



**ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO JOSÉ DO RIO
PRETO**

KARINA DA SILVA SOARES

TÉCNICAS ACESSÓRIAS EM IMUNO-HEMATOLOGIA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2022

KARINA DA SILVA SOARES

TÉCNICAS ACESSÓRIAS EM IMUNO-HEMATOLOGIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Pós Graduação em Hematologia e Banco de Sangue na Academia de Ciência e Tecnologia como requisito para a obtenção do título de Especialista em Hematologia e Banco de Sangue.

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2022

RESUMO

Na rotina dos laboratórios de imuno-hematologia, há situações em que são necessários estudos complementares para resolução de casos complexos e/ou inconclusivos, o que representa necessidade da escolha de um teste de sensibilidade maior para o estudo imuno-hematológico. Técnicas acessórias representam uma ferramenta para elucidar resultados de amostras em que podemos encontrar provas de compatibilidade positiva, coombs/teste direto e indireto de antiglobulina positivo, incompatibilidade ABO/Rh D e técnicas complementares, como a fenotipagem antigênica para outros antígenos eritrocitários. Dessa forma, uma revisão abrangente de técnicas que possam complementar a rotina para melhor interpretação desses casos é importante para os profissionais da área da imuno-hematologia e áreas correlatas.

Palavras chave: Técnicas. Imuno-hematologia. Incompatibilidade. Técnicas complementares

ABSTRACT

In the routine of immunohematology laboratories, there are situations in which complementary studies are needed to resolve complex and/or inconclusive cases, which represents the need to choose a higher sensitivity test for the immunohematological study. Accessory techniques represent a tool to elucidate sample results in which we can find evidence of positive compatibility, coombs/direct and indirect positive antiglobulin test, ABO/Rh D incompatibility and complementary techniques, such as antigenic phenotyping for other erythrocyte antigens. Thus, a comprehensive review of techniques that can complement the routine for better interpretation of these cases is important for professionals in the field of immunohematology and related areas.

Keywords: Techniques. Immunohematology. Incompatibility. Complementary techniques

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
OBJETIVO	7
TÉCNICAS ACESSÓRIAS E SUAS APLICAÇÕES	7
Tipagem direta e reversa: discrepâncias ABO	7
Tipos de discrepâncias:	8
Discrepância 1: Ausência ou fraca reatividade dos anticorpos (Reações inesperadas da reversa A ou B) (Quadro 1).	8
Discrepância 2: Ausência ou fraca reatividade dos antígenos (Reação fraca dos antígenos A e B).	8
Estudos das substâncias secretoras	11
Técnica a frio	11
Prova de compatibilidade maior	11
Importância da estabilidade da amostra	12
Prova de Compatibilidade Positiva	12
Meios potencializadores LISS, PEG, Albumina	13
Pesquisa de Anticorpos Irregulares/Teste de Antiglobulina humana Indireto	14
Painéis de hemácias	14
Análise e interpretação de painéis de hemácias	15
Hemácias fenotipadas/ Hemateca e Antissoros raros	16
Teste de antiglobulina humana direto (TAD)	17
Solucionando positividade do TAD	17
Diferenciação de classe de imunoglobulinas para o um TAD positivo	18
Sistema Complemento	18
Cartão de classe de anticorpo/ ID <i>screening</i> - BIORAD®	19
O ID-Card DAT IgG- <i>Dilution</i> fornece uma indicação da importância clínica do resultado positivo do TAD- BIORAD®	19
IgG1 e IgG3	20
Tratamento de hemácias com TAD positivo	21
TÉCNICAS	21
ADSORÇÃO:	21
ELUIÇÃO ÁCIDA	23
TÉCNICA DE ELUIÇÃO ÁCIDA/ GLICINA-ÁCIDA/EDTA	25

TÉCNICA DE BLOQUEIO	25
DIFOSFATO DE CLOROQUINA	25
DISSOCIAÇÃO (TRATAMENTO DE HEMÁCIAS COM ZZAP)	25
USO DE REAGENTES THÍOIS (DITIOITREITOL- DTT)	25
TESTE DE MMA (MONOCYTE MONOLAYER ASSAY)	28
FENOTIPAGEM	28
GENOTIPAGEM	29
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

INTRODUÇÃO

Na rotina dos laboratórios de imuno-hematologia, há situações em que são necessários estudos complementares para resolução de casos complexos e/ou inconclusivos, o que representa necessidade da escolha de um teste de sensibilidade maior para o estudo imuno-hematológico.¹

Testes pré-transfusionais são aplicados em amostras de receptores de sangue com o propósito de garantir compatibilidade e segurança nas transfusões sanguíneas. Os requeridos obrigatoriamente, tipagem ABO (direta e reversa), tipagem Rh D, pesquisa de anticorpos irregulares/Coombs indireto, retipagem ABO do componente sanguíneo e prova de compatibilidade nos casos especificados no art.179 da portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, fornecem segurança ao receptor de hemocomponentes.²

Com o propósito de garantir uma transfusão mais segura, a identificação do histórico do paciente pode fornecer informações importantes para o processamento da amostra, onde as técnicas acessórias representam uma ferramenta para elucidar resultados de amostras em que podemos encontrar provas de compatibilidade positiva, coombs/teste direto e indireto de antiglobulina positivo, incompatibilidade ABO/Rh D⁴ e técnicas complementares, como a fenotipagem antigênica para outros antígenos eritrocitários e outras técnicas, utilizadas principalmente em pacientes com doenças hematológicas, pacientes aloimunizados contra antígenos eritrocitários, com histórico de transfusões (politransfundidos), gestantes, pacientes com comprometimento renal e que entrarão em regime de transfusão crônica, onde podem apresentar complicações nos testes imuno-hematológicos, sejam eles por interferências de medicamentos ou descontrole imuno-hematológico^{1,5}. Garantindo assim maior segurança transfusional, visto que a incompatibilidade de antígenos de outros sistemas sanguíneos, também imunogênicos, podem causar reações transfusionais hemolíticas.⁴

Dessa forma, uma revisão abrangente de técnicas que possam complementar a rotina para resolução e melhor interpretação desses casos é importante para os profissionais da área da imuno-hematologia e áreas correlatas.

OBJETIVO

Descrever técnicas complementares e sua aplicabilidade nas resoluções de casos complexos de imuno-hematologia.

TÉCNICAS ACESSÓRIAS E SUAS APLICAÇÕES

Tipagem direta e reversa: discrepâncias ABO

A tipagem ABO, direta e reversa, deve produzir resultados concordantes entre elas, para serem considerados válidos. Discrepâncias ocorrem quando os resultados na tipagem direta, onde determinamos os antígenos eritrocitários, estão em discordância com a tipagem reversa, onde determinamos os anticorpos naturais do sistema ABO. Esses resultados inconclusivos devem ser investigados.⁵

Antes da escolha de técnicas para a resolução da discrepância, é necessário que todas as interferências por erros técnicos sejam eliminadas e corrigidas.⁵

Análise das causas:

- **Análise da amostra quanto a:**

- Pequenos coágulos, que se prendem aos eritrócitos, podem apresentar-se aglutinados.
- Plasma com altos índices de fibrinogênio e pacientes com disproteinemia podem apresentar rouleaux eritrocitário.

- **Lavagem dos eritrócitos**

A análise da discrepância inicia-se com a repetição do teste, com a lavagem dos glóbulos vermelhos com solução salina, com o objetivo de retirar interferências de proteínas plasmáticas e autoanticorpos.⁵

- **Histórico de doenças e uso de medicamentos**

O histórico do paciente pode trazer informações importantes, como doenças e medicamentos que possam interferir nos exames, assim como histórico de transfusões e transplantes.⁵

- **Realização do TAD (Teste Direto de Antiglobulina Humana)**

O teste direto de antiglobulina humana pode ser considerado quando se suspeita de que imunoglobulinas possam estar ligadas aos eritrócitos, dificultando sua identificação.⁵

- **Presença de aloanticorpos e/ou autoanticorpos**

Tipos de discrepâncias:

Discrepância 1: Ausência ou fraca reatividade dos anticorpos (Reações inesperadas da reversa A ou B) (Quadro 1).

Discrepância 2: Ausência ou fraca reatividade dos antígenos (Reação fraca dos antígenos A e B).

Nesses casos as possíveis causas estão relacionadas a subgrupos de A e B, doenças como leucemias, linfomas e transplantes de medula óssea.⁵

A identificação dos subgrupos de A, incluem técnicas de adsorção e eluição, estudo das substâncias secretoras e testes de biologia molecular (Quadro 1).⁵

Quadro 1: A quadro abaixo apresenta a relação dos tipos de discrepâncias com suas possíveis resoluções:

	Tipos de discrepâncias	Situações em que ocorrem:	Resoluções
GRUPO 1	<p>1-Depressão ou ausência de anticorpos do sistema ABO.</p> <p>2- Ausência de anticorpos do sistema.</p> <p>3- Quimerismo (O verdadeiro quimerismo pode ocorrer em gêmeos por dispermia – dois espermas fertilizando em um mesmo óvulo – e se manter durante toda vida).</p>	<p>1- Recém-nascidos, idosos, pacientes com doenças imunodeficientes.</p> <p>2- Pacientes submetidos a transplante de medula óssea, leucemias e linfomas com hipogamaglobulinemia.</p> <p>3- Em uso de drogas imunossupressoras que geram hipogamaglobulinemia.</p> <p>4- Agamaglobulinemia congênita.</p>	<p>1- Incubar o soro do paciente com hemácias reagente A1 e B à temperatura ambiente durante aproximadamente 15 a 30 minutos.</p> <p>2- Se a discrepância persistir, incubar o teste a uma temperatura de 4°C durante 15 a 30 minutos, um controle com células O deve ser testado simultaneamente.</p> <p>3- Quando detectada a causa, é importante estabelecer uma conduta para transfusão de hemocomponentes e o paciente deve ser orientado e receber um laudo com a conduta transfusional.</p>
GRUPO 2	<p>1- Antígenos com fraca reatividade ou ausentes.</p>	<p>1-Subgrupos de A e/ou B.*</p> <p>2- Leucemias produzem antígenos A ou B fracos.</p> <p>3- Linfoma de Hodgkin, também causam a diminuição dos antígenos A e B.</p> <p>4- Transplante de medula óssea</p> <p>5- Pós transfusão de plasma, o que pode causar diluição dos anticorpos</p> <p>5-Fenômeno de B adquirido, está associado à obstrução intestinal ou neoplasia de estômago ou intestino.</p> <p>6- Anticorpos para antígenos de baixa incidência nos reagentes anti-A ou anti-B.</p>	<p>1-Incubar o teste à temperatura ambiente por 30 minutos assim é possível aumentar a associação do anticorpo com o antígeno.</p> <p>2- Se a discrepância persistir, incubar o teste a uma temperatura de 4°C de 15 a 30 minutos, incluindo o grupo O e células autólogas como controle.</p> <p>3- Tratar as hemácias em teste com enzima e testados novamente com o antissoros.</p> <p>4-Lavar as hemácias do paciente para remover a substância grupo específicas que são capazes de neutralizar os reagentes comerciais.</p> <p>5- B adquirido (pseudo- antígeno) aparece em pacientes do grupo A e apresentam reação de campo misto com soro anti-B.*</p> <p>6- Investigar subgrupos de A e B.*</p> <p>7- Utilizar reagentes de lotes e marcas diferentes.</p> <p>8- Não apresentam reação com anti-B, pH superior a 8,5 ou inferior a 6,0.</p> <p>9- Repetir o teste com soro anti-B acidificado pH 6,0, deve aglutinar somente o antígeno B verdadeiro.</p>

			10- Pacientes secretores com B adquirido, não secretam B.
GRUPO 3	1- Ocorrem por anormalidades das proteínas ou do plasma e resultam na formação Rouleaux.	<p>1- Níveis elevado de proteínas, observadas no mieloma múltiplo, macroglobulinemia e alguns casos de linfomas de Hodgkin.</p> <p>2- Níveis elevados de fibrinogênio.</p> <p>3- Amostra de sangue de cordão com geleia de Wharton, mucopolissacarídeo presente nos sangues de cordão umbilical.</p> <p>4- Expansores de plasma</p>	<p>1- Lavar as hemácias de cordão de 6 à 8 vezes.</p> <p>2- Lavar as hemácias do paciente pelo menos três vezes antes de realizar os testes.</p> <p>3- Diluir o soro em salina, permitindo que apenas a aglutinação verdadeira permaneça, nos casos de presença de rouleaux.</p>
GRUPO 4	Causas diversas	<p>1- Poliaglutinação.</p> <p>2- Alo e autoanticorpos frios.</p> <p>3- autoanticorpos quentes.</p> <p>4- Isoaglutininas ABO irregulares, complexo antígeno-anticorpo que podem ser adsorvidos pelas hemácias do paciente (ex. autoanticorpos contra acriflavina, corante amarelo utilizado em reagentes anti-B.</p> <p>5-As hemácias com fenótipo cis AB, de ocorrência rara, expressam um antígeno A fracamente reativo (análogo às células A2) e um antígeno B fraco. Anti-B fraco, presente na maioria dos indivíduos “cis-AB” leva a uma discrepância ABO na classificação reversa.</p>	<p>1- Testar células do paciente com lectinas nos casos suspeitos de poliaglutinação, kits comerciais.</p> <p>2- Teste direto de antiglobulina humana, se positivo a discrepância as hemácias podem ser incubadas a 37°C por um curto período, depois lavados com solução salina a 37°C. Caso a discrepância permaneça as hemácias podem ser tratadas com ditiotreitol- DTT.</p> <p>3- Realizar a pesquisa de anticorpos irregulares P.A.I e a I.A.I pelo painel de identificação quanto P.A.I positivo.</p> <p>4- Realizar testes de adsorção e eluição para a remoção do autoanticorpo, posteriormente pode-se repetir a tipagem reversa com o soro eluído.</p>

Tabela adaptada de Controlab.^{5,6}

***Observações:**

Grupo 2: situação 1: Os subgrupos de A incluem:

- A2, pode ter uma reação forte (4+) na prova direta;
- A3, Ax, e Aend, que apresenta reatividade intermediária, fraca ou até negativa;

- Am, Ay e Ael em que são necessárias as técnicas de adsorção e eluição para a confirmação da presença do antígeno A.^{3,5}

Resolução 5: O fenômeno B adquirido está associado a doenças do trato digestivo onde enzimas bacterianas modificam o açúcar imunodominante do grupo A, a N-acetil galactosamina em D galactosamina, que é suficiente similar ao açúcar imunodominante do grupo B – a D-galactose, esse pseudo antígeno B, desaparece após recuperação. Essa reação produz campo misto quanto testados com anti-soro apropriado.^{3,5}

Estudos das substâncias secretoras

Como os antígenos do sistema ABO não são exclusivos dos eritrócitos, também podem ser encontrados em células endoteliais, assim indivíduos podem secretar esses antígenos nos líquidos corporais. Estudos secretores podem então serem realizados para tentativa de caracterizar o fenômeno B adquirido, para confirmação de possível secretor, apenas a substância A é secretada no fenômeno B adquirido.³

Técnica a frio

Nessa técnica é possível detectar antígenos e isoaglutininas, anti-A e Anti-B, que estão em baixos níveis sendo principalmente da classe IgM, com a incubação em baixas temperatura, geralmente em geladeira, devido à baixa temperatura otimizar a ligação dos anticorpos do sistema ABO.³

Prova de compatibilidade maior

Na seleção do hemocomponente, o teste de compatibilidade permite avaliar a compatibilidade ou não dos antígenos das hemácias do doador com os anticorpos presentes no soro/plasma do receptor³

A prova de compatibilidade maior permite demonstrar incompatibilidade ABO e anticorpos clinicamente significativos para antígenos da membrana eritrocitária, lembrando que a terapia transfusional não é isenta de riscos, testes pré-transfusionais tem como função diminuir os riscos eminentes.³

A prova cruzada pode ser realizada por diferentes métodos: método em tubo ou gel teste (figura 1), devendo incluir uma fase de antiglobulina humana. Os anticorpos que reagem na fase de antiglobulina humana, são clinicamente significativos.^{3,5}



Microtubo TC	Conclusão
-	CH compatível
(+)	CH incompatível
1+	CH incompatível
2+	CH incompatível
3+	CH incompatível
4+	CH incompatível

Havendo aglutinação em qualquer grau o resultado do teste de compatibilidade será incompatível. Em caso de ausência de aglutinação o concentrado de hemácias será compatível e poderá ser utilizado para transfusão.

Figura 1: extraída de Polydoro E. Procedimento Operacional Padrão (POP) serviços em hemoterapia: prova de compatibilidade. Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina.⁷

Importância da estabilidade da amostra

A lavagem das hemácias do doador é essencial para a remoção de coágulos de fibrina e aglutininas frias que podem se prender aos glóbulos vermelhos e causar uma falsa aglutinação, interferindo na interpretação dos testes.³

Para o teste, as células podem ser lavadas e posteriormente ressuspendidas em solução salina de 2% a 5%, mantendo também a proporção do soro determinada pelo fabricante, para que não ocorra o excesso de eritrócitos, onde títulos baixos de anticorpos podem não ser detectados.³

Prova de Compatibilidade Positiva

Quando a prova de compatibilidade maior for positiva deve-se avaliar a causa da positividade, algumas causas possíveis podem estar relacionadas aos casos abaixo, mais causas são encontradas em AABB Technical Manual 15th Ed. 2005 p. 417.³

- 1. Tipagem ABO/Rh incorreta do paciente ou doador:** sendo por erro na seleção do hemocomponente ou expressões fracas de antígenos, anticorpo Anti-A1 no soro de um indivíduo A2 ou A2B, níveis significativos de anti-A ou B circulantes podem estar presentes após a infusão de plaquetas incompatíveis com ABO em um receptor;
- 2. Formação de Rouleaux;**

3. **Presença de aloanticorpo no soro do paciente adsorvido com antígeno correspondente na hemácia do doador:** aloanticorpos podem ser reativos à temperatura ambiente (por exemplo, anti-M), anticorpos que reage apenas com glóbulos vermelhos com forte expressão de um antígeno específico devido ao efeito da dosagem como antígenos Rh, Kidd, Duffy e MNS ou devido à variação intrínseca na força do antígeno (por exemplo, P1), um anticorpo que reage com um antígeno de baixa incidência presente nas hemácias do doador;
4. **Presença de autoanticorpo:** Autoanticorpos reativo a frio, autoanticorpos reativos a quente;
5. **Adesão de hemácias do doador com proteínas em casos de teste de antiglobulina humana direto (TAD) positivo;**
6. **Contaminação bacteriana;**
7. **Instabilidade no soro do paciente.**

A resolução da prova de compatibilidade maior, irá depender da sua causa. Podendo assim escolher a técnica melhor para sua interpretação.⁵

Meios potencializadores LISS, PEG, Albumina

Meios potencializadores são substâncias que podem ser adicionadas ao teste para facilitar a interação entre o antígeno e o anticorpo e a diminuição do potencial zeta, favorecendo a aglutinação e o encurtamento do tempo da reação.^{4,5}

Polímero linear solúvel em água polietilenoglicol (PEG) 10% e 20%: Potencializador polietilenoglicol, descrito por Nance e Garraty⁸. É um meio de baixa força iônica que aumenta a sensibilidade de reações antígeno anticorpo, principalmente anticorpos de classe IgG, que necessitam de potencializadores para ser visualizado aglutinações in vitro. ^{5,8}

Sendo utilizado em provas de compatibilidade e pesquisa de anticorpos irregulares, diminui o tempo de incubação pela ação do polietilenoglicol que diminui o potencial zeta pela baixa força iônica e retira moléculas de água que circundam as hemácias, aumentando a sensibilidade da ligação do antígeno ao anticorpo.^{9,37}

Meio de baixa força iônica – solução de *Low Ionic Strength Saline (LISS)*:, solução de meio de baixa força iônica, potencializador, utilizada como diluente de eritrócitos, age diminuindo a força iônica do meio também aumentando a sensibilidade da ligação antígeno ao anticorpo e diminuindo o tempo de incubação.^{4,37}

Enzimas proteolíticas (papaína, bromelina, ficina e tripsina): O tratamento enzimático com enzimas proteolíticas alteram a eletronegatividade das hemácias, com objetivo de quebrar ligações peptídicas específicas, o que, na bancada de exames imuno-hematológicos podem ser aplicadas como ferramenta para caracterizar antígenos eritrocitários, tornando as hemácias aglutináveis. Utilizando reagentes como a papaína, proveniente do melão, bromelina, proveniente do abacaxi, tripsina e alfaquimiotripsina, de origem animal e a ficina, proveniente do figo.^{10,37}

Anticorpos podem ter sua reatividade aumentada com o tratamento enzimático das hemácias-teste, devido alguns antígenos eritrocitários sofrerem destruição ou tornar-se pouco reativos, isso ocorre devido às enzimas retirarem da superfície das hemácias polipeptídios de glicoproteínas da membrana, o que faz a diminuição do potencial zeta e aumenta a afinidade do anticorpo com os antígenos eritrocitários pelas reestruturações desses antígenos.^{4,37}

A atividade de cada enzima proteolítica é diferente sobre cada antígeno, a depender da estrutura bioquímica do grupo sanguíneo, sendo alguns antígenos sensíveis, podem ser destruídos ou se tornar pouco reativos ou passarem a ter sua interação com os anticorpos intensificada.^{4,37}

Anticorpos com reatividade aumentada: anticorpos dirigidos contra antígenos do sistema Rh (C, c, E, e, C^w), Kidd (Jk^a, Jk^b), Lewis (Le^a, Le^b), P (P₁).⁴

Anticorpos com reatividade diminuída ou suprimida: Anticorpos dirigidos contra os antígenos dos sistemas MNS (M, N, S, s), Duffy (Fy^a e Fy^b) e Xg.⁴

Pesquisa de Anticorpos Irregulares/Teste de Antiglobulina humana Indireto

A aloimunização e o risco de aloimunização contra antígenos eritrocitários representa grande importância nos exames imuno-hematológicos. A não detecção de um aloanticorpo, seja por equívoco ou baixa sensibilidade do teste leva a maiores riscos de uma transfusão incompatível, tendo como consequência a sensibilização do paciente e/ou reações transfusionais hemolíticas agudas ou tardias.^{4,5}

A identificação de anticorpos irregulares (IAI), teste em painel, é realizado para quando é identificado uma reação positiva na triagem no teste de antiglobulina indireto/pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), que visa determinar a sensibilização de hemácias *in vitro*.¹¹

O método para a detecção de anticorpos antieritrocitários irregulares deve incluir uma fase de incubação a 37 °C e a utilização de soro de antiglobulina humana (AGH). A fase de leitura a 37 °C pode ser suprimida pela utilização do meio potencializador PEG.^{2,12}

Em serviços de hemoterapia, amostras são triadas nos testes pré-transfusionais incluindo o P.A.I pelas metodologias em Liss/Coombs e NaCl/Enzima, alguns realizando apenas a técnica em meio Liss/Coombs, A triagem de anticorpos envolve testar o soro ou plasma contra 2 ou 3 hemácias de triagem com fenotipagem conhecida, do grupo O para que possíveis anticorpos regulares anti-A e anti-B não interfiram na detecção dos anticorpos. Essas células são selecionadas para que perfis de antígenos de significância clínica estejam presentes em pelo menos uma das hemácias.^{5,13,14}

Painéis de hemácias

Para a identificação dos anticorpos irregulares são utilizados painéis de hemácias compostos por 8 a 30 suspensões de hemácias do grupo O de doadores com perfil antigênico conhecido, contendo os antígenos de maior importância clínica. Essas hemácias são de fabricação comercial, disponível em kits com um diagrama com a composição antigênica de cada célula disponível para identificação dos anticorpos testados, disponibilizado pelo fabricante.^{5,12}

A realização do painel de hemácias pode ser feita por diferentes metodologias como em tubo ou gel teste (figura 2), sendo a técnica empregada capaz de detectar anticorpos clinicamente significativos.¹²

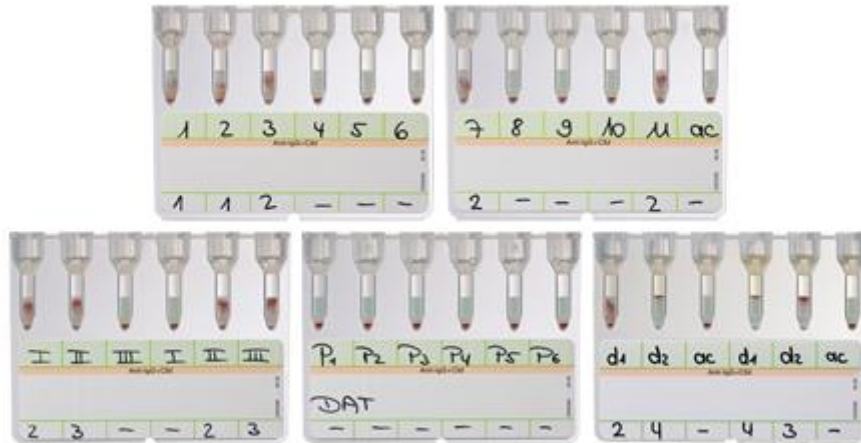


Figura 2: Biorad. ID-Card consisting of 6 microtubes containing anti-IgG and anti. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/liss-coombs?ID=MAPWH615>.¹⁵

A interpretação dos resultados do painel deve ser realizada utilizando-se diagrama disponibilizado pelo fabricante conforme lote e deve assegurar a identificação correta da(s) especificidade(s) do(s) anticorpo(s) reagente(s), a avaliação do padrão de reatividade do painel deve ser cautelosamente identificada para que múltiplos anticorpos não passem despercebidos/estejam mascarados. É importante também avaliar a presença de autoanticorpos e anticorpos dirigidos a antígenos de alta frequência.¹²

Análise e interpretação de painéis de hemácias

Nem todos os aloanticorpos de grupo sanguíneo são de fácil identificação, pacientes com hemoglobinopatias e anemia falciforme tem altos índices de aloimunização podendo apresentar múltiplos anticorpos irregulares, sendo 36% o risco de aloimunização nos pacientes falciformes.^{4,5,16}

A presença de anticorpos transitórios também causa complicações, podendo esses desaparecerem e reaparecerem durante um período de 5 anos, portanto registros da identificação desses aloanticorpos encontrados precisam manter-se disponíveis.⁵

Autoanticorpos podem mascarar os aloanticorpos, devido a isso técnicas apropriadas para a identificação desses são importantes para um processo transfusional e a seleção de unidades de hemocomponentes compatíveis, na investigação da doença hemolítica autoimune e na doença hemolítica do recém-nascido.⁵

A fenotipagem eritrocitária pode auxiliar na resolução dos casos, onde pode-se confirmar a presença ou ausência dos antígenos na membrana da hemácia.⁵

Quanto a reatividade:

- Reatividade de mesma intensidade em todas as células: pode sugerir a presença de apenas um aloanticorpo.
- Reatividade em fase diferentes (Liss/Coombs e Enzima):

Anticorpos direcionados contra antígenos destruídos por tratamento enzimático geralmente apresentam reatividade em fase de temperatura ambiente, térmica e de antiglobulina humana, mas ausência de reatividade em fase enzimática.

Anticorpos com reatividade aumentada com tratamento enzimático.¹²

Quanto a ausência de reatividade:

Na interpretação, anticorpos são excluídos quando há ausência de reatividade do soro do paciente com uma célula fenotipada do antígeno correspondente.¹²

- **Efeito de dose:**

Ocorre geralmente com antígenos que apresentem pares antitéticos, um par antitético são dois antígenos diferentes que pertencem a um mesmo sistema, e que disputam a expressão antigênica na superfície da hemácia, essa expressão desigual dos antígenos faz com que um deles seja expresso em maior quantidade na superfície da hemácia em detrimento de uma menor expressão do outro.^{12,17}

Sistemas que apresentam antígenos que podem apresentar efeito de dose:

Sistema Rh (Ee, Cc), Sistema Kell (Kk, Kp^a e Kp^b, Js^a e Js^b), Sistema Kidd (Jk^a e Jk^b), Sistema Duffy (Fy^a e Fy^b), Sistema MNS (MN e Ss) e Lutheran (Lu^a e Lu^b).^{12,17}

Determinados anticorpos podem apresentar o efeito de dose e não reagir com as hemácias teste, isso ocorre devido a herança codominante dos antígenos codificados por ambos os alelos herdado dos pais. Um anticorpo que se apresenta em efeito de dose pode reagir mais fracamente e até não apresentar reatividade com as hemácias de dose única para o antígeno.^{12,18}

Hemácias fenotipadas/ Hemateca e Antissoros raros

Outros painéis com outros antígenos dos grupos sanguíneos e outros painéis com células com fenótipo raro podem auxiliar casos em que com os painéis comerciais não são possíveis a identificação do anticorpo.⁵

A existência de um acervo de hemácias congeladas com ausência de antígenos de alta frequência, fenótipos raros e antissoros contendo anticorpos de baixa frequência e alta frequência, é um grande diferencial para os laboratórios na resolução de casos complexos de identificação de anticorpos.^{3,5}

Teste de antiglobulina humana direto (TAD)

O teste de antiglobulina direto permite detectar se hemácias foram sensibilizadas *in vivo* por imunoglobulinas e/ou frações do complemento após a adição da antiglobulina humana. O teste identifica quadros de hemólise envolvidos pelo sistema imunológico ou não, como anemias hemolíticas, autoimunes, anemia hemolítica autoimune (AHAI), reações transfusionais hemolíticas, síndrome do enxerto contra o hospedeiro, hemólise induzida por drogas, doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) e outras doenças. Um TAD positivo pode resultar na diminuição da sobrevivência das hemácias portanto deve ser investigado.³

Realizado com adição de soro de coombs/reagente antiglobulina humana (anticorpo específico contra a porção Fc de outro anticorpo) a hemácias lavadas onde é responsável por permitir a detecção de anticorpos IgM e IgG ligados a membrana das hemácias, diminuindo a força de repulsão das hemácias, com a diminuição do potencial zeta até seu ponto crítico, sendo possível sua detecção a depender da quantidade dos sítios antigênicos presentes nas hemácias.^{4,5}

A realização da técnica pode ser feita em tubo ou gel-teste, na técnica em tubo a lavagem de hemácias é essencial para a remoção de todo plasma onde pode conter anticorpos livres e outras proteínas do meio, que podem causar um resultado falso negativo pela neutralização do soro antiglobulina. Onde o resultado é positivo quando observado a aglutinação das hemácias.^{3,4}

Principais causas de um teste direto de antiglobulina humana positivo:^{5,9}

Reação transfusional hemolítica: aloanticorpos reagem com antígenos presentes nas hemácias do doador ou anticorpos presentes no plasma do doador reagem com antígenos nas hemácias do receptor.

Medicamentos: penicilinas, cefalosporinas, metildopa e fludarabine entre outros.

Anemia hemolítica autoimune (AHAI):

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): aloanticorpos maternos (IgG) atravessam placenta e reagem com hemácias fetais.

Administração de globulina imune em altas doses: globulinas ligam-se à membrana das hemácias do receptor.

Hipergamaglobulinemia.

Solucionando positividade do TAD

Se um teste de antiglobulina direto apresentar resultado positivo, os serviços de hemoterapia precisam identificar a causa da reação positiva, devido seu significado clínico, a

dependem da clínica do paciente, como histórico transfusional, gestações, medicações junto aos sinais e sintomas para avaliar a chance de hemólise intravascular.⁴

A metodologia de escolha para resolução de testes de antiglobulina direta positivo deve seguir com a determinação da especificidade do anticorpo. Quando o TAD é realizado com antiglobulina poliespecífica, anti-IgG e anti-complemento; deve-se ser realizado o teste com soros monoespecíficos.^{12,20}

Soros antiglobulinas humanas poliespecíficos contêm anticorpos contra IgG e frações do complemento C3d, contendo pouca atividade para as classes IgM e IgA, utilizado na rotina devido a maioria dos anticorpos de importância clínica, envolvidos principalmente na anemia hemolítica auto-imune ser da classe IgG.²⁰

Diferenciação de classe de imunoglobulinas para o um TAD positivo

As imunoglobulinas de maior importância clínica nas transfusões são as de classe IgM e IgG, as quais tem reatividade em 37°, sendo capazes de produzir hemólise.⁵

Anticorpos IgM, são de ocorrência natural no sistema ABO, podendo também ser produzidos em outros sistemas como Lewis, MNS e P, onde sua ocorrência pode mascarar a reatividade de anticorpos de classe IgG, dificultando sua identificação. Necessitando de técnicas como o Dithiothreitol (DTT) para a dissociação da IgM.⁵

Anticorpos de classe IgG são importantes por estar envolvidas na doença hemolítica do recém-nascido, onde são capazes de atravessar a placenta e fixar o complemento. Também tendo relevância nas transfusões incompatíveis, onde a maioria dos anticorpos dos antígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy são de classe IgG.⁵

Anticorpos da classe IgA possuem no sistema ABO, um terço de sua especificidade, podendo ser formados após transfusões de produtos plasmáticos em pacientes com deficiência de IgA.⁵

IgA secretoras podem ser encontradas em pacientes com hemólise autoimune, devido a múltiplos anticorpos ligados nos glóbulos vermelhos, causando aumento na hemólise induzida.⁵

A imunoglobulina de classe IgE tem significado clínico em reações transfusionais, onde ocorre urticária, devido a porção Fc do anticorpo se ligar a basófilos e mastócitos, desencadeando a liberação de histamina, mediador envolvido nas reações alérgicas.⁵

Pacientes com artrite reumatoide podem desenvolver anticorpos espontaneamente, sem estímulos sensibilizantes.⁵

Sistema Complemento

Sistema de grupo de proteínas envolvidos no reconhecimento de antígenos para a ativação de uma resposta imune, mediante 3 vias de ativação: via clássica, via da lectina ligadora de manose e via alternativa, tem funções como a lise de células, bactérias e vírus envelopados. É em mediador de opsonização onde facilitam a fagocitose revestindo substâncias estranhas com complemento e participação nas respostas imunes e inflamatórias, podem ser ativadas diretamente por patógenos ou indiretamente por anticorpos ligados ao antígeno, gerando a ativação de componentes.^{3,5}

Cartão de classe de anticorpo/ ID screening - BIORAD®

O teste de imunoglobulina direto quando positivo em soros antiglobulina poliespecíficos indicam que possivelmente hemácias estão revestidas in vivo por uma imunoglobulina e/ou frações de complemento, seguidamente devem ser realizados testes para diferenciação das classes de imunoglobulinas utilizando reagentes AHG monoespecíficos, como anti-IgG, IgA, IgM, C3, C3b, C3c, C3d e C4.^{5,18}

Cartões de identificação são usados para diferenciar qual a classe da imunoglobulina está resultando em um teste de antiglobulina direto positivo (TAD) (figura 3):

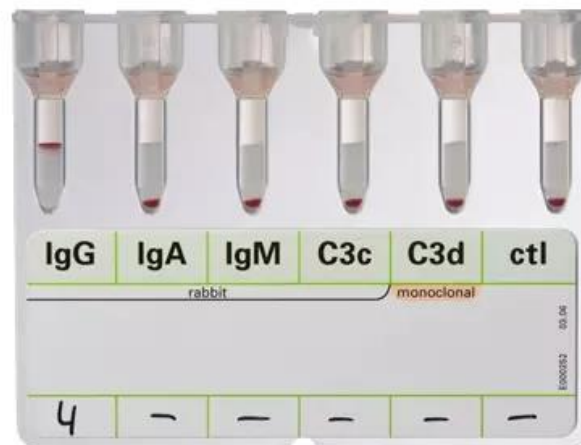


Figura 3: Biorad.ID-Cards used to differentiate results of a positive direct antiglobulin test (DAT). Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/dc-screening-i?ID=LO3452D57>.²¹

O ID-Card DAT IgG-Dilution fornece uma indicação da importância clínica do resultado positivo do TAD- BIORAD®

O número de moléculas de IgG por célula influencia a destruição acelerada de eritrócitos observada na Anemia Hemolítica Autoimune (AIHA), Doença Hemolítica do Recém-nascido (HDN) e reações transfusionais. A presença de autoanticorpo de classe IgG pode ser confirmada pela eluição do anticorpo da hemácia, tem-se geralmente na AHAI quente um eluato que reage com todas as células do painel de hemácias, mas também pode apresentar-se como especificidade Anti-e. Já nas AHAI a frio o eluato apresenta-se geralmente negativo (figura 4).²²

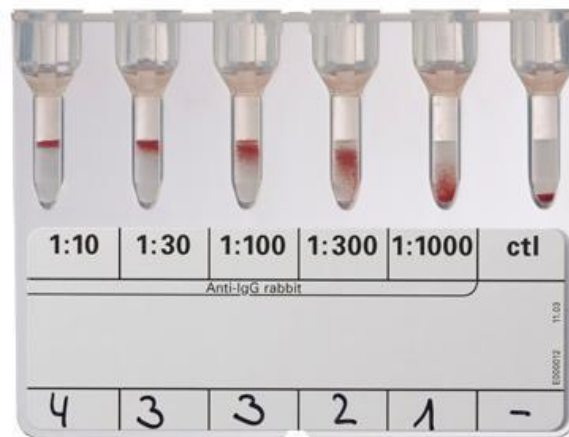


Figura 4: Biorad. The ID-Card DAT IgG-Dilution provides an indication of the clinical importance of the DAT positive result. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/dat-igg-dilution?ID=LO341OJSZ>.²³

IgG1 e IgG3

Subclasses de anticorpos IgG1 e IgG3, a IgG1 são investigados principalmente na DHPN, devido a capacidade maior de anticorpos anti-D IgG3 se ligarem aos receptores dos monócitos do que a IgG1, porém a subclasse IgG1 atravessa a placenta com mais eficiência e mais precoce (por volta da 17ª semana) e a IgG3 por volta de dois meses após, assim tem-se a IgG1 que pode se acumular e agravar a DHPN.²⁴

No ID-Card DAT IgG1/IgG3, duas diluições de anti-IgG1 e IgG3 são adicionadas ao gel para permitir a diferenciação entre baixo e alto risco de hemólise (figura 5).

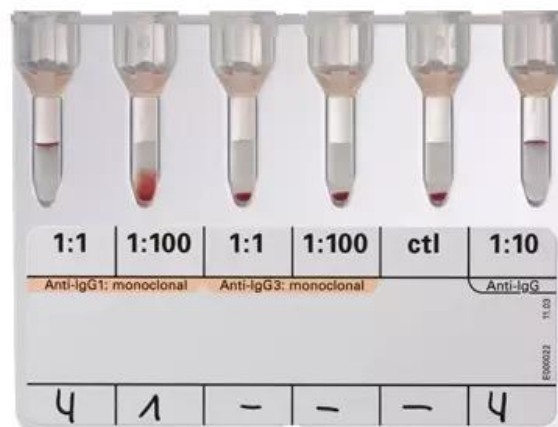


Figura 5: Biorad. ID-Card containing two dilutions of both anti-IgG1 and IgG3, used to differentiate between low and high risk for hemolysis. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/dat-igg1-igg3?ID=LO3438KAJ>.²⁵

Tratamento de hemácias com TAD positivo

Hemácias com TAD positivo podem interferir em resultados de outros testes imuno-hematológicos, devido a presença de autoanticorpos e/ou frações do complemento, as hemácias são sensibilizadas pela ligação do autoanticorpo com a antiglobulina humana, resultando em testes falso-positivos, onde pode ser observado aglutinação, causando interferências em testes como a fenotipagem eritrocitária, teste de compatibilidade, e também na pesquisa de anticorpos irregulares.²⁶

Para então retirar a interferência a técnica de bloqueio e a adsorção pode ser utilizada para tratar as hemácias em TAD com positividade $\leq 2+$.²⁶

Técnicas como o tratamento de hemácias com ZZAP, cloroquina e glicina/ácida EDTA são aplicadas em hemácias com TAD com positividade $>2+$.²⁶

A anemia hemolítica auto-imune (AHAI) doença caracterizada por hemólise, diminuição da sobrevivência das hemácias, mediada por aloanticorpo ou autoanticorpo, despertam um desafio nos testes imuno-hematológicos, onde a condição clínica da doença pode fazer com que um autoanticorpo mascare um aloanticorpo na rotina laboratorial, devido sua interação com todos as células da testagem, por exemplo em um painel de hemácias.⁵

Podendo ser classificada em: AHAI quente, AHAI a frio ou síndrome da aglutinina fria, geralmente mediada por imunoglobulinas IgM que reage a temperatura de 4° C Hemoglobinúria paroxística a Frio, (HPF), AHAI mista (combinação de AHAI quente e fria), AHAI atípica, AHAI induzida por drogas e AHAI induzida por aloanticorpos.¹⁹

A mais comum é a AHAI mediada por autoanticorpos quentes, que reagem em 37°C, sendo frequentemente de classe IgG.¹⁹

TÉCNICAS

ADSORÇÃO:

Auto-adsorção: Utiliza-se hemácias autólogas, do próprio paciente.

Nessa técnica o objetivo será a identificação de aloanticorpos de importância clínica, em pacientes que apresentam também autoanticorpos, através da ligação dos antígenos eritrocitários aos autoanticorpos. Na técnica faz-se a adsorção através da mistura de hemácias do próprio paciente com seu soro ocorrendo a ligação dos autoanticorpos, ou seja, a remoção dos autoanticorpos do soro do paciente, sendo assim possível a identificação dos aloanticorpos que estejam presentes no soro adsorvido, com restrição de não poder ser realizada em pacientes que receberam terapia transfusional há menos de 3 meses, onde hemácias alogênicas provenientes da transfusão podem estar presentes na circulação do paciente.^{3,5}

A auto-adsorção a frio é realizada com a incubação a 4° C, para a retirada de anticorpos de classe IgM.³

A auto-adsorção a quente é realizada com a incubação a 37 ° C, para a retirada de anticorpos de classe IgG.³

Alo-adsorção: Utiliza-se hemácias alogênicas com fenotipagens conhecidas. Utilizada para a remoção seletiva de um aloanticorpo, quando se encontra painéis de hemácias reativo com múltiplos anticorpos.³

Descrição da técnica: extraída de AABB *Technical Manual*:³

Amostra: Soro ou plasma contendo anticorpo a ser adsorvido.

Reagentes: Eritrócitos (autólogos ou alogênicos) que carregam o antígeno correspondente à especificidade do anticorpo a ser adsorvido.

Procedimento:

1. Lave os glóbulos vermelhos selecionados pelo menos três vezes com solução salina.
2. Após a última lavagem, centrifugue os glóbulos vermelhos a 800 a 1000 × g por pelo menos 5 minutos e remova o máximo possível de solução salina sobrenadante. Salina adicional pode ser removida tocando a massa de glóbulos vermelhos com um pedaço estreito de papel de filtro.
3. Misture os volumes apropriados de concentrado de hemácias e soro e incube à temperatura desejada por 30 a 60 minutos.
4. Misture a mistura soro/célula periodicamente durante a fase de incubação.
5. Centrifugue os glóbulos vermelhos a 800 a 1000 × g por 5 minutos para embalar bem as células. Centrifugar à temperatura de incubação, se possível, para evitar a dissociação do anticorpo das membranas dos glóbulos vermelhos.
6. Transfira o sobrenadante, que é o soro adsorvido, para um tubo de ensaio limpo. Se um eluato deve ser preparado, salve os glóbulos vermelhos.
7. Teste uma alíquota do soro adsorvido, preferencialmente contra uma alíquota adicional das células usadas para adsorção, para ver se todos os anticorpos foram removidos.

Interpretação:

Se a reatividade permanecer, o anticorpo não foi completamente removido.

Nenhuma reatividade significa que o anticorpo foi completamente adsorvido.

Observações:

1. A adsorção é mais eficaz se a área de contato entre as hemácias e o soro for grande; é recomendado o uso de um tubo de ensaio de grande diâmetro (13 mm ou maior).
2. Podem ser necessárias várias adsorções para remover completamente um anticorpo, mas cada adsorção sucessiva aumenta a probabilidade de o soro ser diluído e os anticorpos não adsorvidos enfraquecidos.
3. As adsorções repetidas devem usar uma nova alíquota de células e não as células da adsorção anterior.
4. O pré-tratamento enzimático de células adsorventes pode ser realizado para aumentar a captação de anticorpos para antígenos resistentes a enzimas.

ELUIÇÃO ÁCIDA

Anticorpos adsorvidos aos eritrócitos, podem ser dissociados e posteriormente recuperados através do processo de eluição, sejam eles *in vivo* ou *in vitro*, a dissociação permite a identificação de auto e aloanticorpos, a detecção de expressões fracas de antígenos e a separação de múltiplos anticorpos antieritrócitarios.^{27,28}

O eluato produzido pelo processo da eluição pode ser utilizado para vários fins como:²⁷

1. Identificação um anticorpo único em soros que contenham várias especificidades de anticorpos;
2. Demonstrar a presença de um antigêno fraco;
3. Identificação de um anticorpo responsável por um teste de antiglobulina direto positivo para anemia hemolítica adquirida ou reação transfusional;
4. Identificar anticorpos responsáveis pela doença hemolítica em recém-nascidos (DHRN);
5. Separar anticorpos específicos a partir de soros que contenham anticorpos indesejados.

Técnica extraída de ELU KIT™ PLUS Red Cell Elution System Para a eluição de anticorpos em ácido de glóbulos vermelhos intactos (IMMUCOR).²⁸

Métodos de eluição:

Os métodos para preparar eluatos incluem a eluição pelo calor, por congelamento, por alteração do pH e com o tratamento com solventes orgânicos, tais como o éter, cloreto de metileno, clorofórmio ou xileno.

Princípio do teste: O anticorpo não adsorvido que rodeia os glóbulos vermelhos sensibilizados é retirado através de irrigação com uma solução de lavagem que minimiza a perda do anticorpo adsorvido pelos glóbulos vermelhos. Após a lavagem, o complexo antígeno-anticorpo é dissociado adicionando uma solução de pH baixo. O pH do eluato recuperado é então ajustado adicionando uma solução tampão de base. O eluato fica então pronto a ser utilizado.

O Kit ELU KIT™ PLUS consiste em três soluções:

1. Concentrado de solução de lavagem: contém 0,1% de azida de sódio como agente antimicrobiano. Diluir o concentrado 1/10 (1+9) em água destilada ou desionizada para preparar uma solução de lavagem de trabalho.
2. Solução I, solução de eluição em ácido: um tampão de glicina de pH baixo, que contém um agente corante (indicador de pH). Não contém conservantes nem agentes antimicrobianos. Utilizada conforme fornecida.
3. Solução II, solução tampão de base: uma solução Tris (hidroximetilaminometano), que contém albumina bovina com 0,1% de azida de sódio como agente antimicrobiano. Utilizada conforme fornecida.

NOTA: Deixar que todos os reagentes/soluções atinjam a temperatura ambiente (18-25 C°), antes de utilizar neste procedimento. Agitar todas as soluções completamente antes de serem utilizadas.

Procedimento:

1. Diluir o concentrado de solução de lavagem adicionando um volume da solução a nove volumes de água destilada ou deionizada. Esta solução de lavagem de trabalho deverá ser conservada entre 1 e 10°C em um recipiente fechado. Esta solução poderá ser utilizada até seis meses depois, caso não se observe turvação ou outros sinais de contaminação durante a conservação. A utilização de uma solução de lavagem “fria” poderá minimizar acrescidamente a dissociação de anticorpos durante a fase de lavagem do procedimento.

2. Efetuar um teste de antiglobulina direto na amostra de glóbulos vermelhos que foi sensibilizada com o anticorpo in vivo ou in vitro.

Registrar os resultados.

3. Centrifugar a amostra de glóbulos sensibilizados num tubo de ensaio limpo e rotulado. Retirar o excesso de plasma ou de soro. Lavar uma vez com solução salina isotônica.

4. Transferir um volume adequado de glóbulos vermelhos para um tubo de ensaio limpo e rotulado (recomenda-se 1 mL de glóbulos aglomerados).

Lavar os glóbulos vermelhos com a solução de lavagem de trabalho, pelo menos, quatro vezes para eliminar o anticorpo não ligado. Reservar uma pequena alíquota do sobrenadante da última lavagem para testar relativamente à atividade do anticorpo. A lavagem inadequada poderá resultar na contaminação de anticorpos no soro.

5. Transferir os glóbulos lavados para um tubo de ensaio limpo e rotulado.

Adicionar 20 gotas (~1 mL) de Solução I a 1 mL de glóbulos vermelhos aglomerados lavados para a eluição do anticorpo. Homogeneizar cuidadosamente. Centrifugar imediatamente durante 45 a 60 segundos a 900-1000 rcf. Misturar em excesso ou não centrifugar imediatamente poderá resultar em hemólise, alterando o pH do eluato.

6. Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio limpo. Eliminar os glóbulos. Adicionar 5 gotas de Solução II para tamponar o eluato.

Misturar bem. Continuar a adicionar Solução II gota a gota, misturando bem cada gota até surgir uma cor azul distintiva. A cor azul indica uma gama de pH de ~6,5-7,5.

*NOTA: Este procedimento baseia-se num volume de amostra recomendado de 1 mL de glóbulos vermelhos aglomerados. No entanto, podem utilizar-se volumes inferiores se a relação proporcional entre os glóbulos aglomerados e a Solução I ELU KIT™ PLUS se mantiver. A utilização de um volume de glóbulos aglomerados inferior a 1 mL resultará num volume final de eluato inferior para a realização de testes.

7. Centrifugar o eluato para eliminar detritos celulares.

8. Transferir o eluato clarificado para um tubo de ensaio limpo e rotulado.

O eluato está pronto a ser testado.

Se não for imediatamente testado, o eluato poderá ser conservado entre 1 e 10 °C durante até sete dias e testado, caso não se observe turvação durante a conservação. Deverá observar-se uma reatividade ótima com eluatos que se encontrem dentro da gama de pH de 6,5 a 7,5.

TÉCNICA DE ELUIÇÃO ÁCIDA/ GLICINA-ÁCIDA/EDTA

A técnica da glicina-ácida/EDTA se baseia na mudança do pH causando a quebra da ligação antígeno-anticorpo, sustentada pelas forças químicas de ponte de hidrogênio, forças eletrostáticas e a força Van der Waals e pontes hidrofóbicas.²⁶

TÉCNICA DE BLOQUEIO

Técnica usada para tratar hemácias sensibilizadas com autoanticorpo anti-IgG utilizando soro monoespecífico anti-IgG, o anticorpo se liga aos anticorpos que estão sensibilizando as hemácias tornando o TAD que era antes positivo em negativo, dissociando os complexos de antígeno-anticorpo preservando a membrana eritrocitária e permitindo a fenotipagem.²⁹

DIFOSFATO DE CLOROQUINA

A técnica com utilização do difosfato de cloroquina, também utilizada na dissociação do complexo antígeno-anticorpo para fins como a fenotipagem eritrocitária em amostras com TAD positivo, é um reagente que tem por fins remover anticorpos IgG da superfície das hemácias, preservando seus antígenos na membrana. Tem como desvantagem não interpretar corretamente com precisão para os antígenos do sistema Duffy, Kell, Kidd S e s, por exigir a fase de antiglobulina humana.⁵

DISSOCIAÇÃO (TRATAMENTO DE HEMÁCIAS COM ZZAP)

Sulphydryl-Proteolytic Enzyme (ZZAP = DTT 0,02M + papaína), é um reagente utilizado para dissociar imunoglobulinas da classe IgG ligadas a membrana dos eritrócitos enquanto que, ao mesmo tempo, trata enzimaticamente as hemácias deixando seus sítios de ligação mais expostos para maior facilidade do anticorpo se ligar, o tratamento com ZZAP limita a fenotipagem eritrocitária por desnaturar os antígenos do sistema Duffy, MNS e Kell.^{5,30}

USO DE REAGENTES THÍOIS (DITIOTREITOL- DTT)

O DTT é um agente redutor eficiente que pode romper a estrutura terciária das proteínas reduzindo irreversivelmente as ligações dissulfeto a grupos sulfidríla livres, com a ausência da estrutura terciária os antígenos são impedidos de se ligar a seus anticorpos específicos. A técnica com uso de DTT é uma técnica de inibição útil para diferenciar anticorpo da classe IgM do anticorpo da classe IgG pela desnaturação do anticorpo da classe IgM ao romper as pontes de dissulfeto ou para determinar se em uma amostra o soro contém aloanticorpos mascarados. Hemácias tratados com DTT não reagem com anticorpos no sistema de grupo sanguíneo Kell.³

Técnica extraída do AABB *Technical Manual*:³

Reagentes:

- 1- Prepare o DTT 0,2 M dissolvendo 1 g de pó de DTT em 32 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 8,0. Separe em volumes de 1 mL e congele alíquotas a -18° C ou mais frio.
- 2- Glóbulos vermelhos conhecidos por serem positivos para o antígeno em questão e, como controle, glóbulos vermelhos conhecidos por serem positivos para K, que é constantemente interrompido pelo DTT.
- 3- Anti-K, seja na forma de reagente ou fortemente reativo em uma amostra de soro.

Procedimento:

1. Lave um volume das células de teste e das células de controle com PBS. Após a decantação, adicionar quatro volumes de 0,2 M DTT, pH 8,0.
2. Incubar a 37° C por 30 a 45 minutos.
3. Lave quatro vezes com PBS. Pode ocorrer hemólise leve; se a hemólise for excessiva, repita o procedimento usando hemácias frescas e um volume menor de DTT, por exemplo, dois ou três volumes.
4. Ressuspenda as células em uma suspensão de 2% a 5% em PBS.
5. Teste as células tratadas com DTT com soro contendo o anticorpo em questão. Teste os glóbulos vermelhos K⁺ com anti-K.

Interpretação:

1. As hemácias K⁺ controle devem apresentar reações negativas quando testadas com anti-K; caso contrário, o tratamento com DTT foi inadequado. Outros antígenos no sistema Kell também podem servir como controle.
2. Se a reatividade do soro de teste for eliminada, a suspeita de especificidade do anticorpo pode ser confirmada. Amostras de eritrócitos suficientes devem ser testadas para excluir a maioria dos outros aloanticorpos clinicamente significativos.

TRATAMENTO COM DTT 0.01 M

Destruição de imunoglobulinas IgM no soro com solução de DTT 0,01M, com objetivo de selecionar a imunoglobulina IgG presente em soros contendo misturas de classes de anticorpos, para determinar a sua especificidade na fase de antiglobulina humana, sem interferência de IgM que fixa o complemento, e reage com o soro de antiglobulina humana poliespecífico.^{5,31}

A técnica resume-se em tratar o soro ou plasma, a concentração geralmente refere-se de 1:1, a solução é incubada a 37°C por 30 minutos, posteriormente pode ser realizado os testes com hemácias de triagem e painel, um controle deve ser realizado (soro diluído a 1:1 com solução fisiológica,) deve-se obter um resultado de controle positivo, garantindo que o tratamento com o DTT não causou negatividade por diluição.^{5,31}

Descrição da técnica: Técnica extraída de Remlab indústria e comércio.³¹

Preparo da solução: Solução de DTT 0,01M

DTT: 154 mg

Solução salina tamponada pH 7,3 ou ID- Diluente 2 (LISS Bio-Rad): 100mL

- 1- Em um Becker, dissolver 154 mg de DTT em 100 mL de ID-Diluent 2 (LISS) ou solução de salina tamponada pH 7,3 homogeneizando com um bastão de vidro.
- 2- Acondicionar em frascos devidamente identificados distribuindo a solução em alíquotas de suficientes para o uso.

Observações: A solução pode ser conservada a – 20°C, por até 12 meses.

Descrição da técnica:

- 1- Identificar 2 tubos teste: T (Teste) e CD (Controle da Diluição).
- 2- No tubo teste (T) colocar 1 mL de soro a ser testado e 1 mL de solução de DTT 0,01M
- 3- No tubo controle da diluição (CD) colocar 1 mL de soro a ser testado e 1 mL de solução fisiológica 0,9%.
- 4- Homogeneizar os tubos e incubar as reações por 30 minutos a 37 °C.
- 5- Proceder a pesquisa do soro teste e controle de diluição nas técnicas padronizadas pelo serviço.

Interpretação de resultado:

Soro Tratado = Negativo Controle da Diluição = Positivo	Presença de anticorpos IgM.
Soro Tratado = Negativo Controle da Diluição = Negativo	Anticorpos diluídos: Teste inválido.
Soro testado= Fracamente positivo Controle da Diluição = Positivo Forte	Presença de anticorpos IgM + IgG ou IgM não totalmente destruída.
Soro testado= Positivo Controle da Diluição = Positivo	Presença de anticorpos IgM ou o DTT pode não ter atuado (checar se os controles funcionaram).

O controle negativo e positivo controla a atividade do DTT e devem apresentar resultados dentro dos esperados.

Observações:

- Anticorpos IgM de título elevado, podem requerer um tempo de tratamento mais prolongado.
- Se a atividade de IgM não desaparecer com 30 minutos de incubação, é necessário aumentar o tempo. Este procedimento deve ser monitorado pela possibilidade de gelificação do soro ou plasma, durante o tratamento.
- Amostras gelificadas não devem ser utilizadas para pesquisa de anticorpos.

TRATAMENTO COM DTT 0.2 M

Utilizado no tratamento de hemácias de grupos sanguíneos expressos em proteínas terciárias dependentes de ligações dissulfetos, com a desnaturação de antígenos desses grupos sanguíneos. Os grupos sanguíneos envolvidos são: KEL, LW, Sc, IN, JMH eYT.^{3,32}

O tratamento com DTT 0,2 M pode ser utilizado em amostras de para pacientes portadores de mieloma múltiplo em uso de Daratumumab (CD38), que interfere na maioria dos exames imuno-hematológicos. Também pode ser utilizado para tratar hemácias de um painel para a identificação de anticorpos dirigidos contra antígenos de alta frequência, em conjunto com as enzimas proteolíticas.^{3,32}

TESTE DE MMA (MONOCYTE MONOLAYER ASSAY)

A técnica de monocamada de monócitos, consiste em um ensaio celular in vitro para prever a sobrevivência de hemácias transfundida in vivo, utilizado na diferenciação de anticorpos clinicamente significativos e não significativos presentes em pacientes, geralmente com TAD positivo, onde há dificuldade em encontrar hemocomponentes com prova cruzada negativa.³³

FENOTIPAGEM

A determinação do perfil antigênico para outros antígenos de sistemas sanguíneos de importância clínica tem aplicabilidade especialmente em pacientes com hemoglobinopatias, previamente sensibilizados e que possuem previsão de regime de transfusão crônica. A fenotipagem além do sistema ABO e Rh D tem como objetivo a seleção de hemocomponente com fenotipagem compatível para prevenção da aloimunização ou futuras aloimunizações para pacientes já aloimunizados e reações transfusionais hemolíticas. O Art. 124 da Portaria 158/2016 do Ministério da Saúde e Art. 178 da Portaria 158/2016 do Ministério da Saúde diz respectivamente:^{34,35}

“É recomendada a realização da fenotipagem de antígenos eritrocitários dos sistemas Rh(D,C,c,E,e) e Kell(K1) nas amostras de sangue de doadores, conforme demandas do serviço de hemoterapia.”³⁵

“§ 18º Para pacientes que não apresentam anticorpos antieritrocitários que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica, recomenda-se a utilização de concentrado de hemácias fenotipadas compatíveis, principalmente para os sistemas mais imunogênicos (Rh, Kell,Duffy,Kidd e MNS), sob avaliação médica.”³⁵

Anticorpos contra o sistema Rh, Kell, Duffy e Kidd são de extrema importância pois são reativos a 37°C e causam hemólise, ou seja, destruição das hemácias transfundidas. A utilização de concentrado de hemácias com fenotipagem estendida compatível é uma estratégia na compatibilização para pacientes com fenótipos raros (figura 6).³⁴

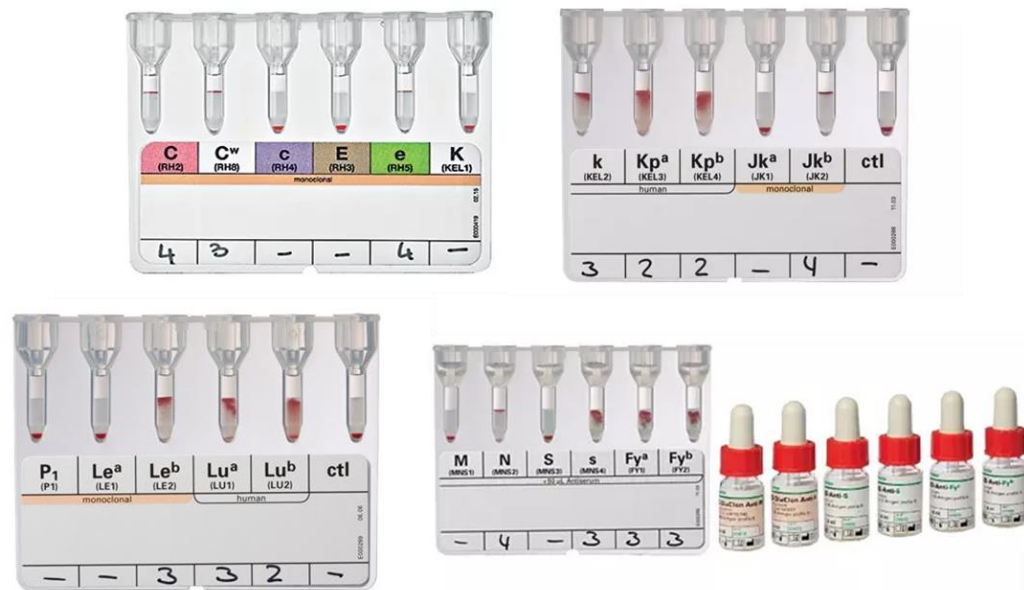


Figura 6: Biorad. Bio-Rad's extensive line of ID-System products for the immunohematology laboratory. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/category/antigen-profiles?ID=LO32JN15>.³⁶

GENOTIPAGEM

Com o conhecimento atual da biologia molecular, com a genética dos grupos sanguíneos, foi permitido o uso de técnicas como ferramenta auxiliar importante na rotina de laboratórios de hemoterapia, garantindo maior precisão nas fenotipagens eritrocitárias, identificação de anticorpos irregulares e resoluções de casos inconclusivos com a prática habitual.³⁸

Técnica auxiliar na rotina de imuno-hematologia que viabiliza a identificação dos fenótipos inconclusivos pela técnica de fenotipagem eritrocitária, com a utilização da biologia molecular. A genotipagem possibilita a determinação de antígenos eritrocitários na prevenção de aloimunização, em pacientes recentemente transfundidos, pacientes com anemia hemolítica autoimune, pacientes com anemia falciforme onde a fenotipagem eritrocitária gera resultados inconclusivos e na identificação de fenótipos menos frequentes na população.³⁸

CONCLUSÃO

O conhecimento atual das técnicas acessórias para a resolução de casos complexos de imuno-hematologia, proporciona maior segurança transfusional e garante resultados com mais acurácia, sendo essenciais na rotina de laboratórios de imuno-hematologia.

REFERÊNCIAS

- 1- Cardoso RA, Silva AC, Bonifácio SL, Carvalho FO, Santos LMD, Santos JAD, Junior RAD, Rocha V, Mendrone-Junior A, Dinardo CL. Pacientes oncológicos e as complicações nos testes imuno-hematológicos, Hematology, Transfusion and Cell Therapy, Volume 43, Supplement 1,2021, ISSN 2531-1379.
- 2- Ministério da Saúde. Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017
- 3- AABB Technical Manual 15th Ed. 2005
- 4- Girello AL, Kühn TIB. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. 4. ed. São Paulo: Senac; 2016.
- 5- Harmennig D. Modern blood banking and transfusion practices. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2006.
- 6- Controlab. Questionário - Proficiência Clínica 2008 disponível em: https://so.controllab.com/pdf/quest_ih_out.pdf
- 7- Polydoro E. Procedimento Operacional Padrão (POP) serviços em hemoterapia: prova de compatibilidade. Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 8- Combs M. R., Telen M. J. Testing eluates in polyethylene glycol (PEG): A sensitive technique for detecting early alloimmunization. (Abstract) Transfusion 1989.
- 9- Fresenius HemoCare Brasil Ltda. Potencializador polietilenoglicol em meio de baixa força iônica para a realização de prova cruzada, pesquisa e identificação de anticorpos irregulares 2015.
- 10- Santis LP, Garcia PC, Secco VN, Ferreira RR, Deffune E. Aplicabilidade de soluções de papaína em imuno-hematologia. einstein (São Paulo). 2019;17(2):eAO4328. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4328.
- 11- BARJAS-CASTRO, M. L. Imuno-Hematologia do Doador e do Receptor. In. Técnico em Hemoterapia: livro texto/Ministério da Saúde. Brasília, 2013.
- 12- Oliveira MBSC, Flávia CR, Alexandre GV. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia. Rio de Janeiro: EPSJV, 2013.

- 13- BARJAS-CASTRO, M. L. Imuno-Hematologia do Doador e do Receptor. In. Técnico em Hemoterapia: livro texto/Ministério da Saúde. Brasília, 2013.
- 14- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H. e PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. 6ª. ed. Rio de Janeiro, Elsevier. 2008.
- 15- Biorad. ID-Card consisting of 6 microtubes containing anti-IgG and anti. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/liss-coombs?ID=MAPWH615>.
- 16- Hemoterapia – Condutas para a prática clínica – Fundação Hemominas 2010
- 17- Blood Bank Guy. Glossary: Dosage Effect. Retrieved from: <https://www.bbguy.org/education/glossary/gld15/> Acessado em 06/11/2022
- 18- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The complement system and innate immunity.
- 19- Leger RM. The positive Direct Antiglobulin Test and Immune-mediated Hemolysis. Technical manual AABB. 16th. Bethesda: American Association of Blood Banks. 2011 p. 497-522
- 20- Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência Imuno-Hematologia laboratorial; 2014.
- 21- Biorad. ID-Cards used to differentiate results of a positive direct antiglobulin test (DAT). Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/dc-screening-i?ID=LO3452D57>.
- 22- Castilho L. Testes pré-transfusionais frente a novas tecnologias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. n° 22 (suplemento 2), 2000.
- 23- Biorad. The ID-Card DAT IgG-Dilution provides an indication of the clinical importance of the DAT positive result. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/dat-igg-dilution?ID=LO341OJSZ>.
- 24- Araújo MA, Deffune E, Carlos LMB, Magalhães SMM, Golim MA, Câmara LMC. Avaliação das subclasses IgG1 e IgG3 na doença hemolítica perinatal, Revista. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2003 disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000400004>
- 25- Biorad. ID-Card containing two dilutions of both anti-IgG1 and IgG3, used to differentiate between low and high risk for hemolysis. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/product/dat-igg1-igg3?ID=LO3438KAJ>.

- 26- Abiko CK. Aplicação da técnica da glicina-ácida/EDTA e avaliação da eficácia no tratamento de hemácias com teste direto da antiglobulina positivo.
- 27- PETZ, L. D. A physician's guide to transfusion in autoimmune haemolytic anaemia. *British Journal of Haematology*, Oxford, v. 124, n. 6, p. 712-716, mar. 2004.
- 28- ELU KIT™ PLUS Red Cell Elution System Para a eluição de anticorpos em ácido de glóbulos vermelhos intactos (IMMUCOR).
- 29- Sererat TS, Veidt D, Dutched A. A quick and simple method for phenotyping IgG-sensitized red blood cells. *Immunohematology*. 2000;16(4):154-6. PMID: 15373607.
- 30- BRANCH, D. R.; PETZ L. D. A new reagent (ZZAP) having multiple applications in immunohematology. *American Journal of Clinical Pathology*, Baltimore, v. 78, n. 2, p. 161-167, aug. 1982.
- 31- Remlab Industria e comércio Destruição de imunoglobulina igm no soro com solução de DTT 0,01m.
- 32- Castilho L, Junior JP , Reid J., Marion E. *Fundamentos de Imuno-hematologia*. 1ª ed., Atheneu, 2015.
- 33- DFM Mühlbeier, PF Araújo, TF Silva, NC Azevedo, ALA Mafra, EO Pinheiro, ECA Pinheiro, BMS Pimentel, FM Amaral Análise do teste de MMA (monocyte monolayer assay), subclasse de anticorpos e desfecho transfusional em pacientes complexos atendidos na fundação hemocentro de brasíliaFundação Hemocentro de Brasília (FHB), Brasilia, DF, Brasil.
- 34- Tioda SO, Gonçalves JVP, Paula BR, Vilanova AG, Lima FZ, Müller JB, Schimites PG. Fenotipagem estendida: implantação da liberação manual de resultados de pesquisa ampliada para antígenos eritrocitários. 2022. DOI: 10.1016/j.htct.2022.09.918
- 35- Ministério da Saúde. Portaria 158/2016, Art. 124 da Portaria 158/2016 e Art. 178.
- 36- Biorad. Bio-Rad's extensive line of ID-System products for the immunohematology laboratory. Disponível em: <https://www.bio-rad.com/pt-br/category/antigen-profiles?ID=LO32JN15>

- 37- CASTILHO, L. Testes pré-transfusionais frente a novas tecnologias. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. n° 22 (suplemento 2), 2000.
- 38- Martins ML, Cruz KVD, Silva MCF, Vieira ZM. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2009 • <https://doi.org/10.1590/S1516-84842009005000065>.