

Técnicas empregadas na rotina laboratorial imunohematológica para a identificação da Anemia Hemolítica Autoimune

*Immuno hematology techniques used into laboratory routine to identify
Autoimmune Hemolytic Anemia*

Hadassa Krystyane de Novais Reis

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

RESUMO: A Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) é uma doença caracterizada pela presença de autoanticorpos que diminuem a sobrevivência dos eritrócitos. O seu prognóstico na rotina laboratorial imunohematológica é feito através do Teste de Antiglobulina Humana Direta (TAD) ou Teste de Coombs Direto (TCD), como também é conhecido. Porém devido a dificuldade de sensibilidade do teste, foram desenvolvidos outros métodos que apresentaram resultados satisfatórios. **Objetivo:** Observar os métodos utilizados na rotina laboratorial em pacientes com AHAI. **Conclusão:** Verificou-se a importância do emprego da variabilidade de testes imunológicos e moleculares para o melhor prognóstico e acompanhamento da doença autoimune.

Palavras-chave: *Anemia Hemolítica Autoimune, AHAI, Teste de Coombs Direto, TCD, Teste de Antiglobulina Humana Direta, TAD.*

ABSTRACT: The Hemolytic Autoimmune Anemia (HAA) is a disease characterized by the presence of antibodies that give less survival to the erythrocytes. This own prognostic into the immuno hematology laboratorial routine is made by the Direct Human Antiglobulin Test (DHAT) or Direct Coombs' Test (DCT), as it is known as well. However although the difficulty of sensibility on the test, were developed other methods that represents satisfactory results. **Objective:** Observe the methods used into the laboratorial routine on patients with HAA. **Conclusion:** Were checked the importance of use of molecular immunologic variability tests to have a better prognostic and also a better accompaniment of the autoimmune disease.

Key Words: *Hemolytic Autoimmune Anemia, HAA, Direct Coombs' Test, TCD, Direct Human Antiglobulin Test, DHAT.*

Introdução

As doenças causadas por anticorpos são de dois tipos: as que não são determinadas por antígenos específicos, mas pelo local da deposição de imunocomplexos; e as produzidas por autoanticorpos específicos contra determinado tipo de tecido ou célula. É nesse segundo tipo que se enquadra a Anemia Hemolítica Autoimune (GIRELLO E KÜHN, 2012).

As anemias hemolíticas autoimunes são fatores complicantes na rotina laboratorial imunohematológica, pois os autoanticorpos responsáveis pela doença interferem nas fenotipagens, identificação de aloanticorpos e testes de compatibilidade pré-transfusionais (GIRELLO E KÜHN, 2012).

O diagnóstico habitualmente é feito pelo Teste de Coombs direto, que quando positivo indica hemólise, porém o teste pode ser negativo em 2% a 4% dos casos, e falso negativo em 8%. Assim, outros testes mais sensíveis que o Coombs direto, devem ser realizados para a confirmação da anemia (RODRIGUES, 2013).

Este trabalho tem como objetivo analisar os métodos complementares ao teste ouro para o diagnóstico da anemia hemolítica auto imune.

1. Anemia Hemolítica Autoimune

A Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI) é uma doença caracterizada pela presença de autoanticorpos do Sistema Complemento (SC) e o Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), que são capazes de se ligar à antígenos dos eritrócitos provocando a destruição da célula (BOLDRIN, 2012).

As causas da AHAI não foram ainda explicadas, mas acredita-se em algumas hipóteses que podem justificar a manifestação da doença, como por exemplo: imunossupressão devido à ação viral; alteração dos antígenos causada por drogas e vírus; e também o desequilíbrio entre as células T facilitadoras e supressoras (FILHO, 2010).

A incidência da AHAI é de 0.8/100.00/ ano e sua prevalência em 17/100.000 na população dinamarquesa. Estudos mostram que nos últimos 14 anos a incidência dessa doença teve um aumento, principalmente em adultos, que em 25% a 30% dos casos se desenvolve para a cronicidade (RODRIGUES, 2013).

A AHAI se diferencia das outras anemias hemolíticas devido à presença de anticorpos antieritrocitários identificados pelo Teste da Antiglobulina

Humana direta (TAD) conhecido também como o Teste de Coombs Direto (TCD) (GIRELLO E KÜHN, 2012).

2. Teste de Antiglobulina Humana Direta (TAD)

O Teste de Antiglobulina (TAG) foi descrita por Coombs, Mourant e Race após o descobrimento dos anticorpos anti-Rh, o soro antiglobulina humana era utilizado para detectar os anticorpos Rh incompletos. Desde então, o TAG é o teste mais empregado na imunohematologia universalmente, sendo usado para identificar a sensibilização das hemácias, ajudando a diagnosticar por exemplo a doença hemolítica do recém-nascido e AHAI (GIRELLO E KÜHN, 2012).

O TAD tem a capacidade de identificar as hemácias sensibilizadas com os componentes do IgG e também com frações do complemento. Por ser um teste simples, rápido e barato, é o mais utilizado (CARMO, 2013).

Porém o resultado positivo isolado do TAD não significa necessariamente que o indivíduo apresentará hemólise. Isso depende da quantidade de moléculas de IgG adsorvidas às hemácias (GIRELLO E KÜHN, 2012).

Contudo um TAD negativo não exclui definitivamente a possibilidade de hemólise, pois as hemácias recobertas por complemento podem não aglutinar imediatamente, sendo necessária a incubação após a leitura. Além também da possibilidade da quantidade de ocorrência de imunoglobulinas ligadas aos eritrócitos estarem abaixo do limiar de sensibilidade estabelecido para a metodologia (GIRELLO E KÜHN, 2012).

O TCD apresenta sensibilidade limitada, cerca de 5%-10% dos pacientes apresentam resultados negativos (RODRIGUES, 2013). Esse fato ocorre devido a sensibilidade do TAD em tubo ter a necessidade de um mínimo de moléculas de IgG e C3d para serem detectadas (GIRELLO E KÜHN, 2012).

Tabela 1. Limitações do Teste de Antiglobulina Humana Direta

Sensibilidade TAD em tubo é estimada em:

- 200-500 moléculas de IgG
- 400-1.000 moléculas de C3d

Fonte: GIRELLO E KÜHN, 2012

Entretanto a metodologia de reação em coluna ou de gel (GT) mostra-se mais sensível que o método convencional (tubo) por não ser necessária a lavagem da amostra, o que aumenta a capacidade de detecção de anticorpos de baixa afinidade, podendo ser usado como alternativa em pacientes com Coombs negativo (BOLDRIN, 2012; GIRELLO E KÜHN, 2012).

Algumas técnicas mais sensíveis que o TCD foram desenvolvidas para avaliar os pacientes com AHAI com TAD negativo, e apresentaram resultados satisfatórios. A escolha do teste a ser usado ocorre conforme a reprodutibilidade dos resultados, facilidade de realização e menor toxicidade (RODRIGUES, 2013).

3. Demais técnicas

As técnicas mais sensíveis que o TCD utilizadas para quantificar o número de moléculas de IgG sobre a membrana dos eritrócitos são de custo elevado e de aplicação complexa. Szymanski et. al. Descreveram um TCD automatizado capaz de detectar 100-150 moléculas de IgG/GV, o estudo de Galili et. al. usaram a formação de rosetas de hemácias, já Jeje et. al fizeram uso do radioimunoensaio, enquanto outros autores têm utilizado o teste imunoenzimático para quantificar o número de IgG/GV (BRAGA, et. al.). O uso da Citometria de Fluxo (CF) na área de imunohematologia vem crescendo devido a sua precisão, reprodutibilidade e compatibilidade com os outros ensaios (BOLDRIN, 2012).

Além de detectar imunoglobulinas ligadas às RBC, a CF quantifica as moléculas de imunoglobulinas expressas na superfície das células, aumentando a sua importância no caso de Coombs negativo (RODRIGUES, 2013).

A técnica pode ser usada como alternativa para ser aplicada no diagnóstico da AHAI. A CF, em estudos apresentados, se mostrou mais sensível na detecção de C3d ligado a RBC e quando comparada ao TCD em tubo. Sua sensibilidade é de 30-40 moléculas por eritrócito (BOLDRIN, 2012).

Em 2009, o estudo de Shi Lin e col. Comparou os resultados obtidos da CF e do TCD na verificação dos autoanticorpos em pacientes com AHAI (BOLDRIN, 2012).

Tabela 2. Comparação de resultados do TAD e CF.

| Método | Sensibilidade para IgG | Sensibilidade para C3d |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| TCD em tubo | 70,2% | 36,8% |
| CF | 73,7% | 73,4% |
| Total de pacientes | 57 | |

Fonte: BOLDRIN, 2012

Existem alternativas mais sensíveis que o TCD e de custo mais baixos que os outros testes empregados tradicionalmente para avaliar a presença de autoanticorpos, como por exemplo o método manual direto de brometo de

hexadimetrina (PolybreneÓ) (TDP) e o teste imunoenzimático (enzyme-linked antiglobulin test – ELAT) (BOLDRIN, 2012).

O princípio do TDP é de que quando há sensibilização das hemácias por IgG, sua aproximação favorece a aglutinação e o agregado não se desfaz após o tratamento com o citrato de sódio (BRAGA, et. al.).

O teste manual direto é um teste auxiliar rápido que se realiza em menos de 10 minutos, de baixo custo e de sensibilidade superior ao TCD. Entretanto há desvantagens como a não detecção do complemento na superfície das hemácias, pode apresentar também baixa sensibilidade para detectar autoanticorpos específicos, por exemplo o auto anti-Kell. Ressalta-se ainda que o TDP, assim como o TCD, não permite a identificação da subclasse de IgG que sensibiliza as hemácias (BRAGA, et. al.).

Em 1998, um estudo brasileiro avaliou o método e demonstrou os seguintes resultados: (BOLDRIN, 2012)

Tabela 3. Comparação de sensibilidade entre o TDP e o TCD

| Método | Positivo | Negativo | Sensibilidade para IgG | Especificidade |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------|
| TDP | 17 | 1 | 94% | 100% |
| TCD | 14 | 4 | 78% | 100% |
| Total de pacientes | 18 | | | |

Fonte: BOLDRIN, 2012

O resultado negativo em um paciente no método TDP é explicado pela fixação do C3d na superfície das hemácias que o indivíduo apresentava (BOLDRIN, 2012).

Já o teste imunoenzimático ELAT pode ser usado também para quantificar os autoanticorpos em pacientes com AHAI (BOLDRIN, 2012). Sua sensibilidade é 9-10 vezes maior que a do TCD e não utiliza material radioativo. Porém a sua implementação na rotina imunohematológica é difícil por ser um teste complexo e demorado (BRAGA, et al.).

4. Conclusão

Apesar de o Teste de Coombs direto ser um método ouro para a identificação da AHAI, com esse estudo conclui-se que é de extrema importância o uso de testes alternativos e complementares para o melhor prognóstico e acompanhamento da doença. Esse feito só é possível devido a variabilidade de métodos imunológicos e moleculares que podem ser

empregados. A escolha do teste a ser utilizado depende das necessidades clínicas e laboratoriais do paciente.

Assim, faz-se necessário o interesse dos laboratórios imuno-hematológicos em se atualizarem e permitirem uma educação continuada de seus analistas sobre a interpretação dos resultados e a diversidade de métodos que podem ser usados no fator complicador da rotina que é a AHAI.

Referências Bibliográficas:

BOLDRIN, NATÁLIA F. Qualidade analítica dos testes laboratoriais atualmente propostos para o diagnóstico e acompanhamento de anemia hemolítica autoimune. 10ª amostra acadêmica UNIMEP. Piracicaba, 2012.

BRAGA, G. W.; BORDIN, J. O.; MOREIRA JR., G. & KURODA, A. Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene. Revista da Associação Médica Brasileira, 44 (1): 16-20, 1998.

CARMO, KENIA P. S. Técnicas utilizadas para seleção de unidades de concentrado de hemácias em pacientes com anemia hemolítica autoimune. Trabalho de Conclusão de Curso (Aprimoramento profissional em Hemoterapia). Secretaria de Estado de Saúde – Fundap. Marília, 25, 2013.

FILHO, RAULY B. P. Anemia hemolítica auto-imune: Um estudo descritivo e revisado de sua origem ao seu tratamento. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 62, 2010.

GIRELLO, ANA L. e KÜHN, TELMA I. B. B. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. 3ª edição atualizada e ampliada. São Paulo: Senac, 303, 2012.

RODRIGUES, ROBERTA. Anemia hemolítica autoimune. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Hematologia Laboratorial). Departamento de Ciências da Saúde. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Injuí, 17, 2013.