



DISTRIBUIÇÃO
VENDA PROIBIDA
GRATUITA

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Imuno-Hematologia LABORATORIAL

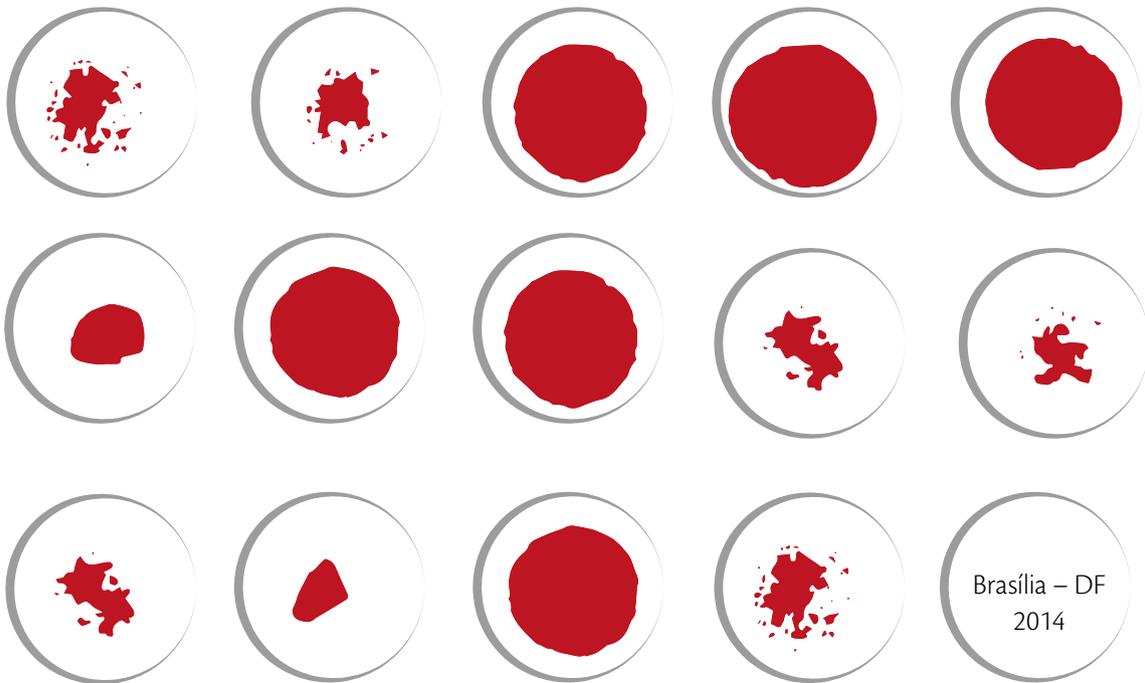
Brasília – DF
2014



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Atenção à Saúde
Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência

Imuno-Hematologia

LABORATORIAL



2014 Ministérios da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <www.saude.gov.br/bvs>.

Tiragem: 1ª edição – 2014 – 2.500 exemplares

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Atenção à Saúde
Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência
Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados
SAF Sul, trecho 2, Ed. Premium, torre II, ala B, 2º andar, sala 202
CEP: 70070-600 – Brasília/DF
Tel.: (61) 3315-6169
Site: www.saude.gov.br/sangue
E-mail: sangue@saude.gov.br

Coordenação:

Maria de Fatima Pombo Montoril – CGSH/DAHU/SAS/MS
Helder Teixeira Melo – CGSH/DAHU/SAS/MS
Priscila Murador – CGSH/DAHU/SAS/MS

Elaboração e Revisão Técnica do Texto Final:

Ângela Melgaço Ferreira
Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro
Priscila Murador
Rodolfo João Ramos
Shirley Lopes de Castilho

Colaboração:

Frieda Reffert de Araújo
Maria do Socorro Ferreira Ferreira
Sérgio Roberto Lopes Albuquerque
Thaiane Cristine Evaristo

Normalização:

Delano de Aquino Silva – Editora MS/CGDI

Capa, projeto gráfico e diagramação:

Fabiano Bastos

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

Ficha Catalográfica

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência.

Imuno-hematologia laboratorial / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

60 p. : il.

ISBN 978-85-334-2160-8

1. Serviços de hemoterapia. 2. Coleta de sangue. 3. Transfusão de Sangue. I. Título.

CDU 616.36

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2014/0086

Títulos para indexação:

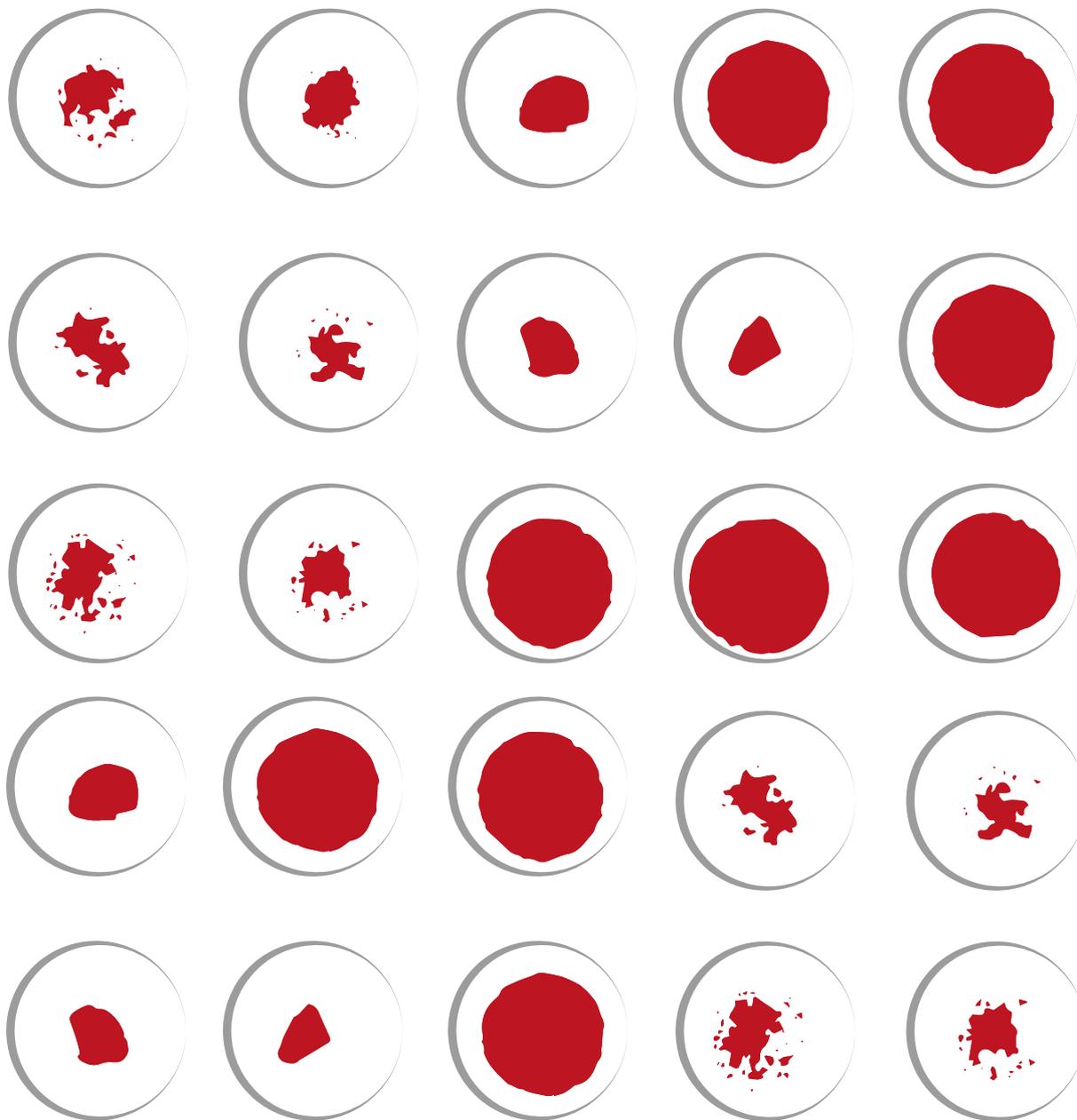
Em inglês: Laboratory Immunohematology

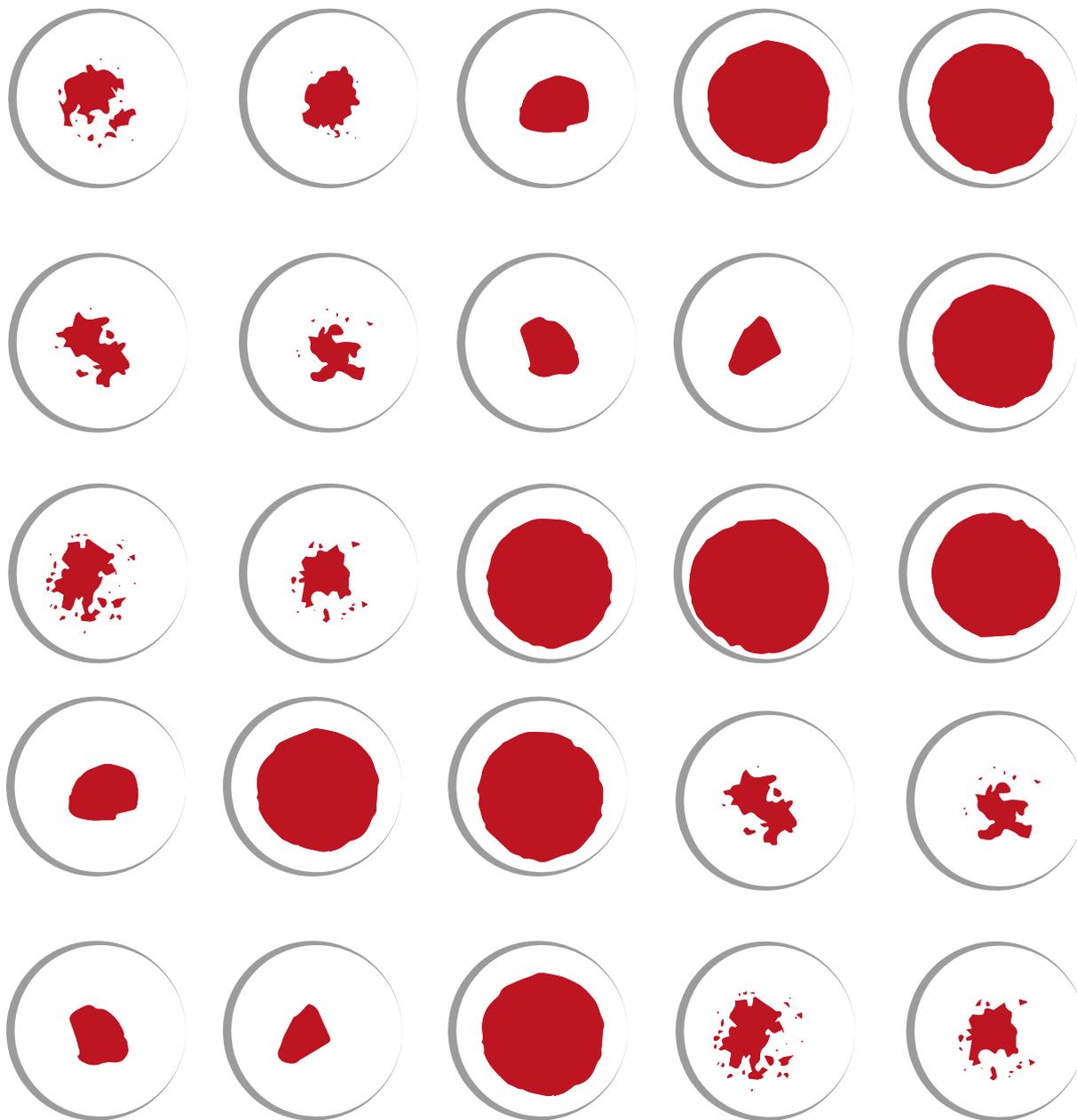
Em espanhol: Inmunohematología laboratorial

Sumário

Apresentação	7
Introdução	9
Capítulo 1 – Controle de Qualidade em Imuno-hematologia	11
Noções Básicas	11
Controle de Qualidade Interno	11
Equipamentos.	12
Técnicas	12
Equipe Técnica	12
Reagentes	12
Principais reagentes imuno-hematológicos	13
Metodologias mais utilizadas	13
Fatores que influenciam na qualidade dos ensaios.	14
Utilização de plasma ou soro	14
Separação e preparo de amostras de sangue	15
Preparo das suspensões de hemácias	15
Leitura das reações de aglutinação	16
Intensidade das reações	16
Qualidade dos reagentes imuno-hematológicos.	17
Controle de Qualidade dos Antissoros	18
Análise dos reagentes.	20
Determinação da reatividade	20
Reagentes Eritrocitários	23
Hemácias para classificação reversa	23
Hemácias para triagem de anticorpos antieritrocitários irregulares.	23
Análise dos resultados do controle de qualidade de reagentes.	23
Controle de qualidade externo	23

Capítulo 2 – Sistema ABO	25
Histórico	25
Genética	25
Antígenos	26
Subgrupos	26
Anticorpos	28
Tipagem em tubo – prova direta	29
Tipagem em tubo – prova reversa	30
Causas de discrepâncias na classificação ABO	31
Problemas na prova direta	31
Capítulo 3 – Sistema Rh	33
Antígenos	33
Os antígenos D fraco e D parcial	36
Antígenos D fraco	36
Antígenos D parciais	36
Anticorpos	37
Considerações sobre a classificação RhD	38
Interpretação dos resultados	41
Capítulo 4 – Teste de Antiglobulina	45
Introdução	45
Teste da antiglobulina direto (TAD)	45
Teste da antiglobulina direto e complemento	46
Indicações do teste da antiglobulina direto	48
Anemias hemolíticas autoimunes	49
Anemias hemolíticas induzidas por drogas (medicamentos)	49
Anemias hemolíticas aloimunes	50
Teste da antiglobulina indireto (TAI)	51
Considerações finais	53
Referências	57





Apresentação

A Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados - CGSH, do Ministério da Saúde, comprometida com a missão de elaborar políticas que promovam o acesso da população à atenção hematológica e hemoterápica de forma segura e com qualidade, desenvolve suas ações em consonância com os princípios e as diretrizes do Sistema Único de Saúde - SUS.

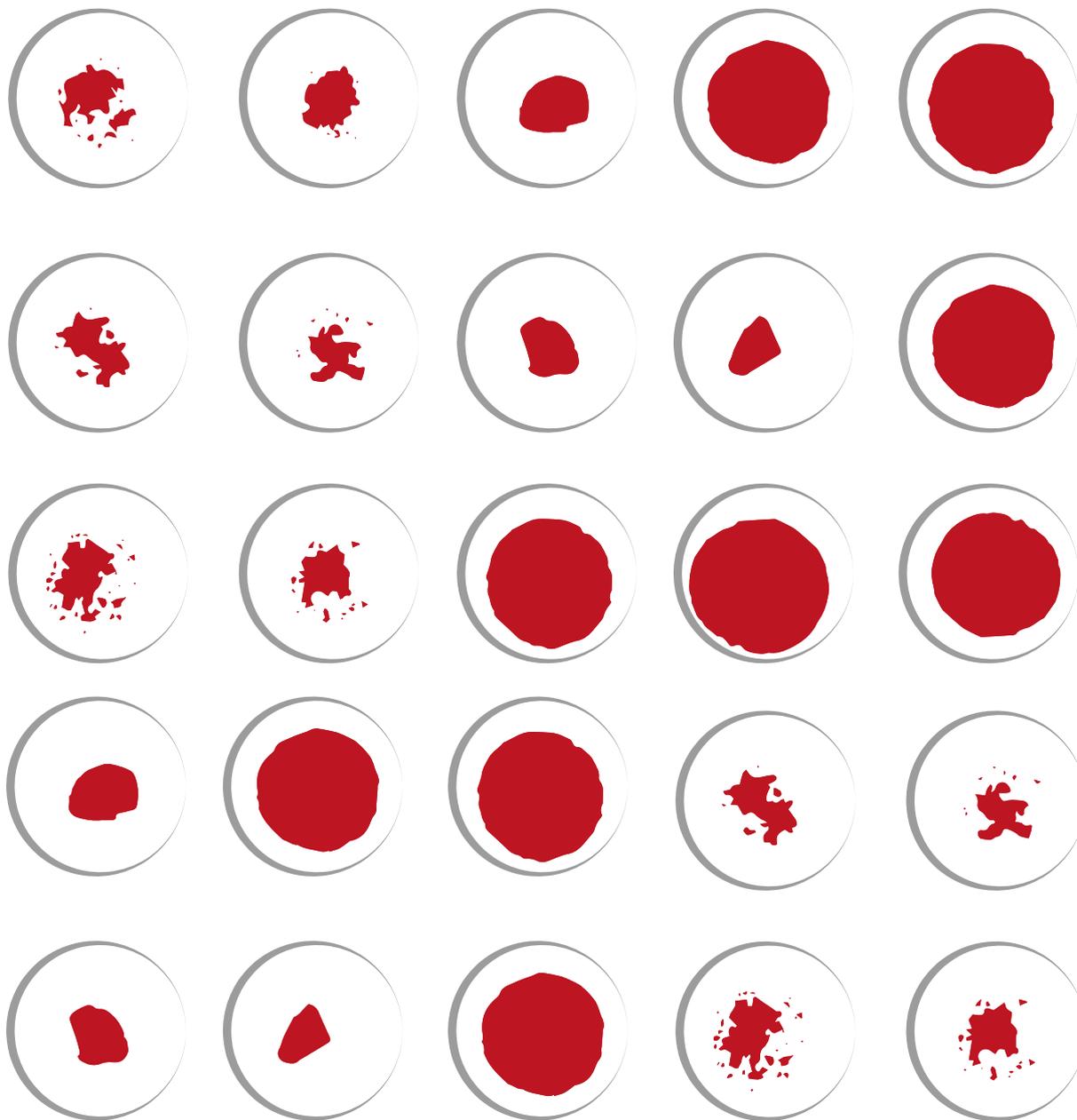
Uma das principais ações nesse sentido é a disponibilização do Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Imuno-hematologia – AEQ-IH para os serviços da Hemorrede Nacional. Desde 2010, o AEQ-IH é disponibilizado pelo Ministério da Saúde aos laboratórios públicos que fazem triagem de doadores de sangue e testes pré-transfusionais nos serviços de hemoterapia de todo o país.

O AEQ-IH conta com a cooperação de comissão de assessoramento técnico em imuno-hematologia – CAT-IH, composto por especialistas das instituições de referência da Hemorrede Nacional. O CAT-IH produz, distribui as avaliações práticas e teóricas e analisa os resultados obtidos pelos serviços de hemoterapia.

Nas últimas análises dos indicadores de desempenho do programa, foi demonstrada a necessidade de apoio técnico aos serviços.

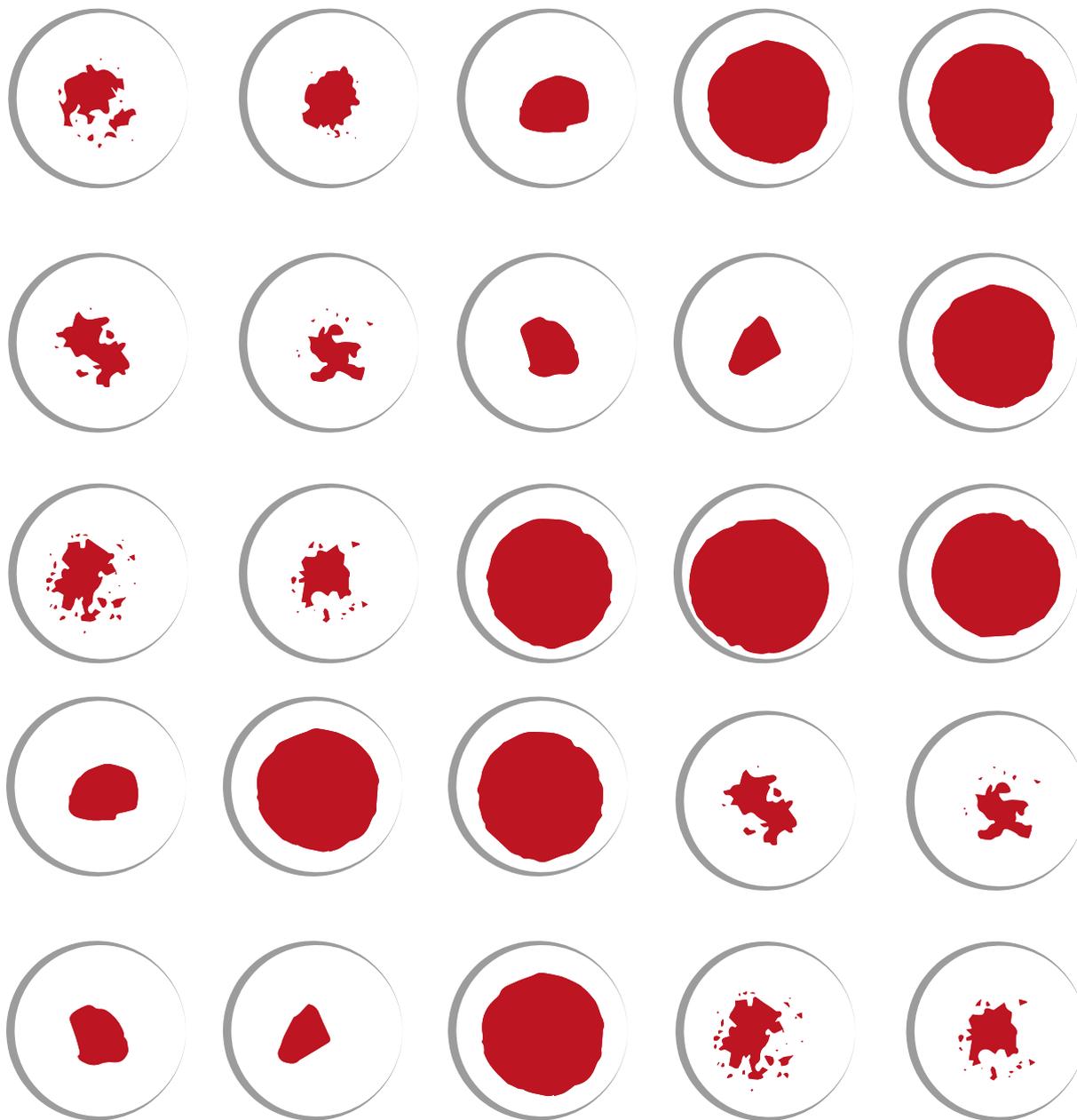
Assim, para realizar essa ação a CGSH publica a *Cartilha: Imuno-hematologia laboratorial* para tipagens ABO, RhD, Teste da Antiglobulina Direta (TAD) e Pesquisa de Anticorpos Antieritrocitários Irregulares (PAI). Esperamos que este instrumento possa servir como orientação aos Serviços de Hemoterapia de todo o país, auxiliando os profissionais que atuam no laboratório a realizar os testes de imuno-hematologia com maior padronização das técnicas, por meio da descrição de diretrizes básicas para a investigação laboratorial adequada.

Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados
DAHU/SAS/Ministério da Saúde



Introdução

A Cartilha Imuno-hematologia Laboratorial tem como objetivo principal abordar o controle de qualidade em imuno-hematologia, além dos testes laboratoriais essenciais em imuno-hematologia: tipagem ABO, RhD, Teste da Antiglobulina Direta (TAD) e Pesquisa de Anticorpos Antieritrocitários Irregulares (PAI). As indicações aqui apresentadas visam à correta realização dos testes imuno-hematológicos em auxílio para uma transfusão segura, contando com a participação de profissionais atuantes em laboratório, que reuniram informações relevantes e atualizadas sobre as técnicas e métodos empregados em laboratório de imuno-hematologia. Serão abordados vários temas relacionados à prática laboratorial, como: métodos, reagentes, equipamentos, manuseio de amostras, análise de qualidade e validação. Esta cartilha não deve ser utilizada como fonte de referência única sobre o tema, ficando a cargo dos profissionais atuantes na área a complementação das informações e a atualização contínua com relação à teoria e à prática dos testes imuno-hematológicos.



Capítulo 1 – Controle de Qualidade em Imuno-hematologia

Noções Básicas

- ▶ Implantar os procedimentos de controle de qualidade em imuno-hematologia conforme legislações vigentes e normatizações estabelecidas pelos serviços de hemoterapia.
- ▶ Estabelecer programas de controle de qualidade interno (equipamentos, técnicas, equipe profissional e reagentes) e participar de programas de controle de qualidade externo obrigatoriamente.
- ▶ Estabelecer registros dos procedimentos e condutas executados nos serviços por meio de manuais, procedimentos operacionais padrão, formulários e outros documentos.
- ▶ Gerenciar as atividades de maneira a identificar e investigar inadequações e adotar medidas preventivas, corretivas e de melhoria.

Controle de Qualidade Interno

Monitora a estabilidade dos processos e procedimentos aumentando a confiança nos resultados e tem várias funções, como:

- ▶ Controlar o desempenho dos materiais, equipamentos e métodos analíticos;
- ▶ Identificar mudanças na estabilidade dos processos;
- ▶ Criar sinais de alerta para prevenir a liberação de resultados não conformes e identificar a necessidade de ações corretivas;
- ▶ Identificar necessidades de melhorias nos processos.

Equipamentos

- ▶ Adquirir equipamentos que atendam as necessidades do laboratório;
- ▶ Manter o equipamento calibrado e os manuais acessíveis aos usuários;
- ▶ Manter protocolos com registro de manutenção preventiva e corretiva;
- ▶ Obedecer às instruções do fabricante em relação ao manuseio e frequência da manutenção preventiva;
- ▶ Contratar profissionais especializados para realização da manutenção preventiva e corretiva;
- ▶ Gerenciar as informações fornecidas pelos registros relacionados aos equipamentos.

Técnicas

- ▶ Obedecer às instruções do fabricante (bula) em relação aos procedimentos técnicos;
- ▶ Utilizar amostras controle positivas e negativas durante a realização dos testes;
- ▶ Utilizar hemácias sensibilizadas com anticorpos da classe “IgG” para validação dos testes antiglobulínicos realizados na metodologia “tubo”;
- ▶ Utilizar obrigatoriamente o Controle de Rh e o soro anti-D do mesmo fabricante para realização da fenotipagem RhD;
- ▶ Gerenciar as informações fornecidas pelos registros relacionados às técnicas.

Equipe Técnica

- ▶ Estabelecer programa de orientação inicial;
- ▶ Realizar treinamento e educação continuada;
- ▶ Toda a equipe de trabalho deve trabalhar de forma padronizada e de acordo com os procedimentos técnicos e condutas documentadas estabelecidos pelas legislações vigentes e normas internas dos serviços.

Reagentes

Implantar programa de qualificação de fornecedores e reagentes e verificar seu desempenho continuamente por meio dos registros estabelecidos.

Obedecer às instruções do fabricante em relação aos procedimentos técnicos, armazenamento, inspeção visual.

Principais reagentes imuno-hematológicos

Antissoros: Reagentes utilizados para identificar antígenos eritrocitários: classificação sanguínea e fenotipagem eritrocitária.

Lectinas: Reagentes utilizados para identificar antígenos eritrocitários: classificação sanguínea e fenotipagem eritrocitária. Ex: Lectina anti-A1 – origem “*Dolichos biflorus*” ou “*Helix pomatia*”.

Reagentes eritrocitários: Reagentes utilizados nas provas reversas da fenotipagem ABO e para detecção e identificação de anticorpos antieritrocitários irregulares.

Potencializadores: são substâncias adicionadas ao teste com objetivo de facilitar a interação entre o antígeno e o anticorpo e aproximar as hemácias, favorecendo dessa forma a aglutinação e encurtando o tempo de reação.

Os mais utilizados na rotina imuno-hematológica são:

- ▶ Enzimas proteolíticas – papaína, bromelina, ficina e tripsina;
- ▶ Meio de baixa força iônica – solução de LISS;
- ▶ Substância macromolecular – albumina bovina 22%;
- ▶ Polímero linear solúvel em água – polietilenoglicol (PEG) 10% e 20%.

Reagente antiglobulina humana (AGH): A AGH é um hetero-anticorpo que reconhece proteínas humanas. É um artifício imunológico para se visualizar o fenômeno da aglutinação. A fração Fab das imunoglobulinas se liga à fração Fc e/ou às proteínas do sistema complemento.

Metodologias mais utilizadas

Técnica em tubo

São utilizados tubos de vidro ou plástico medindo 10 mm ou 12 mm x 75 mm, onde são dispensados reagentes e amostras. Após centrifugação procede-se a análise da aglutinação.

Microplacas

O método consiste na utilização de microplacas de acrílico com fundo em “U” ou fundo em “V”. Existem também microplacas com membrana imuno-ativa fixada na superfície dos poços. Trata-se de micro-técnica em que as hemácias podem ser suspensas em soluções enzimáticas.

Gel Teste

Microtécnica em que se utilizam cartões contendo micro tubos com Gel Sephadex 6100 ou Poliacrilamida. As reações são estáveis e podem ser revistas até 48 horas após a realização dos testes. Ocorrendo reação antígeno-anticorpo, os aglutinados formados são retidos na coluna do gel quando submetidos os cartões a baixa centrifugação, determinando o padrão de positividade do teste. As hemácias livres irão se depositar no fundo do micro tubo.

Fatores que influenciam na qualidade dos ensaios

- ▶ Coleta do sangue em tubo apropriado.
- ▶ Qualidade da coleta.
- ▶ Uso de vidrarias limpas e sem resíduos de detergente (que podem causar resultados falso-positivos).
- ▶ Técnica de separação do soro adequada.
- ▶ Preparo correto das suspensões de hemácias (concentração muito abaixo ou acima da estabelecida pelos fabricantes podem causar resultados falso negativos).
- ▶ Qualidade dos reagentes empregados.
- ▶ Padronização dos ensaios técnicos.
- ▶ Qualidade dos equipamentos empregados.
- ▶ Pessoal técnico capacitado

Utilização de plasma ou soro

Existe uma discussão a respeito da utilização de soro ou plasma na realização dos testes imuno-hematológicos.

A pesquisa de anticorpos antieritrocitários irregulares (PAI) é realizada rotineiramente com reagente antiglobulina humana poli-específico (anti-IgG + anti-complemento) com amostras de soro. Quando se utiliza o plasma, amostra coletada com EDTA (anticoagulante quelante de íons Cálcio), não ocorre a fixação do complemento “in vitro”. Nesse caso, a utilização da AGH mono-específica (anti-IgG) está mais indicada.

Inúmeros estudos foram realizados para definir a importância da utilização de reagente anti-complemento para evidenciar anticorpos:

- ▶ Roubinet et al. (1999) – estudaram 3.264 amostras coletadas em paralelo com tubo seco e com anticoagulante e não encontraram diferença na identificação de 240 amostras positivas;
- ▶ Yales (1998) – demonstrou que anticorpos IgG anti-Kidd são incapazes de fixar complemento. Apenas anticorpos com capacidade de determinar aglutinação direta podem fixar complemento;
- ▶ Garatty (1984) – estimou que a frequência de anticorpos detectáveis pela presença do complemento aderido à membrana da hemácia é estimada em 1 para 8.000 soros testados.

A maioria dos autores aceita a utilização de amostra anticoagulada, pois evita a coleta de sangue excessiva, além de possibilitar a realização dos testes de classificação ABO, RhD, fenotipagem eritrocitária, teste de Coombs direto e técnicas de eluição do anticorpo.

Separação e preparo de amostras de sangue

Na separação do plasma/soro e hemácias de amostras de sangue total devem ser observados o tempo e velocidade ideal para a centrifugação, e os equipamentos devem ser calibrados periodicamente.

Preparo das suspensões de hemácias

No preparo das suspensões de hemácias devemos observar em que concentração as hemácias devem ser preparadas para o ensaio a ser realizado.

Suspensão de hemácias a 2%

- ▶ 0,1 mL de concentrado de hemácias + 4,9 mL de salina
- ▶ 1 gota de concentrado de hemácias + 49 gotas de salina

Suspensão de hemácias a 5%

- ▶ 0,1 mL de concentrado de hemácias + 1,9 mL de salina
- ▶ 1 gota de concentrado de hemácias + 19 gotas de salina

Suspensão de hemácias a 10%

- ▶ 0,1 mL de concentrado de hemácias + 0,9 mL de salina
- ▶ 1 gota de concentrado de hemácias + 9 gotas de salina

Suspensão de hemácias a 50%

- ▶ 0,4 mL de concentrado de hemácias + 0,4 mL de salina
- ▶ 4 gotas de concentrado de hemácias + 4 gotas de salina

Leitura das reações de aglutinação

A velocidade e tempo de centrifugação podem variar conforme as orientações do fabricante e as marcas das centrífugas utilizadas. Determinar a velocidade da centrifugação a partir da força “g”. Os testes imuno-hematológicos devem ser centrifugados entre 900g e 1.000g e a transformação em “rpm” irá variar conforme o raio da centrífuga utilizada. O manual da AABB descreve os procedimentos de calibração para definição do melhor tempo e velocidade de centrifugação (rpm) referentes aos testes imuno-hematológicos.

Intensidade das reações

A padronização da leitura das reações é extremamente importante. No quadro 1, é descrito o padrão utilizado na maioria dos laboratórios de imuno-hematologia.

QUADRO 1 – Intensidade das reações

Gradação	Descrição
4 +	Botão sólido com pequenos grumos e fundo claro
3 +	Grumos grandes e numerosos com fundo claro
2 +	Grumos pequenos e numerosos com fundo róseo
1 +	Grumos pequenos e fundo bastante róseo
(+) - Fraco	Presença de minúsculas aglutinações em fundo bastante róseo
0 - Negativo	Ausência de aglutinação, fundo bastante róseo com hemácias em suspensão
CM (Campo Misto)	Presença de aglutinações e de hemácias em suspensão, com fundo róseo
He	Hemólise total ou parcial das hemácias. É indicador de positividade

Fonte: autoria própria.

Qualidade dos reagentes imuno-hematológicos

Todos os reagentes devem ser inspecionados quanto ao aspecto visual a cada lote e diariamente.

Avaliação do rótulo

- ▶ Deve ser avaliado a cada lote.
- ▶ Devem estar contidas no rótulo informações que permitam uma rápida identificação do reagente, do lote e seu prazo de validade. Deve conter:
 - Nome do produto;
 - Nome do fabricante;
 - Número da licença no país de origem;
 - Data de validade/expiração;
 - Número de lote e designação de sub-lote;
 - Volume do produto;
 - Temperatura de armazenagem;
 - Fonte do produto caso não seja de origem humana; e
 - Técnica para a qual ele é recomendado: salino, lâmina, tubo, etc.

Avaliação da bula

- ▶ Deve ser avaliada a cada lote e utilizada pelo laboratório rotineiramente para obediência às instruções do fabricante.
- ▶ Devem estar contidas na bula as seguintes informações em língua portuguesa:
 - Nome do produto;
 - Composição;
 - Instruções de uso, interpretação de resultados e limitação do teste;
 - Nome do fabricante, endereço e número da licença;
 - Conservante utilizado;
 - A bula deve indicar que o produto foi testado sorologicamente para os principais patógenos transmitidos pelo sangue e que apresentou resultados negativos; e
 - Cuidados na manipulação.

Avaliação do frasco

- ▶ Deve ser avaliado a cada lote:
 - A embalagem deve ser de vidro transparente e neutro;
 - O conta-gotas deve também ser transparente, e uma gota deverá equivaler a 50µL; e
 - O rótulo não deve recobrir totalmente o frasco a fim de permitir a inspeção visual de seu conteúdo.

Avaliação da aparência

- ▶ Deve ser avaliada a cada lote e diariamente antes de utilizar-se o reagente na rotina:
 - Ausência de precipitados, gelatina, partículas, fungos e turvação; e
 - Ausência de hemólise.

Controle de Qualidade dos Antissoros

A seguir estão descritas as especificações técnicas para qualificação de alguns reagentes imuno-hematológicos utilizados nas técnicas em tubos:

Soro anti-A (monoclonal ou policlonal)

O soro anti-A deve reconhecer somente o antígeno A na membrana eritrocitária, ter coloração azul, reatividade (intensidade de reação) com hemácias A₁ de pelo menos 3+, avidéz de até 15 segundos, título 256 e escore 72.

Soro anti-B (monoclonal ou policlonal)

O soro anti-B deve reconhecer somente o antígeno B na membrana eritrocitária, ter coloração amarela, reatividade com hemácias B de pelo menos 3+, avidéz de até 15 segundos, título 256 e escore 72.

Soro anti-AB (monoclonal ou policlonal)

O soro Anti-AB deve reconhecer somente os antígenos A e B na membrana eritrocitária, ser incolor, ter reatividade com hemácias A₁, B ou A₁B de pelo menos 3+, avidéz de até 15 segundos, título 256 e escore 72.

Obs: no caso de serem usados antissoros monoclonais, a utilização do soro anti-AB não é obrigatória.

Soro anti-RhD (monoclonal ou policlonal)

O soro anti-RhD deve reconhecer somente o antígeno D na membrana eritrocitária, apresentar reatividade de pelo menos 3 + com hemácias de grupo O RhD positivas (R₁r, R₂r, R₀r), título 32 e avidéz de até 30 segundos. Deve ainda reconhecer hemácia RhD positivo fraca.

Reagente controle de RhD

Controle de RhD é constituído apenas do meio diluente do soro anti-RhD correspondente. Deve ser límpido e não reagir com hemácias RhD positivas nem negativas, além de ser da mesma marca do soro anti-RhD.

Reagente antiglobulina humana poliespecífico ou monoespecífico

O reagente deve determinar reações positivas de pelo menos (2+) quando testado com hemácias sensibilizadas por anticorpo tipo IgG anti-D (Monoespecífico) e por IgG e/ou frações do complemento (Poliespecífico). Pode-se utilizar também amostras com pesquisa de anticorpos antieritrocitários irregulares positiva cujo anticorpo seja da classe IgG.

Reagente controle do soro antiglobulina humana

Suspensão de hemácias humanas de 3% a 5% do grupo "O", sensibilizadas por anticorpos IgG, para validar resultados negativos em testes antiglobulínicos. Deve apresentar reação de aglutinação quando adicionado aos testes antiglobulínicos negativos.

Albumina bovina 22%

A albumina é uma proteína que atua aumentando a constante dielétrica do meio, diminuindo o potencial Zeta, facilitando a aglutinação. Deve ter aspecto límpido e não determinar aglutinação quando testada frente a hemácias não sensibilizadas.

Análise dos reagentes

Soro Anti-A, Anti-B, Anti-AB, Anti-D

Estes devem ser inspecionados quanto à especificidade e reatividade (intensidade de aglutinação, avides, título e *score*) a cada lote, transporte ou estoque inadequado. Os resultados devem ser registrados em planilha própria, para acompanhamento, gestão e qualificação dos reagentes.

Determinação da Especificidade

Característica inerente ao anticorpo que o torna capaz de reconhecer apenas as hemácias portadoras do antígeno correspondente.

- ▶ A especificidade é estabelecida testando-se o reagente com hemácias negativas em relação ao determinante antigênico específico. Ex: soro anti-A e anti-B são testados com hemácias O.
- ▶ É utilizada a técnica convencional de análise da aglutinação em tubos.

Determinação da reatividade

Avides

Afinidade do anticorpo pelo antígeno. Define o quanto o anticorpo é complementar ao antígeno por meio da velocidade e intensidade com as quais o antígeno e o anticorpo reagem. É feita em lâmina e observa-se o resultado macroscopicamente.

Técnica:

Coloca-se em uma lâmina:

- ▶ Soros anti-A, anti-B ou anti-AB: colocar uma gota da suspensão a 20% de hemácias lavadas, selecionadas segundo o antissoro a ser testado;
- ▶ No caso de anti-RhD, a concentração da suspensão de hemácias deve ser de 40%;
- ▶ Ao lado colocar uma gota do antissoro a ser testado;
- ▶ Misturar formando um halo com cerca de 2,5cm e, ao mesmo tempo, acionar o cronômetro;
- ▶ Marcar o intervalo entre a mistura e o início da aglutinação;
- ▶ Aplicar movimentos de rotação na lâmina homogeneizando bem a mistura. No caso de anti-RhD aconselha-se utilizar o aglutinoscópio;
- ▶ O tempo total marcado a partir da homogeneização da amostra e do reagente até início da aglutinação é denominado AVIDEZ;
- ▶ Ao final de 3 minutos anotar a intensidade da aglutinação em número de cruces (0 a 4+).

FIGURA 1 – Técnica em lâmina

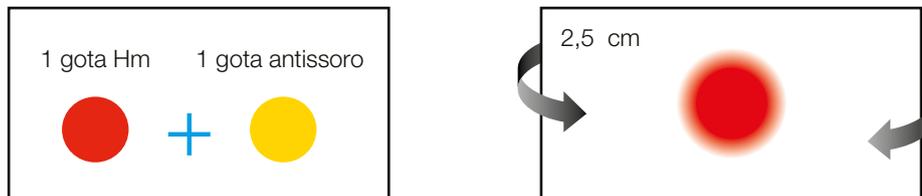


Ilustração: Ângela Melgaço Ferreira

Título

Método utilizado para se determinar a concentração de anticorpos presentes no soro em análise. São realizadas diluições sucessivas, e o título corresponde à última diluição do soro onde houve aglutinação de (1+).

Por exemplo: se a última aglutinação com graduação de (1+) acontecer na diluição 1/64, o título será 64.

Técnica:

- ▶ Numerar 13 tubos: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 + tubo 13;
- ▶ Nos tubos 1 e 2 colocar 2 gotas do soro a titular;

- ▶ Nos tubos 2 a 13, colocar 2 gotas de solução salina 0,9%;
- ▶ Homogeneizar (sem fazer bolhas), transferir duas gotas do tubo 2 para o tubo 3, e deste para o 4, e assim sucessivamente até o tubo 13. Este último tubo deverá ser reservado para se prosseguir com as diluições caso haja aglutinação de (1+) no tubo 12;
- ▶ Acrescentar duas gotas de suspensão de hemácias fenotipadas 3%–5% até o tubo 12;
- ▶ Quando os antíseros a serem titulados apresentarem reatividade à temperatura ambiente (TA), centrifugar e ler, anotando na planilha o resultado final;
- ▶ Antíseros com reatividade na fase de antiglobulina humana, após realizar o item 5, incubar a reação a 37 °C conforme instruções do fabricante, lavar as hemácias com solução salina 0,9% (mínimo 3 vezes) e acrescentar o soro antiglobulina humana. Posteriormente realizar a centrifugação, leitura e anotação na planilha de controle de qualidade.

FIGURA 2 – Titulação de soro

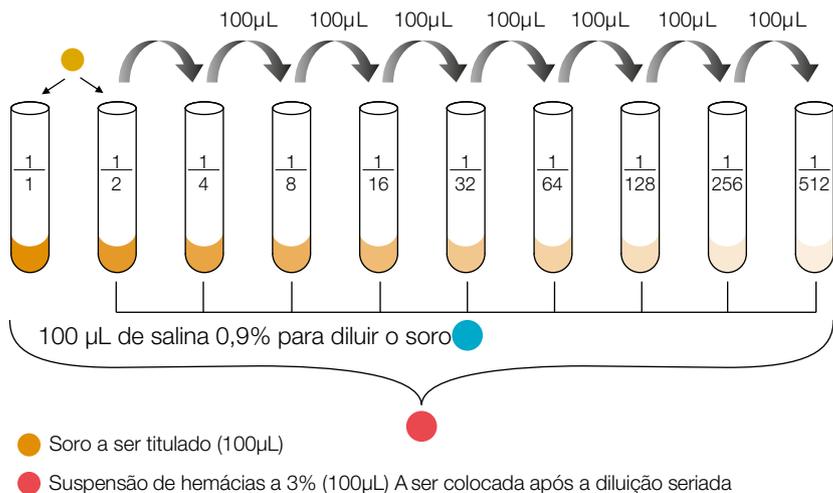


Ilustração: Ângela Melgaço Ferreira

Reagentes Eritrocitários

Hemácias para classificação reversa

Conjunto de reagentes constituído por suspensões de hemácias A₁ e B. Deve apresentar concentração de 3% a 5% para as técnicas em tubo, ser RhD negativo e não apresentar sinais de hemólise. Realizar testes de especificidade e reatividade.

Especificidade: testar as hemácias A e B com plasmas AB

Reatividade: testar as hemácias A com plasmas B e as hemácias B com plasmas A

Hemácias para triagem de anticorpos antieritrocitários irregulares

Conjunto de reagentes constituído por no mínimo duas suspensões de hemácias do grupo O, com perfil fenotípico conhecido em relação aos principais sistemas, na concentração de 3% a 5% para as técnicas em tubo; não devem apresentar sinais de hemólise.

As suspensões de hemácias devem ser preferencialmente R₁R₁ e R₂R₂ e apresentar, pelo menos, uma célula positiva dos principais antígenos – D, C, c, E, e, K, P, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b, M, N, S, s, Le^a, Le^b e Di^a –, se possível.

Análise dos resultados do controle de qualidade de reagentes

- ▶ Verificar a cada lote e transporte as condições de recebimento dos reagentes e proceder à análise do produto conforme as instruções acima. Todos os ensaios devem ser registrados e julgados segundo as especificações estabelecidas pelo serviço;
- ▶ Deve-se elaborar de forma clara o laudo técnico da análise que libera o reagente para uso;
- ▶ As não conformidades devem ser descritas em formulário próprio e comunicadas à Chefia do Laboratório que deve tomar as ações corretivas e preventivas;
- ▶ Os resultados do Controle de Qualidade devem ser registrados e arquivados por período mínimo de cinco anos ou conforme legislações vigentes.

Controle de qualidade externo

- ▶ Segundo a Portaria Ministerial nº 2.712/2013, os serviços de hemoterapia devem participar de programas de proficiência.

- ▶ São programas elaborados por Institutos de referência para avaliar a adequação dos resultados de uma análise e envolve a interação com outras organizações.
- ▶ São compostos por painéis práticos e teóricos.
- ▶ Permitem aos serviços participantes:
 - Avaliar a qualidade das atividades imuno-hematológicas;
 - Diagnosticar desempenhos inadequados;
 - Utilizar os resultados como ferramenta de gerência para promover adequações e melhorias;
 - Melhorar o padrão de desempenho das equipes.

Capítulo 2 – Sistema ABO

Histórico

O Sistema ABO foi o primeiro sistema de grupos sanguíneos, descrito em 1900 por Landsteiner, que descreveu os antígenos A, B e C (depois renomeado como O). Landsteiner descobriu que, misturando soro e hemácias de diferentes pessoas, poderiam ser definidos três grupos e, alguns anos após, Decastello descreveu o fenótipo AB. Em 1910 Von Dungern e Hirschfeld confirmaram que a herança genética do A e B obedeciam as leis de Mendel, com a presença do A e B como dominantes.

Genética

O genes ABO se localizam no braço longo do cromossoma 9 (posição 9q34.1-q34.2).

Foram definidos quatro genes: A_1 , A_2 , B, O.

Esses genes codificam a produção de duas enzimas glicosiltransferases A e B.

A transferase A α (1,3 N acetilgalactosaminil transferase), que adiciona o açúcar N acetil galactosamina e produz o antígeno A; e a transferase B (α 1,3 galactosil transferase), que adiciona a galactose e produz o antígeno B num substrato precursor na membrana da hemácia, o antígeno H. O gene O não produz transferase ativa.

A sequência de DNA do gene O é idêntica ao do gene A, exceto pela deleção (G-261) na região N-terminal, o que codifica uma proteína truncada.

O gene alelo A_2 difere de A_1 pela simples deleção de uma base na região C-terminal, na posição 467, sendo o nucleotídeo T em A_2 e C em A_1 ; o gene A_2 produz uma transferase A2 que tem uma atividade reduzida, quando comparada com a transferase A1.

A diferença entre genes A e B são sete nucleotídeos no DNA, que resultam em quatro aminoácidos diferentes nas transferases A e B.

Antígenos

Os antígenos do Sistema ABO não são restritos à membrana eritrocitária, mas também estão presentes na saliva e outros líquidos biológicos, exceto fluido espinhal. A presença de substância ABO específica nos líquidos biológicos ocorre em indivíduos que apresentam o gene secretor (Se) – 80% das pessoas. Os antígenos ABO são encontrados ainda na maioria das células epiteliais e endoteliais. A presença nos linfócitos e plaquetas parece ser devido à absorção do plasma.

Foram descritos quatro antígenos no sistema ABO: **A (001); B (002); AB (003); A1 (004)**, e estão expressos desde a 5ª semana de vida intrauterina, embora o recém-nascido tenha uma expressão fraca, cerca de 1/3 dos sítios antigênicos totais em relação ao adulto (Molisson, 1992). A expressão aumenta com a idade e é máxima em torno dos dois a quatro anos de vida.

Subgrupos

Os antígenos A e B apresentam subgrupos que se caracterizam por diferenças na quantidade e forma de expressão na membrana das hemácias devido a alterações genéticas (mutações na estrutura dos genes) que codificam transferases diferentes das transferases A e B, levando em geral a uma expressão enfraquecida dos antígenos (A e B) na membrana da hemácia.

Os subgrupos, nos testes imuno-hematológicos, apresentam intensidade de reação mais fraca com reagentes anti-A, anti-B e anti-AB, o que pode levar a discrepâncias entre a prova direta e reversa da classificação ABO.

O uso de lectinas específicas anti-A₁ (*Dolichos biflorus*) e anti-H (*Ulex europeus*) pode auxiliar na determinação dos subgrupos. As hemácias A₁ apresentam reação positiva com lectina anti-A₁ e negativa com lectina anti-H. Nos subgrupos de A, a reação com lectina anti-A₁ apresenta reação negativa e a anti-H, reação positiva.

Os subgrupos também ocorrem nos indivíduos AB. Cerca de 80% dos indivíduos A e AB são A_1/A_1B , 19% são A_2/A_2B e 1%, outros subgrupos ($A_3, A_{int}, A_{el}, A_{m}, A_x, A_y$, etc.). Os subgrupos de B são raros (B_3, B_x, B_m, Bel).

A reação de aglutinação com antissoros A e B só é visível quando mais de 2.000 sítios antigênicos estão presentes na membrana das hemácias.

Na medicina transfusional, em geral, não é importante distinguir os subgrupos de A e de B. A transfusão de subgrupos, em geral, não leva a reação transfusional.

Subgrupo A_2

É o subgrupo mais comum depois do alelo A^1 . O alelo A^2 codifica uma transferase A menos eficaz que aquela produzida pelo alelo A^1 . As hemácias dos indivíduos A_2 possuem somente cerca de 500.000 sítios antigênicos A na membrana eritrocitária. O alelo A^2 é uma mutação do alelo A^1 . A transferase A^1 é capaz de adicionar a N-acetilgalactosamina ao antígeno H sobre todas as cadeias precursoras tipo I a IV. A enzima produzida pelo alelo A^2 , entretanto, é menos eficiente quando adicionado o açúcar em substância H a cadeias dos tipos III e IV. Por isso as hemácias A_2 são aglutinadas por reagentes anti-H, pois nem todo antígeno H é transformado em antígeno A na membrana da hemácia.

Subgrupo A_3

O subgrupo A_3 é o mais comum depois do A_2 . Existem várias mutações genéticas do gene A, relacionadas ao subgrupo A_3 , que produzem transferases com três padrões diferentes de atividade:

- ▶ Enzima sem nenhuma atividade transferase A;
- ▶ Enzima com melhor ação em pH 6 e com 1/3 de atividade da enzima A_1 ;
- ▶ Enzima com melhor ação em pH 7 e com atividade de transferase A muito baixa.

O resultado, na classificação, é a reação em campo misto ou dupla população, isto é, hemácias aglutinadas e não aglutinadas observadas quando utilizamos antissoro monoclonal **anti-A**.

Alguns indivíduos A_3 apresentam apenas 3%–4% dos antígenos A em relação aos indivíduos A_1 . Outros indivíduos apresentam duas populações diferentes de hemácias: uma com antígeno A e outra totalmente desprovida do antígeno.

Anticorpos

Os anticorpos do Sistema ABO estão ausentes no nascimento e são detectáveis após os quatro meses de idade. Uma das teorias propostas para seu aparecimento consiste na heteroimunização (flora bacteriana intestinal, anatoxinas diftéricas ou tetânicas, soroterapia antitetânica, medicamentos de origem animal, vacina antigripal, infecção por *Toxocara canis* etc.).

A gravidez ABO incompatível, assim como a transfusão incompatível, pode determinar a aloimunização eritrocitária e o aparecimento das imunoglobulinas da classe IgG.

Os anticorpos ABO são potentes IgM ou IgG e determinam forte aglutinação direta com hemácias A ou B. São capazes ainda de ativar a cascata de complemento até C9, portanto, levando a hemólise aguda intravascular. São extremamente importantes do ponto de vista transfusional, estando relacionados à reação transfusional grave. Estão também envolvidos em casos de Doença Hemolítica Perinatal, porém, em geral, de forma clínica moderada, levando a icterícia leve.

Anti-A: ocorre naturalmente no soro de todos os indivíduos do Grupo B.

Anti-B: ocorre naturalmente no soro de todos os indivíduos do Grupo A.

Anti-AB: ocorre naturalmente no soro de todos os indivíduos do Grupo O.

Anti-A1: pode ocorrer naturalmente nos indivíduos A₂, quase sempre é uma aglutinina fria, tipo IgM, encontrada em cerca de 1% a 4% dos indivíduos A₂ e em 25% dos indivíduos A₂B. Geralmente não está associada a reação hemolítica transfusional ou doença hemolítica perinatal. Na presença de anti-A₁, só é necessário selecionar hemácias A₂ para transfusão se o anticorpo reagir a 37 °C.

Considerações sobre a classificação ABO

A tipagem ABO deve ser realizada obrigatoriamente por meio de duas provas:

- ▶ Prova direta ou globular (Beth Vincent): consiste em pôr em contato soros-teste conhecidos – anti-A, anti-B e anti-AB – com glóbulos vermelhos (GV) a serem testados, para identificar a presença ou não dos antígenos A e B. Assim, serão definidos os grupos sanguíneos: A, B, AB, O.

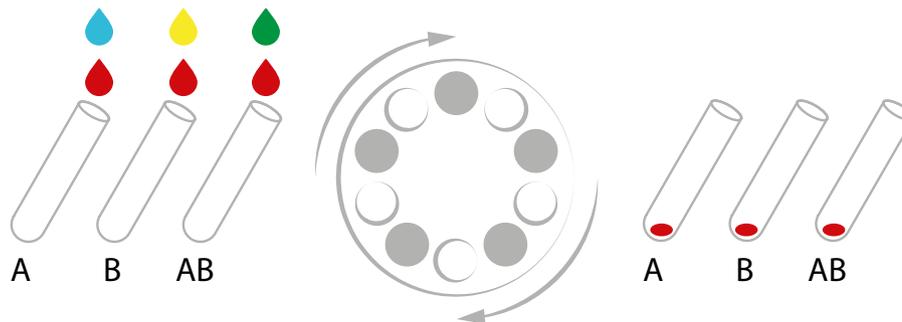
- ▶ Prova reversa, sérica (Simonin): consiste em colocar em contato o soro a testar com pelo menos GV conhecidos A₁ e B, permitindo reconhecer a presença ou não de anticorpos dirigidos contra esses antígenos.

Essas duas provas, direta e reversa, devem ser realizadas preferencialmente por dois técnicos diferentes, sendo que cada teste realizado confirma o outro.

Tipagem em tubo – prova direta

1. Rotular três tubos de ensaio: **A, B, AB**;
2. Nos tubos adequadamente rotulados, colocar uma gota dos soros anti-A, anti-B e anti-AB, respectivamente;
3. A cada tubo acrescentar uma gota de suspensão de hemácias da amostra = 50µL, sendo essa suspensão a 5% em soro fisiológico;
4. Agitar os tubos e centrifugar adequadamente (1.000 rpm durante um minuto ou 3.400 rpm durante 15 segundos);
5. Fazer a leitura da aglutinação contra um fundo iluminado, ressuspendendo gentilmente o botão de aglutinação.

FIGURA 1 – Tipagem em tubo - prova direta

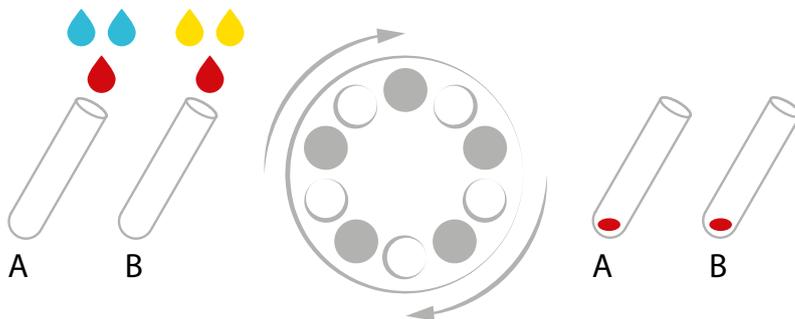


Fonte: Geoff Daniels, 2008.

Tipagem em tubo – prova reversa

1. Rotular dois tubos de ensaio com **a** e **b**;
2. Colocar duas gotas do soro da amostra = 100 µL a testar em cada tubo;
3. Adicionar ao tubo **a** uma gota de hemácias A₁ a 5% e, ao tubo **b**, uma gota de hemácias B a 5%;
4. Agitar os tubos e centrifugar adequadamente;
5. Fazer a leitura da aglutinação contra um fundo iluminado, ressuspendendo gentilmente o botão.

FIGURA 2 – Tipagem em tubo - prova reversa



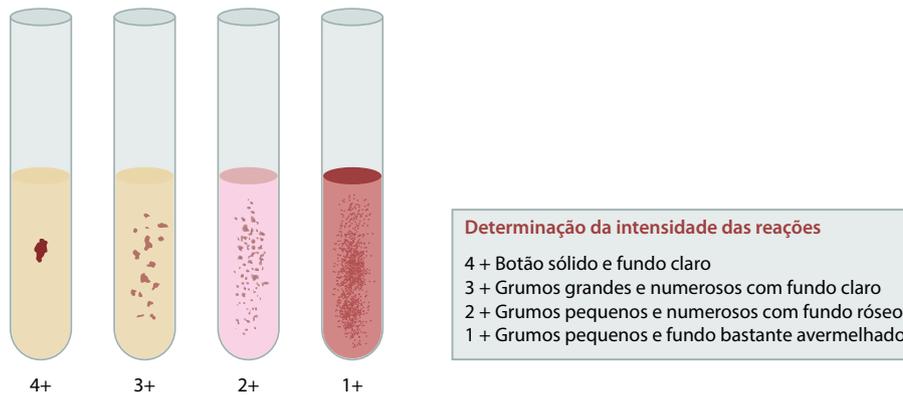
Fonte: Geoff Daniels, 2008.

FIGURA 3 – Interpretação dos resultados

	Soro Anti-A	Soro Anti-B	Soro Anti-A+B	Hemácia A	Hemácia B
Grupo A	○	●	○	●	○
Grupo B	●	○	○	○	●
Grupo AB	○	○	○	●	●
Grupo O	●	●	●	○	○

● Ausência de aglutinação ○ Presença de aglutinação

Fonte: Geoff Daniels, 2008.

FIGURA 4 – Quantificação da reação – intensidade

Fonte: Manual Tube Testing. Image created by Jaye Parsley <<http://emedicine.medscape.com/article/1731198-overview#aw2aab6b4>>.

Causas de discrepâncias na classificação ABO

Discrepância de classificação ABO ocorre quando o resultado na prova direta e na prova reversa são divergentes, ou seja, definem fenotipagens ABO diferentes entre si.

Problemas na prova direta

- ▶ Antígenos A e B fracos, em que os antígenos correspondentes só podem ser demonstrados por técnica de fixação e eluição, pela pesquisa de substâncias ABH na saliva, por estudo genético ou por pesquisa de transferases séricas;
- ▶ Poliaglutinação de hemácias, fenômeno imunológico em que um antígeno é exposto ou existe anormalmente na superfície da hemácia e é reconhecido por um anticorpo: anti-T, anti-Tn, etc.;
- ▶ Aglutinação inespecífica pela presença de geléia de Wharton em amostras de sangue de cordão. Aqui vale a pena lembrar que na determinação do grupo ABO em recém-nascidos só podemos realizar a classificação direta, porque os anticorpos naturais nesse momento ainda não são detectáveis;

- ▶ Rouleaux: é o empilhamento das hemácias tornando todas as reações falsamente positivas na determinação ABO, inclusive os controles. Ocorre em macroglobulinemias, nos mielomas, nas hiperfibrinemias.

Problemas na prova reversa:

- ▶ Subgrupo de A e AB com presença de anti-A₁;
- ▶ Presença de autoaglutinina fria na amostra;
- ▶ Ausência ou diminuição de anticorpos naturais anti-A e anti-B, como em recém-nascidos, idosos e imunodeprimidos;
- ▶ Presença de anticorpo irregular no plasma ou soro.

Capítulo 3 – Sistema Rh

O sistema Rh é o mais complexo dos sistemas eritrocitários e o 2º mais importante, depois do sistema ABO, na medicina transfusional. Foi descoberto em 1939, por Levine e Stetson, por meio de um caso de Doença Hemolítica Perinatal (DHPN). Uma mulher, ao dar à luz uma criança com anemia hemolítica, necessitou ser transfundida com o sangue ABO compatível de seu marido e, a seguir, apresentou reação transfusional grave. O soro dessa mulher aglutinava as hemácias do marido e de cerca de 80% dos doadores caucasianos também ABO-compatíveis. Na mesma época, Landsteiner e Wiener observaram que o soro de coelhos imunizados com hemácias do macaco Rhesus também aglutinava cerca de 85% das hemácias humanas. Inicialmente foi pensado que, nos dois casos, os anticorpos identificavam o mesmo antígeno na superfície das hemácias humanas e do macaco Rhesus (Ag Rh). Posteriormente, foi observado que não se tratava do mesmo antígeno, porém a nomenclatura Rh foi mantida para o sistema. O anticorpo do coelho (heteroanticorpo) passou a ser chamado de anti-LW e o anticorpo humano (aloanticorpo) foi renomeado como anti-D.

Antígenos

Os antígenos do sistema Rh são encontrados exclusivamente nas hemácias. São proteínas codificadas por um par de genes homólogos, *RHD* e *RHCE*. O gene *RHD* codifica a produção do antígeno *RhD* e o gene *RHCE*, a produção de dois pares de antígenos antitéticos: C, c, E, e. Embora o sistema apresente mais de 50 antígenos, apenas a classificação RhD, que se refere a presença ou ausência do antígeno RhD, deve ser realizada obrigatoriamente nas rotinas pré-transfusionais e em doadores de sangue.

A tabela 1 relaciona os principais antígenos do sistema, assim como ano de sua descoberta e prevalência em caucasianos.

TABELA 1 – Principais antígenos do sistema, ano de descoberta e prevalência em caucasianos

Antígenos	Ano de Descoberta	Prevalência em caucasianos (%)	Antígenos	Ano de Descoberta	Prevalência em caucasianos (%)
D	1939	85	Evans	1968	< 1
C	1941	70	Rh32	1971	< 1
c	1941	80	Rh33	1971	< 1
E	1943	30	Rh35	1971	< 1
E	1945	98	Hr ^B	1972	> 99
C ^w	1946	1	hr ^B	1972	98
Hr ₀	1950	> 99	Tar	1975	< 1
f	1953	64	Rh39	1979	> 99
Be ^a	1953	< 1	Rh41	1980	70
C ^x	1954	< 1	Rh42	1980	< 1
E ^x	1955	< 1	Crawford	1980	< 1
V	1955	< 1	Nou	1981	> 99
Go ^a	1958	< 1	Dav	1982	> 99
G	1958	85	Riv	1983	< 1
Ce(rh _i)	1958	70	FPIT	1988	< 1
Hr	1960	> 99	Sec	1989	> 99
hr ^s	1960	98	BARC	1989	< 1
VS	1960	< 1	JAL	1990	< 1
cE	1961	30	STEM	1993	< 1
CE	1961	< 1	LOCR	1994	< 1
C ^G	1962	70	MAR	1994	> 99
D ^w	1962	< 1	JAHK	1995	< 1
Rh26	1964	80	DAK	2003	< 1
hr ^{ll}	1964	< 1	CENR	2004	< 1
Rh29	1967	> 99			

Fonte: Geoff Daniels, 2008.

Como o sistema é complexo, diferentes pesquisadores formularam nomenclaturas diversas para seus antígenos e anticorpos. Na tabela 2 estão representadas as nomenclaturas propostas pela Sociedade Internacional de transfusão sanguínea (numérica), por Wiener e de Fisher e Race, e suas correspondências.

TABELA 2 – Nomenclaturas do sistema Rh

Nomenclatura numérica	Wiener Fenótipo	Fisher e Race Antígenos expressos
RH: 1,2,-3,-4,5	R ₁	C, D, e
RH:1,-2,3,4,-5	R ₂	c, D, E,
RH:1,-2,-3,4,5	R ₀	c, D, e
RH:1,2,3,-4,-5	R ₂	C, D, E
RH:-1,-2,-3,4,5	r	c, e
RH:-1,2,-3,-4,5	r'	C, e
RH:-1,-2,3,4,-5	r''	c, E
RH:-1,2,3,-4,-5	r ^y	C, E

Fonte: Geoff Daniels, 2008.

O antígeno RhD apresenta um extenso polimorfismo. Pode se apresentar como um antígeno com fraca expressão (D fraco) ou como um antígeno modificado (D parcial). Essas características muitas vezes só podem ser determinadas por estudos moleculares.

Esse polimorfismo causa dificuldades na classificação RhD. O reconhecimento de amostras com fraca expressão do antígeno RhD depende do método e da qualidade do reagente anti-D empregado. O surgimento dos reagentes monoclonais e o desenvolvimento das técnicas moleculares nos trouxeram grande contribuição para o esclarecimento dessas diferentes formas de expressão do antígeno RhD. Assim, mesmo apresentando-se enfraquecido ou parcial, o antígeno RhD pode determinar formação de anticorpos em indivíduos RhD negativos. Por outro lado, indivíduos classificados como positivo, apresentando o antígeno RhD parcial, também podem produzir anti-D se expostos ao antígeno RhD. Os reagentes monoclonais apresentam características específicas e, segundo o clone desenvolvido, reagem seletivamente com as diferentes variantes do antígeno RhD. A escolha do reagente apropriado conduzirá

a uma melhor definição da classificação RhD para pacientes e doadores. Em virtude de características tão particulares, a determinação do antígeno RhD é uma tarefa ainda difícil e merece atenção especial na escolha do reagente anti-D.

Os antígenos D fraco e D parcial

O antígeno D pode apresentar variações em sua expressão fenotípica devido a alterações em sua qualitativas e/ou quantitativas. Esses antígenos são globalmente denominados D variantes.

Antígenos D fraco

Os antígenos D fracos são variações quantitativas do antígeno RhD e todos os epítomos (regiões reconhecidas por anticorpos) estão íntegros na membrana eritrocitária, porém expressos fracamente.

As variações no antígeno, quando acontecem, são transmembranares ou intracelulares e por isso os indivíduos que possuem o fenótipo D fraco não produzem aloanticorpos anti-D. Nos testes sorológicos, os antígenos D fracos são detectados somente com o uso de potencializadores (antiglobulina humana ou enzimas), mas atualmente, com o uso dos reagentes monoclonais, aqueles que não apresentam uma densidade antigênica muito baixa são detectados por reação imediata, sem necessidade de potencializadores.

Antígenos D parciais

Os antígenos D parciais são caracterizados pela ausência de um ou mais epítomos da proteína D, que são substituídos por epítomos da proteína CcEe. Estas alterações ocorrem por alterações moleculares no gene RhD, que leva a substituições dispersas de aminoácidos nas alças extracelulares da proteína, em especial nas alças extracelulares. Vários epítomos apresentam-se alterados devido à presença de aminoácidos diferentes da proteína D normal. Dependendo do tipo de antígeno D a densidade antigênica varia. Alguns antígenos têm baixa densidade antigênica e, portanto, além de parcial, apresenta uma expressão fraca (D fraco Tipo 17), enquanto que outros apresentam uma densidade antigênica alta, semelhante ao antígeno D normal (D parcial tipo DIIIc).

Receptores de sangue ou gestantes que possuem antígenos D parciais podem se sensibilizar caso sejam expostos aos antígenos D positivo. Por isso cada vez mais se investe na obtenção de reagentes que sejam capazes de realizar a detecção de todos esses antígenos D variantes.

A tabela 3 relaciona diferentes antígenos D parcial, demonstrando os epítomos alterados.

TABELA 3 – Antígenos D parcial epítomos presentes e ausentes

D Parcial	Epítomos Presentes	Epítomos Ausentes
II	1, 2, 3, 5, 6/7, 8	4, 9
III	1, 2, 3, 4, 5, 6/7, 8, 9	-
IVa	4, 5, 6/7, 8	1, 2, 3, 9
IVb	5, 6/7, 8	1, 2, 3, 4, 9
Va	2, 3, 4, 6/7, 8, 9	1, 5
VI	3, 4, 9	1, 2, 5, 6/7, 8
VII	1, 2, 3, 4, 5, 6/7, 9	8

Fonte: Imelda Bromilow, 2007.

Anticorpos

Os anticorpos do sistema Rh, em especial o anti-D, não são naturais. Eles são produzidos a partir de um estímulo imunológico, seja a gestação de um feto RhD positivo, ou transfusão de um componente RhD positivo. Eles são de natureza IgG, ativos a 37 °C e são melhor detectados por meio da utilização da anti-globulina humana ou por meio da utilização de painéis de hemácias tratadas por enzimas proteolíticas. Como são IgG, atravessam a barreira placentária e estão envolvidos em casos de doença hemolítica perinatal. Esses anticorpos não fixam complemento e a destruição das hemácias é extracelular, podendo estar associados a casos de reação transfusional por destruição das hemácias no meio extravascular.

Considerações sobre a classificação RhD

A classificação rotineira do RhD refere-se somente a presença ou ausência do antígeno RhD. Contrariamente ao sistema ABO, não há prova reversa, pois os indivíduos não apresentam naturalmente anticorpos séricos contra o antígeno RhD.

A classificação RhD inicialmente era baseada na presença ou ausência de aglutinação frente ao reagente anti-D policlonal à temperatura ambiente (TA). Assim era estabelecido se o indivíduo era Rh positivo ou negativo. A variante fraca do antígeno era pesquisada nos casos de resultados negativos à temperatura ambiente, por meio do emprego da antiglobulina humana (AGH). Frente a um resultado positivo apenas com a antiglobulina humana, a tipagem RhD era liberada como Rh negativo D^u positivo. Atualmente o termo correto é antígeno D positivo fraco. Sua frequência era estabelecida por meio desses critérios e variável de acordo com a população estudada. Estimava-se que 0,1%–1% de caucasianos apresentava o antígeno D fraco.

No cenário mundial a produção de reagentes anti-D policlonais vem sendo descontinuada devido ao fato de que a fonte destes reagentes é humana. Os programas de prevenção da aloimunização eritrocitária, assim como a restrição aos programas de aloimunização remunerada, diminuíram consideravelmente a disponibilidade de doadores sensibilizados. Acrescido a esse fato, é consenso que fontes de soro humano contendo anti-D devem ser reservadas para a produção de imunoglobulinas para tratamento e prevenção de diversas patologias, entre elas a Doença Hemolítica Perinatal. O desenvolvimento dos reagentes monoclonais para tipagem sanguínea trouxe grande contribuição ao arsenal imuno-hematológico. Hoje esses reagentes vêm substituindo os reagentes policlonais com total eficácia.

Os anticorpos monoclonais são projetados em laboratório para reconhecer especificamente marcadores proteicos especiais na superfície das hemácias

Os reagentes monoclonais anti-D são de origem humana e, dependendo do clone, podem ser IgG ou IgM. Eles são comercializados separadamente (Reagente IgG ou IgM) ou em misturas de clones (IgG + IgM). Esses reagentes com mais de um clone apresentam grande probabilidade de detectar a maioria dos antígenos D variantes.

Uma boa escolha do reagente a ser utilizado na prática laboratorial é essencial para resultados adequados. É importante a identificação de reagentes monoclonais com abrangência bem estabelecida, pois certamente eles virão a substituir os reagentes policlonais.

Existe uma grande preocupação em relação ao antígeno D parcial VI. Indivíduos com esse fenótipo são susceptíveis à formação de anti-D quando expostos ao antígeno RhD, pois esses antígenos possuem múltiplas alterações em seus epítomos.

Muitos laboratórios escolhem os reagentes baseados na capacidade de detecção ou não do antígeno D VI. É recomendável a utilização de dois diferentes reagentes. Um deve detectar e o outro não deve detectar a variante DVI. Na técnica de gel-teste, muitos cartões para a classificação já apresentam dois microtubos contendo diferentes reagentes anti-D. Já estão também disponíveis no mercado antissoro anti-D líquidos com diferentes clones, podendo ser adquiridos reagentes compostos por mistura de clones ou reagentes apresentando apenas um clone IgG ou IgM. Alguns cartões

A tabela 4 relaciona alguns clones anti-D, o(s) epítomos por eles identificados e a capacidade de detecção da Variante DVI.

TABELA 4 – Clones anti-D e os epítomos identificados

Clone	Tipo	Epítomo	DVI
ESD-1	IgG	9	+
MS-26	IgG	3/9	+
175-2	IgM	6/7	-
MS- 201	IgM	6/7	-
LDM3	IgM	6/7	-
TH28	IgM	6/7	-
RUM1	IgM	6/7	-
LDM1	IgM	6/7	-

Fonte: Imelda Bromilow, 2007.

Uma classificação correta da presença ou ausência do antígeno RhD e de suas variantes na membrana eritrocitária de um indivíduo é de grande importância, pois o antígeno RhD é o mais imunógeno em relação aos demais antígenos eritrocitários conhecidos.

Etapas importantes na classificação RhD:

1. Escolher o reagente anti-D de acordo com a sua aplicação (doadores ou pacientes);
2. Conhecer seu clone e sua abrangência;
3. Utilizar o reagente controle quando estiver preconizada sua utilização;
4. Pesquisar a variante fraca sempre que o resultado inicial for negativo;
5. Não liberar o resultado em caso de dúvida e sempre que o controle de RhD for positivo;
6. Se possível, usar dois reagentes com clones diferentes (IgG e IgM);
7. Seguir as diretrizes estabelecidas na Portaria GM/MS nº 2712/2013.

Sugestão de Técnica em tubos de hemólise:

1. Identificar dois tubos de ensaio, como RhD e CTL;
2. No tubo identificado como RhD, colocar uma gota do reagente anti-D e, no tubo identificado como CTL, uma gota do reagente Controle de RhD;
3. Aos dois tubos adicionar uma gota de suspensão de GV a 3%– 5% em solução salina;
4. Homogeneizar e centrifugar os dois tubos a 3400 rpm por 15 segundos;
5. Ressuspender o sedimento, agitando delicadamente os tubos, e ler macroscopicamente a aglutinação;
6. Se o teste for negativo (aglutinação ausente), proceder conforme indicado no teste para pesquisa de RhD fraco.

FIGURA 1 – Técnica para tipagem RhD

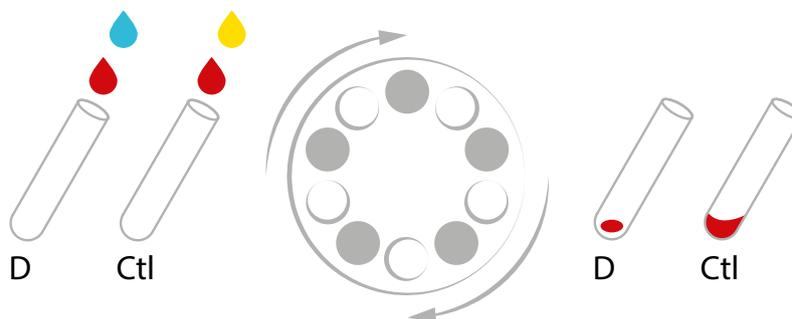


Ilustração: Shirley Lopes de Castilho

Pesquisa da variante fraca do antígeno D:

1. Incubar ambos os tubos (D e CTL) por 15 minutos em banho-maria a 37 °C;
2. Lavar os glóbulos vermelhos (GV) de cada tubo três vezes, em solução salina fisiológica;
3. Decantar completamente por inversão rápida dos tubos, após a última lavagem;
4. A cada tubo, acrescentar duas gotas de soro antiglobulina humana de amplo espectro ou soro de Coombs;
5. Centrifugar a 3.400 rpm por 15 segundos;
6. Ressuspender o “botão” de GV, por agitação delicada, e examinar para aglutinação macroscópica;
7. Anotar os resultados.

FIGURA 2 – Técnica para pesquisa do antígeno D fraco

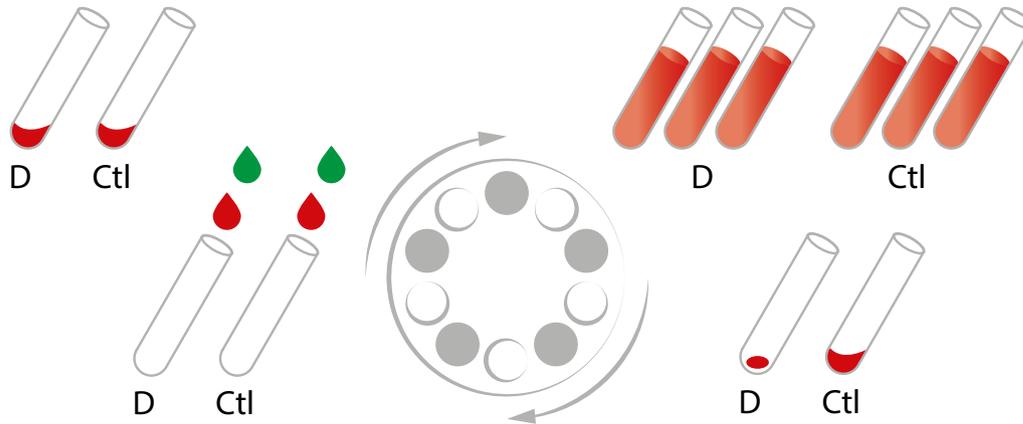


Ilustração: Shirley Lopes de Castilho

Interpretação dos resultados

Havendo ausência de aglutinação em ambos os tubos (item 5), classifica-se o sangue como RhD negativo.

Quando ocorre aglutinação apenas no tubo marcado D (item 5), o sangue deve ser classificado como RhD positivo fraco.

Se ambos os tubos, D e CTL, aglutinarem, não considerar o indivíduo como RhD positivo. Nesse caso, considerá-lo como tendo um teste de Coombs direto positivo, provavelmente por sensibilização de seus GV por autoanticorpos.

Caso não haja tempo de realizar estudos mais aprofundados, na vigência de uma transfusão de urgência, escolher para essa transfusão hemácias RhD negativo.

FIGURA 3 – Interpretação da tipagem RhD

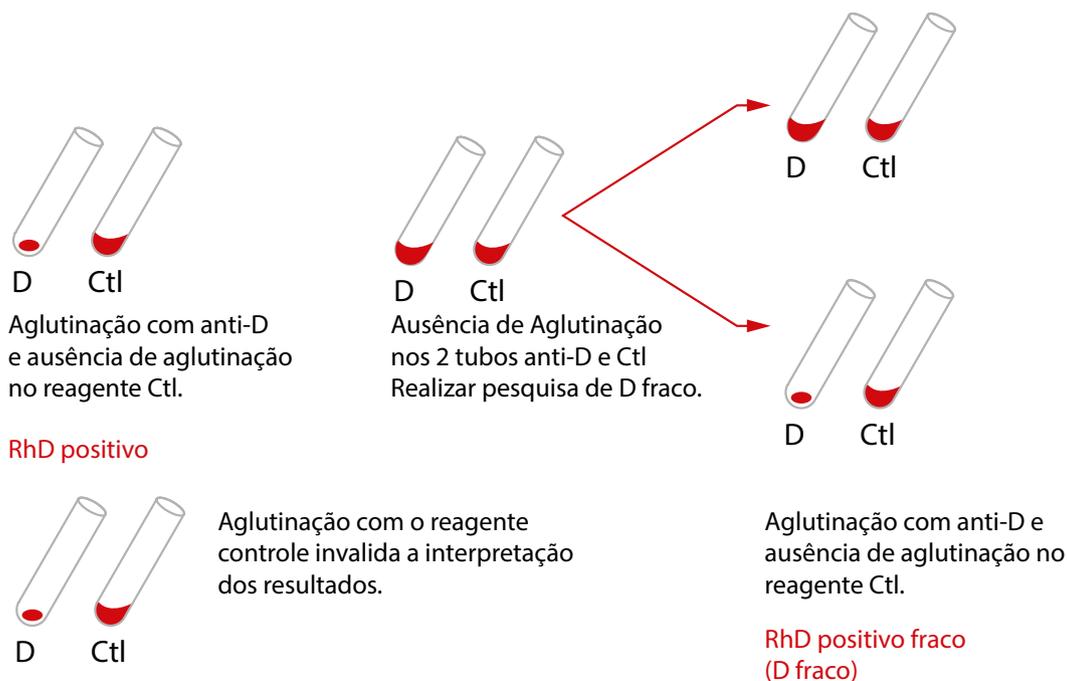


Ilustração: Shirley Lopes de Castilho

FIGURA 4 – Fluxograma de Interpretação

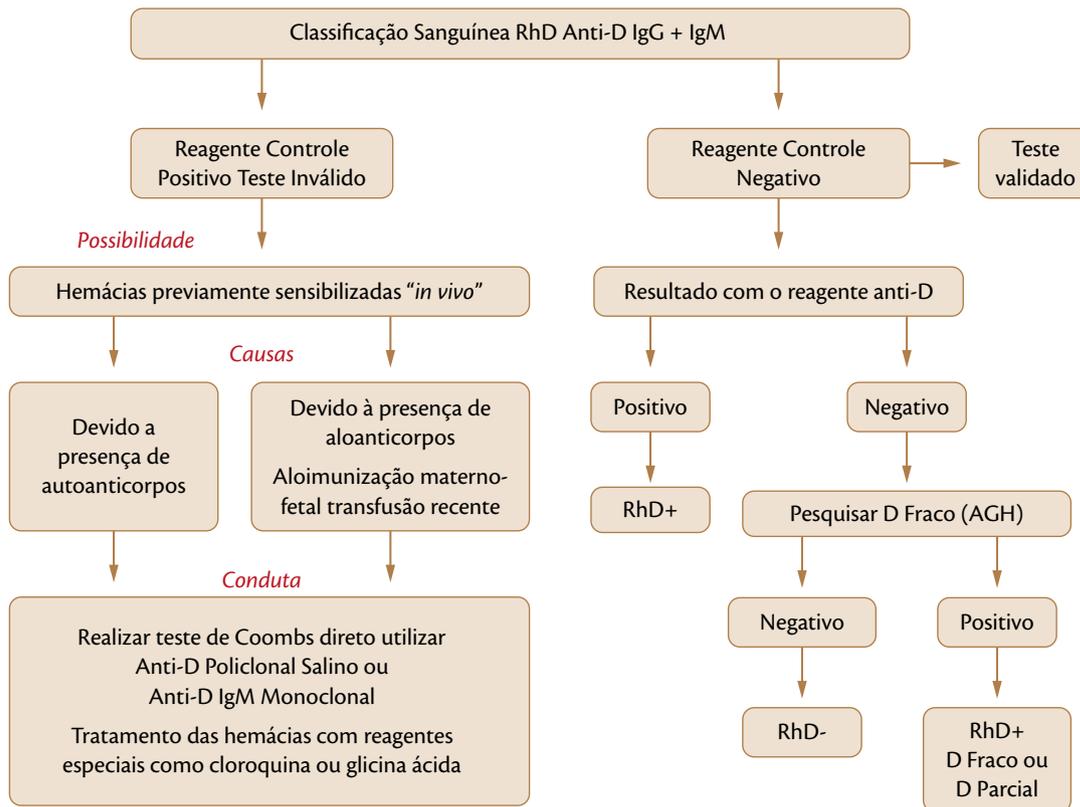
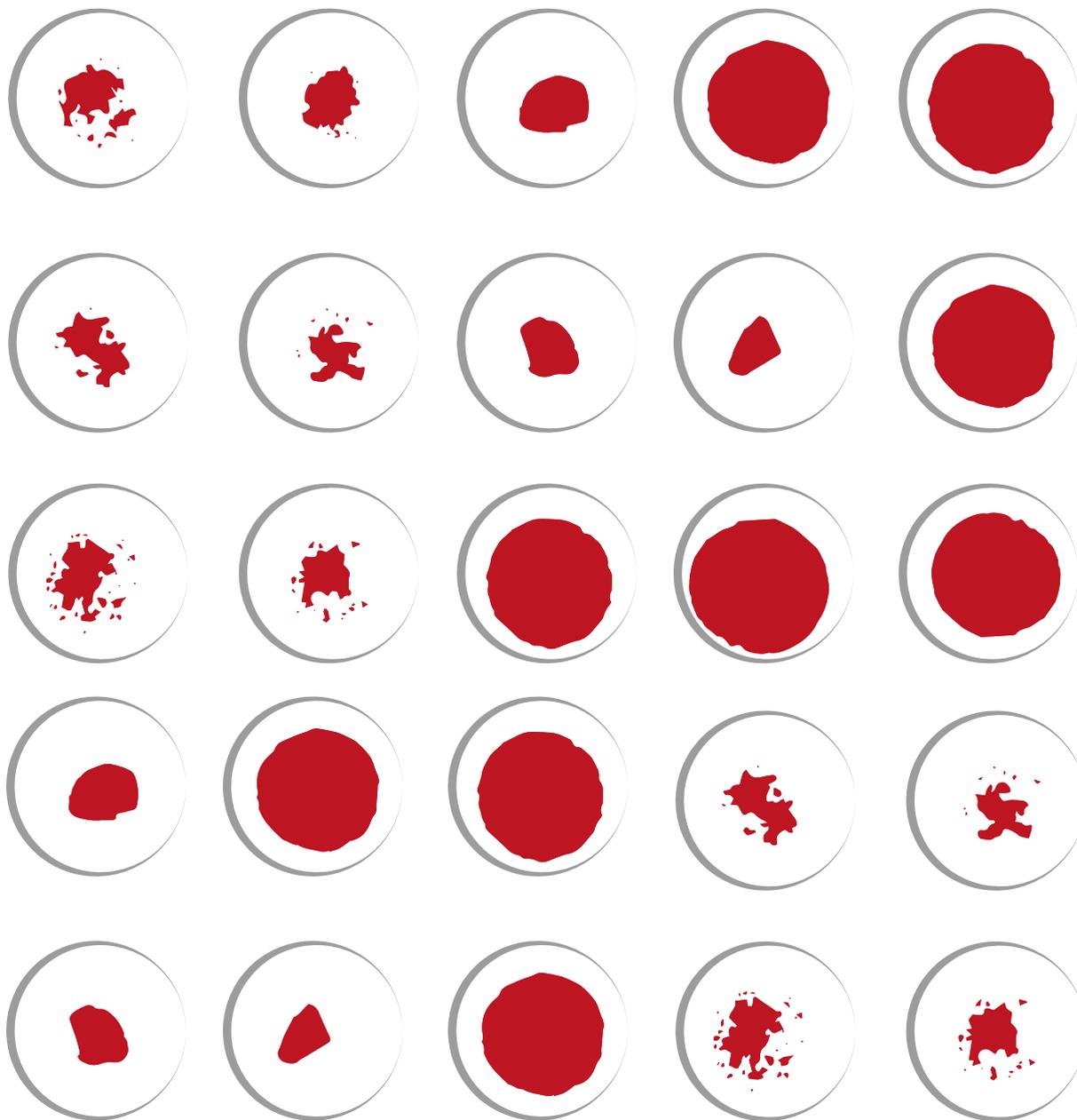


Ilustração: Shirley Lopes de Castilho



Capítulo 4 – Teste de Antiglobulina

Introdução

Coombs, Mourant e Race descreveram em 1945 o *teste da antiglobulina indireta* (TAI). Técnica que, apesar de ter sido previamente demonstrada por Moreschi em 1908, não havia sido divulgada na época. O teste permitia a detecção no soro de anticorpos não aglutinantes do sistema Rh, utilizando o soro antiglobulina humana (TAI). Os mesmos autores demonstraram posteriormente em recém-nascidos com doença hemolítica perinatal (DHPN), hemácias sensibilizadas por anticorpos anti-D. Para tanto, utilizaram o soro antiglobulina em uma técnica que futuramente passou a ser denominada *teste da antiglobulina direto* (TAD).

A utilização do soro antiglobulina humana, na avaliação imunológica eritrocitária, pode ser considerada como a mais importante descoberta da medicina transfusional, depois do sistema de grupo sanguíneo ABO. A facilidade de execução do teste antiglobulina e a informação diagnóstica que fornece contribuíram para sua utilização em larga escala até os dias de hoje.

Teste da antiglobulina direto (TAD)

O TAD é considerado um método simples, que permite detectar hemácias revestidas *in vivo* por imunoglobulinas e/ou frações do complemento.

A realização do teste depende do soro antiglobulina humana (AGH), que pode ser obtido a partir da sensibilização de animais com globulinas humanas e/ou anticorpos monoclonais. Soros monoespecíficos (anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C3, anti-C3d) e poliespecíficos (anti-IgG associado a anti-C3d) são disponíveis comercialmente.

O TAD caracteriza-se pela reação de hemácias diretamente com o soro AGH. Na técnica em tubo, a lavagem de hemácias é importante para remover todo o resíduo de plasma, anticorpos livres e outras proteínas do meio, evitando um resultado falso negativo com a neutralização do soro AGH. As antiglobulinas combinam-se preferencialmente com a porção Fc das moléculas de anticorpos ligadas às hemácias, e os sítios Fab formam pontes entre os anticorpos produzindo uma aglutinação visível (figura 1). As células que não apresentam anticorpos ligados não são aglutinadas.

O teste da antiglobulina pode detectar de 100 a 400 moléculas de IgG por hemácia e de 350 a 1100 moléculas de C3d por hemácia. A investigação laboratorial deve prosseguir quando o TAD realizado com o soro AGH poliespecífico é positivo. Nessa situação, utilizar soros AGH monoespecíficos e a técnica de eluição do anticorpo, visando a melhor caracterização da proteína ligada à membrana da hemácia. O procedimento de eluição caracteriza-se pela remoção de anticorpos da membrana das hemácias sensibilizadas por meio de diferentes técnicas, como calor (56 °C), congelamento, solventes orgânicos (clorofórmio, éter) e meio ácido (glicina-HCl / EDTA, digitonina ácida) (tabela 1).

TABELA 1 – Principais técnicas de eluição

Método	Características
Calor	Temperatura: 56 °C. Indicado na eluição de anticorpos do sistema ABO e anticorpos IgM; fácil execução.
Congelamento	Indicado na eluição de anticorpos do sistema ABO; necessita de pequenos volumes de amostra; fácil execução
Meio ácido	Boa capacidade de recuperação dos anticorpos removidos da hemácia; fácil execução.

Fonte: Tabela Modificada do Manual Técnico da AABB 17ed páginas 501 e 503.

Teste da antiglobulina direto e complemento

Frações do complemento podem se ligar às hemácias “*in vivo*” ou “*in vitro*”. Anticorpos ligados a antígenos eritrocitários formam imunocomplexos capazes de ativar a via do complemento. O outro mecanismo descrito está relacionado a complexos imunes inespecíficos, presentes no plasma e adsorvidos pela membrana da hemácia. Nesse caso, a via do complemento nem sempre é ativada.

As hemácias ligadas ao complemento geralmente são hemolisadas. Entretanto, nas situações em que a cascata não é ativada, frações como C3 e raramente C4 podem ser detectadas por reagentes anticomplemento, sem evidência de hemólise.

O TAD dificilmente identifica anticorpos anti-IgM, em parte porque essas moléculas são pentâmeros e podem dissociar-se durante o processo de lavagem. Outro fator que contribui para isso está relacionado à baixa atividade dos soros anti-IgM, presentes nos reagentes comerciais. Os anticorpos IgM ativam a via do complemento; assim, C3 pode ser detectado na superfície da hemácia mesmo após procedimentos de lavagem.

Avaliação do teste da antiglobulina direto

Os eritrócitos normais podem apresentar-se na membrana IgG e frações do complemento aderidos de forma inespecífica e em quantidades tão pequenas (inferiores a 100 moléculas/hemácia) que não são detectados por meio de um TAD de rotina. Sabe-se que acima de 100 moléculas de IgG e de aproximadamente 400 de complemento por eritrócito é usual a positividade do TAD, e que esse resultado é mais forte quanto maior for o número de moléculas que revestem a hemácia. Não existe uma relação direta entre um TAD positivo e hemólise. Assim, o resultado do TAD deve ser analisado juntamente com a história clínica do paciente e com os resultados dos testes laboratoriais que investigam o quadro hemolítico. Alguns dados da história clínica, como o uso de medicamentos, antecedentes transfusionais e gestações, são fundamentais e poderão inclusive orientar a avaliação imuno-hematológica especializada. Em pacientes com TAD positivo que não apresentam evidências de hemólise, não existe a necessidade de prosseguir a investigação imunológica eritrocitária, exceto quando houver indicação de transfusão.

Aproximadamente 3% dos pacientes com hemólise imune possuem o TAD negativo. O valor preditivo do teste é de 83% em pacientes com anemia hemolítica e apenas de 1,4% em paciente sem hemólise.

O resultado do TAD positivo pode ser encontrado em pacientes recentemente transplantados, transfundidos e recebendo imunoglobulina intravenosa.

TABELA 2 – Principais causas de TAD positivo

Reação transfusional hemolítica:	<ul style="list-style-type: none"> – Aloanticorpos do receptor de uma transfusão recente reagem com antígenos presentes nas hemácias do doador. – Anticorpos presentes no plasma do doador reagem com antígenos nas hemácias de um receptor de transfusão.
Drogas (medicamentos):	<ul style="list-style-type: none"> – <i>Anticorpos “drogas dependentes”</i>: Anticorpo IgG e complemento podem ser detectados na membrana da hemácia quando a droga participa da reação. Exemplos: penicilinas e cefalosporinas. – <i>Anticorpos “drogas independentes”</i>: Droga induz à formação de um anticorpo indistinguível dos autoanticorpos encontrados nas AHAI. Não é necessária a adição da droga “in vitro” para a detecção do anticorpo. Exemplos: metildopa e fludarabine.
Anemia hemolítica autoimune (AHAI):	<ul style="list-style-type: none"> – AHAI “a quente”: autoanticorpos IgG e/ou C3 reagem “in vivo” com hemácias. – Doença da aglutinina a frio : autoanticorpos IgM e complemento ligam-se às hemácias na circulação periférica e podem ser posteriormente eluídos em áreas mais aquecidas, restando apenas o complemento aderido à hemácia. – Hemoglobinúria paroxística ao frio: autoanticorpos IgG reagem com hemácias na periferia e podem posteriormente ativar a via do complemento.
Doença hemolítica perinatal (DHPN)	<ul style="list-style-type: none"> – Aloanticorpos maternos (IgG) atravessam placenta e reagem com hemácias fetais.
Proteínas adsorvidas / Não específicas:	<ul style="list-style-type: none"> – Administração de globulina imune em altas doses: globulinas ligam-se à membrana das hemácias do receptor. – Hipergamaglobulinemia.

Ilustração: Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro

Indicações do teste da antiglobulina direto

O TAD é uma ferramenta importante no diagnóstico das anemias hemolíticas imunes, incluindo as anemias: hemolíticas autoimunes, hemolíticas induzidas por drogas e as hemolíticas aloimunes (doença hemolítica perinatal e reação hemolítica transfusional) (tabela 2).

Anemias hemolíticas autoimunes

A anemia hemolítica autoimune (AHAI) é caracterizada pela redução da sobrevivência eritrocitária, consequência da ligação de imunoglobulinas e/ou complemento na membrana da hemácia. Nas AHAI, o TAD é positivo, acompanhado de eluato reativo e sem especificidade. Apenas 2% a 4% das hemólises imunes apresentam TAD negativo. Em aproximadamente 70% dos casos, o teste é positivo para anticorpos IgG e/ou associados a frações do complemento – são as chamadas anemias hemolíticas a quente. Nas anemias hemolíticas por anticorpos a frio, que representam de 15% a 30% dos casos, o TAD geralmente detecta a presença de frações do complemento. Nas anemias hemolíticas mistas, aproximadamente 8% dos casos, o TAD detecta a presença de IgG e C3 (Tabela 3).

TABELA 3 – Classificação laboratorial das anemias hemolíticas autoimunes

AHAI	DAT	Eluato
AHAI a quente	IgG ou IgG+C3	IgG
Doença da aglutinina a frio	C3	Negativo
AHAI mista	IgG+C3	IgG
Hemoglobinúria paroxística a frio (hemolisina bifásica)	IgG; C3; C3d	Negativo

Fonte: Tabela Modificada do Manual Técnico da AABB 17ed páginas 501 e 503.

Anemias hemolíticas induzidas por drogas (medicamentos)

Drogas raramente causam anemia hemolítica imune (AHI). Estima-se uma incidência de um caso em um milhão de indivíduos.

A maioria dos medicamentos possui baixo peso molecular e, portanto, não apresentam imunogenicidade. Entretanto, diversas drogas podem causar hemólise e numerosas teorias têm sido propostas para explicar como a droga induz à resposta imune e qual a relação dessa resposta com a presença do TAD positivo e com a hemólise. Abaixo, a classificação mais aceita para a AHI induzida por medicamentos:

(1) Anticorpos dependentes da droga – nesse caso, anticorpo IgG e complemento – podem ser detectados na membrana da hemácia “*in vitro*” quando a droga participa da reação (figura 2). Nessa condição, o TAD é positivo quando realizado com soro anti-IgG e anticomplemento. O eluato e os anticorpos presentes no soro reagem somente com hemácias tratadas pela droga ou na presença de solução contendo a droga. Exemplos: penicilinas, quinidina, cefalosporinas.

(2) Anticorpos independentes da droga. Nesse caso não é necessária a adição da droga “*in vitro*” para a detecção do anticorpo. Exemplos: metildopa e fludarabine. Essas drogas induzem à formação de um anticorpo indistinguível dos autoanticorpos encontrados nas AHAI. A mais importante droga nessa categoria é a (alfa) α metildopa. Aproximadamente 10% a 35% dos pacientes que utilizam o medicamento apresentam resultado do TAD fortemente positivo pela presença de moléculas de IgG na membrana da hemácia. Nesse caso os anticorpos presentes no soro e no eluato reagem a 37 °C com eritrócitos homólogos na ausência da droga.

As cefalosporinas também podem acarretar um TAD positivo em aproximadamente 5% dos pacientes, devido à adsorção não específica de proteínas do plasma na membrana eritrocitária.

O TAD apenas está indicado em pacientes que apresentam história de ingestão de drogas, que podem induzir à formação de anticorpos antieritrocitários na vigência de quadro clínico de hemólise.

Anemias hemolíticas aloimunes

Doença hemolítica perinatal

A doença hemolítica perinatal (DHPN) caracteriza-se pela redução da sobrevivência de hemácias fetais, decorrente de um quadro de hemólise imune desencadeado pela ligação de anticorpos de procedência materna com antígenos fetais herdados do pai. Os anticorpos da classe IgG atravessam a placenta e atingem a circulação fetal. A forma mais grave da DHPN é decorrente da aloimunização RhD, ou seja, mãe RhD negativa com filhos RhD positivos. A DHPN pelo sistema ABO é praticamente limitada às mães do grupo sanguíneo O, com filhos do grupo A ou B, e que possuem predomínio de anticorpos anti-A e anti-B da classe IgG. Geralmente o quadro clínico é moderado e raramente responsável pela morte do recém-nascido. Vários outros anticorpos podem estar associados com DHPN de gravidade variável, como anti-C, c, E, e, K1, Fy^a, M, Jk^a, Di^b.

Reações hemolíticas transfusionais

A reação hemolítica transfusional (RHT) caracteriza-se pela destruição de hemácias transfundidas como consequência de uma incompatibilidade imunológica. A RHT pode ocorrer quando hemácias com um determinado antígeno são transfundidas em pacientes previamente aloimunizados contra este antígeno específico ou quando um paciente recentemente transfundido produz um novo aloanticorpo.

Na investigação das RHT, deve-se coletar uma amostra para realização do TAD imediatamente após a reação. O resultado do teste pode ser positivo, se as hemácias sensibilizadas não forem destruídas, ou negativo, caso ocorra hemólise com rápida eliminação das hemácias sensibilizadas da circulação.

Teste da antiglobulina indireto (TAI)

O TAI tem como objetivo determinar a sensibilização de hemácias “*in vitro*”. O teste é largamente empregado na investigação imuno-hematológica para a detecção e identificação de anticorpos incompletos (não aglutinantes) de importância clínica no soro de doadores e pacientes, na fenotipagem eritrocitária e titulação de anticorpos incompletos (tabela 4). O método para a detecção de anticorpos antieritrocitários irregulares deve incluir uma fase de incubação a 37 °C, para facilitar a ligação do anticorpo ao antígeno eritrocitário e a utilização do soro de antiglobulina humana (AGH). A AGH poliespecífica contém atividade anti-IgG e anti-C3. A indicação de anti-IgG monoespecífica versus poliespecífica em testes pré-transfusionais ainda é motivo de discussão entre os especialistas. A maioria dos anticorpos clinicamente significativos, detectados durante a investigação imuno-hematológica transfusional, são da classe IgG, o que poderia justificar a utilização do soro anti-IgG monoespecífico, evitando assim reações positivas não desejáveis (falso positivo). Entretanto a utilização do soro poliespecífico pode proporcionar a detecção de anticorpos capazes de ativar a via do complemento.

TABELA 4 – Aplicações do teste da antiglobulina indireto (TAI)

Testes	Sensibilização “ <i>in vitro</i> ”
Detecção de anticorpos antieritrocitários:	– Pesquisa de anticorpos antieritrocitários irregulares (PAI): anticorpos reagem com reagentes eritrocitários / triagem. – Prova cruzada: anticorpos do receptor reagem com hemácias do doador.
Identificação de anticorpos antieritrocitários:	– Painel de hemácias: anticorpos reagem com hemácias do painel.
Titulação de anticorpos:	– Anticorpos (diferentes diluições) reagem com hemácias selecionadas.
Fenotipagem eritrocitária:	– Detecção de antígenos eritrocitários (K, Fy, etc...) – Pesquisa de antígenos de fraca expressão.

Fonte: Tabela Modificada do Manual Técnico da AABB 17ed páginas 501 e 503.

TABELA 5 – Causas de erro no teste da antiglobulina humana

Resultados falsos positivos
– Amostra inadequada (não refrigerada, coagulada, contaminação bacteriana)
– Contaminação bacteriana da salina usada na lavagem
– Células autoaglutináveis
– Células com teste da antiglobulina direto positivo
– Salina contaminada por metais pesados ou sílica coloidal
– Anticorpos contaminantes no reagente antiglobulina humana
– Tubos de vidro sujos
– Centrifugação excessiva
Resultados falsos negativos
– Lavagem inadequada ou imprópria de células
– Reagente antiglobulina humana não reativo
– Reagente antiglobulina humana não adicionado
– Soro não adicionado no teste indireto
– Condições de incubação inadequada
– Suspensão de células muito diluída ou concentrada
– Pouca ou excessiva centrifugação
– Erro na leitura do resultado

Fonte: Maria de Lourdes Barjas-Castro.

Com o objetivo de se evitar resultados falso negativos no teste de antiglobulina indireto em tubo, deve-se utilizar o reagente de controle de antiglobulina humana (controle de Coombs), que é composto por hemácias sensibilizadas por anticorpos de classe IgG. Essas hemácias reagirão com o reagente antiglobulina humana do sobrenadante na fase final em um teste negativo. Após a adição do reagente controle e centrifugação (15 segundos a 3.500 rpm), o teste deverá se tornar positivo, significando que o resultado é verdadeiramente negativo. Se após a adição do controle, o teste continuar negativo este deverá ser repetido, pois se trata de um falso negativo que pode ter sido causado por algum dos motivos descritos na tabela 5.

Considerações finais

- ▶ Numerosos estudos efetuados nas últimas décadas demonstraram que o TAD:
 - Não deve ser incluído na avaliação imunológica eritrocitária de doadores de sangue;
 - Não deve fazer parte dos testes de rotina pré-transfusional de pacientes.
- ▶ O TAD deve ser realizado em:
 - Pacientes com suspeita de hemólise imune, com o objetivo de diagnóstico ou de monitorização terapêutica. Nessas situações o teste possui um alto valor preditivo;
 - Recém-nascidos, na presença de:
 - Aloanticorpos clinicamente significativos no soro materno;
 - Icterícia neonatal e anemia nos primeiros dias de vida.
- ▶ O TAD positivo não significa que o paciente apresenta anemia hemolítica imune e o teste negativo não exclui hemólise imune
- ▶ Todo paciente com TAD positivo deve ser submetido a criteriosa avaliação clínica.

FIGURA 1 – Hemácias sensibilizadas aglutinadas pelo soro antiglobulina humana

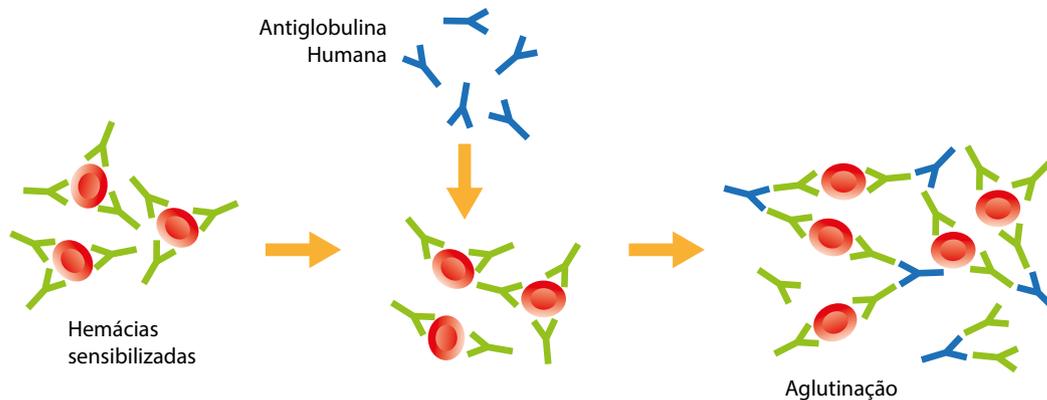


Ilustração: Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro

O teste da antiglobulina direto demonstra a ligação *in vivo* de hemácias com anticorpos, utilizando o soro antiglobulina humana (AGH).

FIGURA 2 – Anticorpos dependentes da droga – nesse caso, anticorpo IgG e complemento – podem ser detectados na membrana da hemácia quando a droga participa da reação. O eluato e os anticorpos presentes no soro reagem somente com hemácias tratadas pela droga ou na presença de solução contendo a droga

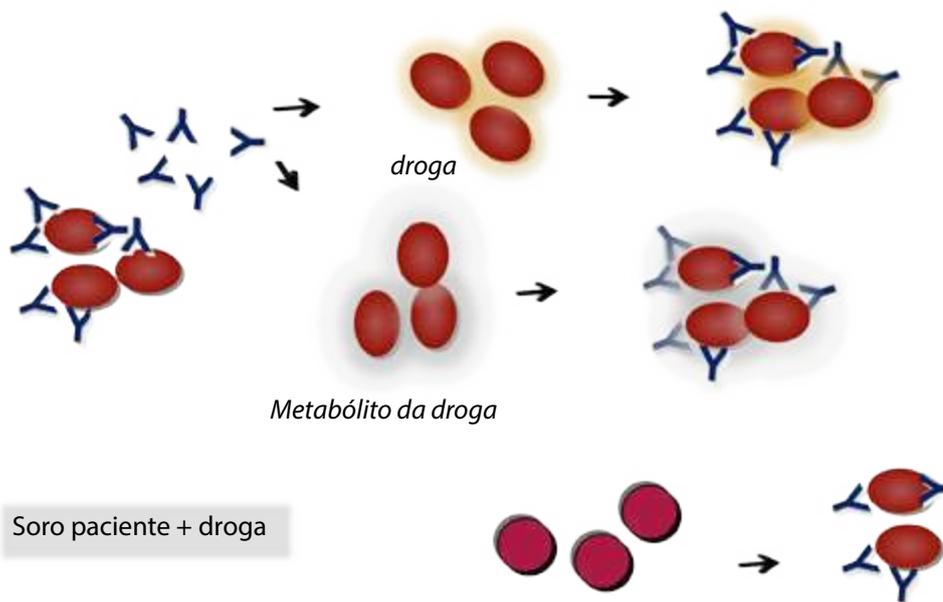


Ilustração: Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro

FIGURA 3 – Fluxo para investigação de anemia hemolítica imune (AHI) induzida por drogas (medicamentos)

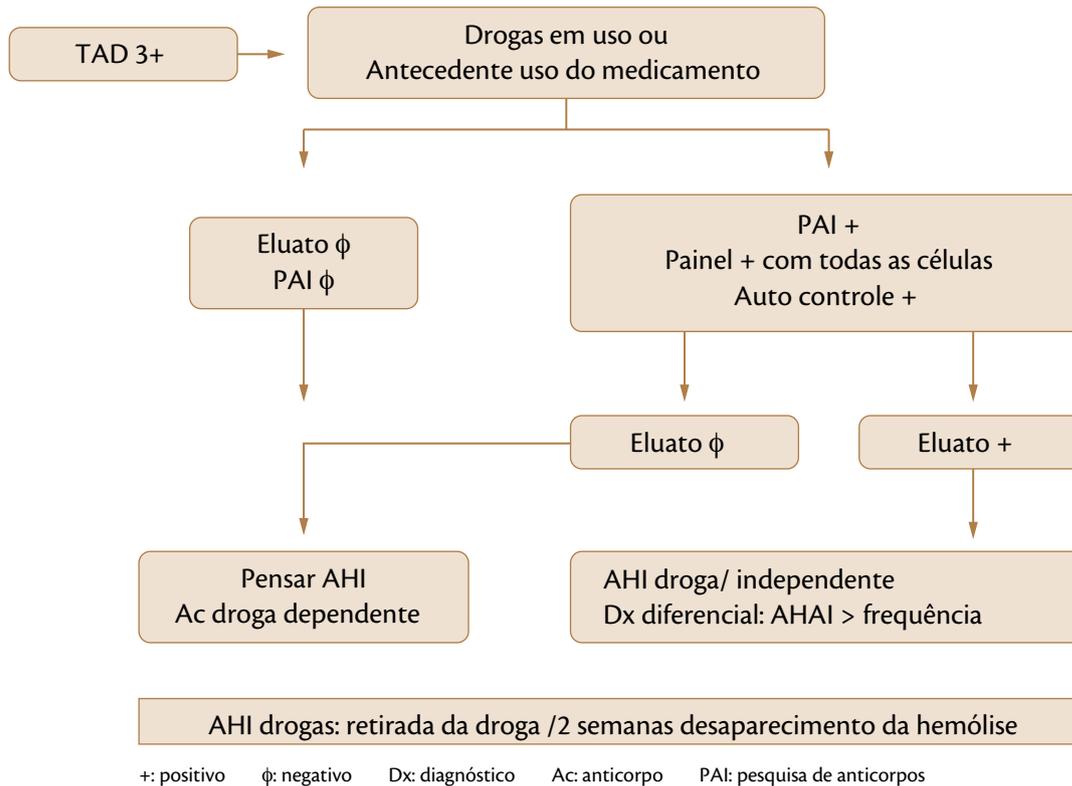
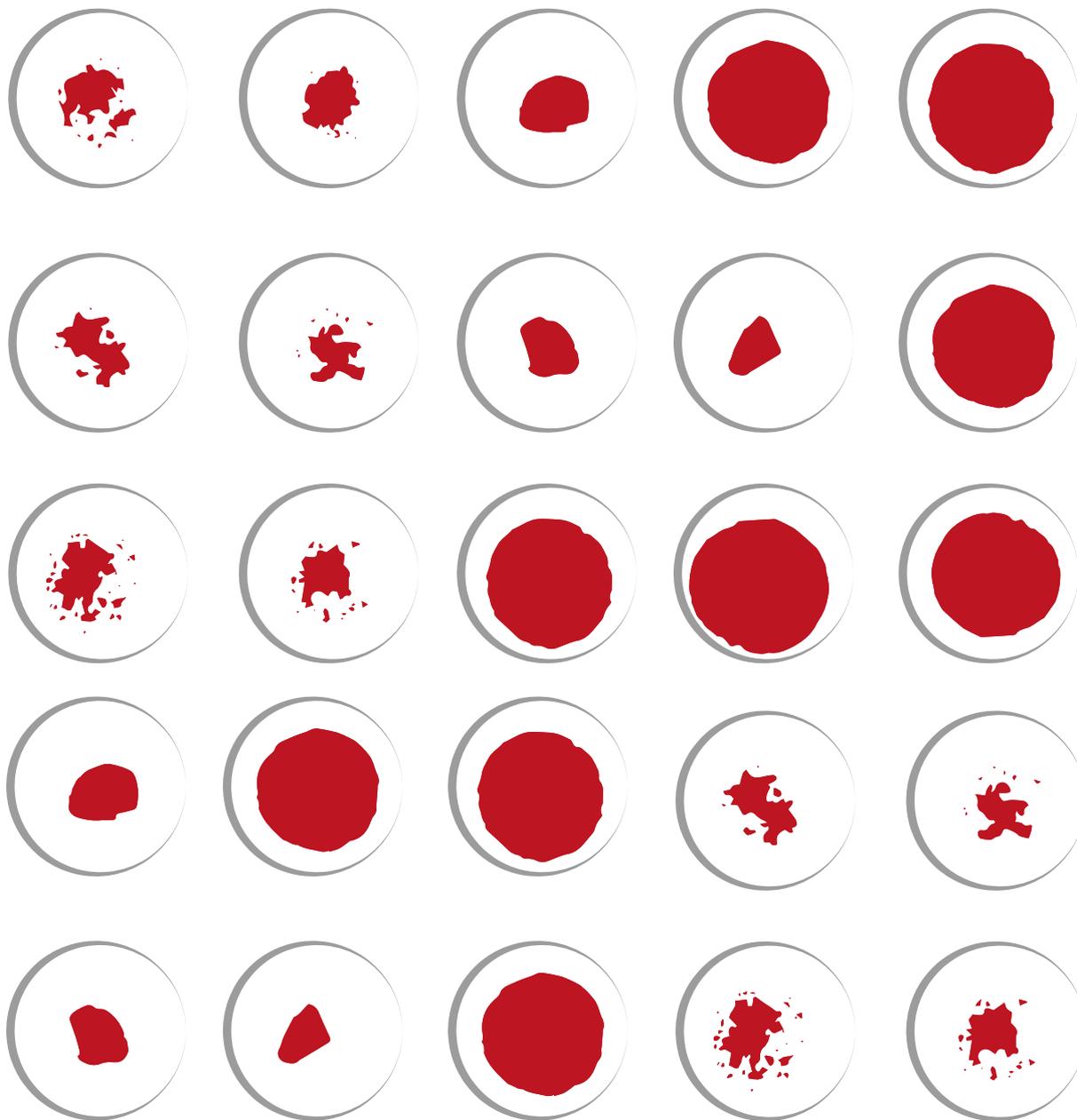


Ilustração: Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro



Referências

- AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Technical Manual**. 17th ed. Bethesda, MD, 2011.
- AVENT, N. D.; REID, M. E. The Rh blood group system: a review. **Blood reviews**, Edinburgh, v. 95, p. 375-387, 2000.
- BARJAS-CASTRO, M. L. Aplicações do teste de antiglobulina direta. In: BORDIN, J. O.; COVAS, D. T.; LANGHI, D. **Fundamentos em Hemoterapia**. São Paulo: Atheneu, 2006.
- BARROS, C. et al. Avaliação de Reagentes Anti-D na detecção dos antígenos D fraco e parcial. **Res. Bras. hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 269-274, 2006.
- BCSH BLOOD TRANSFUSION TASK FORCE. Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. **Transfusion medicine**, Oxford, v. 14, p. 59-73, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/fd337280474597529fcbdf3fbc4c6735/RDC_n%C2%BA_57.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 1 nov. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 13 nov.2013. Seção1.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução de problemas nos testes pré-transfusionais**: controle de qualidade dos reagentes. Brasília, 2001.
- CARRITT, B.; KEMP, T. J.; POULTER, M. Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 6, p. 843-850, 1997.
- DURAN J. A.; RODRIGUES, M. J. Teste de antiglobulina direta: ausência de significado clínico como teste pré-transfusional. **Revista ABO**, v. 1, p. 9-15, mar. 2000.
- EUROPEAN COMMITTEE. **Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components**. 16th Ed, 2013. Disponível em: <<http://www.edqm.eu/en/Guide-to-the-Preparation-Use-and-Quality-Assurance-of-Blood-Components-1586.html?mblID=116>>. Acesso em: 1 nov. 2013.

- FLEGEL, W. A. et al. On the complexity of D antigen typing: a handy decision tree in the age of molecular blood group diagnostics. **JOGC**, v. 29, n. 9, p. 746–752, 2007.
- GARRATTY, G. The significance of complement in immunohematology. **Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 1, p. 25- 56, 1984.
- DANIELS, Geoff. **Human Blood Groups**. 2nd. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
- HILLYER, C. D. et al. **Blood bank and transfusion medicine**. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2007.
- BROMILOW, Imelda. D ou não D: eis a questão (Diamed AG). **ABO**: revista de medicina transfusional, Lisboa, v. 31, Jul./Set. 2007.
- ISSIT, P. D. Review: the Rh blood group system: historical calendar. **Immunohematology**, Filadélfia, v. 21, n. 4, p. 141-145, 2005.
- JONES, J.; SCOTT, M. M.; VOAK, D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. **Transfusion medicine**, Oxford, v. 5, p. 171–184, 1995.
- MANNESIER M.; ROUBINET F. Detection of irregular anti-erythrocyte antibodies using the indirect antiglobulin test in a low-ionic-strength medium. Immunohematology Group of the French Blood Transfusion Society. **Transfusion Clin. Biol.**, v. 6, p. 174-179, 1999.
- MANUAL Tube Testing. Image created by Jaye Parsley. In: GONSORCIK, Victoria K. et al. **ABO Grouping**. 2013. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/1731198-overview#aw2aab6b4>>.
- NASCIMENTO, F. Teste de antiglobulina. Revista ABO, v. 1, p. 78, 2000.
- PETZ, L. D.; GARRATY, G. In **Immune Hemolytic anemia**. 2nd ed. [S.l.]: Ed Churchill Livingstone Elsevier, 2004.
- ROSENFELD, R. E. **Solid phase serology for the study of human erythrocyte antigen**: antibody reactions. Paris, 1976. Proc. Fifteen Congr. Int. Soc. Blood Trans.
- SIMPSON, P. P.; HALL, P. E. Teste de antiglobulina. In: HARMENING, D. M. **Técnicas modernas de banco de sangue e transfusão**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.
- SONNEBORN, H.H.; VOAK, D. A review of 50 years of the Rh blood group system. **Biotest bulletin**, v. 5, 389–552, 1997.

TELEN, M.J. Erythrocyte blood group antigens: polymorphisms of functionally importante molecules. **Seminars in hematology**, Orlando, v. 33, p. 302-314, 1996.

VAN KIM, C.; COLIN, Y.; CARTRON, J. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. **Blood reviews**, Edinburgh, v. 20, p. 93-110, 2006.

WAGNER, F. F. et al. Molecular basis of weak D phenotypes. **Blood reviews**, Edinburgh, v. 93, 385-393, 1999.

WESTHOFF, C.M. (2007) The structure and function of the Rh antigen complex. **Seminars in hematology**, Orlando, v. 44, p. 42–50, 2007.

YATES, J. et al. IgG anti-Jka/Jkb antibodies are unlikely to fix complement. **Transfusion Med.**, v. 2, p. 133-140, 1998.

ISBN 978-85-334-2160-8



9 788533 421608

DISQUE SAÚDE

136

Ouvidoria Geral do SUS

www.saude.gov.br

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde

www.saude.gov.br/bvs



Ministério da
Saúde