

Detecção dos anticorpos regulares abo maternos em recém-nascidos pelo método de tipagem sangüínea reversa estendida até fase de antiglobulina humana.

RESUMO - Neste estudo foram definidos os índices de detecção dos anticorpos regulares ABO maternos em recém-nascidos pelo método de tipagem sangüínea reversa estendida até fase de antiglobulina humana (TRAGH) e a relação destes resultados com os achados de outras metodologias envolvidas no diagnóstico da incompatibilidade materno-fetal pelo sistema ABO (IABO). Foram colhidas amostras sangüíneas para análise imuno-hematológica de 38 recém-nascidos com tipo sangüíneo A ou B, apresentando até 30 dias de vida (sem conhecimento prévio dos fenótipos ABO maternos) e realização dos testes de tipagem ABO direta, TRAGH, Coombs direto e eluato-LUI, visando detectar anti-A e/ou anti-B.

Os resultados demonstraram que a TRAGH efetuou a detecção dos anticorpos regulares ABO maternos na maioria das amostras analisadas nas quais foram confirmados os casos de IABO (09 de 15 amostras), constituindo-se, mediante a análise conjunta com os demais dados imuno-hematológicos, em um útil parâmetro laboratorial na adequação imunológica do hemocomponente ao receptor e na confirmação diagnóstica de IABO.

PALAVRAS-CHAVE - incompatibilidade de grupo sangüíneo, sistema de grupo sangüíneo ABO, recém-nascidos, análises imuno-hematológicas e TRAGH.

***SUMMARY** - In this study were defined the exponents of the detection of mother's ABO regulars antibodies in newborns by the reverse blood typing extend up to stage of the antihuman globulin method (RTAGH) and the relacion this results with the faind other methods include in the diagnosis of the ABO maternal-fetal incompatibility (IABO). Samples of blood were picked for immunohematology analysis from 38 newborns with the blood type A our B , with until 30 days of life (without previous knowing of the ABO mother's types) and make of the ABO typing direct, RTAGH, Coombs direct and elution by freezing tests, purposing the detection of the anti-A and/our anti-B.*

The results demonstrate with the RTAGH maked the detection of the mother's ABO regulars antibodies in the most samples analyses with the were confirmed the cases of the IABO (09 of 15 samples), constitute, trough the completeness analyse with too much tests immunohematology, in the useful laboratory information in the imunology adjust of the hemocomponent to the pacient and in the diagnosis of IABO confirmation.

KEYWORDS - blood group incompatibility, ABO blood-group system, newborns, immunohematology analysis, RTAGH.

INTRODUÇÃO

Os anticorpos ABO estão presentes nos soros e/ou plasmas de indivíduos, contra os antígenos que eles não possuem nas hemácias, e são formados naturalmente por estímulos passivos, principalmente por bactérias que começam a colonizar o trato intestinal a partir do nascimento, as quais possuem açúcares em suas membranas celulares semelhantes aos açúcares imunodominantes dos antígenos A e B, sendo estes anticorpos classificados como naturais e regulares (ocorrência regular e estímulo natural)[8]. Portanto, para determinação do fenótipo ABO, recomenda-se pesquisar os antígenos (prova direta) e os anticorpos(prova reversa). Entre 3 e 6 meses de idade já é possível encontrar pequenas quantidades de anticorpos, mas sua produção máxima se dá entre 5 e 10 anos (8).

As anemias neonatais mais comuns são as anemias hemolíticas, incluindo as ocasionadas pelos antígenos de grupos sanguíneos ABO (11). A incompatibilidade sanguínea materno-fetal ABO apresenta importância no período neonatal pois determina a maioria dos casos de doença hemolítica neste período (5-17). As hemácias fetais podem conter antígenos de grupos sanguíneos herdados do pai que não existam na mãe. Os indivíduos produzem, em maior quantidade, anticorpos de classe IgM contra os antígenos do sistema ABO, porém os indivíduos de fenótipo O produzem, em maior quantidade, anticorpos IgG da especificidade AB, os quais podem atravessar a barreira placentária (8).

Embora possa ocorrer com frequência, a incompatibilidade ABO entre mães e feto raramente ocasiona uma doença hemolítica perinatal clinicamente significativa (18) e anormalidades hematológicas são detectadas somente se o sangue de um recém-nascido aparentemente saudável for sorologicamente testado (8).

Falterman e Richardson (6) descreveram reações hemolíticas com hemoglobinúria e hiperbilirrubinemia em três casos de crianças prematuras do grupo A ou B de mães do grupo O e que receberam hemácias ABO compatíveis com seus grupos sanguíneos. Exames pré-transfusionais mostraram teste de Coombs direto negativo e pós transfusionais positivos. O anticorpo foi identificado como anti-A ou anti-B maternos, que estavam na circulação da criança, mas, devido à pequena expressão dos sítios antigênicos A ou B, estes não haviam se ligado aos eritrócitos. Reagiram, porém, com as hemácias de adultos transfundidas, que apresentam grande quantidade de sítios antigênicos.

A determinação do fenótipo ABO dos neonatos é realizada através da prova direta utilizando-se anti-soros específicos (AB, A, B), não sendo rotineiramente utilizada a prova reversa agregada, uma vez que crianças com menos de 4 meses de vida raramente produzem anticorpos contra antígenos dos grupos sanguíneos (16). Por meio da RDC 153 de junho de 2004, a ANVISA orientou os laboratórios de imuno-hematologia clínica vinculados aos serviços hemoterápicos para a realização da pesquisa de anti-A ou anti-B no soro ou plasma dos recém-nascidos, apresentando tipagem sanguínea A ou B, através de métodos que incluam uma fase antiglobulínica (3), visando a segurança transfusional destes pacientes através da seleção de unidades de concentrados globulares desprovidos dos antígenos correspondentes aos anticorpos detectados (18).

O princípio dos testes de antiglobulina humana é a utilização de anti-soros contendo anticorpos dirigidos contra imunoglobulinas humanas (ligadas primariamente à superfície celular), os quais após a ligação determinam a diminuição das forças de repulsão existentes entre as hemácias, promovendo assim a aglutinação (9). Desta maneira, a aplicação da fase antiglobulínica aos respectivos exames laboratoriais constitui-se em um artifício para a visualização da reação antígeno-anticorpo, uma vez que a maioria dos anticorpos de classe IgG, quando ligados aos antígenos específicos,

não diminuam as forças de repulsão a ponto de atingir o limiar necessário para que ocorra a reação de aglutinação (8).

OBJETIVOS

Definir os índices de detecção dos anticorpos regulares ABO maternos no soro ou plasma de recém nascidos através da prova de tipagem sanguínea reversa estendida até a fase de antiglobulina (TRAGH), bem como relacionar estes resultados com os demais parâmetros laboratoriais (tipagem ABO, Coombs direto e eluato) envolvidos no diagnóstico da incompatibilidade materno-fetal pelo sistema ABO (IABO).

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes:

Foram analisadas 38 amostras de recém nascidos apresentando até 30 dias de vida, sem o conhecimento prévio dos fenótipos ABO Rh (D) maternos, atendidos pela primeira vez no laboratório de prática transfusional do Associação Beneficente Hospital Universitário-SP (ABHU-SP) para realização de seus respectivos exames pré transfusionais no período de janeiro de 2012 a junho de 2012, e encaminhadas ao laboratório de Imuno-hematologia clínica do mesmo hospital, mediante a confirmação dos fenótipos A ou B, para realização de investigações adicionais visando a detecção dos anticorpos regulares ABO maternos e conseqüentemente prováveis diagnósticos de incompatibilidades materno-fetais pelo sistema ABO.

Amostras:

As amostras foram coletadas pelas técnicas convencionais de flebotomia, sem a necessidade de preparo prévio dos pacientes, na unidade de tratamento intensivo neonatal do ABHU-SP e transferidas para tubos de ensaios contendo anticoagulante EDTA 3%, obtendo-se, após procedimento padronizado de centrifugação, o plasma sobrenadante, destinado para a realização da tipagem sanguínea reversa, e o concentrado de hemácias sedimentado, utilizado para a classificação sanguínea ABO direta, Coombs direto e realização dos eluatos.

Métodos:

Tipagem sanguínea ABO direta:

A determinação dos fenótipos ABO dos recém nascidos foi realizada através da pesquisa dos antígenos do sistema ABO pelo método de hemaglutinação direta em tubo, utilizando-se anticorpos monoclonais Diamed® anti-A, anti-B e anti-AB (anticorpos de classe IgM, específicos para os antígenos A-ABO1, B-ABO2 e AB-ABO3). De acordo com protocolo específico foram preparadas suspensões de hemácias a 5% em salina fisiológica e testadas com os respectivos anti-soros.

Tipagem sanguínea ABO reversa estendida até fase de antiglobulina humana (TRAGH):

A TRAGH foi efetuada nos plasmas dos recém-nascidos utilizando-se suspensões a 3% de glóbulos vermelhos humanos de doadores pertencentes respectivamente, a grupos sanguíneos A1 e B (REVERCEL-Diamamed®), e posterior procedimento de centrifugação, seguindo-se a leitura pela observação da presença ou não de aglutinação e/ou hemólise. Após a leitura os testes foram submetidos à fase antiglobulínica através do teste indireto de antiglobulina em tubo, realizando-se incubação em temperatura de 37°C durante 30 minutos, 03 ciclos de lavagem em salina fisiológica, sendo que ao final

do terceiro ciclo foi adicionado o soro de antiglobulina humana (Diaclon Coombs Serum poliespecífico/Diamed®).

Teste de Coombs direto:

Para a realização dos testes de Coombs direto foi utilizada a técnica de aglutinação em coluna (gel-centrifugação)-cartões ID-Liss/Coombs-Diamed® com suspensões de hemácias dos recém-nascidos a 1% em solução de baixa força iônica (Liss).

Eluição por congelamento:

As técnicas de eluição são utilizadas para remoção dos anticorpos opsonizantes ligados à membrana eritrocitária e conseqüente identificação dos mesmos. Este exame detecta no sangue do recém-nascido a presença de anticorpos maternos anti-A e anti-B, tem elevada sensibilidade e alto valor preditivo negativo-99%(2-17).

Existem vários métodos para a eluição dos anticorpos através da alteração ou reversão das forças que matem ligados os antígenos e os anticorpos, como os que utilizam solventes orgânicos (éter ou clorofórmio), os que utilizam soluções que alteram o pH (glicina ácida), e os que promovem hemólise por alteração de temperatura, como congelamento-LUI (método utilizado neste estudo) ou ainda o aquecimento.

Na técnica de congelamento-LUI as hemácias, previamente lavadas em solução salina fisiológica, são submetidas à temperatura de -20°C, degeladas em banho-maria 37°C e centrifugadas para obtenção do eluato sobrenadante. Realiza-se o teste de antiglobulina indireto em tubo com o eluato de hemácias dos recém-nascidos e hemácias A1 ou B.

RESULTADOS

**TABELA I
CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO
(38 RECÉM NASCIDOS)**

CARACTERÍSTICAS	VALOR
Tipo sanguíneo	29 A 09 B
TRAGH	09 positivos (anti-A e anti-B) 29 negativos
Coombs direto	26 positivos 12 negativos
Eluição-congelamento	15 positivos (11 anti-A, 4 anti-B) 23 negativos

**TABELA II
Caracterização do grupo de estudo com
diagnóstico de IABO (15 recém nascidos)**

Número de casos	Coombs direto	TRAGH	Eluato
7	negativo	Positivo anti-A e anti-B	Positivo 6 anti-A e 1 anti-B
2	positivo	Positivo anti-A e anti-B	Positivo 1 anti-A e 1 anti-B
6	positivo	negativo	Positivo 4 anti-A e 2 anti-B

Em 15 das 38 amostras de recém-nascidos analisadas determinou-se o diagnóstico laboratorial de IABO, com confirmação dos fenótipos ABO maternos como sendo do tipo O. Destes 15 casos confirmados em 09 foi possível detectar o anticorpo regular ABO materno nos plasmas dos recém nascidos pelo método de TRAGH, e em 06 casos a TRAGH resultou negativa.

Nas 23 amostras em que o diagnóstico de IABO foi descartado, deve ser considerada a possibilidade de que em algumas delas os fenótipos ABO maternos não pertenciam ao tipo O.

DISCUSSÃO

Nas 07 amostras analisadas apresentando resultado negativo no teste de Coombs direto, foi possível a prévia detecção dos anticorpos regulares maternos nos plasmas dos recém nascidos pela TRAGH e posterior confirmação de diagnóstico de IABO pelo método de antiglobulina indireto com eluato das hemácias dos pacientes e hemácias A1/B. Recém-nascidos acometidos por IABO apresentam Coombs direto fracamente positivo, ou até negativo pela expressão incompleta dos antígenos A e B nas hemácias e o nível relativamente baixo de complemento no soro (8). Deste modo, os resultados do Coombs direto não indicam corretamente a quantidade de anticorpos ligados nas hemácias *in vivo*, sendo que na técnica de eluição ocorre uma concentração destes anticorpos, permitindo sua detecção (8).

Em 02 amostras a TRAGH foi concordante com a positividade do Coombs direto e posterior confirmação diagnóstica de IABO pela eluição.

A TRAGH apresentou resultado negativo em 06 amostras com achados positivos no teste de Coombs direto e confirmação de detecção dos anticorpos pelo método de eluição.

A TRAGH demonstrou positividade na maioria dos casos de IABO (09 de 15 amostras), mesmo quando o teste de Coombs direto apresentou-se negativo (07 amostras), e nesta condição foi o parâmetro que direcionou a pesquisa laboratorial para a realização do método de eluição e confirmação dos casos de IABO.

CONCLUSÃO

O método de TRAGH realizou a detecção de anticorpos regulares ABO maternos em recém-nascidos (apresentando tipo sanguíneo A ou B) na maioria dos casos confirmados de IABO e mediante a análise conjunta com os demais dados imuno-hematológicos, auxiliou na adequação imunológica do hemocomponente ao receptor e na confirmação diagnóstica da IABO.

REFERÊNCIAS

- 1-ABBAS, A. K. Imunologia Celular e Molecular. 3ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.
- 2-AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. Technical Manual. 9ed. Arlington: 1985. p429-33: elution procedures.
- 3-Brasil, Ministério da Saúde. Instruções normativas para estabelecimentos hemoterápicos. RDC 153 de junho de 2004.
- 4-CARVALHO, W.F. Técnicas Médicas de Hematologia e Imunohematologia. 7ed. Ed. Médica, 1999.
- 5-DILLON H.C., KRIVT W., Serial Study of Bone Marrow in Hemolytic Disease of the Newborn (erythroblastosis fetalis). Pediatrics 1959.
- 6-FALTERMAN, C.G. & RICHARDSON, J. "Transfusion Reaction Due to Unrecognized ABO Hemolytic Disease of the Newborn Infant", em J. Pediatr., n97, 1980.
- 7-FERREIRA, A. W.; ÁVILLA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças

- Infeciosas e Auto-imunes. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.302p
- 8-GIRELLO, A.L. Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária. 1ed. São Paulo: SENAC, 2002.205p.
- 9-HARMENING D., CALHOUN L., POLESHY, H. Técnicas Modernas para Banco de Sangue. 2ed, Revinter, 1992.
- 10-HENRY, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais. 19ed. São Paulo: Manole, 1999.1552p.
- 11-HUMBERT, J. & P. WARCKER, “Common Anemias in Neonatology”, em Schweis Rundsh Med Prax, 88 (05), 1999.
- 12-ISSIT, P.D.; D.J. ANSTEE. Applied Blood Group Serology. 4ed, Durhan: Montgomery Scientific, 1999.
- 13- JUDD, J.W. Methods in Imunihematology. 2ed, 1994.
- 14-LEE, H.H., ROUGER, P., GERMAIN, C., MULLER, A. and SALMON,C.: The production and standardization of monoclonal antibodies as ABH blood grouping typing reagents. Symposium of International Association of Biological Standardization on monoclonal antibodies, 1983.
- 15-LEONE, C.R., KONDO M.M., QUINTAL V.S. Doença Hemolítica do recém-nascido por Incompatibilidade sanguínea materno-fetal. In: Marcondes E., Vaz F.A .C., Ramos J.L.A., Okay Y., editores. 9ed. Pediatria básica. São Paulo: Sarvier, 2002.
- 16-MOLLISON, P.L., ENGELFRIET, C.P. and CONTRERAS, M. Blood Transfusion in Clinical Medicine, 10ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- 17-PROCIANOY R.S., GIACOMINI C.B. FARINA D.M., MOLLING G.A.D.,WINCKLER M.I., SILVEIRA M.B., et al. Early diagnosis of ABO haemolytic disease of the newborn . Eur. J. Pediatr, 1987.
- 18-TRIULZI, D.J. Terapêutica Transfusional-Manual para Médicos. 7ed. EUA: American Association of Blood Banks, 2002.142p.

http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_40_04/12.pdf

acesso: 22/04/12