoniazida ¹	Pirimetamina ¹	Vancomicina ¹⁶

Tabela 1B. Fármacos associados com anemia hemolítica induzida por fármaco por mecanismo de anemia hemolítica autoimune por anticorpos fármaco-independentes.

Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco
Ácido mefenâmico ²	Captopril ⁹	Chaparral ³⁴	Interleucina ¹¹	Metildopa ⁹
Ácido Nalidíxico ¹⁶	Cetoconazol ¹⁸	Fenfluramina ²⁸	Lenalidomida ²⁹	Procainamida ²⁴
Alemtuzumabe ^{11, 17}	Cimetidina ¹⁵	Fludarabina ¹¹	Levodopa ³⁰	Rituximabe ¹¹
Bendamustina ¹¹	Cladribina ¹¹	Interferon ^{11, 3}	Mesantoína ²³	Tracolimo ¹⁷

Tabela 1C. Fármacos associados com anemia hemolítica induzida por fármaco por mecanismo de adsorção de proteínas não imunológicas.

Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco	Fármaco
Cefotetano ¹	Cefalotina ¹	Clavulanato ³¹	Oxaliplatina ¹¹	Suramina ^{32, 33}
Cefaloridina ¹	Cisplatina ¹¹	Diglicolaldeído ¹¹	Sulbactam ³¹	Tazobactam ³¹

A classe dos fármacos é indicada por um símbolo numérico. 1: Antimicrobiano; 2: Anti-inflamatório não esteroide, 3: Antiviral; 4: Anti-histamínico; 5: Analgésico; 6: Antipirético; 7: Anti-inflamatório; 8: Diurético; 9: Anti-hipertensivo; 10: Antitiroideano. 11: Antineoplásico, 12: Sedativo, hipnótico, 13: Antiemético, 14: Antidiabético, 15: Antiulcerativo, 16: Antibacteriano, 17: Imunossupressor, 18: Antifúngico, 19: Corticosteroide, 20: Meio radiopaco, 21: Antirreumático, 22: Antipsicótico, 23: Anticonvulsivante, 24: Antiarrítmico, 25: Uricosúrico, 26: Trombolítico, 27: Anestésico, 28: Anoréxico, 29: Imunomodulatório, 30: Antiparkinsoniano, 31: Inibidor beta-lactâmico, 32: Anti-helmíntico, 33: Antiprotózoário, 34: Erva.

O curso da terapia deve ser cuidadosamente avaliado. Prescrição, comprimidos e fórmulas intravenosas dos fármacos têm sido implicados e devem ser considerados suspeitos em uma análise inicial da história medicamentosa do paciente. Posologias e horários das medicações também devem ser avaliados. No caso dos anti-inflamatórios não esteroidais a hemólise ocorre após o paciente ser re-exposto ao fármaco mesmo com uma pequena dose. A segunda e a terceira geração das cefalosporinas podem induzir uma resposta imune após a exposição a altas doses intravenosas. É muito raro ver um fármaco utilizado cronicamente causar AHIF [11].

A identificação do medicamento que está causando a anemia hemolítica e a interrupção do uso é a primeira abordagem terapêutica para a AHIF. Não é fácil identificar precisamente as interações do fármaco "*in vitro*". Laboratórios especializados nesta área são imprescindíveis para confirmar o diagnóstico. A equipe médica deve estar atenta e alertar seus pacientes que uma nova exposição ao fármaco pode causar um aumento da hemólise, que pode ser fatal [10,11,13].

As informações sobre o paciente desempenham um papel fundamental nos aspectos clínicos e sorológicos. A grande maioria dos pacientes não é informada sobre os sintomas de hemólise e quais fármacos podem, embora raramente, resultar em hemólise. O quadro clínico da AHIF é extremamente variável e os pacientes afetados

geralmente são incapazes de reconhecer uma relação entre os fármacos e os sintomas secundários de hemólise, ou seja, taquicardia ou dispneia causada por anemia, dor abdominal, dor lombar e urina vermelha (hemoglobinúria) causada pela hemólise intravascular. Muitos médicos não estão familiarizados com AHIF, eles não sabem que as manifestações clínicas são variáveis. Além disso, persiste uma falta de conhecimento do ponto de vista clínico ou sorológico sobre a diferença entre a AHIF por autoanticorpos isolados e induzidos por anticorpos fármaco-dependentes. Semelhante à situação clínica, muitos sorologistas não estão bem informados sobre todos os aspectos sorológicos e clínicos da AHIF. Isso torna o teste e a interpretação correta dos achados sorológicos muitas vezes impossível. Ainda não existem testes padronizados ou diretrizes para confirmar os achados sorológicos nos casos de AHIF. Estas deficiências representam riscos e armadilhas que conduzem a resultados falso-positivos e falso-negativos [10].

É amplamente desconhecido que a administração do fármaco não resulta em imunização primária significativa nos primeiros cinco dias se o paciente não tiver recebido previamente o medicamento. Posteriormente, a reação imune pode ocorrer em qualquer momento durante a administração contínua ou intermitente ou após a reexposição do fármaco causador [37].

A investigação da AHIF é realizada por técnicas padronizadas por alguns autores com grande experiência nesta área, como Judd e colaboradores [40], Garratty, Arndt e Leger [14] e Salama e colaboradores [39]. O soro e o eluato dos pacientes devem ser testados com hemácias sensibilizadas com o fármaco e testados com o fármaco presente na solução. Segundo Garratty, mais fármacos reagem quando testados com o fármaco presente na solução do que quando o teste é realizado com as hemácias sensibilizadas com o fármaco [22].

O teste da hemaglutinação em gel é uma técnica confiável que permite a detecção de anticorpos. A solução de hemácias e o soro a serem testados são dispensados na parte superior do microtubo contendo o gel, após a incubação, os microtubos são centrifugados e as hemácias são separadas da suspensão, enquanto as células aglutinadas ficam presas no gel (reação positiva), as células livres são comprimidas no fundo do microtubo (reação negativa) [38]. O teste em gel pode ser útil na detecção de anticorpos com baixa afinidade, como os anticorpos relacionados aos fármacos que não se ligam firmemente às hemácias. Com esse propósito, uma grande

quantidade de anticorpos fármaco-dependentes relacionados a diferentes fármacos foram sistematicamente estudados com essa técnica [39].

1.4. Justificativa

Anemias hemolíticas induzidas por fármaco são raras, mas apresentam alta morbidade e mortalidade. A dificuldade na padronização e disponibilização de testes imunohematológicos para a investigação de anticorpos dirigidos contra fármaco é um fator limitante para a confirmação diagnóstica em pacientes com quadro clínico e laboratorial de anemia hemolítica imune adquirida. A investigação de anticorpos contra fármacos em indivíduos saudáveis, tem o potencial de auxiliar na padronização de testes laboratoriais e o potencial de identificar indivíduos saudáveis com risco de desenvolver AHIF na ocasião de uma nova exposição ao fármaco que induziu a formação do anticorpo.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Geral

Padronizar testes imunohematológicos para a detecção de anticorpos dirigidos contra fármaco-dependentes.

2.2. Específicos

- Padronizar testes imunohematológicos para detecção de anticorpos fármaco-dependentes dirigidos contra fármacos específicos.
- Investigar a presença de anticorpos fármaco-dependentes anti-cefalexina, anti-rifampicina e anti-diclofenaco de sódio em doadores de sangue.
- Investigar a presença de anticorpos contra fármaco-dependentes em pacientes com suspeita de anemia hemolítica imune induzida por fármaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Casuística

3.1.1. Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, parecer N° 850.067 (Anexo 1) e todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

3.1.2. Doadores de sangue

Foram incluídos 162 doadores de sangue voluntários do Hemocentro de Campinas. Amostras remanescentes de sangue periférico coletadas em EDTA para rotina de testes imunohematológicos do doador de sangue foram também utilizadas para os testes imunohematológicos destinados a este projeto de pesquisa. Amostras foram coletadas de todos os doadores que consentiram em participar do estudo, no período de 22/11/2014 a 16/04/2015. Na ocasião da coleta da amostra, os doadores de sangue responderam a um questionário clínico para coleta de dados demográficos e históricos de uso de fármacos, incluindo antibióticos, anti-inflamatórios, e hábitos alimentares (Tabela 2).

Tabela 2. Questionário clínico aplicado aos doadores de sangue.

Pergunta clínica	Respostas
Já teve infecção urinária?	Sim/Não
Lembra qual medicamento tomou?	
Já teve infecção do trato respiratório? Sinusite? Pneumonia?	Sim/Não
Lembra qual medicamento tomou?	
Já precisou tomar anti-inflamatórios?	Sim/Não
Lembra qual medicamento tomou?	
Come peixe com frequência?	Sim/Não
Quantas vezes por semana?	
Come frango com frequência?	Sim/Não
Quantas vezes por semana?	

Os plasmas dos doadores de sangue foram testados para detecção de anticorpos anti-cefalexina, anti-rifampicina e anti-diclofenaco de sódio, esses medicamentos foram selecionados, a critério do investigador, por serem amplamente utilizados pela comunidade e serem fornecidos no sistema único de saúde brasileiro.

Adicionalmente, foi incluído um doador de plaquetas colhidas por aférese que apresentou TAD positivo na avaliação imunohematológica de rotina.

Em nossos estudos, seguimos a padronização feita por Judd e colaboradores [40] para os testes em tubo, e seguimos os métodos padronizados por Salama e colaboradores [39] para os testes em gel.

3.1.3. Pacientes com anemia hemolítica imune

Oito pacientes com suspeita clínica e laboratorial de AHIF, cujas amostras para investigação de testes imunohematológicos de rotina foram encaminhadas para o Laboratório de Imunohematologia Eritrocitária Especializada do Hemocentro de Campinas, foram incluídos no estudo. As amostras foram coletadas no período de 01/10/2014 a 18/07/2017. Todos os pacientes apresentavam evidências clínicas e laboratoriais de hemólise (redução dos valores da hemoglobina e aumento da contagem de reticulócitos com aumento da lactato desidrogenase e/ou de bilirrubina indireta e/ou redução da haptoglobina) de início recente. A suspeita sorológica de AHIF era indicada pelo médico responsável pelo Laboratório de Imunohematologia Eritrocitária Especializada do Hemocentro de Campinas, a partir de resultados de TAD positivo e eluato negativo, ou TAD e eluato negativos. A suspeita clínica era discutida com o médico responsável pelo paciente, o qual informava a história dos medicamentos prescritos ao paciente no período de duas semanas prévias ou até o momento em que a hemólise aguda foi constatada.

Idade, diagnóstico e fármacos prescritos aos pacientes incluídos no estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Pacientes com suspeita de anemia hemolítica induzida por fármaco.

Paciente	Idade	Diagnóstico	Fármacos testados
1	26 ¹	Lúpus eritematoso sistêmico	Hidralazina e cloroquina
2	29 ¹	Carcinoma gástrico	Cloridrato de cefepima
3	36 ¹	Doença de Graves	Tiomazol
4	57 ¹	Leucemia linfóide crônica	Fludarabina
5	75 ¹	Doença pulmonar obstrutiva crônica	Furosemida e fluconazol
6	85 ¹	Doença diverticular do cólon	Ceftriaxona
7	12 ²	Sífilis congênita	Penicilina
8	18 ¹	Fibrose Cística	Ceftazidima

A idade é indicada em anos (¹) ou dias (²).

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação dos fármacos utilizados para os testes

Os fármacos utilizados para os testes de identificação de anticorpos contra fármacos foram: cefalexina, rifampicina, diclofenaco de sódio, hidralazina, cloroquina, cloridrato de cefepima, tiomazol, fludarabina, furosemida, fluconazol, ceftriaxona, penicilina, valsartana e ceftazidima.

Todos os fármacos foram preparados e testados para detecção de anticorpos fármaco-dependentes em que o fármaco se liga covalentemente à membrana da hemácia (solução do fármaco 40 mg/mL) e para a detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução (fármaco em solução 1mg/mL).

A preparação do fármaco variou de acordo com a formulação do medicamento estudado. As formulações em comprimidos foram trituradas utilizando um gral com pistilo, a cápsula teve seu selo de vedação rompido e o conteúdo foi despejado em um béquer pequeno, as formulações em pó já estavam prontas para a pesagem.

Em todos os testes, um soro com pesquisa de anticorpos irregulares negativo foi utilizado como controle negativo. Para os testes em que a hemácia foi sensibilizada com o fármaco, uma alíquota da hemácia não tratada foi separada e utilizada como controle negativo.

3.2.2. Detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco ligado covalentemente à membrana da hemácia em doadores de sangue

O primeiro fármaco testado em doadores de sangue foi a cefalexina, na forma de cápsula. Quinhentos miligramas do fármaco foram diluídos em 12,5 mL de tampão PBS pH 7.3 e essa solução foi incubada a 37°C por 30 minutos sob agitação vigorosa para uma melhor solubilização. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 1370g por 5 minutos, 7,5 mL do sobrenadante foram incubados com 0,5 mL de hemácias do grupo sanguíneo “O”, fenótipo rr, à temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação, as hemácias foram lavadas 3 vezes com soro fisiológico 0,9%, e ressuspensas em diluente de baixa força iônica na concentração de 0,8 a 1%. Cinquenta microlitros das hemácias sensibilizadas com a cefalexina foram pipetadas em cada microtubo do gel Liss Coombs (Diamed®, Minas Gerais, Brasil) e 25 µL do plasma dos 162 doadores de

sangue selecionados foram adicionados às hemácias. O cartão Liss Coombs foi incubado a 37°C por 15 minutos e centrifugado a 1370g por 10 minutos.

O comprimido de rifampicina foi triturado utilizando-se um gral com pistilo (Figura 1). Trezentos miligramas de rifampicina foram diluídos em 7,5 mL de tampão PBS pH 7.3, a solução a 40 mg/mL foi incubada a 37°C durante 30 minutos sob agitação vigorosa. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 1370 g por 5 minutos e 7,5 mL do sobrenadante foram incubados com 0,5 mL de hemácias do grupo sanguíneo “O”, fenótipo rr, à temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação, as hemácias foram lavadas 3 vezes com soro fisiológico 0,9%. Após a lavagem, as hemácias foram ressuspendidas em diluente de baixa força iônica na concentração de 0,8 a 1%. Cinquenta microlitros das hemácias sensibilizadas com a rifampicina foram pipetadas em cada microtubo do gel Liss Coombs (Diamed ®) e 25 µL do plasma dos 162 doadores de sangue selecionados foram adicionados às hemácias. O cartão Liss Coombs (Diamed ®) foi incubado a 37°C por 15 minutos e centrifugado a 1370 g por 10 minutos.

Figura 1: Trituração do comprimido de rifampicina utilizando gral e pistilo.

3.2.3. Detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução em doadores de sangue

O conteúdo da cápsula de cefalexina foi dissolvido em solução de PBS pH 7.3 na concentração de 1 mg/mL. Uma hemácia do grupo sanguíneo “O”, fenótipo rr, foi diluída em meio de baixa força iônica na concentração de 0,8 a 1%. Cinquenta µL das hemácias foram pipetados em cada microtubo do gel Liss Coombs, em que foram

adicionados 25 µL do fármaco em suspensão 1mg/mL e 25 µL do plasma dos 162 doadores de sangue selecionados. Esses cartões foram incubados a 37°C por 15 minutos e centrifugados a 1370 g por 10 minutos.

O comprimido de rifampicina foi triturado e dissolvido em solução de PBS pH 7.3 na concentração de 1 mg/mL. Preparamos hemácias do grupo sanguíneo “O”, fenótipo rr, em meio de baixa força iônica na concentração de 0,8 a 1%. Cinquenta µL das hemácias foram pipetados em cada microtubo do gel Liss Coombs, em que foram adicionados 25 µL do fármaco em suspensão 1 mg/mL e 25 µL do plasma dos 162 doadores de sangue selecionados. Os cartões foram incubados a 37°C por 15 minutos e centrifugados a 1370 g por 10 minutos.

Formulações de diclofenaco de sódio em cápsula e em comprimido foram utilizadas. As cápsulas foram abertas para utilização do pó e os comprimidos foram triturados em gral com ajuda de pistilo. Cem mililitros de tampão PBS pH 7.3 foram adicionados em 100 mg de diclofenaco de sódio, a solução foi incubada a 37°C por 30 minutos sob agitação vigorosa e centrifugada a 1370 g por 5 minutos e o sobrenadante na concentração de 1 mg/mL foi reservado para utilização no teste. Hemácias do grupo sanguíneo “O”, fenótipo rr, foram diluídas em meio de baixa força iônica na concentração de 0,8 a 1%. Cinquenta microlitros das hemácias foram pipetados em cada microtubo do gel Liss Coombs (Diamed ®), em que foram adicionados 25 µL do sobrenadante correspondente ao fármaco em suspensão 1 mg/mL e 25 µL do plasma de 50 doadores de sangue. Os cartões foram incubados a 37°C por 15 minutos e centrifugados a 1370 g por 10 minutos.

3.2.4. Testes com amostras de pacientes com suspeita de anemia hemolítica induzida por fármacos

Os oito pacientes incluídos no estudo foram submetidos aos testes imunohematológicos de rotina do Laboratório de Imunohematologia Eritrocitária Especializada do Hemocentro de Campinas. Os testes de rotina incluem a tipagem sanguínea ABO e Rh(D), o TAD poliespecífico e o PAI; os casos com TAD poliespecíficos positivos foram submetidos ao TAD monoespecífico e eluato. Adicionalmente, as amostras foram submetidas aos testes com os fármacos que foram prescritos aos pacientes no período de duas semanas prévias ou até o momento em que a hemólise aguda foi constatada.

As amostras dos pacientes foram submetidas aos testes para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco ligado covalentemente à membrana da hemácia e aos testes para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução, de acordo com as técnicas descritas para a pesquisa de anticorpos contra fármacos realizadas para os doadores de sangue. Adicionalmente, as amostras dos pacientes foram submetidas a testes para pesquisa de anticorpos contra fármacos em tubo.

3.2.5 Técnica em tubo para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução ou se ligam covalentemente a membrana das hemácias em amostras de pacientes

Para detecções de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução, os fármacos hidralazina, cloroquina, cloridrato de cefepima, tiomazol, fludarabina, furosemida, fluconazol, ceftriaxona, penicilina, valsartana e ceftazidima foram diluídos em tampão PBS pH 7.3 até a concentração final de 1mg/mL, duas gotas do soro/plasma e/ou eluato do paciente, duas gotas da solução do fármaco (1 mg/mL) e uma gota das hemácias (“O”, rr, submetida a 3 lavagens com salina) e diluídas na concentração de 3% a 5% foram adicionadas ao tubo.

Para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente à membrana das hemácias em pacientes, os fármacos hidralazina, cloroquina, cloridrato de cefepima, tiomazol, fludarabina, furosemida, fluconazol, ceftriaxona, penicilina, valsartana e ceftazidima foram diluídos em tampão PBS pH 7.3 até a concentração final de 40 mg/mL. Essa solução foi incubada a 37°C por 30 minutos sob agitação vigorosa, após a incubação, a solução foi centrifugada a 1370 g por 5 minutos, 7,5 mL do sobrenadante foram incubados com 0,5 mL de hemácias do grupo sanguíneo “O”, fenótipo rr, à temperatura ambiente por 1 hora. Após a sensibilização das hemácias com o fármaco, as hemácias foram lavadas 3 vezes com salina e diluídas de 3% a 5% em soro fisiológico 0,9%. Duas gotas do soro do paciente e/ou eluato e uma gota das hemácias tratadas com o fármaco foram adicionadas ao tubo. Duas gotas do soro do paciente e/ou eluato e uma gota das hemácias não tratada com o fármaco foram adicionadas ao tubo de controle negativo.

A seguir, para ambas as situações, os mesmos passos foram seguidos. Um controle negativo com um soro que apresentava pesquisa de anticorpos irregulares negativo foi utilizado. Idealmente, o teste requisita a utilização de um controle positivo

com um soro que contenha anticorpo fármaco-dependente conhecido. Entretanto, conforme mencionado na introdução, não dispomos deste controle, e esta limitação é uma das justificativas para a realização desse trabalho.

Para detecção de anticorpos fármaco-dependentes, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 15 minutos para detecção de anticorpos fármaco-dependentes da classe IgM, centrifugados por 15 segundos a 1370 g e submetidos à análise macroscópica da aglutinação. Subsequentemente, os tubos foram incubados à 37°C por uma hora, centrifugados por 15 segundos a 1370 g e submetidos à análise macroscópica de aglutinação. O material foi submetido a 3 lavagens com salina, o sobrenadante da última lavagem foi decantado completamente e duas gotas do reagente antiglobulina humana poliespecífica (AGH) foram adicionadas. Os tubos foram homogeneizados, centrifugados por 15 segundos a 1370 g e submetidos à análise macroscópica da aglutinação. Aos tubos com resultados negativos, uma gota do reagente de hemácias sensibilizadas com IgG foi adicionada, o tubo foi homogeneizado e centrifugado por 15 segundos a 1370 g e submetido à análise macroscópica de aglutinação. Os controles negativos foram incubados juntamente com o tubo teste.

Os medicamentos e as formulações utilizadas nos testes para detecção de anticorpos fármaco-dependentes estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Formulações dos medicamentos utilizados nos testes.

Fármacos testados	Formulações
Cefalexina	Cápsula (Furp)
Rifampicina	Comprimido (Lqflex)
Diclofenaco de sódio	Comprimido (Voltaren®) e cápsula (Artren®)
Hidralazina	Drágea (Apresolina®)
Cloroquina	Comprimido (Cristália)
Cloridrato de cefepima	Pó injetável (ABL)
Tiomazol	Comprimido (Biolab)
Fludarabina	Pó injetável (Fludalibbs®)
Furosemida	Comprimido (Lasix®)
Fluconazol	Cápsula (Prati-Donaduzzi)
Ceftriaxona	Pó injetável (Triaxton®)
Penicilina	Pó injetável (Penkaron®)
Ceftazidima	Pó injetável (Aurobindo)
Valsartana	Comprimido (Diovan®)

RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Dados demográficos dos doadores de sangue

Foram incluídos neste estudo 162 doadores de sangue da região de Campinas, 94 masculinos, 68 femininos, mediana de idade=37, mínimo=18 – máximo=66.

Cento e quarenta e oito doadores de sangue responderam ao questionário clínico (Tabela 2). Cinquenta e seis informaram que já haviam apresentado infecções de urina tratadas com um dos antibióticos: ciprofloxacina, cloridrato de fenazopiridina, cefalexina, norfloxacino, fosfomicina ou macrodantina; 58 relataram que já tiveram infecções do trato respiratório tratadas com um dos antibióticos: amoxicilina, azitromicina, benzilpenicilina e penicilina. Esses foram os antibióticos relatados pelos doadores de sangue que recordavam o medicamento utilizado nas infecções. O uso de anti-inflamatórios foi relatado por 115 doadores. Dentre todos os medicamentos citados pelos doadores, o diclofenaco de sódio foi o mais mencionado, seguido pelo cetoprofeno nimesulida, amoxicilina, ciprofloxacino, cloridrato de fenazopiridina, ibuprofeno, azitromicina, cefalexina, norfloxacino, cloridrato de fexofenadina, benzilpenicilina, penicilina, fosfomicina, macrodantina, loratadina e refecoxib (Figura 2).

Figura 2: Medicamentos citados no questionário clínico aplicado aos doadores de sangue. Os nomes dos medicamentos estão relacionados no eixo X e o número de doadores que citaram os medicamentos está relacionado no eixo Y e ilustrado em cada barra. As barras indicam a quantidade de vezes que os medicamentos foram citados pelos 148 doadores de sangue que responderam o questionário clínico.

Sessenta e três doadores informaram ingerir peixe, 1 vez por semana (n=31), duas vezes por semana (n=25), três vezes por semana (n=4) e seis vezes por semana (n=6). Os outros 85 doadores relataram não comer peixe com frequência.

Em relação à ingestão de frango, 132 doadores relataram comer frango com frequência; uma vez por semana (n=22), duas vezes por semana (n=53), três vezes por semana (n=35), quatro vezes por semana (n=6), cinco vezes por semana (n=5), seis vezes por semana (n=3) sete vezes por semana (n=7). Os outros 16 doadores informaram não comer frango com frequência.

Foi incluído no estudo um doador de plaquetas colhidas por aférese, masculino, 62 anos, que fazia uso regular de valsartana para tratamento de hipertensão arterial sistêmica, e que apresentava TAD positivo nos testes de triagem de doador de sangue.

4.2. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra cefalexina e rifampicina em doadores de sangue

Investigamos a presença de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco ligado covalentemente à membrana da hemácia e a presença de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução.

Os testes imunohematológicos para detecção de anticorpos contra a cefalexina nos 162 doadores de sangue apresentaram resultados negativos para ambas as técnicas. Em uma das técnicas, a hemácia era sensibilizada com o fármaco, de forma que a fármaco se ligava covalentemente a membrana do eritrócito (concentração do fármaco 40mg/ml). Alternativamente, o fármaco era adicionado na reação na forma de solução 1mg/mL (Figura 3).

Figura 3: Testes realizados com plasmas de doadores de sangue no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-cefalexina. No cartão à esquerda, as hemácias foram sensibilizadas previamente com a cefalexina na concentração de 40 mg/ml. Em cada microtubo foram adicionados, 50 μ L das hemácias sensibilizadas, ressuspensas na concentração de 0,8 a 1% e 25 μ L do plasma do doador de sangue. No cartão à direita, o fármaco foi adicionado em solução 1 mg/ml. Em cada microtubo foram adicionados 50 μ L das hemácias “O” na concentração de 0,8 a 1%, 25 μ L da solução do fármaco a 1mg/mL e 25 μ L do plasma do doador de sangue. Nestes cartões estão demonstrados testes de seis doadores de sangue numerados de 74 a 79. A presença da hemácia no fundo de cada microtubo indica resultado negativo, sem presença de anticorpo contra cefalexina.

Os testes imunohematológicos para detecção de anticorpos contra a rifampicina nos 162 doadores de sangue apresentaram resultados negativos para a técnica em que as hemácias eram sensibilizadas com o fármaco, e para a técnica em que o fármaco era adicionado na reação na forma de solução 1mg/mL (Figura 4).

Figura 4: Testes realizados com plasmas de doadores de sangue no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-rifampicina, quando o fármaco foi adicionado à solução. Em cada microtubo do cartão foi adicionado 50 μ L da hemácia “O” na concentração de 0,8 a 1%, 25 μ L da solução do fármaco a 1mg/mL e 25 μ L do plasma do doador de sangue. Demonstramos nesta figura oito cartões com seis testes em cada cartão, numerados com os números dos doadores de sangue de 1 a 24 na primeira fileira e de 73 a 96 na segunda fileira. A presença da hemácia no fundo de cada microtubo indica resultado negativo, sem presença de anticorpo contra rifampicina.

4.3. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra o diclofenaco de sódio em doadores de sangue

Testes para detecção de anticorpo anti-diclofenaco de sódio em 50 doadores de sangue foram realizados utilizando-se diferentes formulações do fármaco, cápsulas e comprimidos. Entretanto, todas as amostras apresentaram hemólise quando a solução com o fármaco era adicionada aos testes; os resultados foram inconclusivos (Figura 5).

Figura 5: Testes realizados com plasmas de doadores de sangue no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-diclofenaco de sódio, quando o fármaco foi adicionado à solução. Em cada microtubo do cartão foi adicionado 50 µL da hemácia “O” na concentração de 0,8 a 1%, 25 µL da solução do fármaco a 1mg/mL e 25 µL do plasma do doador de sangue. Demonstramos nessa figura seis testes, numerados com os números dos doadores de sangue de 13 a 18. O plasma com colocação avermelhada indica a presença de hemólise, invalidando os testes.

4.4. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra valsartana em doador de plaquetas colhidas por aférese

Um doador de plaquetas colhidas por aférese que apresentava TAD (1+) com soro monoespecífico anti-C3d, desde 2011, relatou uso crônico de valsartana durante a entrevista clínica pré-doação. Amostra do doador de plaquetas colhidas por aférese foi submetida aos testes imunohematológicos para detecção de anticorpos contra a valsartana. O teste com o eluato do doador de plaquetas colhidas por aférese foi positivo e o teste com o soro apresentou resultado negativo na técnica em que as hemácias foram sensibilizadas com a valsartana 40mg/mL (Figura 6). Os testes em que a valsartana foi adicionada à reação na forma de solução 1mg/mL foram negativos para a detecção de anticorpo anti-valsartana com o eluato e com o soro do doador de plaquetas. O controle negativo foi realizado com o soro de um doador de sangue com pesquisa de anticorpos irregulares negativo.

Figura 6: Testes realizados com o eluato e o soro do doador de plaquetas colhidas por aférese e o controle negativo no cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) para detecção da presença do anticorpo anti-valsartana, quando a hemácia foi sensibilizada com o fármaco na concentração de 40mg/mL (o fármaco se liga covalentemente com a membrana da hemácia). Em todos microtubos do cartão foram adicionados 50 µL da hemácia sensibilizada com valsartana na concentração de 0,8 a 1%. Na posição 1 foi adicionado 25 µL do eluato, na posição 2 foi adicionado 25 µL do soro do doador de plaquetas colhidas por aférese e na posição 3 foi adicionado 25 µL do soro controle negativo. A presença de um aglutinado de hemácias na posição 1 indica reação positiva (presença do anticorpo anti-valsartana). A presença de hemácias no fundo do microtubo na posição 2 e 3 indica resultado negativo, sem presença de anticorpo contra valsartana.

4.5. Investigação da presença de anticorpos dirigidos contra fármacos em pacientes com suspeita de AHIF

Amostras de 8 pacientes com suspeita de AHIF foram testadas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes.

Paciente 1, sexo feminino, 26 anos com diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico e suspeita de AHAI, em uso de hidralazina e cloroquina, apresentava TAD de (2+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-IgG, eluato negativo com as 3 células de triagem Liss e papaína (Diamed ®, Minas Gerais, Brasil) e PAI negativo. Os testes foram realizados com os dois fármacos separadamente. A hidralazina e a cloroquina foram diluídas na concentração de 1mg/mL e o soro e o eluato da paciente foram testados na presença do fármaco em solução em cartão gel Liss Coombs (Diamed ®) e em tubo. Os dois fármacos também foram testados quando ligados covalentemente à membrana das hemácias, em que os fármacos foram diluídos na concentração de 40 mg/mL.

Paciente 2, sexo masculino, 28 anos, com carcinoma gástrico avançado, em uso de cloridrato de cefepima, metoclopramida, dimenidrinato e morfina, apresentava TAD de (4+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-IgG e eluato negativo com as 3

células de triagem Liss e papaína (Diamed ®), com PAI positivo, com especificidade para anti-I sem amplitude térmica, positivo apenas nas hemácias tratadas com a enzima papaína. Os testes com o cloridrato de cefepima foram realizados através das duas técnicas, com o fármaco em solução (1 mg/mL) e com o fármaco ligado covalentemente à membrana da hemácia, ambas as técnicas foram realizadas em gel e em tubo.

Paciente 3, sexo masculino, 33 anos, com doença de Graves e diabetes mellitus, em uso de tiomazol, enalapril e insulina, apresentava TAD de (4+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-IgG e TAD de (2+) com soro monoespecífico anti-IgM, eluato positivo. Foi identificado anticorpo com especificidade para anti-E em meio Liss e papaína (Diamed ®) no soro (PAI positivo) e no eluato. Foram realizados testes com o tiomazol nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução (concentração do fármaco 1 mg/mL) em gel Liss Coombs (Diamed ®) e em tubo, e testes para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente à membrana da hemácia (concentração do fármaco 40 mg/ml), em gel e em tubo. Resultados dos níveis de hemoglobina desse paciente durante o tratamento com tiomazol e após a suspensão do fármaco estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7: Resultados dos níveis de hemoglobina do paciente 3 com suspeita diagnóstica de AHIF pelo tiomazol. D-121 indica o resultado da hemoglobina do paciente em uso contínuo do tiomazol, D0 indica a data em que o medicamento tiomazol foi suspenso, no D0 o paciente iniciou tratamento com imunossupressor, no D1 os níveis de hemoglobina começam a subir gradativamente. No D1 o TAD apresentou resultado positivo, mas os resultados sorológicos para detecção do anticorpo anti-tiomazol apresentaram resultados negativos.

Paciente 4, sexo feminino, 57 anos, com leucemia linfóide crônica, em uso de fludarabina, apresentava TAD negativo com soro poliespecífico e monoespecíficos (IgG, IgM, IgA, C3c e C3d), eluato negativo nas 3 células de triagem Liss e papaína (Diamed ®) e em painéis de hemácias com 11 células Liss e papaína (Diamed ®). O resultado da PAI foi positivo com especificidade para anti-c em painel em meio enzimático (papaína). Testes com a fludarabina foram realizados nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução (concentração do fármaco 1mg/mL) em gel Liss Coombs (Diamed ®) e em tubo, e testes para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente à membrana da hemácia (concentração do fármaco 40 mg/mL), em gel e em tubo.

Paciente 5, sexo masculino, com doença pulmonar obstrutiva crônica, em uso de omeprazol, fluconazol, imipenem, metoclopramida, albumina, hidrocortisona e furosemida, apresentava TAD de (3+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-IgG, eluato negativo com as 3 células de triagem Liss e papaína (Diamed ®) e PAI negativo. Os testes com os fármacos furosemida e fluconazol foram realizados nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução (concentração do fármaco 1 mg/mL), em gel e em tubo, e testes para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente à membrana da hemácia (concentração do fármaco 40 mg/mL), em gel e em tubo.

Paciente 6, sexo feminino, com hemorragia digestiva baixa e doença diverticular do colon, em uso de ceftriaxona, escopolamina, bromoprida e ácido fólico, apresentava TAD de (3+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-C3d, eluato negativo com as 3 células de triagem Liss e papaína (Diamed ®) e PAI negativo. Realizamos os testes com o fármaco ceftriaxona nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução (concentração do fármaco 1mg/mL) em gel Liss Coombs (Diamed ®) e em tubo, e testes para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente à membrana da hemácia (concentração do fármaco 40 mg/mL), em gel e em tubo.

Paciente 7, sexo masculino, 12 dias de vida, com sífilis congênita, em uso de penicilina procaína, apresentava TAD de (3+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-C3d e (1+) com soro anti-C3c, eluato negativo com as 3 células de triagem Liss e papaína (Diamed ®) e PAI positivo com especificidade para anti-D fracamente positivo (mãe recebeu imunoglobulina). Realizamos os testes com a penicilina nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em

solução (concentração do fármaco 1 mg/mL) em gel Liss Coombs (Diamed ®) e em tubo e testes para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente na membrana da hemácia (concentração do fármaco 40 mg/mL), em gel e em tubo.

Paciente 8, sexo feminino, 18 anos, com fibrose cística, em uso de ceftazidima, apresentava TAD de (1+) com soro poliespecífico e monoespecífico anti-IgG (Figura 8), eluato negativo nas 3 células de triagem Liss e Papaína (Diamed ®) e PAI positivo com especificidade para anti-I sem amplitude térmica. Os testes com a ceftazidima foram realizados nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução (concentração do fármaco 1 mg/mL) em gel Liss Coombs (Diamed ®) e em tubo, e testes para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente à membrana da hemácia (concentração do fármaco 40 mg/mL), em gel e em tubo. Os resultados dos testes com o soro do paciente para detecção do anticorpo anti-ceftazidima neste paciente apresentaram resultados fortemente positivos em gel e em tubo; os resultados com o eluato foram negativos (Figura 9). Os níveis de hemoglobina do paciente com AHIF pela ceftazidima antes, durante e após a suspensão do fármaco estão ilustrados na Figura 10.

Figura 8: Resultado positivo do teste direto da antiglobulina no cartão monoespecífico com soro anti-IgG do paciente 8 com AHIF por ceftazidima. Foi observada aglutinação no microtubo com soro anti-IgG e ausência de aglutinação nos microtubos com soro anti-IgA, -IgM, -C3c, -C3d e no controle negativo.

Figura 9: Resultados dos testes realizados para o paciente 8 com anemia hemolítica induzida pela ceftazidima em gel e em tubo. Os testes foram realizados em gel Liss Coombs (Diamed ®) (painel à esquerda) e em tubo (painel à direita) após adição do fármaco em solução na concentração de 1mg/mL. No microtubo 1 foi testado o eluato do paciente, no microtubo 2 o soro do paciente, no microtubo 3 um controle negativo com soro conhecido com resultado de pesquisa de anticorpos irregulares negativo e no microtubo 4 um controle com o soro do paciente sem adição do fármaco em solução. Nos microtubos 1, 3 e 4, a presença de hemácia no fundo do gel indica reação negativa (ausência de anticorpos contra ceftazidima) e no microtubo 2 a presença de aglutinado de hemácias no topo do gel indica reação positiva com forte intensidade de aglutinação (presença de anticorpo contra ceftazidima). Nos tubos 5 e 6, foi realizado o teste com a presença do fármaco em solução na concentração de 1mg/mL; no tubo 5 foi adicionado o soro do paciente e no tubo 6 o soro controle negativo. A presença de aglutinação das hemácias no tubo 5 indica reação positiva (presença de anticorpo contra ceftazidima) e a ausência de aglutinação demonstrada no tubo 6 indica reação negativa.

Figura 10: Níveis de hemoglobina do paciente 8, com anemia hemolítica induzida pela ceftazidima. D0 indica o início do tratamento com a ceftazidima, o D7 é o dia em que o tratamento com ceftazidima foi suspenso, no D10 é o dia em que o nível de hemoglobina atingiu o nível mais baixo dentre os hemogramas realizados pelo paciente no período em que ficou internado. A partir do D11 os níveis de hemoglobina começam a subir gradativamente. O teste da antiglobulina direta (TAD) positivo e a identificação do anticorpo contra ceftazidima foram realizados no D14.

Os resultados dos testes imunohematológicos de rotina e dos testes para pesquisa de anticorpos contra fármacos nos 8 pacientes com suspeita de AHIF estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados de testes imunohematológicos para pesquisa de anticorpo contra fármaco em pacientes com suspeita de anemia hemolítica induzida por fármaco

Testes imunohematológicos de rotina					Testes imunohematológicos para pesquisa de anticorpo contra fármaco							
					Hemácias sensibilizadas				Fármaco em solução			
					Testes em tubo		Testes em gel		Testes em tubo		Testes em gel	
#	TAD ^{poli}	TAD ^{mono}	Eluato	PAI	Eluato	PAI	Eluato	PAI	Eluato	PAI	Eluato	PAI
1	2+	IgG	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	4+	IgG/ C3d	Neg.	Anti-I	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	4+	IgG/IgM	Anti-E	Anti-E	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
5	3+	IgG	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	3+	C3d	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
7	3+	C3c/ C3d	Neg.	Anti-D*	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
8	1+	IgG	Neg.	Anti-I	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos

Abreviações; TAD^{poli}: Teste da antiglobulina direto com soro poliespecífico; TAD^{mono}: Teste da antiglobulina direto com soros monoespecíficos (Anti-IgG, -IgM, -IgA, -C3c e C3d; PAI: Pesquisa de anticorpos irregulares;

Número dos pacientes estudados

* Anti-D fracamente positivo (mãe recebeu imunoglobulina).

Os fármacos testados para os pacientes foram: paciente #1 – Hidralazina e cloroquina; paciente #2 – Cloridrato de cefepima; paciente #3 – Tiomazol; paciente #4 – Fludarabina; paciente #5 – Furosemda e Fluconazol; paciente #6 – Ceftriaxona; paciente #7 – Penicilina; paciente #8 – Ceftazidima.

5. Discussão

O diagnóstico de AHIF permanece bastante confuso em todos os aspectos, incluindo sua patogênese e os achados clínicos e sorológicos. Essas variabilidades não são apenas observadas para diferentes fármacos, mas também para o mesmo fármaco. Qualquer fármaco pode induzir uma anemia hemolítica imune. Isso deve ser invariavelmente suspeito em todos os indivíduos afetados por um tratamento medicamentoso [41]. A AHIF é frequentemente confundida com a AHAI a quente. Fornecer diagnóstico e orientação para a equipe de médicos que participam do atendimento ao paciente é primordial, porque o fracasso em reconhecer a AHIF pode resultar em complicações do quadro clínico e até a morte do paciente. Uma vez reconhecido o quadro, as opções de tratamento diferem com base na natureza do anticorpo [36]. Foram relatadas taxas de mortalidade de 6 a 15% em pacientes com AHIF causadas por cefalosporinas e diclofenaco de sódio [10,42].

A dificuldade em detectar os anticorpos contra fármacos em testes laboratoriais “*in vitro*” é uma limitação para o diagnóstico confirmatório dos casos de AHIF. A falta de um controle positivo específico para cada fármaco é uma limitação importante. A padronização da investigação laboratorial para detecção de anticorpos induzidos por fármacos deve considerar estas limitações, e o sucesso dessa padronização depende da identificação de uma amostra com anticorpo anti-fármaco que indique a factibilidade e efetividade do teste laboratorial.

Dessa forma, duas estratégias foram utilizadas neste trabalho. Uma estratégia foi testar fármacos comumente utilizados pela população em amostras de doadores de sangue, especificamente a cefalexina, a rifampicina, e o diclofenaco de sódio. Outra estratégia consistiu em se testar amostras de pacientes com suspeita de anemia hemolítica imune induzida por fármacos, em que o fármaco específico era conhecido. Os testes laboratoriais detectaram a presença de anticorpo anti-valsartana no eluato de um doador de plaquetas colhidas por aférese com TAD positivo e a presença de anticorpo anti-ceftazidima no soro de um paciente com suspeita clínica de AHIF. A investigação de anticorpo anti-cefalexina e anti-rifampicina foi negativa em amostras de doadores de sangue. O teste laboratorial para investigação de anticorpo anti-diclofenaco de sódio não foi finalizado devido à presença de hemólise em hemácias sensibilizadas com o fármaco e após a adição do fármaco na solução de hemácias. As dificuldades

encontradas neste trabalho, em muito refletem as dificuldades encontradas por outros autores, durante a evolução do conhecimento sobre a AHIF, conforme detalhado a seguir.

As cefalosporinas são uma classe de antibióticos beta-lactâmicos agrupados em gerações com base em seus propósitos antimicrobianos. Na década de 1970 até o início dos anos 80, as AHIF eram associadas principalmente a primeira e segunda geração das cefalosporinas [43]. As cefalosporinas formam ligações covalentes com a membrana da hemácia e dessa forma os glóbulos vermelhos tratados com fármacos podem ser preparados em laboratório. As características iniciais das cefalosporinas que causavam AHIF eram o TAD positivo com soro anti-IgG e às vezes anti-C3 também podia estar associado, o soro e o eluato reagiram com hemácias tratadas com o fármaco e a hemólise “*in vivo*” era extravascular. Com isso, até meados dos anos 80, havia uma suposição geral de que os anticorpos contra cefalosporinas reagissem pelo mecanismo de adsorção de fármacos e a melhor maneira de detectá-los era tratando as hemácias com o fármaco. Após está constatação alguns conceitos foram revistos [17].

Em 1987, Salama e colaboradores [44] descreveram um paciente com hemólise intravascular mediada pelo complexo imune causada por um anticorpo contra cefotaxima (uma cefalosporina de terceira geração). O TAD foi positivo somente com soro anti-C3, o soro não foi reativo com hemácias tratadas com o fármaco, mas reagiu pelo método do complexo imune (soro mais a hemácia na presença de uma solução do fármaco) [44]. Um ano depois, o laboratório de Arndt P.A. relatou um caso fatal de AHIF pelo uso da ceftriaxona (uma cefalosporina de terceira geração). As características clínicas e sorológicas foram associadas ao mecanismo de complexo imune. O TAD foi positivo apenas com soro anti-C3 e o soro reagiu apenas pelo método do complexo imune (soro mais a hemácia na presença de uma solução do fármaco) [45].

Em 1990, havia 5 publicações de AHIF atribuível ao cefotetano (uma cefalosporina de segunda geração) [43]. Esses anticorpos reagiram por mais de um método, todos reagiram com glóbulos vermelhos tratados com o cefotetano, três reagiram na presença do fármaco em solução e dois reagiram com hemácias não tratadas (sem adição do cefotetano). Acreditava-se que a reatividade dos soros testados sem a adição do fármaco devia-se a presença de autoanticorpos independentes de fármacos que são encontrados em combinação com anticorpos dependentes de fármacos. Com isso, no final da década de 1980, ficou claro que a melhor maneira de detectar anticorpos contra cefalosporinas nem sempre era tratando a hemácia com os

fármacos. Desde então houve numerosos relatos de AHIF causados por diferentes cefalosporinas. Os anticorpos contra cefalosporinas de primeira e de segunda geração foram detectados principalmente com hemácias tratadas com os fármacos, com exceção dos anticorpos contra cefotetano, que foram detectados igualmente pelos dois métodos (hemácias tratadas com o fármaco e na presença de uma solução do fármaco). Anticorpos contra cefalosporinas de terceira geração foram detectados principalmente por testes na presença da solução do fármaco. Reatividade na ausência do fármaco “*in vitro*” foi detectada principalmente em pacientes com AHIF causada por cefotetano, mas também foi encontrada com outras cefalosporinas [14,17].

No início de 1980, era bem aceito que os anticorpos contra cefalosporina como os anticorpos contra penicilina, deveriam causar hemólise extravascular “*in vivo*” e que os anticorpos contra cefalosporina seriam detectados usando glóbulos vermelhos tratados com o fármaco. Atualmente sabemos que os anticorpos contra cefalosporina podem estar associados com hemólise intravascular grave e fatal “*in vivo*” e que esses anticorpos podem reagir com glóbulos vermelhos tratados com fármaco, ou na presença de uma solução de fármaco, ou por ambos os métodos [17].

Nos casos relatados de anticorpos contra cefalexina, a hemólise não imune deve ser incluída no diagnóstico diferencial, além de elevações na contagem de reticulócitos, lactato desidrogenase, bilirrubina indireta e hemoglobina livre. Nos casos disponíveis na literatura, alguns casos com hemólise induzida pela cefalexina apresentaram resultados de TAD positivo ou negativo. Esta inconsistência de resultados, bem como a incerteza dos mecanismos causadores da hemólise faz com que o diagnóstico definitivo de AHIF pela cefalexina seja muito difícil [46].

Numerosos casos de AHIF causadas pelo antibiótico beta-lactâmico penicilina foram relatados desde a década de 1960, estes casos apresentaram TAD positivo com soro anti-IgG com ou sem presença de anti-C3, o soro e o eluato dos pacientes que continham anticorpo contra penicilina apresentavam título sérico ≥ 1000 quando as hemácias eram tratadas com penicilina e a hemólise “*in vivo*” era extravascular. Essas características também foram aplicadas a outros fármacos da família da penicilina (por exemplo, ampicilina, amoxicilina, e ticarcilina). Assim, assumiu-se que a melhor maneira de detectar anticorpos contra penicilinas era testando os glóbulos vermelhos tratados com fármacos. Mas, na década de 1990, os conceitos começaram a mudar [17].

Em 1994, Johnson e colaboradores relataram o primeiro caso sorologicamente bem documentado de AHIF causado pela piperacilina, uma penicilina semi-sintética. O

TAD foi positivo com soro anti-IgG e anti-C3, o soro reagiu com glóbulos vermelhos tratados com a piperacilina e na presença de piperacilina solúvel, o eluato não foi reativo por ambos os métodos. Em 2002, o laboratório de Arndt P.A. relatou dois pacientes com AHIF causada pela piperacilina em que o soro e o eluato dos pacientes reagiram apenas na presença da piperacilina solúvel [47].

Em 2008, o laboratório de Arndt P.A. relatou que a melhor maneira de detectar anticorpos contra a piperacilina era pelo método do complexo imune em que o fármaco é adicionado em solução. Isso diferiu da maneira de se detectar anticorpos contra as outras penicilinas, que é realizando os testes com as hemácias tratadas com o fármaco. O método do complexo imune foi recomendado porque 91% dos doadores de sangue e 49% dos pacientes aleatórios testados apresentaram reação positiva com hemácias tratadas com piperacilina [27].

A ceftazidima é um antibiótico comumente utilizado e raramente causa AHIF, poucos casos foram relatados na literatura [43,48]. Anticorpos fármaco-dependentes de ceftazidima têm achados clínicos e sorológicos indicativos de reagirem pelos métodos de formação de imunocomplexos com hemácias sensibilizadas com o fármaco e pelo método de adsorção do fármaco. O anticorpo contra ceftazidima está implicado em causar hemólise intravascular [48,49,50]. Apesar da ceftazidima não ser amplamente relatada como responsável pela AHIF, a *Food and drug administration* (FDA) recebeu 27 relatórios de anemia hemolítica possivelmente relacionada à ceftazidima entre 1998 e 2011 (eHealthMe study from FDA reports. Available at: <http://www.ehealthme.com/print/ds>) [50,51].

Dentre os antibióticos beta-lactâmicos, cinco drogas foram testadas no presente trabalho; anticorpo anti-cefalexina foi testado em amostra de doadores de sangue; anti-ceftriaxona, anti-penicilina, anti-cefepima e anti-ceftazidima foram testadas em amostras de pacientes com suspeita de AHIF.

Por ser um medicamento frequentemente utilizado para tratamento de infecções da comunidade, escolhemos a cefalexina para padronização da detecção do anticorpo anti-fármaco em amostras de doadores de sangue. Curiosamente, apenas 3 dos 148 doadores de sangue que responderam ao questionário clínico, indicaram uso de cefalexina prévia. Os testes laboratoriais foram negativos em todas as 162 amostras testadas. Destacamos que os testes foram realizados com a hemácia sensibilizada com o fármaco e com o fármaco em solução. Especulações que justifiquem a negatividade dos testes realizados podem ser a ausência de anticorpo anti-fármaco nas amostras testadas

ou falta de sensibilidade do teste realizado. Conforme já mencionado, a ausência de um controle positivo não permite a conclusão sobre o fato.

A pesquisa de anticorpos anti-cefepima, anti-ceftriaxone e anti-penicilina foi negativa nos pacientes com suspeita clínica de AHIF testados. Os pacientes #2, #6 e #7 faziam uso de cefepima, ceftriaxone e penicilina, respectivamente, na ocasião em que apresentaram hemólise. Ambos os pacientes apresentavam TAD positivo e eluato negativo. Para todos os casos, realizamos os testes com o fármaco nas técnicas para detecção de anticorpos fármaco-dependentes que reagem na presença do fármaco em solução e técnicas para detecção de anticorpos que se ligam covalentemente na membrana da hemácia. Entretanto, todos os testes foram negativos. Conforme discutido anteriormente, não é possível afirmar se a negatividade dos testes laboratoriais deveu-se a falha na técnica ou ausência de anticorpo anti-fármaco nas amostras testadas.

Fato importante foi a positividade nos testes de investigação de anticorpo anti-fármaco em um paciente em uso de ceftazidima. O paciente #8 recebeu ceftazidima para tratamento de infecção de vias aéreas, o fármaco foi suspenso após 7 dias de tratamento devido queda de hemoglobina de 13,1 g/dL para 6,1 g/dL com evidência laboratorial de hemólise. Os testes imunohematológicos indicaram TAD positivo e eluato negativo. A investigação de anticorpos anti-ceftazidima foi positiva, quando o soro do paciente foi testado pela técnica que detecta anticorpos contra fármacos que se ligam covalentemente à membrana da hemácia, no qual as hemácias são previamente sensibilizadas com o fármaco, e quando o soro do paciente foi testado pela técnica que se adiciona o fármaco na solução de hemácias. Os testes com o eluato do paciente, nas mesmas condições, foram negativos. Estes resultados destacam a factibilidade do método realizado e indica o sucesso na padronização da técnica para este caso.

A rifampicina é um antibiótico utilizado como primeira linha em combinação com outros fármacos no tratamento da tuberculose e outras patologias infecciosas. É bem tolerado, embora a presença de distúrbios gastrointestinais seja comum no início do tratamento; menos de 4% dos pacientes apresentam reações adversas exigindo a retirada do medicamento, sendo a toxicidade hepática a mais frequente [52]. Os medicamentos antituberculosos raramente causam efeitos colaterais hematológicos graves. Entretanto, a isoniazida e a rifampicina, especialmente quando administradas intermitentemente, podem, mesmo que raramente, estar relacionadas com anemia hemolítica imune [53,54,55]. Hemólise aguda raramente foi relatada com o uso da rifampicina, e ocorreu apenas em pacientes com terapia intermitente ou descontínua. Na maioria dos relatórios,

os sintomas sistêmicos se desenvolveram 2 a 3 horas após uma única dose descontínua e a recuperação foi completa quando a rifampicina foi retirada [56].

O mecanismo de reação imune induzido pela rifampicina é pela formação de imunocomplexos. A hemólise pode ser intravascular ou extravascular dependendo da ligação do fármaco à membrana da hemácia. O gatilho tem sido associado com altas doses em regimes intermitentes, mas há grande variabilidade em relação ao tempo de uso do medicamento [57,58].

Há relatos de casos de pacientes que desenvolveram simultaneamente anticorpos fármaco-dependentes e autoanticorpos quentes em resposta ao tratamento com rifampicina [59]. Pereira e colaboradores [60] relataram o caso de uma paciente com cirrose biliar primária que desenvolveu anemia hemolítica imune e insuficiência renal pelo uso da rifampicina utilizada para tratar prurido refratário. Estudos sorológicos revelaram a presença de anticorpos dependentes de rifampicina da classe IgM que, quando testados contra um vasto painel de hemácias, possuíam especificidade para anti-I [60]. Duran-Suarez e colaboradores [61] relataram casos de anemia hemolítica induzidas por fármacos pela formação de complexos imunes, nos quais os autores acreditavam que a presença do antígeno I na superfície das hemácias era necessária para a adsorção do complexo imune, o antígeno I foi indicado como um receptor para os complexos imunes circulantes [61].

Devido ao potencial uso da rifampicina para tratamento preventivo e curativo da tuberculose, e os riscos de AHIF relacionadas a este fármaco, a pesquisa de anticorpos anti-rifampicina foi testada em amostras de doadores de sangue no presente trabalho, entretanto todos os testes foram negativos. A negatividade dos testes pode ser justificada pela ausência do anticorpo nos soros dos doadores testados, o que é corroborado pelo fato de nenhum doador ter mencionado o uso deste fármaco no questionário clínico, ou pela ineficiência do teste, fato que não pode ser concluído devido à ausência de um controle positivo.

O diclofenaco de sódio é um anti-inflamatório não esteroide amplamente utilizado, está disponível para uso oral, intravenoso, intramuscular, tópico e como supositórios. Há evidências que o fármaco e seus metabólitos podem levar a produção de anticorpos fármaco-dependentes e/ou autoanticorpos [62,63]. O resultado da anemia hemolítica imune é geralmente aguda e frequentemente está associada com insuficiência renal [42]. Informações limitadas estão disponíveis em relação ao alvo proteico na membrana dos eritrócitos. Como os metabólitos do diclofenaco de sódio podem causar

AHIF, a urina de voluntários que tomaram o diclofenaco de sódio é usada como fonte de metabólitos [62,63].

Em 2015, Mayer e colaboradores [41], da Universidade de Berlim, relataram que o diclofenaco de sódio foi o fármaco responsável pela maioria dos casos de AHIF em seus pacientes nos últimos 20 anos, provavelmente por ser um dos medicamentos mais prescritos na Alemanha. O número de casos de AHIF por diclofenaco de sódio foi seguido pela piperacilina, ceftriaxona e oxaliplatina, sendo que esses quatro medicamentos representaram mais de 80% de todos os casos de AHIF [41].

Conforme sugerido por Ahresn e colaboradores [42], existe uma falta geral de consciência que o diclofenaco de sódio pode causar AHIF, fato que pode ser atribuído ao acesso limitado às técnicas sorológicas de qualidade. Alguns pacientes foram primeiramente diagnosticados com AHAI devido à autoanticorpos quentes e na verdade eles tinham uma anemia hemolítica imune dependente de fármacos devido ao diclofenaco de sódio [42]. Há relatos de casos fatais de AHIF causadas pelo diclofenaco de sódio, enfatizando a necessidade de aumentar a consciência das complicações decorrentes do uso desse medicamento [64,65].

Os pacientes que recebem diclofenaco de sódio devem ser avisados que a hemólise pode ocorrer como um efeito colateral do fármaco, eles devem ser informados sobre os sintomas e achados clínicos que podem desenvolver durante ou após a administração do diclofenaco de sódio. Além disso, todos os médicos envolvidos com estes pacientes devem estar conscientes da possibilidade de AHIF induzida pelo diclofenaco de sódio. Os médicos devem saber que o diclofenaco de sódio pode levar à produção de autoanticorpos e anticorpos fármaco-dependentes. A hemólise pode se desenvolver gradualmente ou abruptamente. Os sintomas iniciais são geralmente característicos de anemia hemolítica imune (fadiga, icterícia, palidez, dores nas costas e/ou abdominais), enquanto os sintomas tardios podem ser caracterizados por complicações normalmente relacionados à hemólise descompensada, ou seja, choque e/ou insuficiência renal [42]. Não é possível prever quais pacientes serão afetados, a reação pode se desenvolver durante o uso contínuo ou intermitente e pode ocorrer imediatamente ou após a re-exposição ao fármaco [66].

Salama e colaboradores [65] estudaram dois pacientes em que o diclofenaco de sódio induziu simultaneamente anticorpos contra plaquetas e contra os glóbulos vermelhos. Os soros dos pacientes foram testados na presença e ausência do diclofenaco de sódio e seus metabólitos. Um dos pacientes desenvolveu hemólise grave e púrpura

trombocitopênica significativa, o outro paciente desenvolveu trombocitopenia significativa, mas não apresentou hemólise. Ambos pacientes apresentaram TAD positivo e anticorpos contra fármaco e/ou metabólitos dependentes contra hemácias e plaquetas [65].

Devido ao frequente uso de diclofenaco de sódio pela população, um dos objetivos deste trabalho foi padronizar a pesquisa de anticorpo anti-diclofenaco de sódio em amostras de doadores de sangue. Este foi o fármaco mais citado pelos doadores de sangue no questionário clínico; 48 dos 148 doadores afirmaram já terem feito uso de diclofenaco de sódio. Entretanto, a hemácia controle sensibilizada com o fármaco, e a hemácia que foi exposta ao fármaco em solução apresentaram hemólise, impossibilitando a execução do teste. Apesar de diferentes formulações da droga terem sido testadas, não foi possível testar o fármaco purificado. As formulações comerciais utilizadas contêm ingredientes inertes que podem causar hemólise e dificultar os testes “*in vitro*”. Este fato reflete a dificuldade na investigação laboratorial de anticorpos anti-fármacos e permanece um desafio a ser superado em estudos futuros.

Embora muitos quimioterápicos tenham sido relacionados com AHIF, o diagnóstico é difícil, pois muitas vezes, vários fármacos estão envolvidos e nenhum anticorpo fármaco-dependente é detectado. Os anticorpos são geralmente fármaco-independentes e o paciente apresenta quando clínico e laboratorial de anemia hemolítica imune verdadeira. Os melhores exemplos de tais fármacos são os análogos de purina (por exemplo, fludarabina e cladribina) utilizados para tratar doentes com leucemia linfocítica crônica (LLC). A anemia hemolítica após o uso da fludarabina foi descrita por diversos autores e ocorreu em média em 14% dos pacientes [67,68,69,70].

Os pacientes com LLC podem apresentar AHAI secundárias a neoplasia e podem também apresentar AHIF, sendo que o diagnóstico diferencial é um desafio [22,71,72]. Um estudo descreveu 300 pacientes com LLC tratados com fludarabina, ciclofosfamida e rituximab, 6,5% dos pacientes desenvolveram anemia hemolítica imune e os autores consideraram se tratar de AHAI [73].

Segundo Raymond Weiss e colaboradores [74], 17% dos pacientes estudados por eles desenvolveram anemia hemolítica após o primeiro, segundo ou terceiro ciclo do uso da fludarabina, 29% dos pacientes morreram de complicações médicas associadas à anemia hemolítica. Sete dos oito pacientes que foram retratados com a fludarabina após um episódio de anemia hemolítica desenvolveram anemia hemolítica recorrente e três desses pacientes morreram. A anemia hemolítica associada à terapia com fludarabina

parece ser incomum, mas pode ser grave e fatal, especialmente se um paciente for retratado com esse medicamento após um episódio anterior de anemia hemolítica [74].

No presente trabalho, um paciente que apresentou anemia hemolítica após uso de fludarabina para tratamento de LLC foi investigado para presença de anticorpo anti-fludarabina. Dentre todos os pacientes investigados neste trabalho, este foi o único caso que apresentou TAD negativo. Testes laboratoriais não evidenciaram presença de anticorpo anti-fludarabina. Não é possível concluir se a negatividade dos testes deve-se à inefetividade do teste ou ausência de anticorpo anti-fármaco, o que favoreceria o diagnóstico de AHAI. Este caso ilustra a dificuldade no diagnóstico diferencial entre AHIF e a AHAI.

Anti-hipertensivos, de diferentes classes, já foram associados à AHIF [22]. Em 1980 a causa mais comum de AHIF era o fármaco anti-hipertensivo alfa-metildopa. Com o passar dos anos, a AHIF causada pela alfa-metildopa diminuiu, provavelmente devido à diminuição do uso deste fármaco. O anticorpo induzido pela alfa-metildopa é fármaco-independente, é indistinguível da anemia hemolítica por autoanticorpos quentes, com isso, o laboratório de referência não pode afirmar que a AHIF é devido à alfa-metildopa [75]. Além da alfa-metildopa, outros anti-hipertensivos como hidralazina, captopril e diuréticos como furosemida, butiazida, triantereno e hidroclorotiazida têm sido relatados em casos de AHIF [22]. A hidralazina causou anemia hemolítica com TAD positivo em um paciente que recebeu pequenas doses deste medicamento usado para o controle de uma hipertensão leve [76].

Salama e colaboradores [34] descreveram dois pacientes que tiveram uma grave hemólise intravascular devido anticorpos fármaco-dependentes devido a metabólitos de butiazida, um diurético eficaz, que segundo o fabricante é amplamente utilizado na maioria dos países. A detecção desses anticorpos "*in vitro*" só foi possível com o uso de soro fresco de voluntários após a ingestão do fármaco (antígenos "*ex-vivos*"). Quando os testes utilizando o soro e o eluato dos pacientes eram feitos com hemácias tratadas com o fármaco ou quando o fármaco era adicionado à solução, os resultados eram negativos ou inconclusivos. Mas quando os antígenos "*ex-vivos*" eram adicionados, reações fortemente positivas eram observadas. O anticorpo relacionado com a butiazida foi da classe IgG [34].

Hidroclorotiazida [77] é um diurético frequentemente prescrito para o tratamento de hipertensão arterial, embora seja raro ele pode causar anemia hemolítica. Shirey e colaboradores descreveram um caso, com achados clínicos e laboratoriais, de hemólise

intravascular aguda após a ingestão desse medicamento. Anticorpos contra hidroclorotiazida são das classes IgG ou IgM. Foi proposto que a hemólise associada pelo hidroclorotiazida é induzida pela formação de imunocomplexos [77].

A investigação de anticorpos contra três fármacos anti-hipertensivos e/ou diuréticos foi realizada no presente trabalho. A investigação de anticorpos anti-furosemida e anti-hidralazina foram negativas em dois pacientes com suspeita de AHIF, o que impede a conclusão sobre a factibilidade dos métodos testados e a confirmação diagnóstica de AHIF. Fato interessante foi a detecção de anticorpo anti-valsartana em amostra de um doador de plaquetas colhidas por aférese que apresentava TAD positivo nos testes de triagem de doador de sangue, sem evidência clínica de hemólise. O teste com o eluato do doador de plaquetas colhidas por aférese foi positivo e o teste com o soro apresentou resultado negativo na técnica em que a hemácia foi sensibilizada com a valsartana. Os testes em que a valsartana foi adicionada na reação na forma de solução 1 mg/mL foram negativos para a detecção de anticorpo anti-valsartana tanto para o eluato quanto para o soro do doador de plaquetas colhidas por aférese. A positividade dos testes para investigação de anticorpo anti-fármaco pode ser detectada tanto no soro quanto no eluato dos indivíduos acometidos [14]. O resultado positivo da detecção de anticorpo anti-valsartana no eluato do doador de plaquetas colhidas por aférese ressalta o sucesso na padronização do método para este caso, e confirma a presença de anticorpo anti-valsartana ligado à membrana das hemácias do doador de plaquetas colhidas por aférese. Não há relatos de casos de AHIF relacionados com o medicamento valsartana na literatura, o que reforça a importância da vigilância clínica, suspeita clínica e confirmação laboratorial de novos medicamentos relacionados a anticorpos anti-fármacos com potencial de causar AHIF.

Há relatos de pacientes que desenvolveram AHIF pelo uso de medicamentos anti-tiroidianos, com hemólise imune intravascular “*in vivo*” e “*in vitro*”. Estudos sorológicos evidenciaram TAD positivo com soro anti-IgG e anti-C3d. O anticorpo reage com hemácias revestidas com o fármaco e com o fármaco presente na solução [78]. Entretanto, não há relatos de casos de AHIF relacionados com o medicamento tiomazol na literatura. A investigação de anticorpo anti-tiomazol foi negativa em amostra de um paciente com suspeita clínica de AHIF no presente estudo, apesar dos exames clínicos apresentarem melhora após a retirada do fármaco, indicando novamente a dificuldade na padronização dos testes laboratoriais para detecção de anticorpos anti-fármacos e um obstáculo na confirmação diagnóstica.

O fluconazol é um fármaco utilizado como antimicótico, pertence à classe dos antifúngicos triazólicos, e já foi associado à AHIF. Estudos sorológicos apresentaram TAD positivo com soros anti-IgG e anti-C3d e o anticorpo reagiu com hemácias revestidas com o fármaco e com o fármaco presente na solução [79]. Entretanto, a investigação laboratorial da presença de anticorpo anti-fluconazol em amostra de um paciente com suspeita de AHIF foi negativa no presente estudo.

Na literatura, não há relatos de casos de AHIF relacionados com o medicamento cloroquina. A investigação laboratorial da presença de anticorpo anti-cloroquina em amostra de um paciente com suspeita de AHIF foi negativa no presente estudo.

Os resultados positivos encontrados através de testes laboratoriais para investigação de anticorpos anti-fármacos indicam a factibilidade do método. O método não é caro e utiliza materiais disponíveis rotineiramente em um laboratório de imunohematologia. Entretanto, a falta de um controle positivo limita a realização e a implementação do teste na rotina dos laboratórios de imunohematologia. A disponibilidade de soro com presença de anticorpo anti-ceftazidima, e de eluato com anti-valsartana podem ser úteis para investigação de anticorpos contra estes fármacos em outros indivíduos com suspeita clínica de anticorpos contra esses fármacos na presença ou ausência de hemólise.

A ampliação da investigação da presença de anticorpos anti-fármacos dirigida contra outros fármacos é necessária para a obtenção de novas amostras controles positivos para uso ampliado na rotina laboratorial de um serviço de imunohematologia de referência e para comprovar a efetividade do método. O sucesso na padronização da investigação de anticorpos anti-fármacos nos dois casos aqui descritos é importante para indicar a factibilidade do método, permitir a divulgação da metodologia e estimular a implementação dos testes na rotina dos laboratórios de imunohematologia no Brasil.

CONCLUSÕES

6. Conclusões

- A padronização de testes laboratoriais permitiu a detecção de anticorpo anti-valsartana no eluato de um doador de plaquetas colhidas por aférese com TAD positivo e a detecção de anticorpo anti-ceftazidima no soro de um paciente com suspeita clínica de AHIF.

- A investigação de anticorpos anti-cefalexina e anti-rifampicina foi negativa em amostras de doadores de sangue; não é possível concluir se a negatividade dos testes deveu-se à ausência de anticorpos anti-fármacos ou à ineficácia do método testado. O teste laboratorial para investigação de anticorpo anti-diclofenaco de sódio não foi finalizado devido à presença de hemólise em hemácias sensibilizadas com o fármaco e quando o fármaco em solução era adicionado à hemácia.

- A detecção de anticorpo anti-ceftazidima em amostra de um paciente confirmou a suspeita clínica de AHIF.

Em conclusão, a detecção de anticorpo anti-valsartana no eluato de um doador de plaquetas colhidas por aférese com TAD positivo e a detecção de anticorpo anti-ceftazidima no soro de um paciente com suspeita clínica de AHIF indicam o sucesso na padronização da investigação de anticorpos anti-fármacos nestes dois casos. Os resultados aqui apresentados demonstram a factibilidade de testes laboratoriais na investigação de anticorpos anti-fármacos em doadores de sangue e em pacientes com AHIF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Garratty G (1985) Drug-induced immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Immunohematology* 2(1):1-8.
2. Garratty G (2012) Immune hemolytic anemia caused by drugs. *Expert Opin Drug Saf* 11(4):635-642.
3. Snapper I, Marks D, Schwartz L, Hollander L (1953) Hemolytic anemia secondary to mesantoin. *Ann Intern Med* 39(3):619-623.
4. Harris JW (1956) Studies on the mechanism of a drug-induced hemolytic anemia. *J Lab Clin Med* 47(5):760-775.
5. Dausset J, Contu L (1967) Drug-induced hemolysis. *Annu Rev Med* 18(55-70).
6. Garratty G (1989) Current viewpoints on mechanisms causing drug-induced immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Immunohematology* 5(4):97-106.
7. Garratty G, Arndt PA (2007) An update on drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology* 23(3):105-119.
8. Gehrs BC, Friedberg RC (2002) Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 69(4):258-271.
9. Arndt PA, Leger RM, Garratty G (1999) Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion* 39(11-12):1239-1246.
10. Garratty G (2010) Immune hemolytic anemia associated with drug therapy. *Blood Rev* 24(4-5):143-150.
11. Johnson ST (2009) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Transfus Apher Sci* 40(3):205-207.
12. Barjas-Castro ML, Aplicações do Teste de Antiglobulina Direta, in: J.O. Bordin, D.M. Júnior Langhi, D.T. Covas (Eds.), *Hemoterapia: Fundamentos e Prática*, Editora Atheneu, São Paulo, 2007.
13. Garratty G (2009) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:73-79.
14. Leger RM, Arndt PA, Garratty G (2014) How we investigate drug-induced immune hemolytic anemia. *Immunohematology* 30(2):85-94.
15. Carstairs KC, Breckenridge A, Dollery CT, Worlledge SM (1966) Incidence of a positive direct coombs test in patients on alpha-methyldopa. *Lancet* 2(7455):133-135.
16. Worlledge SM, Carstairs KC, Dacie JV (1966) Autoimmune haemolytic anaemia associated with alpha-methyldopa therapy. *Lancet* 2(7455):135-139.

17. Arndt PA (2014) Drug-induced immune hemolytic anemia: the last 30 years of changes. *Immunohematology* 30(2):44-54.
18. Garratty G (2004) Review: drug-induced immune hemolytic anemia--the last decade. *Immunohematology* 20(3):138-146.
19. Worlledge SM (1973) Immune drug-induced hemolytic anemias. *Semin Hematol* 10(4):327-344.
20. Garratty G, Petz LD (1975) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Am J Med* 58(3):398-407.
21. Kirtland HH, 3rd, Mohler DN, Horwitz DA (1980) Methyldopa inhibition of suppressor-lymphocyte function: a proposed cause of autoimmune hemolytic anemia. *N Engl J Med* 302(15):825-832.
22. Garratty G, Arndt PA (2014) Drugs that have been shown to cause drug-induced immune hemolytic anemia or positive direct antiglobulin tests: some interesting findings since 2007. *Immunohematology* 30(2):66-79.
23. Garratty G, Arndt PA (1998) Positive direct antiglobulin tests and haemolytic anaemia following therapy with beta-lactamase inhibitor containing drugs may be associated with nonimmunologic adsorption of protein onto red blood cells. *Br J Haematol* 100(4):777-783.
24. Gralnick HR, Wright LD, Jr., McGinniss MH (1967) Coombs' positive reactions associated with sodium cephalothin therapy. *JAMA* 199(10):725-726.
25. Molthan L, Reidenberg MM, Eichman MF (1967) Positive direct Coombs tests due to cephalothin. *N Engl J Med* 277(3):123-125.
26. Arndt PA, Leger RM, Garratty G (2003) Positive direct antiglobulin tests and haemolytic anaemia following therapy with the beta-lactamase inhibitor, tazobactam, may also be associated with non-immunologic adsorption of protein onto red blood cells. *Vox Sang* 85(1):53.
27. Leger RM, Arndt PA, Garratty G (2008) Serological studies of piperacillin antibodies. *Transfusion* 48(11):2429-2434.
28. Leger RM, Garratty G (2011) Antibodies to oxaliplatin, a chemotherapeutic, are found in plasma of healthy blood donors. *Transfusion* 51(8):1740-1744.
29. Anderson AD, Nelson JM, Rossiter S, Angulo FJ (2003) Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. *Microb Drug Resist* 9(4):373-379.
30. Shea KM (2004) Nontherapeutic use of antimicrobial agents in animal agriculture: implications for pediatrics. *Pediatrics* 114(3):862-868.
31. Landsteiner K, van der Scheer J (1938) On Cross Reactions of Immune Sera to Azoproteins : II. Antigens with Azocomponents Containing Two Determinant Groups. *J Exp Med* 67(5):709-723.

32. Eisen HN, Orris L, Belman S (1952) Elicitation of delayed allergic skin reactions with haptens; the dependence of elicitation on hapten combination with protein. *J Exp Med* 95(5):473-487.
33. Eisen HN, Carsten ME, Belman S (1954) Studies of hypersensitivity to low molecular weight substances. III. The 2,4-dinitrophenyl group as a determinant in the precipitin reaction. *J Immunol* 73(5):296-308.
34. Salama A, Mueller-Eckhardt C, Kissel K, Pralle H, Seeger W (1984) Ex vivo antigen preparation for the serological detection of drug-dependent antibodies in immune haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 58(3):525-531.
35. Salama A, Mueller-Eckhardt C (1985) The role of metabolite-specific antibodies in nomifensine-dependent immune hemolytic anemia. *N Engl J Med* 313(8):469-474.
36. Pierce A, Nester T (2011) Pathology consultation on drug-induced hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 136(1):7-12.
37. Salama A (2009) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Expert Opin Drug Saf* 8(1):73-79.
38. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al. (1990) The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 30(2):109-113.
39. Salama A, Berghofer H, Mueller-Eckhardt C (1992) Detection of cell-drug (hapten)-antibody complexes by the gel test. *Transfusion* 32(6):554-556.
40. Judd WJ, Jhonson ST, Story J, Judd's Methods in Immunohematology, Investigating Drug-Induced Hemolysis, AABB press, Bethesda, MD, 2008, pp. 473-509.
41. Mayer B, Bartolmas T, Yurek S, Salama A (2015) Variability of Findings in Drug-Induced Immune Haemolytic Anaemia: Experience over 20 Years in a Single Centre. *Transfus Med Hemother* 42(5):333-339.
42. Ahrens N, Genth R, Kiesewetter H, Salama A (2006) Misdiagnosis in patients with diclofenac-induced hemolysis: new cases and a concise review. *Am J Hematol* 81(2):128-131.
43. Garratty G (1993) Immune cytopenia associated with antibiotics. *Transfus Med Rev* 7(4):255-267.
44. Salama A, Gottsche B, Schleiffer T, Mueller-Eckhardt C (1987) 'Immune complex' mediated intravascular hemolysis due to IgM cephalosporin-dependent antibody. *Transfusion* 27(6):460-463.
45. Garratty G, Postoway N, Schwellenbach J, McMahonill PC (1991) A fatal case of ceftriaxone (Rocephin)-induced hemolytic anemia associated with intravascular immune hemolysis. *Transfusion* 31(2):176-179.

46. Thiessen K, Kraleti S (2017) Cephalexin-induced haemolytic anaemia: A case report. *J Clin Pharm Ther*.
47. Arndt PA, Garratty G, Hill J, Kasper M, Chandrasekaran V (2002) Two cases of immune haemolytic anaemia, associated with anti-piperacillin, detected by the 'immune complex' method. *Vox Sang* 83(3):273-278.
48. Chambers LA, Donovan LM, Kruskall MS (1991) Ceftazidime-induced hemolysis in a patient with drug-dependent antibodies reactive by immune complex and drug adsorption mechanisms. *Am J Clin Pathol* 95(3):393-396.
49. Branch DR (1991) Drug-induced immune hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 96(2):288-289.
50. Chen F, Zhan Z (2014) Severe drug-induced immune haemolytic anaemia due to ceftazidime. *Blood Transfus* 12(3):435-437.
51. Sokolov VS, Sokolenko EA, Sokolov AV, Dontsov AE, Chizmadzhev YA, Ostrovsky MA (2007) Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. *J Photochem Photobiol B* 86(2):177-185.
52. Garcia-Garcia JM, Gonzalez-Martin J (2016) [Prothionamide and PAS doses. Correction to <<Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis>>]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 34(7):466.
53. Nicolini A, Perazzo A, Gatto P, Piroddi IM, Barlascini C, Karamichali S, et al. (2016) A rare adverse reaction to ethambutol: drug-induced haemolytic anaemia. *Int J Tuberc Lung Dis* 20(5):704-705.
54. Diaz-Pollan B, Pena-Pedrosa JA, Nunez-Orantos MJ, Sotres-Fernandez G (2013) [Hemolytic anemia secondary to rifampicin in patient diagnosed of pulmonary tuberculosis reinfection]. *Rev Esp Quimioter* 26(4):369-370.
55. Manika K, Tasiopoulou K, Vlogiaris L, Lada M, Papaemmanouil S, Zarogoulidis K, et al. (2013) Rifampicin-associated acute renal failure and hemolysis: a rather uncommon but severe complication. *Ren Fail* 35(8):1179-1181.
56. Tahan SR, Diamond JR, Blank JM, Horan RF (1985) Acute hemolysis and renal failure with rifampicin-dependent antibodies after discontinuous administration. *Transfusion* 25(2):124-127.
57. Mediavilla Garcia JD, Lopez-Gomez M, Arrebola Nacle JP, Oyonarte S, Jimenez-Alonso J (1992) [Hemolytic anemia and acute renal failure caused by rifampicin]. *An Med Interna* 9(5):259.
58. Guzzini F, Angiolini F, Cazzaniga L, Gasparini P, Milvio E, Mosconi L (1994) [Immune hemolytic anemia and acute kidney failure due to rifampicin]. *Recenti Prog Med* 85(3):182-185.

59. Ahrens N, Genth R, Salama A (2002) Belated diagnosis in three patients with rifampicin-induced immune haemolytic anaemia. *Br J Haematol* 117(2):441-443.
60. Pereira A, Sanz C, Cervantes F, Castillo R (1991) Immune hemolytic anemia and renal failure associated with rifampicin-dependent antibodies with anti-I specificity. *Ann Hematol* 63(1):56-58.
61. Duran-Suarez JR, Martin-Vega C, Argelagues E, Massuet L, Ribera A, Triginer J (1981) Red cell I antigen as immune complex receptor in drug-induced hemolytic anemias. *Vox Sang* 41(5-6):313-315.
62. Heuft HG, Postels H, Hoppe I, Weisbach V, Zeiler T, Zingsem J, et al. (1990) [Fatal course of immune hemolytic anemia following administration of diclofenac]. *Beitr Infusionsther* 26(4):412-414.
63. Salama A, Gottsche B, Mueller-Eckhardt C (1991) Autoantibodies and drug- or metabolite-dependent antibodies in patients with diclofenac-induced immune haemolysis. *Br J Haematol* 77(4):546-549.
64. Jurgensen JS, Seltsam A, Jorres A (2001) Fatal acute diclofenac-induced immune hemolytic anemia. *Ann Hematol* 80(7):440-442.
65. Salama A, Kroll H, Wittmann G, Mueller-Eckhardt C (1996) Diclofenac-induced immune haemolytic anaemia: simultaneous occurrence of red blood cell autoantibodies and drug-dependent antibodies. *Br J Haematol* 95(4):640-644.
66. Salama A, Mueller-Eckhardt C (1992) Immune-mediated blood cell dyscrasias related to drugs. *Semin Hematol* 29(1):54-63.
67. Hamblin TJ, Orchard JA, Myint H, Oscier DG (1998) Fludarabine and hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 16(9):3209-3210.
68. Myint H, Copplestone JA, Orchard J, Craig V, Curtis D, Prentice AG, et al. (1995) Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 91(2):341-344.
69. Gonzalez H, Leblond V, Azar N, Sutton L, Gabarre J, Binet JL, et al. (1998) Severe autoimmune hemolytic anemia in eight patients treated with fludarabine. *Hematol Cell Ther* 40(3):113-118.
70. Fernandez MJ, Llopis I, Pastor E, Real E, Grau E (2003) Immune thrombocytopenia induced by fludarabine successfully treated with rituximab. *Haematologica* 88(2):ELT02.
71. Tertian G, Cartron J, Bayle C, Rudent A, Lambert T, Tchernia G (1996) Fatal intravascular autoimmune hemolytic anemia after fludarabine treatment for chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 38(4):359-360.
72. Paydas S (2004) Fludarabine-induced hemolytic anemia: successful treatment by rituximab. *Hematol J* 5(1):81-83.

73. Borthakur G, O'Brien S, Wierda WG, Thomas DA, Cortes JE, Giles FJ, et al. (2007) Immune anaemias in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab--incidence and predictors. *Br J Haematol* 136(6):800-805.
74. Weiss RB, Freiman J, Kweder SL, Diehl LF, Byrd JC (1998) Hemolytic anemia after fludarabine therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 16(5):1885-1889.
75. Arndt PA, Garratty G (2005) The changing spectrum of drug-induced immune hemolytic anemia. *Semin Hematol* 42(3):137-144.
76. Orenstein AA, Yakulis V, Eipe J, Costea N (1977) Immune hemolysis due to hydralazine. *Ann Intern Med* 86(4):450-451.
77. Shirey RS, Bartholomew J, Bell W, Pollack B, Kickler TS, Ness PM (1988) Characterization of antibody and selection of alternative drug therapy in hydrochlorothiazide-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion* 28(1):70-72.
78. Salama A, Northoff H, Burkhardt H, Mueller-Eckhardt C (1988) Carbimazole-induced immune haemolytic anaemia: role of drug-red blood cell complexes for immunization. *Br J Haematol* 68(4):479-482.
79. Gonzalez CA, Guzman L, Nocetti G (2003) Drug-dependent antibodies with immune hemolytic anemia in AIDS patients. *Immunohematology* 19(1):10-15.

8. Anexos

Anexo I

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Implantação de uma rotina imuno-hematológica para investigação de anticorpos dirigidos contra drogas que podem causar anemia hemolítica imune induzida por droga.

Pesquisador: Fernanda Acedo Moretto Gonçalves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37291914.4.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 850.067

Data da Relatoria: 20/10/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Mestrado que consiste em um estudo de natureza experimental com o objetivo de padronizar e implantar testes imuno-hematológicos para a investigação de anticorpos droga-dependentes em pacientes com suspeita de anemia hemolítica imune induzida por droga, e investigar anticorpos contra drogas que potencialmente podem causar anemia hemolítica imune na população sadia.

Os pesquisadores esclarecem que anemias hemolíticas induzidas por drogas (AHID) são caracterizadas por uma queda brusca da hemoglobina seguido da exposição a uma droga, e são identificadas por evidências clínicas de hemólise associadas a droga e confirmadas por testes sorológicos. O teste da antiglobulina direto (TAD) positivo é o primeiro indicativo de se tratar de uma AHID, mas testes confirmatórios específicos e interpretação por profissionais experientes na área são fundamentais para confirmação da AHID. Esclarecem ainda que anticorpos IgM e IgG envolvidos nas AHID são principalmente de dois tipos, droga-dependente e droga independente.

Serão incluídos no estudo 150 doadores de sangue sadios e 10 pacientes com suspeita de AHID provenientes do Hemocentro da Unicamp. Serão coletadas amostras de sangue dos pacientes com hipótese diagnóstica de anemia hemolítica imune e dos doadores de sangue selecionados. Todos os pacientes serão submetidos a testes sorológicos como TAD poliespecífico e monoespecífico,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)

Continuação do Parecer: 850.067

eluicao com glicina acida e teste da antiglobulina indireto. Apos essa triagem serao realizados os testes com as drogas e/ou seus metabolitos que foram prescritos ao paciente no periodo de duas semanas previas ou ate o momento em que a hemolise aguda foi constatada. Amostras de doadores selecionados serao testadas contras as seguintes drogas: cefalexina, ciprofloxacino, rifampicina, diclofenaco e oxaliplatina, para identificacao de anticorpos contra essas drogas. Ao final da pesquisa, espera-se concluir a padronizacao dos testes "in vitro" de identificacao de anticorpos dirigidos contra drogas, que possam ser incorporados na rotina para avaliacao imuno-hematologica futura de pacientes com suspeita de anemia hemolitica imune induzida por drogas. A data prevista para inicio da pesquisa é 01/09/2014. A pesquisa contará com financiamento próprio. Não haverá retencao de amostras para armazenamento em banco.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primario:

Padronizar testes imuno-hematologicos para a investigacao de anticorpos droga dependentes em pacientes com suspeita de anemia hemolitica imune induzida por droga, e investigar anticorpos contra drogas que potencialmente podem causar anemia hemolitica imune em doadores de sangue.

Objetivos Secundarios:

(1) Implantar e padronizar a tecnica de identificacao de anticorpos anti-droga. (2) Em doadores de sangue, investigar a presenca de anticorpos droga dependentes anti-cefalexina, anti-ciprofloxacino, anti-rifampicina, anti-diclofenaco e anti-oxaliplatina. (3) Em pacientes com anemia hemolitica imune, com TAD positivo e eluato negativo, investigar a presenca de anticorpo contra droga.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos da participacao na pesquisa sao minimos, pois a coleta das amostras ja e prevista no atendimento de rotina e/ou nos procedimentos diagnosticos para os participantes da pesquisa.

Não há benefícios diretos para os participantes na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considero que o estudo é válido e está de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos. A justificativa e os objetivos são claros e o projeto não apresenta riscos para os voluntários.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)

Continuação do Parecer: 850.067

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: 1) Projeto de pesquisa; 2) Folha de rosto, devidamente preenchida, datada e assinada pela diretora da unidade na qual a pesquisadora tem vínculo; 3) Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), de acordo com as normas da Res. CNS-MS 466/12. 4) Orçamento financeiro.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero a proposta adequada para desenvolvimento com seres humanos.

Não há pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)

Continuação do Parecer: 850.067

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

CAMPINAS, 29 de Outubro de 2014

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Anexo II

HEMOCENTRO – UNICAMP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: “Implantação de uma rotina imuno-hematológica para investigação de anticorpos dirigidos contra drogas que podem causar anemia hemolítica imune induzida por droga.”

Pesquisadora responsável: Fernanda Acedo Moretto Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Traina

Objetivo da pesquisa: Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo a padronização de testes laboratoriais capazes de detectar anticorpos no seu sangue. Os anticorpos são proteínas produzidas pelo nosso organismo para nos defender de agentes externos. Em determinadas situações, nosso organismo pode produzir um anticorpo que reage com um medicamento que já tomamos anteriormente, ou produzir um anticorpo que reage com algum tecido do próprio organismo, como as células vermelhas do sangue. Este projeto de pesquisa tem como objetivo padronizar testes laboratoriais que sejam capazes de detectar os anticorpos presentes no sangue e que foram produzidos para reagir contra medicamentos. Pretendemos investigar a presença destes anticorpos em doadores saudáveis e em pacientes com anemia hemolítica auto-imune, caracterizada pela destruição das células do sangue por um anticorpo.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma via original assinada ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessário que você autorize o uso da sobra do sangue que você coletou para os seus testes de rotina para a pesquisa, e a sua autorização para que a pesquisadora possa ver suas informações clínicas no seu cadastro e prontuário médico. Não será necessária uma coleta de sangue específica para a pesquisa.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e não haverá armazenamento de material para a pesquisa. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e, quando o trabalho for publicado, o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

É muito pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você. Estes resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro. Os riscos da participação na pesquisa são mínimos, uma vez que não há coleta específica para a pesquisa.

É seu direito ter acesso aos resultados dos testes da pesquisa. Esses resultados não serão fornecidos automaticamente a você, mas caso você se interesse em saber o resultado, deverá entrar em contato com a Fernanda Acedo Moretto Gonçalves pelo telefone 19-3521-8649.

Versão 1 (17.07.2014)

Rubrica do participante e do pesquisador:

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar os pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Fernanda Acedo Moretto Gonçalves (19-3521-8649). Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, Tel. (19) 3521-8936, Fax (19) 3521-7187, E-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

COMPLETE OS ÍTENS APROPRIADOS ABAIXO:

A. Consentimento do Participante Adulto

Li as informações acima sobre o estudo e recebi explicações sobre a participação no estudo. Portanto, dou o meu consentimento para participar do estudo.

Assinatura

Data

Nome

Assinatura do Investigador

Data

Assinatura da Testemunha

Data

Nome

Nome