ANA PEDRO

Manual prático de IMUNO-HEMATOLOGIA



UNIDADE LOCAL DE SAÚDE AMADORA / SINTRA
HFF HOSPITAL PROFESSOR DOUTOR FERNANDO FONSECA

Publicação impressa com o patrocínio da Bio-Rad



Manual prático de

IMUNO-HEMATOLOGIA

1ª edição / 2026

PREFÁCIO

*O **Manual prático de Imuno-hematologia** é um guia que oferece informações e orientações úteis sobre os princípios e práticas relacionadas com o estudo dos antigénios e anticorpos, presentes nos sistemas de grupos sanguíneos humanos.*

O objetivo da criação deste manual é fornecer instruções, passo a passo, recorrendo a tabelas, imagens e esquemas, abordando temas como grupagem sanguínea, testes de compatibilidade para transfusões de sangue, técnicas de deteção de anticorpos irregulares e outras situações da prática transfusional. Os métodos utilizados para os testes descritos são o tubo e a microcoluna, sendo que, neste último caso, as fotografias ilustrativas dos testes foram autorizadas para utilização neste livro e estão de acordo com a bula dos produtos da Bio-Rad.

É um manual destinado a profissionais de saúde, em particular aos Técnicos Superiores de Diagnóstico e Terapêutica da área de Análises Clínicas e Ciências Biomédicas Laboratoriais, com o objetivo de apoiar a prática laboratorial e a resolução de problemas em imuno-hematologia. Contudo, não dispensa a consulta da literatura científica de referência.



AGRADECIMENTOS

Este Pocketbook resulta do esforço coletivo de profissionais dedicados à prática e ao ensino das Ciências da Transfusão.

Agradecemos à Técnica Coordenadora, Regina Ferreira, pela visão e entusiasmo que impulsionaram o projeto.

À Ana Pedro, autora principal, reconhecemos o rigor e a clareza com que transformou essa visão num recurso didático de excelência, baseado na prática laboratorial.

Um agradecimento especial à Marlene Pinto, da Bio-Rad Portugal, pela ponte entre a empresa e a equipa, e à Marília Tavares, da Bio-Rad Suíça, pela revisão rigorosa.

A António Aleixo, Maria Carmo Lopes, Ana Mota, Fernando Zorro e Susana Aquino, agradecemos as sugestões valiosas.

A revisão técnico-científica de Fátima Nascimento e Marcus Mota assegurou rigor metodológico, coerência científica e qualidade pedagógica.

Este Pocketbook é um tributo aos TSDT na Medicina Transfusional e um convite à partilha do saber.

Esta publicação contou com o apoio da Bio-Rad na paginação, produção e impressão. O conteúdo científico é da responsabilidade dos autores e da instituição, que mantiveram a sua independência editorial. As imagens fornecidas pela Bio-Rad são reproduzidas com a sua autorização e permanecem sua propriedade, incluindo os respetivos direitos de autor.

ABREVIATURAS

AGH - Antiglobulina Humana

AHAI - Anemia Hemolítica Autoimune

CE - Concentrado Eritrocitário

CtI - Microtubo Controlo

DHFRN - Doença Hemolítica do Feto e do Recém-Nascido

DHTR *(Delayed hemolytic transfusion reactions)* - Reações Transfusionais Hemolíticas Tardias

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

IPST - Instituto Português do Sangue e da Transplantação

LDH - Desidrogenase Láctica

LISS *(Low-ionic-strength solution)* - Meio de Baixa Força Iónica

PAI - Pesquisa de Anticorpos Irregulares (realizada por teste de antiglobulina indireto)

PC - Prova de Compatibilidade

RN - Recém-Nascido(s)

RTH - Reação Transfusional Hemolítica

SSMT - Serviço de Sangue e Medicina Transfusional

TA - Temperatura Ambiente

TAD - Teste de Antiglobulina Direto (também designado Teste de Coombs Direto)

TCI - Teste de Antiglobulina Indireta (também designado Teste de Coombs indireto)

ÍNDICE

1. Introdução 7
Fundamento 7
Amostra utilizada 7
Prescrição 7
Reagentes 8
Métodos 8
2. Grupo e fenótipo 9
2.1. Prova globular ou direta 9
Procedimento em *card* 9
Procedimento em tubo 10
Resultados 11
Sistema RhD e Kell 11
Pesquisa de D fraco - Procedimento 12
2.2. Prova sérica ou reversa 13
Procedimento em *card* 13
Procedimento em tubo 14
Resultados 15
Discrepâncias entre prova direta e reversa 15
3. Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) 17
Procedimento em *card* 18
Procedimento em tubo 22
Resultados 23
Efeito dose 23
4. Prova de compatibilidade 25
Procedimento em *card* 25
Procedimento em tubo 26
Dificuldades na identificação de anticorpos – Provas incompatíveis 27

5. Teste de antiglobulina direto (TAD) 31
Doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN) 31
Anemia hemolítica autoimune 32
1. AHAI a anticorpos quentes 32
2. Doença de aglutininas a frio 33
3. Hemoglobinúria paroxística fria 33
5.1. Procedimento em card- Coombs direto 34
Interpretação de resultados 35
Pesquisa de aglutininas anti-A e anti-B por TCI– Procedimento 35
5.2. Procedimento em *card* – Coombs direto monoespecífico 35
Resultados 36
5.3. Procedimento em *card* – Coombs direto diluição IgG 37
Resultados 38
5.4. Procedimento em *card* – Coombs direto IgG1/IgG3 38
Resultados: 39
Procedimento em tubo – Coombs direto 39
Técnica de eluição 40
Resultados 41
6. Titulação de anticorpos 42
Procedimento em *card* 42
Procedimento em tubo 43
Resultados 44
7. Fenotipagem alargada 44
7.1. Perfil I e II 44
7.2. Perfil III 46
Resultados 47
8. Doentes com drepanocitose 47
Pesquisa de hemoglobina S 47
Resultado 48
9. Referências Bibliográficas 49
Anexo I- Características dos anticorpos anti-eritrocitários 50
Anexo II- Seleção de CE e plasma para transfusão 51
Anexo III- Classificação de Wiener 52

1. INTRODUÇÃO

Fundamento:

A imuno-hematologia tem como fundamento reações de hemaglutinação entre antigénios eritrocitários e anticorpos específicos. A hemaglutinação ocorre em duas fases:

1. Sensibilização – ligação entre o anticorpo e os determinantes antigénicos, presentes na membrana do eritrócito;
2. Aglutinação – ligação entre os eritrócitos sensibilizados[1].

Amostra utilizada:

São estudadas amostras colhidas em tubo de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), uma vez que este agente promove a quelação de catiões, como cálcio e magnésio, impedindo a coagulação. Estes iões são, também, essenciais para a ativação do sistema do complemento. Assim, a sua remoção previne a fixação do complemento, evitando a opsonização e, eventualmente, a fagocitose dos eritrócitos. Além disso, a presença de EDTA inibe a ação hemolítica, *in vitro*, de alguns anticorpos, nomeadamente dos sistemas Kidd, Kell, Duffy e Lewis [2].

A amostra recebida deve estar corretamente identificada com os seguintes elementos: nome completo, número do processo, data de nascimento e sexo do doente, devendo estar assinada pelo profissional de saúde habilitado, que procedeu à colheita, e incluir data e hora da mesma. A amostra é válida durante 72 horas após a colheita, de acordo com o intervalo convencionado que reflete o estado imunológico do doente. No entanto, deve ser armazenada durante 7 dias, para estudos posteriores, no caso de ocorrência de reações transfusionais tardias, bem como as tubuladuras dos concentrados eritrocitários (CE) transfundidos[1].

As amostras hemolisadas ou coaguladas devem ser evitadas, pois dificultam a leitura de resultados e podem causar resultados falsamente positivos.

Prescrição:

A amostra recebida no SSMT deve ser acompanhada de prescrição, a qual deve conter elementos como: identificação inequívoca do doente, componente(s) requisitado(s) e respetiva quantidade, diagnóstico do doente, nome do médico prescritor e pedidos especiais (nomeadamente, irradiação do componente). Pedidos telefónicos são aceites apenas em situações emergentes, sendo obrigatória a posterior formalização, por escrito, da respetiva prescrição. Nestes casos, deve ser solicitado o nome completo do doente, número do processo, data de nascimento e a identificação do médico responsável pelo envio de sangue sem provas de compatibilidade (ou os critérios aplicáveis à identificação de doente inconsciente sem qualquer documento identificativo).

Reagentes:

No laboratório de imuno-hematologia, as ligações antigénio-anticorpo são potenciadas através do uso de diversos reagentes, nomeadamente:

- LISS (*Low-ionic-strength solution*) – reduz o potencial zeta, que normalmente impede a aglutinação por anticorpos IgG, dado que estes, por serem de pequenas dimensões, não conseguem ultrapassar a barreira eletrostática entre os eritrócitos. Ao reduzir essa barreira, a LISS promove ligações não covalentes, aumentando a taxa de ligação entre antigénio-anticorpo, durante a incubação, e posterior aglutinação, durante a centrifugação;
- Enzimas proteolíticas (como a papaína e a bromelina) – removem fragmentos de glicoproteína (resíduos de ácido siálico) da membrana eritrocitária, aumentando a proximidade dessas células e facilitando a ligação antigénio-anticorpo – potenciação (apesar de destruir alguns antigénios eritrocitários como M, N, S, s, Fy^a e Fy^b - inibição)[3].

Além destes, são também utilizados *cards* impregnados com anticorpos dirigidos contra antigénios eritrocitários específicos (no caso de *cards* para grupo e fenótipo eritrocitário), com soro de AGH (antiglobulina humana) poliespecífico, vulgarmente denominado soro de Coombs (presente nos *cards* de LISS/Coombs) ou com soro de AGH monoespecífico (*cards* para classificação de imunoglobulinas). Frequentemente, utiliza-se soro fisiológico para lavagem de amostras, de modo a remover proteínas inespecíficas, que possam provocar falsos positivos.

As células comerciais utilizadas têm uma diluição pré-definida, consoante o método utilizado, e o seu fenótipo é conhecido, facilitando a interpretação de resultados.

Métodos:

Podem ser utilizadas técnicas manuais, mas também automatizadas, existindo vários métodos, tais como: o método em *card* de gel de microcoluna (a técnica deve ser efetuada de acordo com as especificações do fabricante), o método em tubo (considerado método de referência), entre outros. A interpretação dos resultados obtidos, através dos métodos mencionados, é apresentada nas imagens 1 e 2[4].

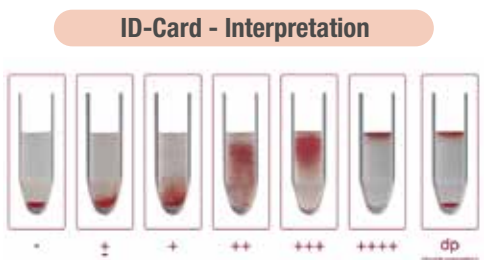


Imagem 1. *Interpretação de resultados em card. Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

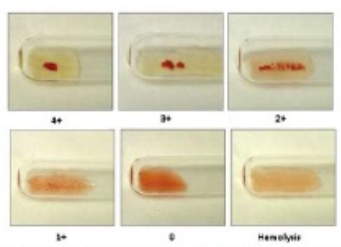


Imagem 2. *Interpretação dos resultados em tubo. Fonte: https://commons.bcit.ca/news/2019/06/pre-transfusion-testing/*

2. GRUPO E FENÓTIPO

O termo grupo sanguíneo refere-se a todos os sistemas que compõem os antigénios eritrocitários, cuja expressão é determinada de forma hereditária. Para provas de compatibilidade e subsequentes práticas transfusionais, os sistemas ABO e Rh são considerados os mais importantes, por serem os mais relevantes na prática transfusional[5].

Os principais fenótipos do grupo ABO são A, B, AB e O, sendo determinados pela presença ou ausência dos antigénios A ou B, na membrana eritrocitária. A expressão desses antigénios está dependente da produção de substância H, uma vez que as cadeias de açúcar dos epítopos terminais, destes 4 fenótipos, apenas conseguem ligar-se se houver adição de fucose na cadeia terminal, determinada pela expressão de substância H. Assim, é necessária a presença de fucose para que as glicosiltransferases A (N-acetilgalactosamina) e B (galactose) se liguem à cadeia de oligossacáridos. No caso do grupo O, não ocorre ligação de transferases, pelo que apenas é expressa a substância H[6].

A ausência de produção de substância H impede a produção dos antigénios do grupo ABO. O fenótipo hh (ou fenótipo de Bombay) é extremamente raro e caracteriza-se pela falta de expressão das transferases ABH nos eritrócitos e secreções, havendo produção de grandes quantidades de anti-H, fazendo com que os eritrócitos Oh sejam incompatíveis com os do grupo O. Na necessidade de transfusão deste tipo de doentes, apenas podem ser transfundidas unidades sem substância H (ou seja, hh), uma vez que este tipo de incompatibilidade causa reação transfusional hemolítica (RTH)[6].

Além do grupo ABO, existem outros antigénios que são determinados, por rotina, nomeadamente, os antigénios D, C, c, E, e, do sistema Rh, e o antigénio K, do sistema Kell.

2.1. Prova globular ou direta

A prova direta permite determinar os antigénios eritrocitários, através de uma reação específica entre os eritrócitos a testar e os anti-soros conhecidos, os quais estão inseridos no gel do *card*, no caso dos testes realizados em microcoluna. Esta prova é suficiente para determinar estes antigénios, com exceção do sistema ABO, que necessita de uma prova sérica ou reversa para a sua validação.

Procedimento em *card*:

Material:

- Diluente 2 (LISS);
- *Card* DiaClon ABO/D ou ABD-Confirmation;
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Tubos de hemólise;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Fazer uma diluição de 25 µL de eritrócitos com 500 µL de diluente 2;
2. Pipetar 12,5 µL da diluição para cada poço;
3. Centrifugar 10 minutos, 910 rpm;
4. Fazer a leitura.

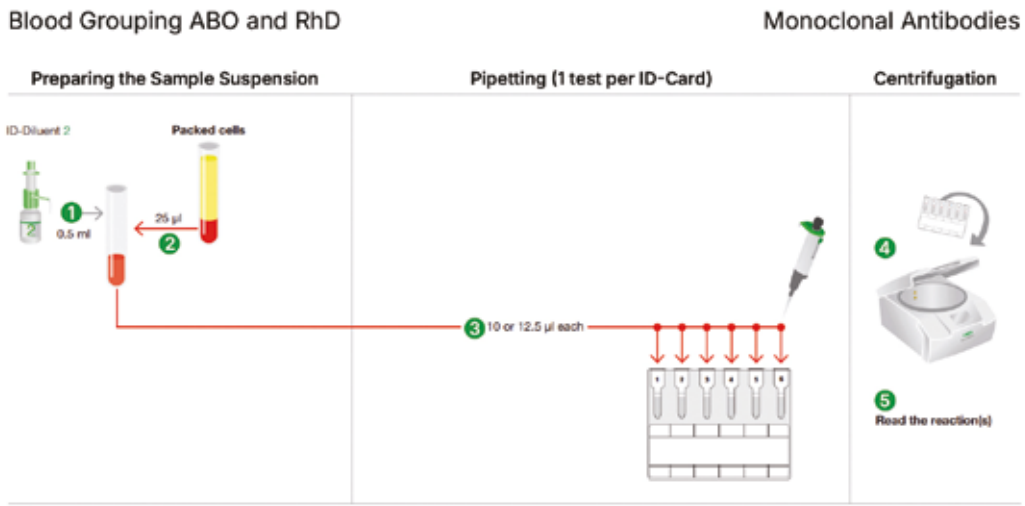


Imagem 3. *Procedimento da prova direta, em* card.
Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização, com eritrócitos com grupo conhecido.

O controlo de qualidade da técnica é efetuado através do microtubo controlo (*ctl*), o qual deve apresentar uma reação negativa. Caso *ctl* seja positivo, a determinação do grupo deve ser considerada inválida.

Procedimento em tubo:

Material:

- Anti-soros (anti-A; anti-B; anti-AB; anti-D);
- Soro fisiológico;
- Tubos de hemólise;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga de tubos;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Aglutinoscópio.

Procedimento:

1. Fazer a diluição de 50 µL de eritrócitos com 1000 µL de soro fisiológico (suspensão entre 2% a 5%);
2. Identificar os tubos;
3. Colocar 1 gota dos anti-soros (Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D), no respetivo tubo;
4. Adicionar 1 gota da diluição preparada, em cada tubo;
5. Centrifugar durante 1 minuto, a 125 G;
6. Fazer a leitura.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização, com eritrócitos com grupo conhecido.

Resultados:

Os resultados obtidos são interpretados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. *Interpretação dos resultados obtidos na prova direta*

	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-AB**
Grupo A	Positivo	Negativo	Positivo
Grupo B	Negativo	Positivo	Positivo
Grupo AB	Positivo	Positivo	Positivo
Grupo O	Negativo	Negativo	Negativo
Grupo *Bombay*	Negativo	Negativo	Negativo

Sistema RhD e Kell:

A execução técnica e interpretação dos sistemas RhD e Kell são realizadas de forma semelhante à da prova direta do sistema ABO, sendo a positividade no respetivo reagente indicativa da expressão do antigénio correspondente.

O antigénio D tem diversas variantes que afetam as reações serológicas. Se o antigénio D tiver estrutura normal, mas apresentar um número reduzido de determinantes antigénicos, é designado D fraco. Caso seja um defeito estrutural, denomina-se D parcial. Desta forma, doentes com um D parcial podem produzir anti-D, enquanto pessoas com D fraco habitualmente não. Assim sendo, doentes que sejam D variante devem ser considerados RhD negativos e, enquanto os dadores, são considerados RhD positivo[1].

A variante D mais frequente nos caucasianos é DVI. Por esta razão, utilizamos, por rotina, *cards* positivos e negativos para esta variante. Embora a serologia não nos permita diferenciar, com certeza, entre D fraco e D parcial, é importante ter em atenção a intensidade de positividade apresentada (tabela 2), que nos pode dar uma indicação para presença de uma variante.

Tabela 2. *Interpretação de RhD*

Anti-DVI+	Anti-DVI-	Interpretação
+++ a ++++	+++ a ++++	RhD positivo
± a ++	± a ++	RhD fraco
Negativo	Negativo	RhD negativo
+ a ++++	Negativo	DVI+
Negativo	+ a ++++	DVI-

Na presença de D variante, a intensidade de reação pode variar entre os dois microtubos DVI+/DVI-. As reações fracas devem ser sujeitas a investigação adicional, pelo laboratório de referência, o Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST), para distinguir o tipo de D variante em causa[7].

Nos recém-nascidos (RN) e dadores de sangue que forem Rh negativos, deve ser realizada a pesquisa do D fraco.

Pesquisa de D fraco - Procedimento:

1. Dispensar 1000 µL de diluente 2, num tubo de hemólise, e adicione 12,5 µL de eritrócitos a testar;
2. Num card de LISS/Coombs, adicionar 50 µL de ID-DiaClon Anti-D (IgG Monoespecífico);
3. Adicionar 50 µL da suspensão realizada;
4. Incubar 15 minutos, a 37ºC;
5. Centrifugar o card durante 10 minutos, a 910 rpm;
6. Proceder à leitura.

A interpretação deste teste deve ser efetuada, de acordo com a tabela 3.

Tabela 3. *Interpretação da pesquisa de D fraco*

Resultados	Reações
RhD positivo	++++
RhD fraco/RhD parcial	+ a +++
RhD Negativo	Negativo

Nota: *A pesquisa de D fraco é efetuada, por rotina, a todos os recém-nascidos e dadores de sangue que sejam RhD negativo. Importa referir que a presença de Teste de antiglobulina direto (TAD) positivo pode originar resultados falsamente positivos. Por isso, como parte do controlo de qualidade, deve ser garantida a presença de TAD negativo.*

2.2. Prova sérica ou reversa

Os anticorpos do sistema ABO são anticorpos naturais – maioritariamente IgM – que aglutinam a temperaturas iguais ou inferiores à Temperatura ambiente (TA)[1].

A presença ou ausência destes anticorpos pode ser detetada através do teste entre o plasma a testar com suspensões celulares dos respetivos grupos – prova reversa. Por ser um teste que valida a prova direta, apenas é efetuado a doentes cujo grupo não é conhecido. Além disto, não deve ser efetuado em crianças com menos de 4 meses, uma vez que os anticorpos apenas se começam a desenvolver entre os 3 e os 6 meses de idade[1].

Procedimento em *card:*

Material:

- Card NaCl;
- Células A_1, células A_2, células B, células O.
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Tubos de hemólise;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar os poços do *card*;
2. Colocar 50 µL das células reagentes, no respetivo poço (células A_1, A_2, B e O);
3. Pipetar 50 µL do plasma a testar, em cada poço;
4. Incubar 10 minutos, à TA;
5. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm.
6. Fazer a leitura.

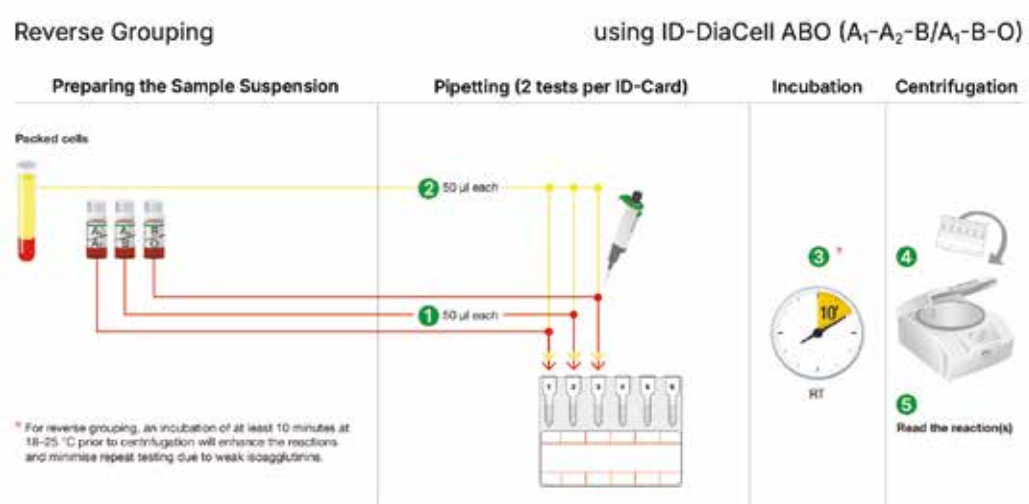


Imagem 4. *Procedimento da prova reversa, em* card.
Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização, com eritrócitos com grupo conhecido.

Procedimento em tubo:

Material:

- Células A_1, células A_2, células B e células O;
- Tubos de hemólise;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga de tubos;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Aglutinoscópio.

Procedimento:

1. Colocar 50 µL de cada suspensão celular, no respetivo tubo;
2. Pipetar 100 µL do soro a testar;
3. Homogeneizar e incubar 10 minutos, à TA;
4. Centrifugar os tubos durante 1 minuto, a 125 G;
5. Ler e interpretar os resultados.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

Resultados:

Os resultados são interpretados de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. *Interpretação dos resultados obtidos na prova reversa*

	Células A_1	**Células A_2**	**Células B**	**Células O**
Grupo A	-	-	+	-
Grupo B	+	+	-	-
Grupo AB	-	-	-	-
Grupo O	+	+	+	-
Grupo *Bombay*	+	+	+	+

Discrepâncias entre prova direta e reversa

As discrepâncias ocorrem quando as provas globular e sérica não coincidem. Perante uma discrepância, o grupo não pode ser determinado até à sua resolução. Ou seja, caso se trate de um dador, a unidade não pode ser transfundida. No caso de um recetor, poderá ser necesssária a administração de um CE do grupo O, até que a discrepância esteja resolvida.

Nos doentes recentemente transfundidos, pode observar-se a presença de uma dupla população na prova direta. Nesses casos, só deverão ser transfundidas unidades isogrupais, se o grupo sanguíneo do doente estiver previamente documentado e confirmado.

A primeira etapa na resolução de uma discrepância passa por repetir os testes na mesma amostra, de forma a eliminar a possibilidade de se tratar de um erro técnico.

Se a discrepância não for resolvida, torna-se necessário:

1. Obter o diagnóstico do doente, histórico transfusional e/ou transplante/medicação;
2. Verificar os resultados da pesquisa de anticorpos irregulares (PAI) ou do TAD, para excluir a interferência de aloanticorpos ou autoanticorpos;
3. Solicitar nova amostra e repetir os testes com nova amostra, para eliminar a hipótese de uma discrepância causada por uma contaminação[1].

Apesar disto, existem determinadas situações que provocam esta discrepância e que podem ser resolvidas, de acordo com as tabelas 5 e 6[8].

Tabela 5. Discrepâncias na prova direta		
Categoria	**Causas**	**Resolução**
Reações fracas ou negativas	Possível subgrupo	• Incluir anti-A_1 e anti-H nos testes; • Transfundir CE do grupo O; • Enviar para o laboratório de referência (IPST).
Reações positivas inesperadas	Células poliaglutináveis	Usar um reagente monoclonal.
	TAD positivo	Utilizar células lavadas, em teste pré-aquecido.
	Fenótipo B adquirido	Utilizar um soro anti-B monoclonal conhecido, que não reaja com o B adquirido.
	Aglutinação espontânea	• Concentrações anormais de proteínas séricas ou presença de Geleia de Warton (em amostras de cordão) – lavar os glóbulos antes de determinar o grupo, pode solucionar o problema; • Autoanticorpo frio – colher nova amostra, a 37 ºC, e manter o tubo a essa temperatura.

Tabela 6. Discrepâncias na prova reversa		
Categoria	**Causas**	**Resolução**
Discrepâncias devido à ausência de anticorpos esperados	Doentes imunodeprimidos (doentes oncológicos, idosos, hipogamaglobulinémia, transplantados)	• Aumento do tempo de incubação para 15 a 30 minutos, à TA; • Incubação a 4 ºC, durante 15 a 30 minutos. • Adicionar enzima às células (potenciador).
Discrepâncias devido a reações não esperadas	Reação de células A_1 com amostra que reage com anti-A (subgrupos de A)	Testar o soro com células A_1 e A_2. Se positivo para A_1 e negativo para A_2 pode tratar-se de um subgrupo de A (enviar amostra para o laboratório de referência ou, se urgente, transfundir com CE grupo O).
	Presença de aglutininas frias	Pré-aquecer o soro e os reagentes a 37 ºC antes de testar.
	Presença de aloanticorpos que reajam à TA (como anti-M e anti-P_1) e cujas células tenham esse antigénio	• Utilização de células A ou B sem o respetivo antigénio; • Realizar técnica a 37 ºC; • Se PAI negativa, pode significar a presença de um anticorpo para um antigénio de baixa incidência.

Nota: *Em doentes com transplante de medula poderá ocorrer discrepância entre a prova direta e a prova reversa. Por exemplo, um doente do grupo A que recebeu um transplante de medula do grupo O, terá em circulação eritrócitos do grupo O, mas irá produzir, por um período, apenas anticorpos anti-B.*

3. PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES (PAI)

Os aloanticorpos são os anticorpos produzidos contra antigénios em falta nos eritrócitos em estudo. Esses anticorpos podem ser produzidos em resposta a uma transfusão de eritrócitos ou exposição a eritrócitos fetais, durante a gravidez ou parto, sendo, normalmente, da classe IgG[1].

Apesar de já serem conhecidos vários sistemas de grupos sanguíneos, nem todos os anticorpos são clinicamente significativos e capazes de causar reação transfusional e doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN). Os anticorpos mais frequentes são dirigidos contra os antigénios dos sistemas:

- ABO (A, B, AB);
- Rh (D, C, c, E, e);
- Kell (K);
- Kidd (Jk^a, Jk^b);
- Duffy (Fy^a, Fy^b);
- MNS (S, s, raramente M, N);
- Lewis (raramente Le^a).

Além da compatibilidade ABO entre o sangue do dador e do recetor, o soro ou plasma do recetor deve ser testado contra um painel de eritrócitos reagentes do grupo O. Esses eritrócitos são selecionados porque possuem os antigénios necessários para detetar os aloanticorpos mais importantes. Este procedimento é conhecido como pesquisa de anticorpos irregulares (PAI). A PAI permite determinar se o doente produziu um anticorpo contra um antigénio, presente nos eritrócitos transfundidos, com potencial para causar hemólise. Deve ser realizada nos seguintes casos:

- Recetores de transfusão de sangue;
- Mulheres grávidas;
- Recetores de transfusão, com história de reações transfusionais anteriores;
- Dadores de sangue total e dadores de plasma.

O painel utilizado para a PAI é composto por três suspensões eritrocitárias de células do grupo O, identificadas como células I, II e III. Essas suspensões celulares são acompanhadas por uma tabela, onde estão discriminados, para cada uma delas, os antigénios positivos e negativos, para os principais sistemas antigénicos. Uma reação a qualquer uma das células da PAI demonstra a presença de um ou mais anticorpos. Na presença de PAI positiva, torna-se necessário efetuar a identificação de anticorpos, utilizando um painel de 11 suspensões celulares, fenotipadas para os principais sistemas, permitindo, assim, a identificação do respetivo anticorpo[9].

Procedimento em card:

Material PAI em LISS/Coombs:

- *Card* LISS/Coombs;
- Células I, II, III, a 0,8 % ± 0,1;
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento PAI em LISS/Coombs:

1. Identificar o card LISS/Coombs;
2. Adicionar 50 µL de células reagentes (I, II, III), no respetivo poço;
3. Pipetar 25 µL do plasma do doente;
4. Incubar 15 minutos, a 37 ºC;
5. Centrifugar 10 minutos a 910 rpm;
6. Fazer a leitura.

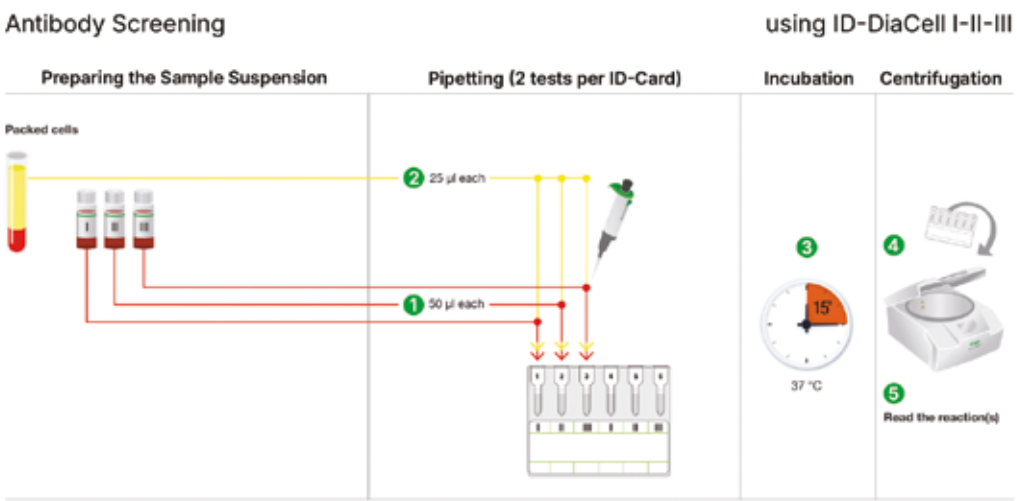


Imagem 5. *Procedimento PAI, em card LISS/Coombs. Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

Se a PAI for positiva, deve ser repetida utilizando células tratadas com enzimas, uma vez que estas podem potenciar ou inibir reações antigénio-anticorpo. A identificação do ou dos anticorpos deve ser realizada com os mesmos meios e condições de temperatura utilizados na PAI inicial. Existem células comercialmente tratadas com enzima, usualmente a papaína, mas, em alternativa, pode ser adicionado diluente 1 (bromelina) às células não tratadas, conforme indicações do fabricante. Para distinção entre as células tratadas com enzima das que não o são, atribui-se um "P" ou um "B", às tratadas enzimaticamente. Simultaneamente, também é feito o teste de Coombs direto ou autocontrolo.

Material PAI em enzima:

- *Card* NaCl ou LISS/Coombs[1];
- Células reagentes IP, IIP, IIIP, a 0,8 % ± 0,1;
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento PAI em enzima:

1. Identificar o *card* NaCl ou LISS/Coombs;
2. Adicionar 50 µL de células reagentes (IP, IIP, IIIP), no respetivo poço;
3. Pipetar 25 µL do plasma do doente;
4. Incubar 15 minutos, a 37 ºC;
5. Centrifugar 10 minutos a 910 rpm;
6. Fazer a leitura.

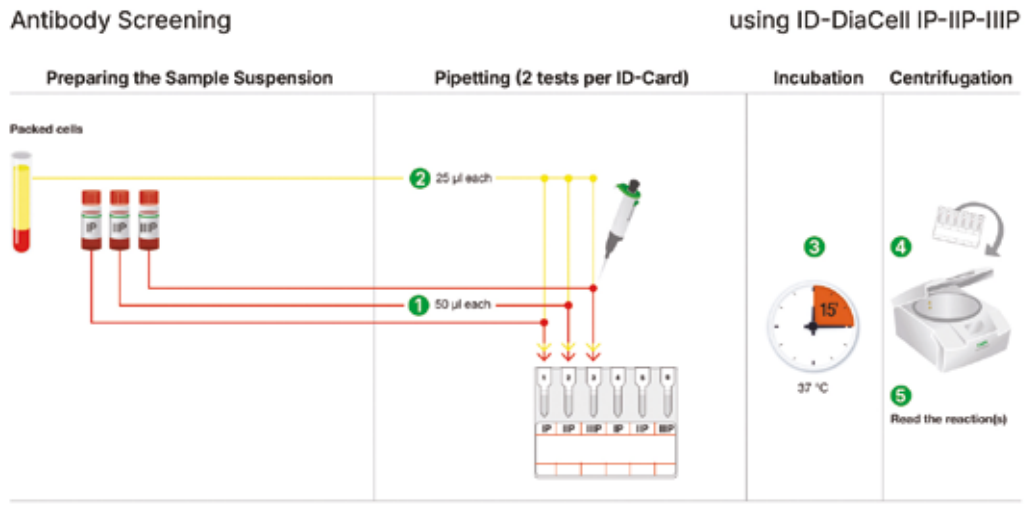


Imagem 6. *Procedimento PAI em enzima card NaCl. Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

[1] Consoante a prática de cada laboratório, pode ser efetuada PAIP em *card* LISS/Coombs, no sentido de potenciar reações e fornecer um bom termo de comparação com as reações obtidas em LISS/Coombs sem enzima

Material painel 11 células em LISS/Coombs:

- *Card* LISS/Coombs;
- Células reagentes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, a 0,8 % ± 0,1;
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento painel de 11 células LISS/Coombs:

1. Identificar o *card* LISS/Coombs
2. Adicionar 50 µL de cada célula reagente, no respetivo poço;
3. Pipetar 25 µL do plasma do doente;
4. Incubar 15 minutos a 37 ºC;
5. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
6. Fazer a leitura.

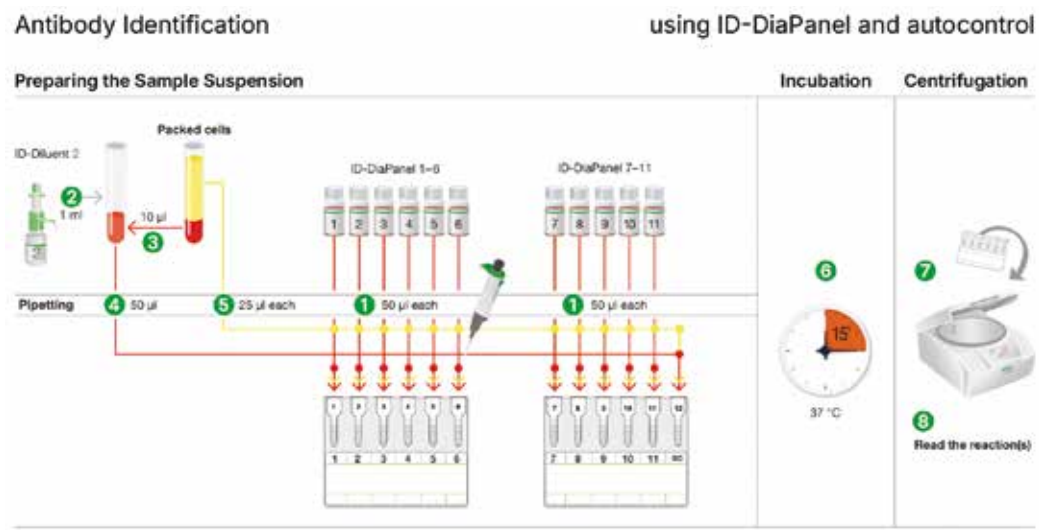


Imagem 7. *Procedimento Painel 11 células, em card LISS/Coombs. Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

Material Painel 11 células em enzima:

- *Card* NaCl ou LISS/Coombs[2];
- Células reagentes 1P, 2P, 3P, 4P, 5P, 6P, 7P, 8P, 9P, 10P, 11P, a 0,8 % ± 0,1;
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento painel de 11 células enzima:

1. Identificar o *card* NaCl ou LISS/Coombs;
2. Adicionar 50 µL de cada célula reagente, no respetivo poço;
3. Pipetar 25 µL do plasma do doente;
4. Incubar 15 minutos a 37 ºC;
5. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
6. Fazer a leitura.

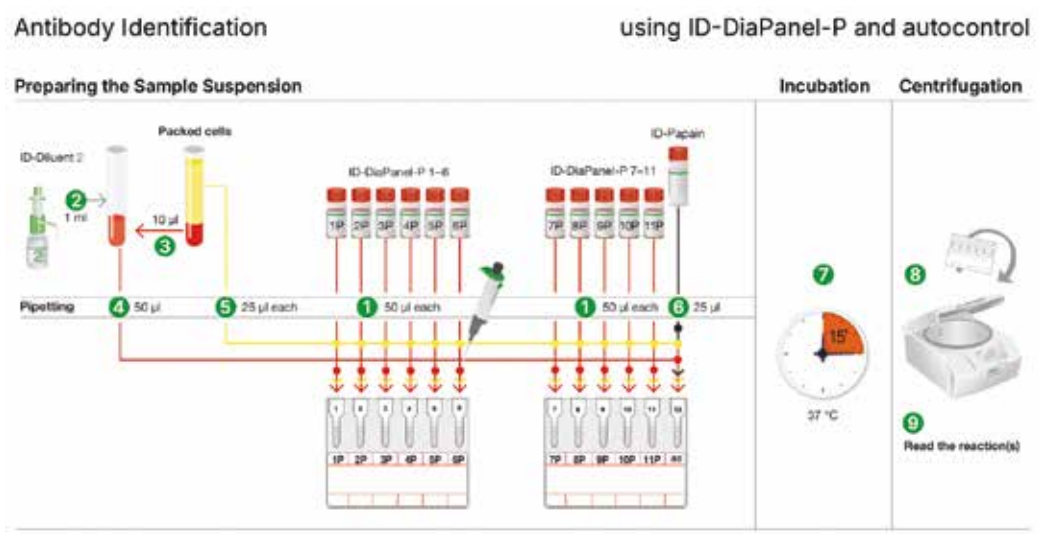


Imagem 8. *Procedimento Painel 11 células, em enzima, em card NaCl. Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

[2] Consoante a prática de cada laboratório, pode ser efetuada PAIP em *card* LISS/Coombs, no sentido de potenciar reações e fornecer um bom termo de comparação com as reações obtidas em LISS/Coombs sem enzima

O autocontrolo testa o soro do doente com os seus próprios eritrócitos. Em alternativa, pode ser efetuado o Teste de Antiglobulina Direto (TAD) e ambos fornecem informações úteis para determinar se o anticorpo do doente é direcionado contra os seus eritrócitos ou células transfundidas.

Procedimento em tubo:

O procedimento em tubo da PAI e da identificação de anticorpos são idênticos, variando, unicamente, no número de células reagentes utilizadas. Assim, apenas será descrito um único procedimento.

Material:

- Células reagentes I, II, III e/ou IP, IIP, IIIP e/ou 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e/ou 1P, 2P, 3P, 4P, 5P, 6P, 7P, 8P, 9P, 10P, 11P, todas elas a uma concentração entre 3 % a 5 %;
- Tubos de hemólise;
- Soro de Coombs;
- Soro fisiológico;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga de tubos;
- Incubadora de tubos;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Aglutinoscópio/microscópio.

Procedimento:

1. Identificar os tubos;
2. Colocar, no respetivo tubo, 50 µL de cada célula;
3. Adicionar 100 µL do plasma do doente;
4. Agitar e incubar 1 hora, a 37 ºC;
5. Lavar 3 vezes com soro fisiológico;
6. Juntar 2 gotas de soro de Coombs;
7. Agitar e centrifugar a 125 G, durante 1 minuto;
8. Fazer a leitura em microscópio.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

As *Checkcells* (células sensibilizadas por IgG) devem ser adicionadas a todos os resultados negativos. Se a reação, após a adição das células de controlo, for mais fraca do que o esperado (menor que 2+), o teste deve ser repetido.

Resultados:

Após a conclusão do teste, os resultados são registados no painel de antigénios, fornecido com o *kit*, para cada fase do teste. A fase ou temperatura de reação onde é obtida aglutinação é uma indicação do tipo de anticorpo – IgG, que reagem a 37 ºC, ou IgM, que reagem a temperaturas iguais ou inferiores à TA (é o caso de anticorpos como anti-Le^a, anti-Le^b, anti-M, anti-N, anti-I e anti-P_1).

Após registar os resultados no painel fornecido, o anticorpo é identificado, utilizando a seguinte metodologia:

- Exclusão: células onde se obtenha reação negativa com todas as fases testadas podem ser usadas para descartar os anticorpos. Se não ocorreu reação, sugere que o anticorpo não reagiu com o antigénio presente na célula do painel e, como tal, os respetivos antigénios podem ser excluídos. Na presença de antigénios em dose simples, estes não devem ser eliminados devido à presença do efeito dose;
- Observação do padrão: o passo seguinte na interpretação do painel consiste em analisar as reações positivas e identificar quais delas coincidem com um padrão específico. Quando está presente um único anticorpo, o padrão de reações corresponde à presença do antigénio nas células testadas;
- Fenotipagem do doente: os indivíduos não produzem aloanticorpos para os antigénios que possuem. Por isso, outra forma de confirmar a identificação do anticorpo é o fenótipo dos eritrócitos do doente. Só se pode dizer que existe um aloanticorpo, se o doente for negativo para o antigénio correspondente[9].

Os resultados da identificação de anticorpos podem ser os seguintes:

- Positivo – Resultado positivo, onde é possível identificar o(s) anticorpo(s);
- Positivo, mas inconclusivo – Existem diferentes intensidades de reação nas células do painel de identificação de anticorpos mas não é possível identificá-lo(s);
- Panaglutinação – Aglutinação em todas as células do painel de identificação de anticorpos;
- Negativo – Não é observada reação em nenhuma célula do painel de anticorpos.

Efeito dose:

A PAI e a identificação de anticorpos são os métodos mais fiáveis e sensíveis para a deteção de aloanticorpos, utilizando várias células em dose dupla e dose simples para determinados pares de alelos. Estes métodos são preferíveis à prova de compatibilidade (que utiliza um único tipo de células), porque alguns anticorpos são suscetíveis ao efeito dose. Para explicar o efeito dose, exemplificamos, na tabela 7, com os dois antigénios do sistema do grupo sanguíneo Kidd, Jk^a e Jk^b [9]:

Tabela 7. Exemplo de efeito dose			
Célula	**Jk^a**	**Jk^b**	
Célula I	+	0	Esta célula tem uma expressão, em dose dupla, de Jk^a
Célula II	0	+	Esta célula tem uma expressão, em dose dupla, de Jk^b
Célula III	+	+	Esta célula tem uma expressão, em dose simples, de Jk^a e Jk^b

No exemplo acima, a célula I possui expressão, em dose dupla, de Jk^a, enquanto que a célula III, possui expressão, em dose simples, de Jk^a e de Jk^b, tendo por isso menor expressão do antigénio Jk^a.

Durante a realização da prova de compatibilidade, o fenótipo dos eritrócitos do dador não é conhecido. Num doente com anti-Jk^a, se os eritrócitos do dador expressarem o antigénio Jk^a, em dose simples, a prova de compatibilidade pode ser negativa devido ao efeito dose, não revelando o risco potencial de hemólise (imagem 9)[9].

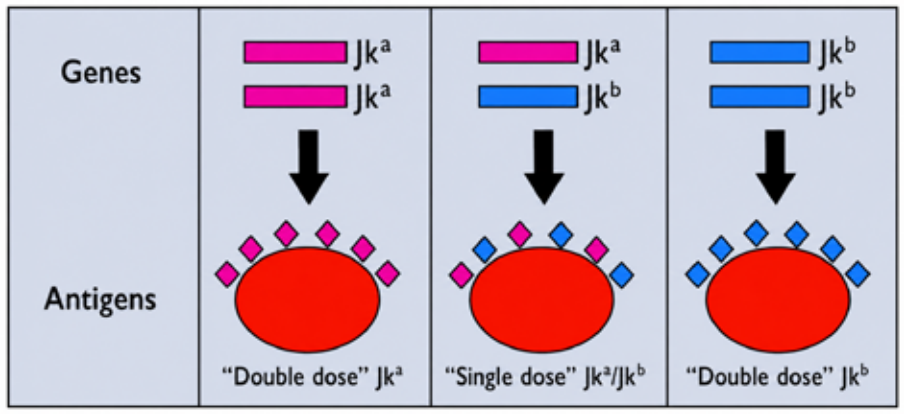


Imagem 9. *Efeito dose.*
https://www.bbguy.org/education/glossary/gld15/

Este efeito é observado em alguns antigénios codificados por genes alelos, sendo que, alguns deles, têm significado clínico e, se não detetados, podem dar origem a reações transfusionais, como:

- Jk^a e Jk^b;
- M e N;
- S e s;
- Fy^a e Fy^b;
- Lu^a e Lu^b.

4. PROVA DE COMPATIBILIDADE

A prova de compatibilidade (PC) é uma etapa essencial no processo transfusional, destinada a detetar anticorpos inesperados no plasma do recetor contra os eritrócitos do dador, prevenindo, assim, reações adversas. É efetuada através do teste de antiglobulina indireto[1].

Procedimento em *card*:

Material:

- *Card* LISS/Coombs;
- ID-Pipeta;
- Diluente 2;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar o *card* LISS/Coombs;
2. Fazer uma diluição do concentrado eritrocitário do dador utilizando 1000 µL de diluente 2 com 12,5 µL de eritrócitos do dador;
3. Pipetar, para o poço, 50 µL da diluição;
4. Adicionar 25 µL do plasma do recetor;
5. Incubar 15 minutos, a 37 ºC;
6. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
7. Fazer a leitura.

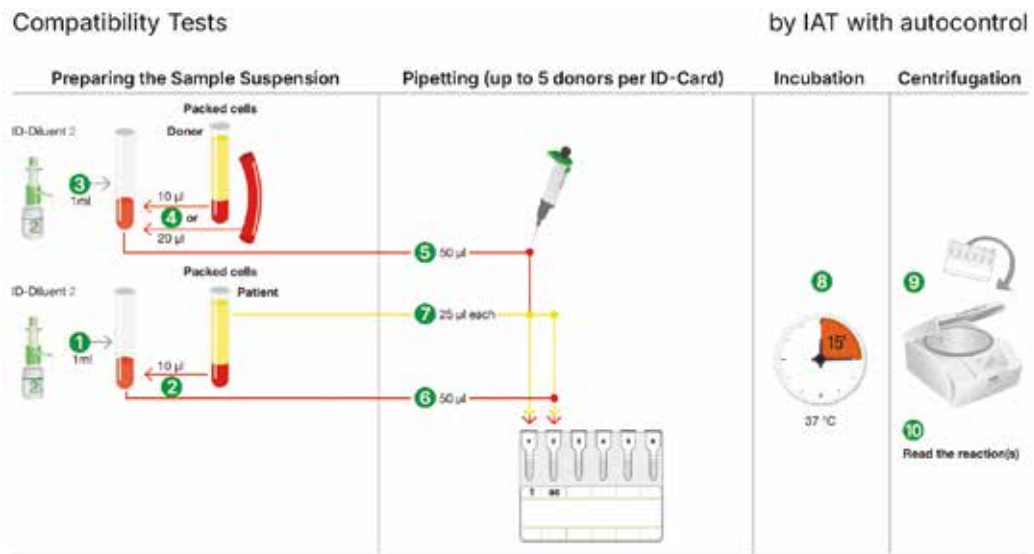


Imagem 10. *Procedimento prova de compatibilidade, em* card.
Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

Procedimento em tubo:

Material:

- Tubos de hemólise;
- Soro de Coombs;
- Soro fisiológico;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga de tubos;
- Incubadora de tubos;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Aglutinoscópio/microscópio.

Procedimento:

1. Lavar 3 vezes os eritrócitos do dador com soro fisiológico. Após a última lavagem, descartar a maior quantidade de sobrenadante possível;
2. Preparar a suspensão, adicionando 1200 µL de soro fisiológico a 50 µL de eritrócitos do dador;
3. Colocar 50 µL da suspensão, num tubo identificado;
4. Adicionar 100 µL do plasma do doente;
5. Agitar e incubar durante 1 hora, a 37 ºC;
6. Lavar 3 vezes com soro fisiológico;
7. Juntar 2 gotas de soro de Coombs;
8. Agitar e centrifugar a 125 G, durante 1 minuto;
9. Fazer a leitura em microscópio.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

Dificuldades na identificação de anticorpos – Provas incompatíveis:

Uma PC incompatível indica que o doente possui anticorpos dirigidos contra antigénios presentes nos eritrócitos do dador. Nestas situações, a primeira etapa consiste em verificar se estamos perante um aloanticorpo e/ou de um autoanticorpo[3].

Quando a prova de compatibilidade é incompatível e a PAI é negativa, deve ser realizado o TAD diretamente na unidade de CE, para excluir a possibilidade de interferência causada por um resultado positivo. Outra possível causa para uma PC positiva é a presença de um anticorpo de baixa frequência, não detetado pela PAI, mas que reaja com o antigénio, presente na unidade de CE do dador. Nestes casos, é geralmente fácil encontrar outra unidade compatível.

Se o doente apresentar uma pesquisa de anticorpos positiva, torna-se necessário identificar o(s) anticorpo(s) e selecionar uma unidade de CE, sem o(s) respetivo(s) antigénio(s). Nem todos os aloanticorpos apresentam o mesmo risco hemolítico, e, em alguns casos, pode não ser necessário garantir que a unidade é negativa para o antigénio, bastando que a PC seja negativa (Tabela 8). Anticorpos contra antigénios dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy e anticorpos anti-S ou anti-s, do sistema MNS, podem causar RTH clinicamente significativas[10].

[3] Um aloanticorpo consiste num anticorpo contra os antigénios dos eritrócitos que não sejam do próprio, resultantes de uma gravidez ou de uma transfusão prévia. Já um autoanticorpo trata-se de um anticorpo dirigido contra os antigénios dos eritrócitos do próprio doente.

Tabela 8. Seleção de CE de acordo com o(s) anticorpo(s) identificado(s)
Fonte: Antunes E, Nascimento F, Rodrigues F, Duran J, Figueiredo M, Amil M, et al. Imuno hematologia recomendações. 2ª edição. Instituto Português do Sangue: Ministério da Saúde; 2008.

Sistema	Anticorpo	Recomendação
ABO	Anti-A_1	PC compatível em meio de AGH*
Rh	Anti-D, -C, -c, -E, -e	Antigénio negativo e PC compatível em AGH
	Anti-Cw	PC compatível em meio de AGH
Kell	Anti-K, -k	Antigénio negativo e PC compatível em AGH
	Anti-Kpa	PC compatível em meio de AGH
Kidd	Anti-Jk^a, -Jk^b	Antigénio negativo e PC compatível em AGH
MNS	Anti-M (reativo a 37ºC)	Antigénio negativo e PC compatível em AGH
	Anti-M (não reativo a 37ºC)	PC compatível em meio de AGH*
	Anti-N	PC compatível em meio de AGH*
	Anti-S, -s, -U	Antigénio negativo e PC compatível em AGH
Duffy	Anti-Fy^a,- Fy^b	Antigénio negativo e PC compatível em AGH
P	Anti-P_1	PC compatível em meio de AGH*
Lewis	Anti-Le^a, -Le^b, -Le^{a+b}	PC compatível em meio de AGH*
Luterano	Anti-Lu^a	PC compatível em meio de AGH*
Diego	Anti-Wr^a (anti-DI3)	PC compatível em meio de AGH
H	Anti-HI (em doentes A_1 e A_1B)	PC compatível em meio de AGH*
*A PC deve ser realizada em técnica de pré-aquecido ou utilizando soro de AGH anti-IgG, mesmo que seja reativa noutros meios/temperatura.		

Quando se observa panaglutinação, é importante investigar antecedentes de transfusões, medicação e/ou gravidezes anteriores, bem como o resultado do TAD.

Se o TAD for negativo, a panaglutinação pode indicar a presença de um aloanticorpo dirigido contra um antigénio de alta prevalência.

Se o TAD for positivo, em doentes sem exposição prévia a antigénios externos, e a intensidade de reação no painel de identificação de anticorpos for semelhante à do TAD, poderá tratar-se de autoanticorpo(s).

A presença de sinais laboratoriais de hemólise, como aumento da desidrogenase láctica (LDH), do índice de reticulócitos e da bilirrubina indireta, ou a diminuição da haptoglobina, confirma o diagnóstico de anemia hemolítica autoimune (AHAI). No entanto, a confirmação requer sempre a integração com o contexto clínico.

Nestes casos, geralmente não é possível encontrar concentrados eritrocitários compatíveis, exceto quando o autoanticorpo possui uma especificidade clara, por exemplo anti-e. Nestas situações, é frequente que o autoanticorpo não reaja com células EE (duplamente negativas para o antigénio e).

A decisão de transfundir deve ser clínica e realizada com vigilância apertada, uma vez que os autoanticorpos reagem com todos os eritrócitos testados.

Em situações em que o doente apresenta antecedentes de gravidez ou já foi transfundido há mais de 3 meses, com TAD positivo e presença de panaglutinação no painel de anticorpos, mas com intensidades de reação diferentes, pode-se estar perante uma combinação de autoanticorpos e aloanticorpos. Este cenário é frequente em casos de AHAI, na qual a presença de autoanticorpos pode dificultar a deteção de aloanticorpos clinicamente significativos.

As diferentes intensidades de reação observadas no painel podem fornecer pistas para a identificação dos aloanticorpos. No entanto, quando os autoanticorpos apresentam reatividade forte (por exemplo 4+) ou predominem em relação aos aloanticorpos, estes últimos podem ficar mascarados. Nestas circunstâncias, é necessário recorrer a técnicas de adsorção, que permitem remover os autoanticorpos do soro e facilitar a deteção de aloanticorpos. A adsorção pode ser:

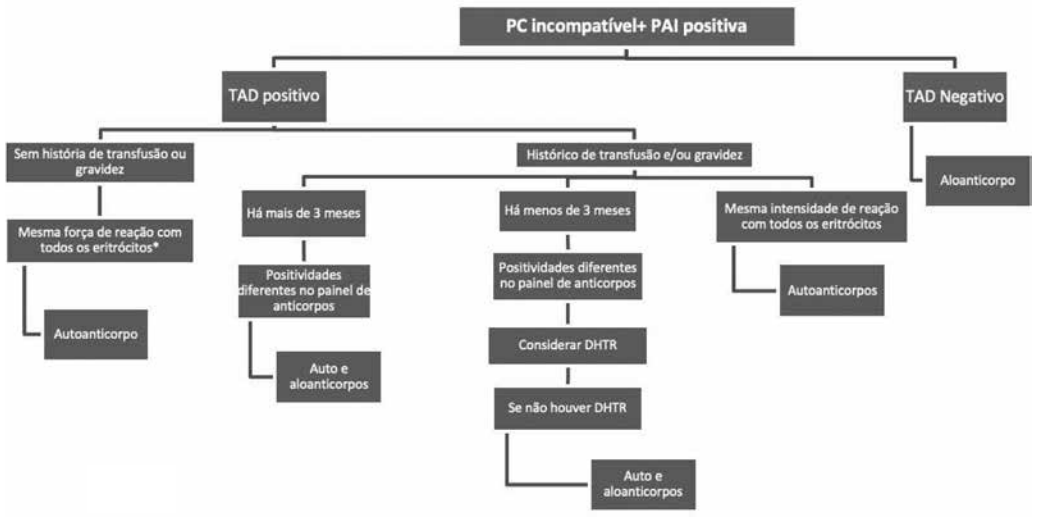
- Autoadsorção – se forem utilizadas células do próprio doente, o que apenas é possível se este não tiver sido transfundido nos últimos 3 meses;
- Aloadsorção – se houve transfusão nos últimos 3 meses. Utiliza-se células com fenótipos conhecidos (R_1R_1, R_2R_2 e rr), com expressão homozigótica (dose dupla) para antigénios dos sistemas Kidd, Duffy e Ss.

Após a adsorção, a identificação de anticorpos deve ser realizada com o plasma adsorvido, incluindo a repetição da prova de compatibilidade[1].

Se houver histórico de transfusão e/ou gravidez nos últimos 3 meses, poderão estar em circulação eritrócitos que não pertencem ao doente e, como tal, um resultado de um TAD positivo pode não ser devido a autoanticorpos, sendo, por isso, necessário realizar eluição. A eluição é uma técnica na qual os anticorpos que revestem os eritrócitos são dissociados. Após a eluição, a identificação do(s) anticorpo(s) é realizada no eluato[10].

Numa situação com uma pesquisa de anticorpos inconclusiva, onde não é possível encontrar unidades de sangue compatíveis, torna-se necessário enviar a amostra do doente para estudo e compatibilização de CE, num laboratório de referência.

A Imagem 11 estrutura a distinção entre aloanticorpos e autoanticorpos quando estamos perante uma situação de uma PC e uma PAI positivas.



**Quando a positividade é de 4+, é impossível dizer se se trata, apenas, de autoanticorpos ou se de aloanticorpos e autoanticorpos*

Imagem 11. *Diferenciação entre aloanticorpos e autoanticorpos.*
Fonte: Andiç N. Practical Solutions for Problems in Blood Grouping and Crossmatching. Tjh. 24 de fevereiro de 2022;39(1):55–60.

Nota: *Atenção aos aloanticorpos que reagem mais fracamente.*

"Uma prova de compatibilidade negativa mostra que estão ausentes, no soro/plasma do doente, os anticorpos correspondentes aos antigénios dos eritrócitos do dador. Mas uma prova de compatibilidade negativa não significa que não haja aloanticorpos presentes no soro/plasma do doente."

5. TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETO (TAD)

Este teste é utilizado para demonstrar eritrócitos revestidos, *in vivo*, por anticorpos e/ou complemento, particularmente IgG e C3d. É útil para o diagnóstico de AHAI, hemólise induzida por drogas, DHFRN ou reações aloimunes causadas por transfusões eritrocitárias recentes. É, por isso, um teste efetuado, por rotina, em RN ou doentes com suspeita de hemólise de causa imune, de forma a distinguir-se anemia hemolítica imune, da não imune. Deve, também, ser efetuado em dadores, caso ocorra reação transfusional ou PC incompatível em doente com PAI negativa, e em doentes com PAI positiva[1]. Não deve ser utilizado, como rotina, nos testes pré-transfusionais.

Doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN):

Durante a gravidez, se a mãe apresentar anticorpos, do tipo IgG, estes atravessam a barreira placentária e entram na circulação fetal. Quando estes anticorpos são dirigidos contra antigénios que existem nos eritrócitos do feto, vão levar à formação de complexos antigénio-anticorpo na superfície eritrocitária. Os eritrócitos sensibilizados, circulam no feto até serem destruídos pelos macrófagos, no baço, dando origem à DHFRN[6].

Uma das principais causas de DHFRN é incompatibilidade do grupo sanguíneo Rh, entre a mãe e o feto, sobretudo pelo antigénio D. Nestes casos, a mãe é RhD negativa e o feto RhD positivo. A sensibilização ocorre numa gravidez anterior ou, mais raramente, no início da gravidez atual ou por transfusão. Após a sensibilização da mãe, o soro desta terá anti-D, detetado pela PAI. No momento da sensibilização, o anti-D materno formado é do tipo IgM, que não consegue atravessar a placenta, mas que, posteriormente, se transforma em IgG. Nas gestações subsequentes, basta que uma pequena quantidade de sangue fetal entre na circulação da mãe para que ocorra a estimulação rápida com produção de anti-D, do tipo IgG, que pode ser transportado através da placenta e entrar na circulação fetal, provocando hemólise[6].

Além disto, a DHFRN também pode ser causada por uma incompatibilidade do grupo sanguíneo ABO – a mãe é do grupo O e o feto de um grupo sanguíneo diferente (tipo A, B ou AB). O soro da mãe contém, naturalmente, anti-A e anti-B, que tendem a ser da classe IgG e, portanto, podem atravessar a barreira placentária e provocar hemólise dos eritrócitos fetais[6]. No caso do grupo O, os anticorpos anti-A e anti-B são, predominantemente IgM com componente IgG, e, por isso, a incidência de DHFRN, cujas mães são do grupo O, é superior à incidência nos bebés de mães de outros grupos[1].

A DHFRN, por incompatibilidade ABO, é geralmente menos grave do que a incompatibilidade Rh, uma vez que os eritrócitos fetais expressam menos antigénios do grupo sanguíneo ABO, em comparação com os adultos. Além disso, contrariamente aos antigénios Rh, os do grupo ABO são, também, expressos por vários tecidos, o que aumenta o número de antigénios disponíveis para a ligação dos respetivos anticorpos, resultando numa depleção de anti-A e anti-B, no plasma[6].

Outros anticorpos foram relatados, com menos frequência, como causa de DHFRN moderada ou grave como E, c, C, K, k, Kp^a, Kp^b, Jk^a, Fy^a, Fy^b, S, s e U. Até o momento, os anticorpos dos grupos P e Lewis não foram associados à DHFRN[1].

A taxa de hemólise caracteriza a DHFRN como leve, moderada ou grave. O feto tolera casos leves de hemólise e, no nascimento e período neonatal, os sintomas incluem anemia leve e icterícia, que podem resolver sem tratamento. Nos casos em que há uma maior taxa de hemólise, o nível de bilirrubina não conjugada pode permanecer baixo durante a gravidez (devido à capacidade do fígado materno ser capaz de conjugar o excesso de bilirrubina não conjugada circulante). No entanto, após o nascimento, o fígado imaturo do RN é incapaz de metabolizar o excesso de bilirrubina não conjugada, que se acumula no sangue. Se os níveis continuarem a subir, a bilirrubina não conjugada atravessa a barreira hemato-encefálica e entra no sistema nervoso central, causando kernicterus, uma condição potencialmente fatal, que deixa danos neurológicos permanentes nos bebés que sobrevivem. Além disto, a hemólise pode causar anemia grave no feto. O aumento de produção de eritrócitos pelo fígado, para compensar a sua perda, faz com que este órgão aumente de tamanho (hepatomegalia), podendo ocorrer disfunção hepática. Os eritrócitos imaturos (eritroblastos) entram em circulação, dando origem a eritroblastose fetal. Uma complicação da DHFRN grave é a hidropisia fetal, causada por diminuição da albumina produzida no fígado, levando a edema dos tecidos fetais. Esta condição é geralmente fatal, seja no útero ou logo após o nascimento[6].

Anemia hemolítica autoimune:

A AHAI é uma doença causada pela hemólise dos eritrócitos, que ocorre devido à presença de anticorpos, produzidos pelo doente, e dirigidos contra os seus próprios antigénios eritrocitários. A hemólise, *in vivo*, inicia-se com a opsonização dos eritrócitos, por imunoglobulinas, sendo as da subclasse IgG1 e IgG3 aquelas que possuem maior fixação do sistema complemento e quimiotaxia para os macrófagos e, por isso, são as mais hemolisantes.

O aumento significativo da LDH, da bilirrubina indireta e dos reticulócitos, a diminuição da haptoglobina, a existência de fragmentos eritrocitários no esfregaço ou a presença de hemoglobinémia e de hemoglobinúria e/ou hemossiderina urinária, sugerem um processo de hemólise intravascular. A positividade do TAD pode confirmar que a hemólise tem origem numa resposta imunológica.

As anemias hemolíticas imunes, que podem ser intra ou extravasculares, de acordo com o local onde se dá a destruição dos eritrócitos, são, ainda, classificadas de acordo com a amplitude térmica a que os anticorpos provocam lise celular, podendo ser primárias ou idiopáticas ou secundárias a doenças linfoproliferativas, uso de medicamentos ou a infeções virais e/ou bacterianas[11,12].

1. AHAI a anticorpos quentes

A maioria das AHAI é causada por autoanticorpos, cuja temperatura ótima de reação é 37ºC. Os autoanticorpos são, sobretudo, da classe IgG. O resultado do TAD pode ser positivo com IgG, IgG+C3 e, mais raramente, apenas com complemento. Estes anticorpos quentes causam dificuldades técnicas, nomeadamente, a reação com todas as células do painel de identificação de anticorpos (sendo necessário realizar adsorções), aglutinação espontânea (comprometendo o controlo do reagente – resultado positivo – impossibilitando a validação de resultados) e provas de compatibilidade incompatíveis. A duração da sobrevivência dos glóbulos vermelhos transfundidos é aproximadamente a mesma que a dos glóbulos vermelhos do próprio doente. Em doentes com hemólise ativa, a transfusão pode aumentar a hemólise e os eritrócitos transfundidos podem ser destruídos mais rapidamente que os eritrócitos do próprio doente. A destruição das células transfundidas pode aumentar a hemoglobinémia e a hemoglobinúria, podendo desenvolver coagulação intravascular disseminada[11,12]. Em casos de indicação médica para transfusão, é aconselhável transfundir, em pequenos volumes (frações) e com reforço na vigilância do doente.

2. Doença de aglutininas a frio

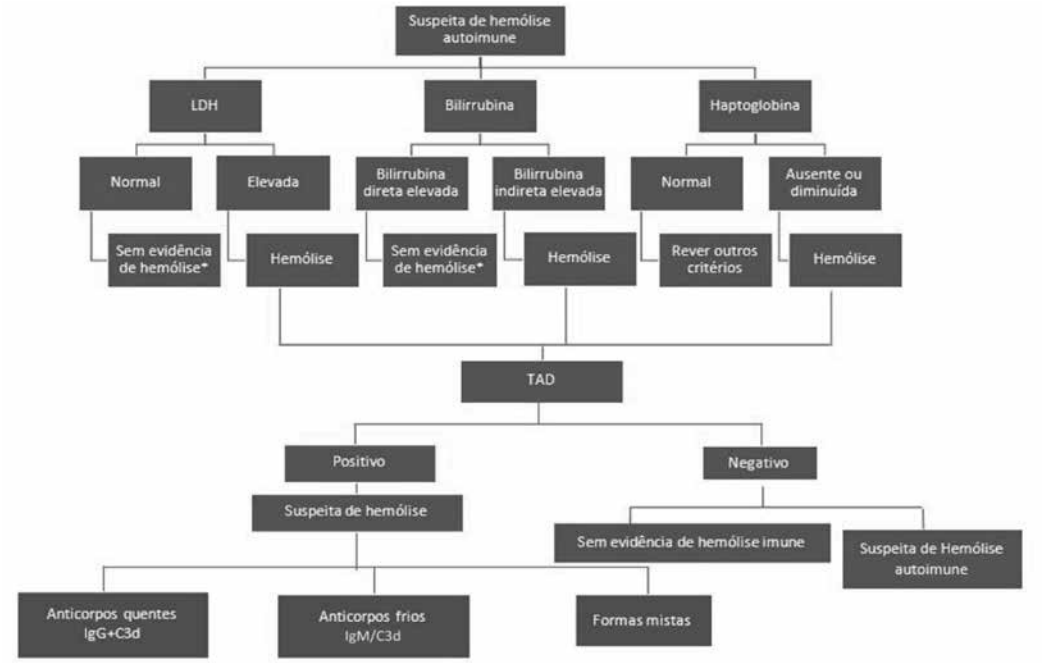
A anemia hemolítica associada a autoanticorpos frios (habitualmente, da classe IgM) caracteriza-se, laboratorialmente, pela aglutinação dos eritrócitos, colhidos em EDTA, à TA, e pela deteção, através do TAD, da fração do complemento C3d. Pode ser uma condição primária ou idiopática, ou secundária a doenças linfoproliferativas de células B, como a leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia de Waldenström, e a doenças autoimunes – habitualmente de início insidioso – ou, ainda, a infeções, como *Mycoplasma pneumoniae* ou Epstein-Barr, em que a evolução é geralmente transitória[13].

Desta forma, a amostra deve ser colhida num tubo de EDTA, previamente aquecido a 37 ºC, e todos os testes e material utilizado devem estar, também, previamente aquecidos a 37 ºC. O autoanticorpo específico mais comum da doença de aglutininas a frio é o anti-I e, o menos frequente, é o anti-i[11,12,13].

3. Hemoglobinúria paroxística fria

É uma forma mais rara de AHAI com TAD positivo, apresentando-se como uma condição aguda transitória, secundária a infeção respiratória viral ou bacteriana, sobretudo em crianças, ou, mais raramente, como uma doença crónica idiopática, em idosos. É causada por uma IgG bifásica, que se liga aos eritrócitos, a baixa temperatura, causando hemólise intravascular, à temperatura corporal, e de especificidade, principalmente, anti-P. Existem várias hipóteses para que este evento ocorra, nomeadamente: alteração do antigénio P, pelo agente infecioso; aumento da imunogenicidade dos glicoesfingolípidos, por se associarem ao vírus envelopado; aumento da produção de autoanticorpos, devido ao aumento da ativação linfocitária. O seu diagnóstico é feito através do teste Donath-Landsteiner onde ocorre a incubação do soro ou plasma a testar com eritrócitos normais, positivos para o antigénio P, a 4 ºC, por 30 minutos (a fim de permitir a fixação do complemento), seguidas de incubações a 37 ºC. A presença de hemólise, após essas sucessivas incubações, confirma a presença da hemolisina bifásica. Se não houver hemólise, a hemolisina bifásica não está presente[11,12]. O teste deve ser feito utilizando os controlos adequados.

A imagem 12 sintetiza o diagnóstico de hemólise autoimune.



**O diagnóstico de AHAI não pode ser estabelecido*

Imagem 12. *Algoritmo de hemólise autoimune*

5.1. Procedimento em *card*- Coombs direto:

Material:

- *Card* LISS/Coombs;
- ID-Pipeta;
- Diluente 2;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar o card de LISS/Coombs;
2. Fazer a diluição de 1000 µL de diluente 2 com 12,5 µL de eritrócitos do doente;
3. Pipetar 50 µL para o poço;
4. Centrifugar durante 10 minutos, a 910 rpm;
5. Fazer a leitura.

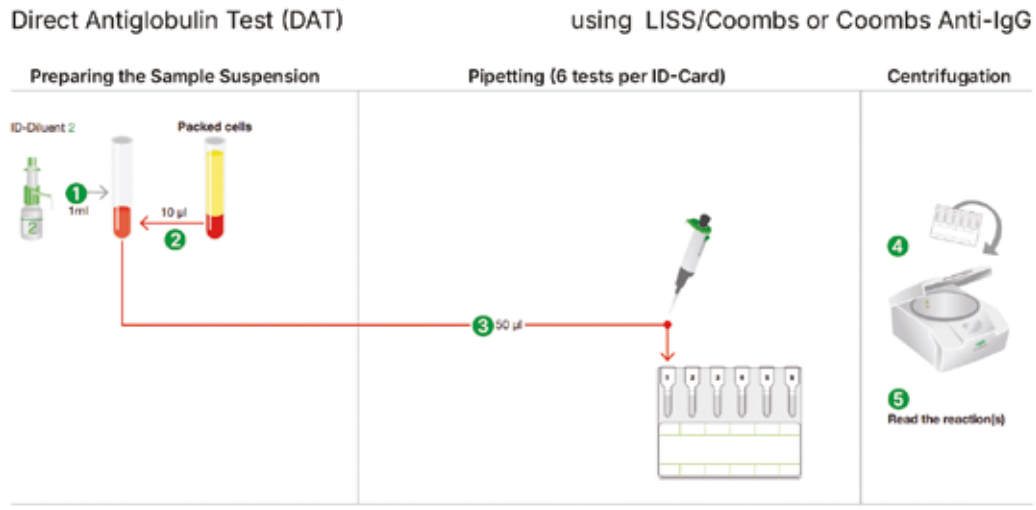


Imagem 13. *Procedimento TAD, em* card. *Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

Interpretação de resultados:

Um TAD positivo não indica, por si só, a presença de hemólise. A sua interpretação deve ter em conta a história clínica do doente, os dados laboratoriais, a medicação recente e qualquer histórico de transfusão ou transplante hematopoiético.

A força da aglutinação observada é geralmente proporcional à quantidade de proteínas ligadas aos eritrócitos[1].

No caso de TAD positivo em RN, significa que os eritrócitos estão sensibilizados por IgG, provenientes da mãe, capazes de atravessar a barreira placentária. Nestas situações, é necessário solicitar uma amostra da mãe, para pesquisar anticorpos irregulares, capazes de provocar um TAD positivo, e fazer a pesquisa de aglutininas maternas no RN, caso haja uma incompatibilidade ABO, entre mãe e RN.

Pesquisa de aglutininas anti-A e anti-B por TCI– Procedimento:

1. Em *card* LISS/Coombs, colocar 50 µL de células A_1 e células B, no respetivo poço;
2. Pipetar 25 µL do plasma do bebé;
3. Incubar 15 minutos, a 37 ºC;
4. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
5. Fazer a leitura.

5.2. Procedimento em *card* – Coombs direto monoespecífico:

Quando o TAD, realizado com reagentes poliespecíficos, é positivo, deve ser utilizado um *card* monoespecífico, de forma a caracterizar o tipo de anticorpo (IgG, IgA, IgM) e/ou a fração do complemento (C3c, C3d) envolvido, uma vez que os reagentes de AGH poliespecíficos reagem com as cadeias leves do tipo lambda e kappa, presentes em todas as classes de imunoglobulinas[14].

Material:

- *Card* DC-Screening I;
- ID-Pipeta;
- Diluente 2;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar o card monoespecífico;
2. Fazer a diluição de 1000 µL de diluente 2 com 12,5µL de glóbulos do doente;
3. Pipetar 50 µL para o poço;
4. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
5. Fazer a leitura.

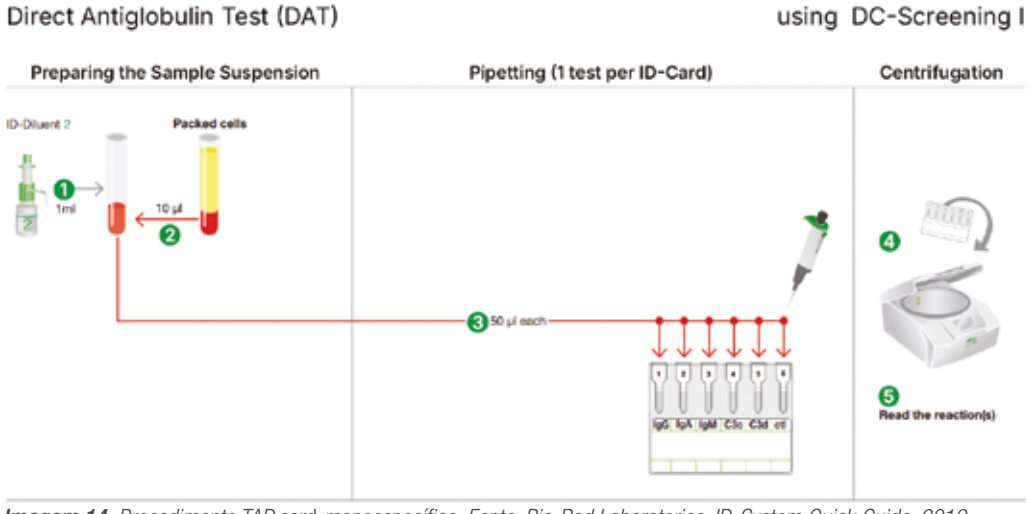


Imagem 14. *Procedimento TAD* card *monoespecífico. Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

Resultados:

Como já referido, os resultados obtidos devem ser interpretados de acordo com a situação clínica do doente.

Para identificação de anticorpos do tipo IgG, podem ser utilizadas técnicas de eluição ácida[14].

5.3. Procedimento em *card* – Coombs direto diluição IgG:

Os anticorpos do tipo IgG são os que têm maior significado clínico, por poderem desencadear hemólise a 37 ºC. Assim, caso se esteja em presença de IgG, dever-se-á determinar o seu título[15]. Os *cards* DAT IgG-Dilution consistem em diluições sucessivas de reagente monoespecífico anti-IgG, permitindo uma interpretação clínica de um TAD positivo.

Material:

- *Card* DAT IgG-Dilution;
- ID-Pipeta;
- Diluente 2;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar o *card* DAT IgG-Dilution;
2. Fazer a diluição de 1000 µL de diluente 2 com 12,5 µL de eritrócitos do doente;
3. Pipetar 50 µL para o poço;
4. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
5. Fazer a leitura.

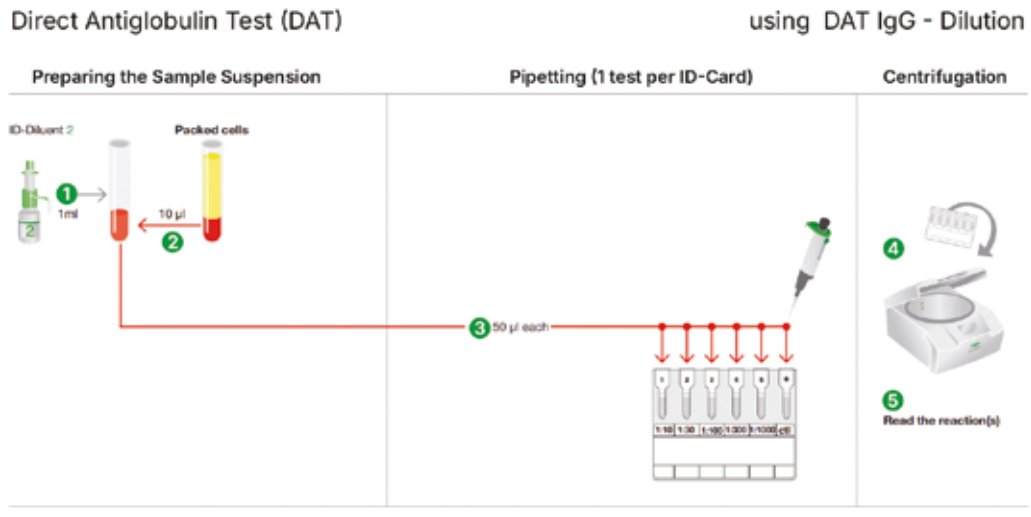


Imagem 15. *Procedimento de titulação de IgG, em* card. *Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

Resultados:

Títulos de IgG iguais ou superiores a 300 estão associados a um risco aumentado de hemólise clinicamente significativa. Nestas situações, torna-se importante determinar a subclasse de IgG, que provoca este título, dado que as classes IgG1 e IgG3 são consideradas as mais hemolisantes. Para isso, é utilizado o card DAT IgG1/IgG3[16].

5.4. Procedimento em *card* – Coombs direto IgG1/IgG3:

Além da determinação do título de IgG presente, é também importante identificar a subclasse de IgG presente.

Material:

- *Card* DAT IgG1/IgG3;
- ID-Pipeta;
- Diluente 2;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar o *card* DAT IgG1/IgG3;
2. Fazer a diluição de 1000 µL de diluente 2 com 12,5 µL de eritrócitos do doente;

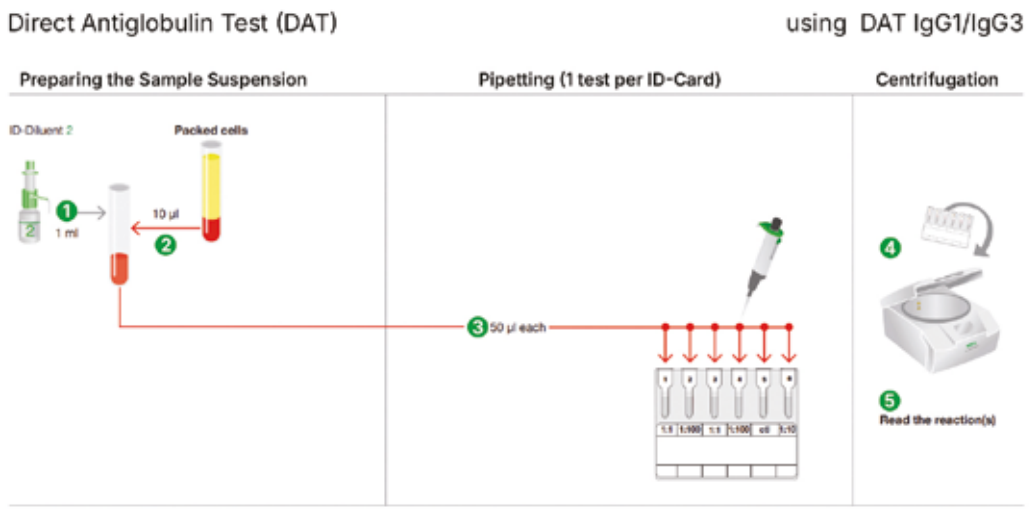


Imagem 16. *Procedimento para determinação de classe de IgG, em* card. *Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

3. Pipetar 50 µL para o poço;
4. Centrifugar 10 minutos, a 910 rpm;
5. Fazer a leitura.

Resultados:

Se o título de IgG1 ou IgG3 for igual ou superior a 100, considera-se que o risco de hemólise é elevado. A decisão de transfundir deve, por isso, ser cuidadosamente ponderada, com base numa avaliação rigorosa do risco-benefício para o doente.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

No caso do *card* monoespecífico e das diluições, o microtubo *ctl* deve apresentar uma reação negativa. Se o *ctl* apresentar reatividade, deve realizar-se lavagem dos eritrócitos antes da repetição da técnica. Caso a positividade persista, o teste deve ser considerado inválido.

Procedimento em tubo – Coombs direto:

Material:

- Tubos de hemólise;
- Soro de Coombs;
- Soro fisiológico;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga de tubos;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Microscópio.

Procedimento:

1. Colocar 100 µL de glóbulos, num tubo de hemólise;
2. Lavar 3 vezes com soro fisiológico. Após a última lavagem, descartar a maior quantidade de sobrenadante possível;
3. Fazer a suspensão de 1200 µL de soro fisiológico com 50 µL de eritrócitos;
4. Num novo tubo de hemólise, colocar 50 µL da suspensão e adicionar 100 µL de soro de Coombs;
5. Centrifugar 1 minuto, a 125 G;
6. Fazer a leitura.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

Técnica de eluição:

A técnica de eluição permite separar os anticorpos dos eritrócitos sensibilizados, mantendo as suas características, permitindo a sua identificação. Existem vários métodos de eluição, sendo, o mais utilizado, a eluição ácida. Quando a causa da positividade de um TAD é desconhecida, deve ser feito um eluato para tentar identificar os anticorpos presentes. Se o TAD for positivo, unicamente, para C3 não se deve fazer eluição, pois não se conseguem eluir partículas do complemento [1,17].

Existem diversos fatores que influenciam os resultados obtidos pela técnica de eluição, nomeadamente:

a. Lavagem incompleta – Os glóbulos vermelhos sensibilizados devem ser cuidadosamente lavados, antes da eluição, para evitar a contaminação do eluato, com anticorpos residuais não ligados. Seis lavagens com solução salina são, geralmente, suficientes, mas podem ser necessárias mais lavagens, se estivermos na presença de altos títulos de anticorpos;

b. Ligação de proteínas ao tubo – Se o eluato for preparado no mesmo tubo de ensaio que foi usado durante as fases de sensibilização ou lavagem, pode ocorrer a ligação inespecífica do anticorpo à superfície do tubo. Para evitar tal contaminação, os glóbulos vermelhos utilizados devem ser transferidos para um tubo de ensaio limpo, antes da lavagem e, posteriormente, para outro tubo limpo, antes de iniciar o processo de eluição;

c. Dissociação do anticorpo antes da eluição – Anticorpos IgM (como anti-A ou anti-M) ou IgG de baixa afinidade, podem dissociar-se espontaneamente dos eritrócitos, durante a fase de lavagem. Para minimizar a perda de anticorpos ligados, deve-se usar uma solução salina fria (4ºC) ou solução de lavagem fornecida pelo fabricante para o processo;

d. Técnica incorreta – A remoção incompleta de solventes orgânicos ou a incorreta neutralização do eluato, podem fazer com que os eritrócitos utilizados para testar o eluato hemolisem;

e. Instabilidade dos eluatos – Os eluatos devem ser testados o mais rapidamente possível, após a preparação. Quando são usados *kits* de eluição comerciais, as instruções do fabricante para a preparação e armazenamento devem ser seguidas[1].

Material:

- Kit de eluição- DiaCidel;
- Tubos de hemólise;
- Suporte de tubos;
- Pipetas de Pasteur;
- Centrífuga de imunohematologia.

Procedimento da eluição:

1. Preparar a diluição da *DiaCidel Wash* (1 parte de concentrado para 9 partes de água). Esta solução é estável, até 6 meses, num frasco fechado, conservado entre 2 e 8 ºC;
2. Lave 1 mL de concentrado de eritrócitos com solução isotónica de NaCl, a 0,9%. Centrifugue, durante 2 minutos, a 2000 G;
3. Lave o concentrado de eritrócitos 4 vezes com a diluição *DiaCidel Wash* (3 mL de *DiaCidel Wash* para 1mL de concentrado de eritrócitos). Centrifugue durante 2 minutos, a 2000 G;
4. Decante completamente, após a última lavagem e guarde o sobrenadante;
5. Transfira 1 mL de concentrado de eritrócitos para um tubo limpo e adicione 1 mL de *DiaCidel Elution* ao tubo e misture bem, por inversão;
6. Centrifugue de imediato durante 1 minuto, a 900 G;
7. Transfira o eluato para um tubo limpo;
8. Adicione, ao eluato, a solução *DiaCidel Buffer* até este obter uma cor azul (indicador de pH neutro);
9. Centrifugue durante 1 minuto, a 900 G;
10. Transfira o eluato para um tubo limpo e este pode ser utilizado para a realização de testes;
11. Submeta o eluato ao procedimento normal utilizado para deteção e identificação de anticorpos.

Controlo de qualidade:

Para esta técnica, utiliza-se a solução sobrenadante da última lavagem, como controlo negativo. Um controlo positivo invalida o resultado obtido, uma vez que a reatividade desta solução pode indicar uma contaminação, por lavagem inadequada, antes da eluição. No entanto, também pode indicar a presença de um anticorpo de baixa afinidade, eluído durante o procedimento de lavagem. Nesse caso, o procedimento de eluição deve ser repetido, utilizando reagentes e amostra refrigerados[17].

Resultados:

A aglutinação dos eritrócitos do painel de identificação de anticorpos com o eluato, e a ausência de aglutinação no tubo de controlo, indicam que os anticorpos foram eluídos da superfície dos eritrócitos. A interpretação do painel de anticorpos é efetuada de forma semelhante à da PAI.

A ausência de aglutinação dos eritrócitos com o eluato indica que não foram eluídos anticorpos ou que o antigénio correspondente não está presente nos eritrócitos teste. Uma reação negativa na eluição, num doente com TAD positivo para IgG, pode, também, indicar que as globulinas de revestimento não foram removidas, através do processo de eluição ácida, sendo, por isso, necessário utilizar outros métodos de eluição[17]. A interpretação da eluição pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9. Interpretação da técnica de eluição *Fonte: New York Blood Center Enterprises [Internet]. 2024. NYBCe Quick Lesson: Elution and Eluates.*	
Reatividade do eluato	**Possíveis causas de um TAD positivo**
Não reativo	• Drogas (reações comuns em anemias hemolíticas induzidas por drogas: Positividade forte do TAD e eluato negativo); • Aloanticorpo para um antigénio de baixa prevalência.
Panaglutinação, reativo com autocontrolo	• Autoanticorpo.
Presença de aloanticorpos	• DHFRN; • Reação transfusional.
Nota: *Um TAD positivo nem sempre indica redução da sobrevivência dos eritrócitos, assim como um TAD negativo não elimina a possibilidade de um processo hemolítico, devido ao facto da quantidade de anticorpos ligados aos eritrócitos se encontrar abaixo do limiar de sensibilidade de deteção do teste.*	

6. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

A titulação é uma técnica semi-quantitativa que permite determinar a concentração relativa dos anticorpos identificados e a probabilidade de causarem hemólise eritrocitária. O título de um anticorpo é determinado testando diluições seriadas do soro com eritrócitos que possuem antigénio positivo para o anticorpo a ser titulado, devendo ser utilizadas células com o mesmo fenótipo nas titulações subsequentes. É um teste utilizado, sobretudo, em estudos de obstetrícia, uma vez que os resultados obtidos na titulação contribuem para a decisão de procedimentos adicionais, caso tenham significado clínico (responsável por DHFRN)[1].

Procedimento em *card*:

Material:

- *Card* LISS/Coombs;
- Célula com o respetivo antigénio, a 0,8% ± 0,1;
- Tubos de hemólise;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Diluente 2 ou ID-Titration Solution;
- ID-Pipeta;
- Pontas de pipeta;
- Incubadora de *cards*;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Marcam-se os tubos, com as respetivas diluições;
2. Colocar 500 µL de Diluente 2 ou ID-Titration Solution, em todos os tubos;
3. Colocar 500 µL de plasma ou soro, no 1º tubo;
4. Transferir 500 µL do primeiro tubo para o segundo tubo e assim sucessivamente (de modo a fazer as seguintes diluições seriadas: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048…);
5. Num *card* LISS/Coombs, colocar 50 µL da célula do painel selecionada;
6. Pipetar 25 µL das diluições, nos respetivos poços;
7. Incubar 15 minutos, a 37 ºC;
8. Centrifugar durante 10 minutos, a 910 rpm;
9. Fazer a leitura.

Procedimento em tubo:

Material:

- Célula com o respetivo antigénio, a 3–5%;
- Tubos de hemólise;
- Soro de Coombs;
- Soro fisiológico;
- Pipetas Pasteur;
- Centrífuga de tubos;
- Incubadora de tubos;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro;
- Aglutinoscópio.

Procedimento:

1. Marcam-se os tubos, com as respetivas diluições;
2. Colocar 500 µL de soro fisiológico, em todos os tubos;
3. Colocar 500 µL de plasma ou soro, no 1º tubo;
4. Transferir 500 µL do primeiro tubo para o segundo tubo e assim sucessivamente (de modo a fazer as seguintes diluições seriadas: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048…);
5. Adiciona-se 50 µL de cada diluição, ao respetivo tubo;
6. Adiciona-se 50 µL da célula selecionada, 3 a 5%, a cada tubo;
7. Incubar durante 1 hora, a 37 ºC;
8. Lavar, 3 vezes, com soro fisiológico;
9. Juntar 100 µL de soro de Coombs;

10. Centrifugar durante 1 minuto, a 125 G;
11. Fazer a leitura.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

É, ainda, utilizada a execução de titulações em paralelo com a amostra anterior, armazenada em seroteca, e com a nova amostra, a fim de comparar o resultado obtido na última titulação com o da titulação atual.

Resultados:

O título de anticorpos em estudo corresponde ao inverso da diluição mais alta onde se observa aglutinação, fornecendo informações sobre a quantidade relativa de anticorpo presente numa amostra.

O título obtido pela técnica em *card* será superior ao título obtido em tubo, por ser uma técnica mais sensível.

O aumento de dois ou mais títulos, entre amostras, demonstra que existe um aumento significativo na produção de anticorpos.

7. FENOTIPAGEM ALARGADA

A fenotipagem de eritrócitos refere-se à determinação de antigénios, presentes na membrana dos eritrócitos. A determinação do grupo ABO e do fenótipo Rh e Kell é realizada em todos os doentes que necessitam de transfusões. No entanto, pode ser necessária a realização de uma fenotipagem alargada, ou seja, a determinação da expressão de antigénios diferentes daqueles determinados por rotina.

A fenotipagem alargada dos eritrócitos é realizada como um teste complementar, nomeadamente, em situações onde os doentes possuam aloanticorpo(s), doentes regularmente transfundidos e que, por isso, têm um risco elevado de produzir aloanticorpo(s) (como doentes oncológicos ou com drepanocitose) ou em dadores, para encontrar CE compatíveis, e sem o antigénio eritrocitário para o qual o doente possui aloanticorpo(s)[18].

7.1. Perfil I e II

Material:

- *Cards* ID-Antigen Profile I e ID-Antigen Profile II;
- ID-Pipeta;
- Diluente 1;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar os respetivos *cards*;
2. Fazer uma diluição de 500 µL de bromelina com 25 µL de eritrócitos a testar;
3. Incubar 10 minutos, à TA;
4. Pipetar 12,5 µL, em cada poço;
5. Centrifugar todos os *cards* durante 10 minutos, a 910 rpm;
6. Fazer a leitura.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

O microtubo *ctl* deve apresentar uma reação negativa. Caso o *ctl* seja positivo, pode-se proceder à lavagem dos eritrócitos antes de executar a técnica. Se a positividade se mantiver, a técnica terá de ser invalidada.

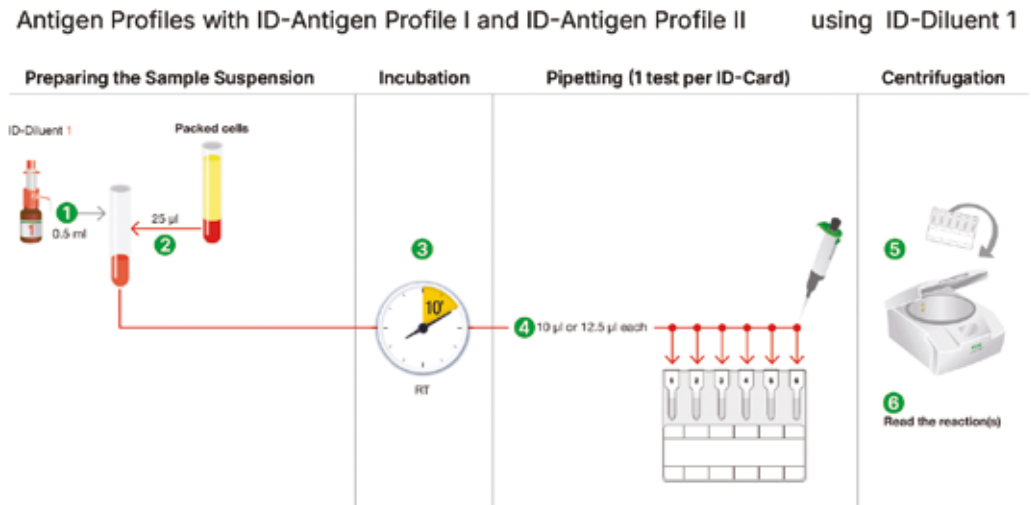


Imagem 17. *Procedimento da fenotipagem alargada perfil I e II, em* card. *Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

7.2. Perfil III

Material:

- Anti-soros ID-Antigen Profile III;
- *Card* ID-Antigen Profile III[4];
- ID-Pipeta;
- Diluente 2;
- Tubo de hemólise;
- Pontas de pipeta;
- Centrífuga de *cards*.

Procedimento:

1. Identificar o respetivo *card*;
2. Colocar 50 µL dos anti-soros, no respetivo poço;
3. Fazer a diluição de 1000 µL de diluente 2 com 12,5 µL de eritrócitos a testar e adicionar 50 µL em cada poço;
4. Incubar 10 minutos, à TA;
5. Centrifugar o *card* durante 10 minutos, a 910 rpm;
6. Fazer a leitura.

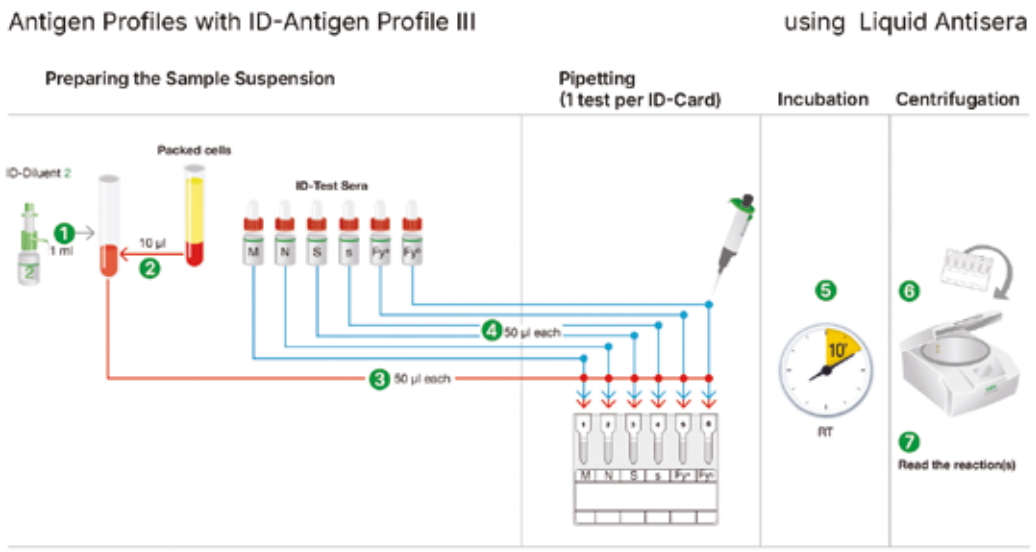


Imagem 18. *Procedimento da fenotipagem alargada perfil III, em* card. *Fonte: Bio-Rad Laboratories. ID-System Quick Guide. 2019. (H010303).*

[4] Pode ser utilizado, em alternativa, o *card* de NaCl para os antigénios M e N e o *card* LISS/Coombs para os antigénios S, s, Fy^a e Fy^b.

Controlo de qualidade:

Todos os reagentes utilizados deverão ser controlados na periodicidade definida por cada laboratório. Se a técnica não for realizada diariamente, o controlo de qualidade deve ser efetuado no momento da sua utilização.

Para os antigénios S, s, Fy^a e Fy^b serem validados, é necessário realizar, em paralelo, o TAD do doente, devendo este ser negativo.

Resultados:

Os resultados dos 3 perfis são interpretados da mesma forma: a positividade no antigénio indica que o doente é portador desse mesmo antigénio.

8. DOENTES COM DREPANOCITOSE

A Drepanocitose, também conhecida como anemia falciforme, é uma hemoglobinopatia, de origem genética, onde ocorre a produção de hemoglobina S. A hemoglobina S pode existir em homozigotia (anemia falciforme) ou em heterozigotia (traço falciforme).

Em condições de hipóxia, desidratação ou infeção, os eritrócitos dos doentes com drepanocitose assumem, irreversivelmente, forma de foice, provocando crises vaso oclusivas. A vaso oclusão leva a danos isquémicos nos tecidos provocando dor e lesões em vários órgãos. Além da vida útil dos eritrócitos falciformes ser, pelo menos, seis vezes menor que a dos eritrócitos normais, a polimerização da hemoglobina S leva à destruição da membrana eritrocitária, agravando a anemia.

O tratamento das crises vaso oclusivas consiste no fornecimento de oxigénio, soro (via intravenosa) e analgésicos, podendo ser necessário recorrer a transfusão. As transfusões de sangue e o oxigénio permitem diminuir o risco de vaso oclusão, que pode levar, entre outros, a acidente vascular cerebral, enfarte do miocárdio ou danos pulmonares[19].

Para transfundir estes doentes, são necessários alguns cuidados como:

→ Utilização de uma unidade de concentrado eritrocitário, com colheita recente (<14 dias) e HbS negativa;

→ Respeitar fenótipo Rh e Kell;

→ Realizar fenotipagem alargada e PAI enzima;

→ Solicitar unidades Fy^a negativas, se o doente for transfundido pela primeira vez no hospital ou tiver uma PAI positiva.

Pesquisa de hemoglobina S:

Este teste é utilizado para estudar os concentrados eritrocitários compatíveis, de modo a garantir que as unidades a transfundir não têm hemoglobina S, evitando o agravamento da crise vaso oclusiva.

Material:

- Tubos de hemólise;
- Kit SICKLEDEX®;
- Pipetas Pasteur;
- Suporte para tubos;
- Marcador de vidro.

Procedimento:

Preparação do reagente:

1. Depois de atingir a TA, adicione o conteúdo do reagente em pó ao frasco de tampão de solubilidade;
2. Dissolva o pó reagente com agitação vigorosa;
3. A solução reconstituída é válida durante 45 dias.

Procedimento do teste:

1. Dispensar 2 mL de reagente já preparado, em dois tubos de hemólise;
2. Depois de atingir a TA, adicionar, num deles, 12,5 µL de eritrócitos do CE a testar e 12,5 µL de eritrócitos do doente, no outro;
3. Homogeneizar o conteúdo de cada um e aguardar, pelo menos, 6 minutos;
4. Proceder à leitura.

Controlo de qualidade:

Quando o reagente é aberto e reconstituído, é necessário realizar controlo de qualidade do mesmo. Para isso, é utilizada a amostra do doente, a qual dará positiva.

Resultado:

A hemoglobina S desoxigenada é insolúvel, na presença de uma solução concentrada de tampão fosfato, formando uma suspensão turva, que pode ser facilmente visualizada. A hemoglobina A normal e outras hemoglobinas permanecem em solução, sob estas condições.

Desta forma, um teste positivo para hemoglobina falciforme é indicado por uma suspensão turva, através da qual as linhas pretas não são visíveis. Um teste negativo para hemoglobina falciforme é indicado por uma suspensão transparente, através da qual as linhas pretas são claramente visíveis (Imagem 19) [20].

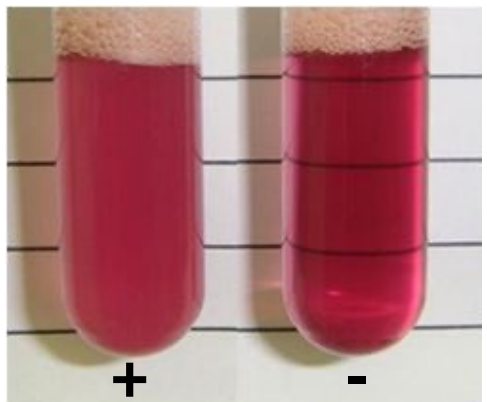


Imagem 19. *Resultados do teste de pesquisa de hemoglobina S. Fonte: https://5.imimg.com/data5/LT/VW/MY-1053400/sickle-cell-solubility-test-screening-kit-sickle-sense.pdf*

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cohn CS, Delaney M, Johnson ST, Katz LM, editores. Technical manual. 20th edition. Bethesda, Maryland: AABB; 2020.

2. Grey C. Addition of fresh serum to plasma to aid in enhancement of complement-dependent antibodies. Immunohematology. 1 de janeiro de 2019;35(3):102–4.

3. Fernandes HP, Cesar CL, Barjas-Castro MDL. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. Rev Bras Hematol Hemoter. 2011;33(4):297–301.

4. Li HY, Guo K. Blood Group Testing. Front Med. 11 de fevereiro de 2022;9:827619.

5. Mitra R, Mishra N, Rath G. Blood groups systems. Indian J Anaesth. 2014;58(5):524.

6. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. National Center for Biotechnology Information. 2005;

7. Bio-Rad. ID-DiaClon Anti-D. B007531. 15 de fevereiro de 2021;V.01.

8. Resolving ABO Discrepancies- Quick Reference Chart. Bio-Rad Laboratories. janeiro de 2017; Bulletin H008019.

9. Bagh DrR. Antibody Screening in Pre-transfusion Testing and Antenatal Screening. Tulip Group.

10. Andıç N. Practical Solutions for Problems in Blood Grouping and Crossmatching. Tjh. 24 de fevereiro de 2022;39(1):55–60.

11. Mendes RDS, Dias JLRM, Mendonça SD, Freitas LAD, Silva LGD, Pardi PC. ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE: INTRODUÇÃO ÀS FORMAS DE APRESENTAÇÃO DA SÍNDROME E DIAGNÓSTICO IMUNO-HEMATOLÓGICO. Em: Expansão do Conhecimento e Inovação Tecnológica no Campo das Ciências Farmacêuticas [Internet]. 1.a ed. Atena Editora; 2020 [citado 6 de setembro de 2023]. p. 56–68. Disponível em: https://www.atenaeditora.com.br/post-ebook/3511

12. Hill A, Hill QA. Autoimmune hemolytic anemia. 2018.

13. Berentsen S, Tjønnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. Blood Reviews. maio de 2012;26(3):107–15.

14. Bio-Rad. DC-Screening I. 18 de dezembro de 2020;(B004851 v.01).

15. Bio-Rad. DAT IgG-Dilution. 15 de fevereiro de 2021;(B004033 v.01).

16. Bio-Rad. DAT IgG1/IgG3. 15 de fevereiro de 2021;(B004043 v.01).

17. Bio-Rad. DiaCidel. 7 de abril de 2022;(B108200 v.02).

18. Mitra A, Barnhard S. Red blood cell antigen phenotyping and genotyping. UC Davis Health. 2 de dezembro de 2020.

19. Houwing ME, De Pagter PJ, Van Beers EJ, Biemond BJ, Rettenbacher E, Rijneveld AW, et al. Sickle cell disease: Clinical presentation and management of a global health challenge. Blood Reviews. setembro de 2019;37:100580.

20. Streck. SICKLEDEX®. setembro de 2021.

ANEXO I- CARACTERÍSTICAS DOS ANTICORPOS ANTI-ERITROCITÁRIOS

Tabela 10. *Características dos anticorpos anti-eritrocitários*

Anticorpo	Classe de imunoglo-bulina	Reatividade		Papaína/ Ficina	DTT	DHFRN	RTH
		4ºC	37ºC				
Anti-D	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Sim	Sim
Anti-C	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Sim	Sim
Anti-E	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Sim	Sim
Anti-c	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Sim	Sim
Anti-e	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Sim	Sim
Anti-K	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Sensível	Sim	Sim
Anti-k	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Sensível	Sim	Sim
Anti-Kp^{a}	IgG		Maioria	Resistente	Sensível	Sim	Sim
Anti-Kp^{b}	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Sensível	Raro	Sim
Anti-M	IgM>IgG	Maioria	Raro	Sensível	Resistente	Raro	Possível
Anti-N	IgM>IgG	Maioria	Raro	Sensível	Resistente	Não	Raro
Anti-S	IgM>IgG	Alguns	Maioria	Sensível	Resistente	Sim	Sim
Anti-s	IgM>IgG	Alguns	Maioria	Sensível	Resistente	Sim	Sim
Anti-P_1	IgM (IgG raro)	Maioria	Raro	Resistente	Resistente	Não	Raro
Anti-Lu^{a}	IgM>IgG		Entre 24ºC e 37ºC	Resistente	Variável	Possível	Possível
Anti-Lu^{b}	IgG>IgM		Entre 24ºC e 37ºC	Resistente	Variável	Possível	Sim
Anti-Le^{a}	IgM>IgG		Entre 24ºC e 37ºC	Resistente	Resistente	Não	Sim
Anti-Le^{b}	IgM>IgG		Entre 24ºC e 37ºC	Resistente	Resistente	Não	Raro
Anti-Fy^{a}	IgG>IgM		Maioria	Sensível	Resistente	Sim	Sim
Anti-Fy^{b}	IgG>IgM		Maioria	Sensível	Resistente	Possível	Sim
Anti-Jk^{a}	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Possível	Sim
Anti-Jk^{b}	IgG>IgM		Maioria	Resistente	Resistente	Raro	Sim

ANEXO II- SELEÇÃO DE CE E PLASMA PARA TRANSFUSÃO

Pela peculiaridade do sistema ABO, as compatibilidades para a transfusão de plasma são diferentes das compatibilidades para a transfusão de eritrócitos. A seleção dos eritrócitos tem por base a compatibilidade com os anticorpos naturais existentes no doente, como demonstra a tabela 11.

Tabela 11. *Seleção de CE a transfundir*

Grupo do recetor	Grupo do CE que pode ser transfundido			
Grupo AB	Grupo AB	Grupo A	Grupo B	Grupo O
Grupo A	Grupo A	Grupo O		
Grupo B	Grupo B	Grupo O		
Grupo O	Grupo O			

A transfusão de plasma é utilizada em doentes com alterações da coagulação, nomeadamente, deficiência de fatores de coagulação ou de proteínas plasmáticas ou em situações de transfusão maciça. Existem diversos tipos de plasma, sendo o mais utilizado o plasma fresco e congelado, que, depois de descongelado, tem uma validade de 5 dias[1].

Na transfusão de plasma humano, deve respeitar-se, sempre que possível, o grupo ABO do doente. A seleção de plasma a ser transfundido tem por base a presença ou ausência de anticorpos circulantes e como tal, o plasma do grupo AB é considerado dador universal (tabela 12).

Tabela 12. *Seleção dos plasmas a transfundir*

Grupo do recetor	Grupo do plasma que pode ser transfundido			
Grupo O	Grupo O	Grupo A	Grupo B	Grupo AB
Grupo B	Grupo B	Grupo AB		
Grupo A	Grupo A	Grupo AB		
Grupo AB	Grupo AB			

ANEXO III- CLASSIFICAÇÃO DE WIENER

A nomenclatura de Wiener é baseada na teoria de que um único gene codifica vários fatores de grupos sanguíneos, tornando possível a identificação de antigénios Rh, presentes num único cromossoma, usando um haplótipo. Assim, nesta nomenclatura, "R" indica que o antigénio D está presente e o número ou letra que se seguem indicam os antigénios C/c e E/e: R_1 para Ce, R_2 para cE, R_0 para ce e R_z para CE. Em contraste, "r" indica a ausência do antigénio D, sendo utilizados os símbolos: r' para Ce, r" para cE e r^y para CE[1]. A tabela 13 exemplifica os diferentes fenótipos existentes e a respetiva classificação de Wiener.

Tabela 13. *Designação da nomenclatura de Wiener*

	Fenótipo	Genótipo (Wiener)
Rh positivo	DCe	R_1
	DcE	R_2
	Dce	R_0
	DCE	R_z
Rh negativo	ddce	r
	ddCe	r'
	ddcE	r"
	ddCE	r^y

Manual prático de

IMUNO-HEMATOLOGIA





UNIDADE LOCAL DE SAÚDE AMADORA / SINTRA
HFF HOSPITAL PROFESSOR DOUTOR FERNANDO FONSECA

Publicação impressa com
o patrocínio da Bio-Rad