

## FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM PACIENTES INTERNADOS NO INSTITUTO DO CORAÇÃO DO DISTRITO FEDERAL (InCor-DF)

FREITAS, Ana Paula Paulino

**Resumo:** A imuno-hematologia é a especialidade que estuda antígenos e anticorpos presentes nos elementos sanguíneos, definindo as propriedades e reações imunológicas entre os mesmos. Pacientes podem ser aloimunizados por anticorpos irregulares associados à transfusão, gestação e transplante de órgãos. É necessária a realização de exames laboratoriais como a pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), para detectar a presença desses anticorpos. O objetivo geral desse trabalho é avaliar a frequência desses anticorpos em pacientes internados no InCor-DF, no período de janeiro de 2007 a dezembro 2008. Através de estudos retrospectivos foram levantados dados no arquivo do Instituto, de todos os pacientes aloimunizados nesse período. Realizou-se a análise por meio do exame de rotina PAI com cartão gel LISS/Coombs e painel de hemácias ID-Painel para identificação dos anticorpos. Dos 2.340 pacientes internados nesse período, observou-se a ocorrência de aloimunização em 30(1.28%), desse total apenas 16(53.3 %) foi identificado o anticorpo. A proporção entre homens e mulheres foi de 50%. Quanto à faixa etária 60 % tinham mais de 40 anos. Os sistemas Rh (anti-E), Diego (anti-Di<sup>a</sup>), MNS (anti-M) e Duffy (anti-Fy<sup>a</sup>) juntos tiveram frequência superior a 26%. Foi comprovada a baixa prevalência de aloanticorpos. Foi identificada a especificidade dos aloanticorpos envolvidos e determinação dos seus significados clínicos.

**Palavras-chave:** imuno-hematologia, anticorpos irregulares, aloimunização.

**Abstract:** The immuno-hematology is the specialty that studies antigens and antibodies in blood elements, defining the properties and immunological reactions between them. Patients may be alloimmunised for irregular antibodies associated with transfusion, pregnancy and transplantation of organs. It is necessary to perform laboratory tests such as the detection of irregular antibodies (PAI) to detect the presence of these antibodies. The general objective of this study is to assess the frequency of these antibodies in patients hospitalized at InCor-DF, from January 2007 to December 2008. Through retrospective studies were raised in the data file of the Office of all patients alloimmunised that time. Was held out the analysis through the examination of routine PAI card gel LISS/Coombs scoreboard and erythrocyte-ID panel for identification of antibodies. Of the 2340 patients admitted during this period, we observed the occurrence of alloimmunisation in 30 (1.28%) of that total only 16 (53.3%) was identified the antibody. The proportion between men and women was 50%. As for the age group 60% were over 40 years. The Rh system (anti-E), Diego (anti-Di<sup>a</sup>), MNS (anti-M) and Duffy (anti-Fy<sup>a</sup>) together have more than 26% frequency. Was shown to lower prevalence of alloantibodies. It identified the specific alloantibodies involved and determining their clinical significance. **Key-Words:** immuno-hematology, irregular antibodies, alloimmunisation.

## INTRODUÇÃO

A imuno-hematologia consiste em uma especialidade da hemoterapia que estuda os antígenos presentes nos elementos sanguíneos e anticorpos direcionados contra tais antígenos, definindo as propriedades e reações imunológicas entre os mesmos. A imuno-hematologia encontra-se intimamente relacionada com a medicina transfusional, envolvendo a transfusão de hemocomponentes e hemoderivados. Através da realização de exames laboratoriais, avaliação dos resultados e de procedimentos adicionais ela fornece subsídios necessários para o estudo da patogênese, diagnóstico, prevenção e conduta em situações de aloimunização (sensibilização) associada à transfusão, gestação e transplante de órgãos (HENRY, 1999).

Os testes de rotina consistem de tipagens ABO e Rh, pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) e testes de compatibilidade. A finalidade da triagem de anticorpos por PAI visa à detecção dos anticorpos contra antígenos eritrocitários, além daqueles de ocorrência natural anti-A ou anti-B. A ocorrência de anticorpos

irregulares na população geral varia entre 0,3%-2%. Habitualmente esses anticorpos irregulares são aloanticorpos (direcionados contra um antígeno eritrocitário que está na superfície das hemácias) (HARMENING, 2006).

O significado clínico dos anticorpos detectados dependerá da temperatura de reação, potência (grau de reatividade), classe de imunoglobulina e capacidade de ativação do sistema complemento. Geralmente, o anticorpo clinicamente significativo é reativo a 37° C e/ou fase de antiglobulina humana, portanto, sendo anticorpos de classe IgG ou IgM de grande amplitude térmica (GIRELLO, 2002).

Nem sempre é fácil detectar e identificar anticorpos de grupo sanguíneo. Alguns pacientes, como os portadores de anemia falciforme, apresentam altas porcentagens de aloimunização, e muitos desses pacientes podem ter numerosos aloanticorpos, o que torna difícil sua identificação. Outra complicação é que muitos anticorpos de grupo sanguíneo são lábeis (42% desaparecem ao longo de um período de 5 anos), podendo reaparecer com o passar do tempo. Com uma manutenção adequada dos históricos transfusionais,

histórias patológicas e gestacionais dos pacientes que utilizam os serviços do mesmo hospital, isso não chega a ser um problema, mas se anticorpos clinicamente significativos desaparecerem e não existem registros precisos de sua presença, o paciente pode vir a receber sangue positivo para o antígeno, o que provavelmente irá causar reação hemolítica transfusional tardia (HARMENING, 2006).

Os métodos usados para detectar anticorpos irregulares no soro ou plasma devem ser capazes de detectar anticorpos clinicamente significativos e devem incluir incubação a 37° C e o uso de antigamaglobulina humana. Para evitar resultados falsos negativos nas provas antiglobulínicas deve ser utilizado um sistema de controle mediante o uso de glóbulos vermelhos sensibilizados com IgG. Podem ser utilizados métodos alternativos para validar as reações negativas, desde que exista documentação apropriada (RDC 57, 2010).

Os testes de triagem de anticorpos envolvem testar o soro ou plasma do paciente contra duas ou três hemácias reagentes chamadas células de triagem. As células de triagem são suspensões de células do grupo O comercialmente preparadas,

obtidas de doadores individuais fenotipados para os antígenos eritrocitários mais comumente observados na população e clinicamente importantes. As células do grupo O são usadas de modo que Anti-A ou Anti-B “naturalmente ocorrentes” não interfiram com a detecção de anticorpos irregulares. As células são selecionadas de modo que estejam presentes os seguintes antígenos em pelo menos uma das amostras de hemácias: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P<sub>1</sub>, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>. Se um grupo de células de triagem não contivesse determinado antígeno – K, por exemplo – o anticorpo correspondente não seria detectado quando as amostras de soro fossem testadas contra essas células. Acompanha cada lote de células de triagem fornecidas pelo fabricante um perfil antigênico listando a composição antigênica de cada célula. É importante que o número do lote para as células de triagem corresponda ao número do lote impresso no perfil antigênico, porque a composição antigênica varia com cada lote (HARMENING, 2006) (Figura1).



**Figura 1: Tabela de Painel de Hemácias**

		Tabela de antígenos													Antigen-Table					Tabla de antígenos													Resultado Result		
Rh-hr	Doador Donor Donante	Rh-hr					Kell					Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Di.	Antígenos especiais Special types Tipos especiales			LISS/ Coombs	Enzima Enzyme	4°C				
		D	C	E	c	e	C <sup>0</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Di <sup>a</sup>								
I	C <sup>w</sup> cD.ee R <sup>w</sup> r	012-2804	+	+	0	+	+	+	0	0	+	nt	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0	k-						
II	ccD.EE R:R <sub>2</sub>	045-1805	+	0	+	+	0	0	+	0	+	nt	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0							
III	ccddee rr	207594	0	0	0	+	+	0	0	+	0	nt	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+								
			Autocontrole Autocontrol																																

A identificação dos anticorpos, previamente detectados nos exames de triagem, é realizada através da testagem de um painel de 8 a 16 suspensões de hemácias do grupo O reagentes contra o soro do receptor utilizando o teste de Coombs indireto. No Brasil, a maioria dos produtores fornece painéis de células reagentes 11 suspensões de hemácias, com o objetivo de atingir um intervalo de confiança de 99% na identificação de muitos anticorpos comumente encontrados (AABB, 1999). Entretanto como é difícil assegurar que tenha no painel três células positiva ou negativa para cada um dos antígenos (GIRELLO, 2002), células adicionais podem ter que ser testadas, e deverão ser obtidas de outros painéis ou células selecionadas, para uma melhor determinação da possível especificidade de certos aloanticorpos, particularmente aqueles dirigidos contra antígenos de baixa ou alta frequência (RUIZ, 2005).

## OBJETIVO

### Geral

Avaliar a frequência de anticorpos irregulares encontrados em pacientes internados no InCor-DF.

### Específicos

Comprovar a baixa incidência de anticorpos irregulares, se comparados com os dados da literatura.

Determinar a especificidade dos aloanticorpos encontrados.

Identificar a proporção entre homens e mulheres.

## Métodos

### Local da coleta

O estudo foi realizado no Instituto do Coração do Distrito Federal (InCor-DF), localizado no endereço Estrada Parque Contorno do Bosque s/n, Cruzeiro Novo-Distrito Federal.

### **Amostra**

Foram avaliados dados de prontuários 2.340 pacientes, entre eles crianças e adultos, homens e mulheres de diversas etnias, internados no InCor-DF, durante período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008. Em um banco de dados foram registradas informações como sexo e idade. O levantamento de dados foi realizado no período de abril a junho de 2009. As amostras utilizadas para os exames foram coletadas em tubos de coletas pediátricos e adultos com anticoagulante EDTA (etilenodiaminotetracético).

### **Instrumentos**

Centrífuga de gel (ID-Centrífuga), incubadora (ID-Incubadora), estante, soro fisiológico a 0,9%, tubos de ensaio 10x75mm, pipeta eletrônica (ID-Pipeta), ponteira branca (ID-Ponteiras), caixa de luvas, óculos de proteção, caneta com tinta permanente, máscara, cartão gel LISS/Coombs (ID-Cartão) com 6 microtubos, células de triagem (ID-DiaCell I-II-III), painel de hemácias (ID-Painel),

solução de baixa força iônica (ID-Diluent 2) para preparo de suspensão de hemácias.

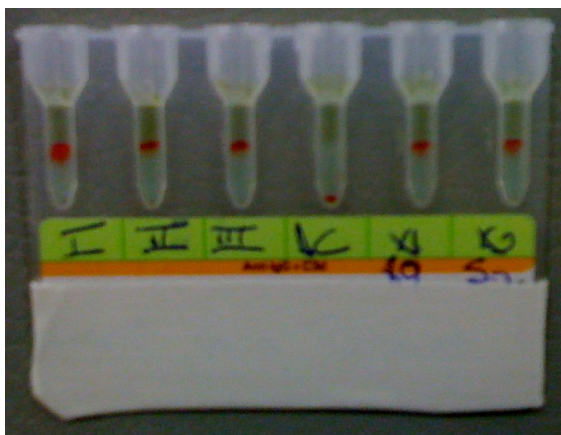
### **Procedimentos**

Realizou-se a observação dessas amostras por dois métodos coombs indireto (PAI) e painel de hemácias. O teste de coombs indireto teve como objetivo verificar a presença de aloanticorpos, e o painel de hemácias forneceu dados para identificar a especificidade do aloanticorpo encontrado. Uma vez que o anticorpo foi identificado, realizou a fenotipagem do paciente para o sistema estudado na tentativa de confirmar nossa pesquisa.

### **Coombs indireto (PAI)**

A amostra centrifugada por 2 minutos a 3400 rpm. Após a centrifugação, foi separado o plasma do concentrado de hemácias, o cartão gel LISS/Coombs foi identificado com o nome do paciente, foi retirado o lacre de alumínio dos microtubos necessários, foi dispensado 50µL de cada célula de triagem em poços diferentes, logo após adicionou 25µL de plasma do paciente, que foi separado inicialmente, em cada microtubo. O cartão gel foi colocado na incubadora por 10 minutos à 37°C. Após a incubação, o cartão gel foi para a centrífuga por mais 10 minutos a 1000 rpm. A interpretação é

feita, se positivo, haveria células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel. Se negativo, haveria botão compacto de células no fundo do microtubo.



#### Painel de hemácias

Logo após a pesquisa de anticorpos irregulares, foi realizado o painel de hemácias no intuito de determinar a especificidade do anticorpo. O cartão foi identificado com o nome do paciente, os microtubos numerados de 1 a 11 e retirou o laque de alumínio. Dispensou 50  $\mu$ L de cada frasco nos microtubos correspondentes (numerados de 1 a 11), adicionado 25  $\mu$ L de plasma do paciente em cada microtubo. Foi incubado durante 10 minutos à 37°C e logo após centrifugado durante 10 minutos a 1000 rpm. A interpretação é feita, se positivo, haveria células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel. Se negativo,

haveria botão compacto de células no fundo do microtubo.



#### Tratamento Analítico

Os dados foram analisados segundo análise estatística descritiva, através de frequências absolutas e percentuais, os resultados foram organizados em tabelas e gráfico, sendo que o programa usado foi Microsoft Excel 2007.

#### RESULTADOS

No período de janeiro de 2007 a dezembro de 2008 foram realizados 2340 exames de pesquisa de anticorpos irregulares. Foram encontrados anticorpos irregulares em trinta pacientes (1,28%) correspondendo a um paciente aloimunizado para cada setenta e oito pacientes. Dos trinta pacientes aloimunizados, a especificidade dos anticorpos foram determinadas em apenas 16 (53.35%), os outros 14(46.66%) pacientes não foi possível identificar o anticorpo. Os anticorpos de maior frequência foram anti-E (13.33%), anti-Di<sup>a</sup>

(10%), anti-Fy<sup>a</sup> (6.66%), anti-M (6.66%)

(Tabela01).

**Tabela 01: Frequência de aloanticorpos identificados.**

Anticorpo	Nº de pacientes	Frequência (%)
Anti-C	1	3.33
Anti-E	4	13.33
Anti-Di <sup>a</sup>	3	10
Anti-Jk <sup>a</sup>	1	3.33
Anti-Js <sup>a</sup>	1	3.33
Anti-Cw	1	3.33
Anti-K	1	3.33
Anti-Fy <sup>a</sup>	2	6.66
Anti-M	2	6.66
Anti-Kp <sup>a</sup>	1	3.33
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>53.3</b>

Do total de aloimunizados, 15 (50%) são do sexo masculino e 15 (50%) são do sexo feminino.

A média de idade de pacientes aloimunizados foi de  $49,37 \pm (23,54)$ .

A distribuição segundo a faixa etária foi possível em todos os pacientes, dentre os quais 20 (60%) tinham mais de 40 anos e 10 (40%) estavam abaixo dessa idade.(Tabela 02)

**Tabela 02: Distribuição segundo faixa etária.**

Idade		%
0-20 anos	05	16.66
21-40 anos	05	16.66
41-60 anos	05	16.66
61-80 anos	14	46.66
> 80 anos	01	3,33
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100</b>

## DISCUSSÃO

A aloimunização está sempre associada a um estímulo antigênico que pode ter sua gênese por transfusão, gestação ou transplante de órgãos. Os fatores que influenciam na capacidade de um indivíduo desencadear uma resposta imunológica ao estímulo antigênico é a imunogenicidade do mesmo, quantidade de determinantes, sexo, epítomos nos antígenos, competência imunológica dos indivíduos, idade e frequência com que foram expostos ao antígeno (MARTINS, 2008).

O estudo da presença de aloanticorpo no soro ou plasma de pacientes em amostras pré-transfusionais, é ferramenta fundamental para garantir a



compatibilidade transfusional, e prevenir reação hemolítica transfusional tardia (RHTT).

Os antígenos do sistema Rh estão comumente associados aos casos de aloimunização devido a sua grande imunogenicidade. Dentre eles o antígeno E, está frequentemente envolvido, desencadeando na formação de aloanticorpos anti-E em indivíduos antígeno E ausente. Aloanticorpos anti-E são clinicamente significativos, pois na sua grande maioria se apresentam como IgG e reativos a 37°C e/ou antiglobulina humana.

SILVA relata que o sistema de grupo sanguíneo Diego é composto principalmente por dois antígenos Diego<sup>a</sup> (Di<sup>a</sup>) e Diego<sup>b</sup> (Di<sup>b</sup>). A prevalência de Di<sup>a</sup> na população caucasóide é rara com uma frequência de 0,02 %, podendo gerar aloanticorpos de importância clínica em transfusão e gestação. Sua prevalência é maior entre filipinos, mongóis e índios. Os aloanticorpos envolvidos podem ser detectados por métodos antiglobulina humana (AGH) e a 37°C.

Segundo RIZZIGATI aloanticorpos anti-Di<sup>a</sup> e anti-Di<sup>b</sup> podem estar relacionados, aos casos de reação hemolítica transfusional tardia e doença hemolítica perinatal (DHPN).

No Brasil, o antígeno Di<sup>a</sup> tem grande importância clínica devido a sua prevalência na população indígena, chegando a 54%. Portanto, torna-se maior a frequência de aloanticorpos encontrados em indivíduos expostos ao antígeno.

Os antígenos das membranas celulares dos grupos sanguíneos eritrocitários (em particular os dos sistemas Rh, Kell, Duffy, e Kidd), são os antígenos mais imunogênicos de nossa espécie (GIRELLO, 2002).

A formação de anticorpos contra antígenos eritrocitários é o primeiro efeito imunológico a ser reconhecido após transfusão de glóbulos vermelhos. Quando um indivíduo é exposto aos antígenos eritrocitários que não lhe são próprios, seu organismo é capaz de rejeitá-los. A produção de anticorpos é parte do processo de rejeição. Alguns estudos mostram que a probabilidade de um indivíduo produzir um ou mais anticorpos anti-eritrocitários é de aproximadamente 1% por unidade de sangue transfundida.(GIRELLO, 2006).

Os antígenos M e N pertencentes ao sistema MNS se caracterizam por serem o segundo em diversidade antigênica depois do sistema Rh. GIRELLO relata que podem também, serem receptores para bactérias, vírus e *Plasmodium falciparum*. A maioria dos antígenos estão bem

desenvolvidos ao nascimento e parecem estar restritos à linhagem eritróide. Os antígenos M e N são antitéticos, possuem efeito de dose e são geralmente destruídos por enzimas proteolíticas.

O anti-M é um anticorpo geralmente natural e irregular. Reage melhor a 4°C, mas podendo reagir a 37°C.

São quase sempre IgM, mas em grande parte apresentam associação IgG + IgM, podem também ser IgG imune. Normalmente não fixam complemento, mas IgM potentes e reativos a 37°C podem causar reações hemolíticas agudas e tardias. Sua reatividade pode ser potencializada pelo uso de potencializadores macromoleculares, ou em meio com pH reduzido (GIRELLO, 2002).

O sistema Duffy é composto por seis antígenos, sendo esses Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Fy<sup>3</sup>, Fy<sup>4</sup>, Fy<sup>5</sup>, e Fy<sup>6</sup>. Funcionam como receptores para o *Plasmodium vivax* sendo essencial para a invasão deste parasita. Portanto indivíduos Fy<sup>(a-b-)</sup>, fenótipo comumente encontrado em indivíduos negro africano, são naturalmente resistentes à Malária pelo plasmódio citado (GIRELLO,2002).

Os antígenos estão presentes em fetos de 6 a 7 semanas e podem se apresentar em células eritróides e não

eritróides, como células endoteliais, epiteliais e em vários órgãos como cérebro, rins, baço, coração, pulmão, pâncreas e placenta. Não são detectados em linfócitos e plaquetas.

Em africanos o fenótipo Fy<sup>(a-b-)</sup>, pode ser produto de uma mutação de ponto na região promotora GATA1(33TX) do gene Duffy, isso leva a ausência da expressão do antígeno nas hemácias, mas não em outros tecidos. Isso explica porque indivíduos com esse fenótipo não desenvolvem aloanticorpos anti-Fy<sup>3</sup> após transfusão e/ou gestação (GIRELLO, 2002).

Os antígenos são destruídos após tratamento enzimático e os anticorpos encontrados são clinicamente significantes podendo estar envolvido nos casos de reação hemolítica transfusional tardia (RHTT) e doença hemolítica perinatal (DHPN).

## CONCLUSÃO

No estudo realizado, foi comprovada a baixa prevalência de aloanticorpos, se comparados com a literatura. Foram identificadas a especificidade dos aloanticorpos envolvidos e a determinação dos seus

significados clínicos. Quanto ao sexo, houve equidade.

A técnica gel LISS/Coombs foi eficaz na identificação e confirmação de 53,3% dos aloanticorpos dos pacientes estudados. Apesar do custo, a técnica reage com maior sensibilidade e de fácil execução, obteve testes estáveis por  $\pm$  2 dias, sem a necessidade de lavagem de hemácias e melhor biossegurança.

## REFERÊNCIAS

- BORDIN, J.O. **Imunohematologia eritrocitária**. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Belo Horizonte, vol. 12. 1996.
- GIRELLO, A.L. **Fundamentos da imunohematologia eritrocitária**. 1ª Ed. São Paulo: SENAC, 2002. 205p.
- HARMNENING, D.M. **Técnicas Modernas em banco de sangue e transfusão**. 4ª Ed. 2006.
- HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19ª Ed. São Paulo: Manole, 1999. 1552p.
- MARTINS, P.J. **Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, vol. 30. 2008.
- NETO, A.L. **Aplicação do método gel LISS/Coombs na rotina de pesquisa e identificação de anticorpos irregulares**. Serviços de Hemoterapia 9 de Julho, São Paulo. 2001.
- NOVARETTI, M.C. **Controle de qualidade interno de reagentes em imuno-hematologia - Aspectos práticos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, vol. 24. 2002.
- RIZZIGATTI, M.V. **Frequência de antígeno Di<sup>a</sup> nos doadores de sangue do Centro de Hematologia de São Paulo**. Centro de Hematologia de São Paulo.
- RUIZ, L.G. **Frequência de aloanticorpos e auto-anticorpos em pacientes politransfundidos atendidos pelo Hemonúcleo de Catanduva**. 67ª Ed. Revista do Biomédico, 2005.
- HENRIQUES, C.M. **Resolução da Diretoria Colegiada**. RDC nº 153, 2004. 92 p.
- SILVA, C.R. **Aloanticorpos anti-Di<sup>a</sup> em gestante**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Rio de Janeiro, vol. 26. 2004.
- SOUZA, M.H. Manual de Instrução Programada. **Princípios de Hematologia e Hemoterapia**. 2ª Ed. 2005.
- TRIULZI, D.J. **Terapêutica Transfusional-manual para médicos**. 7ª Ed. EUA: American Association of Blood Banks, 1999. 142p.