UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Aplicação da técnica da glicina-ácida/EDTA e
avaliação da eficácia no tratamento de hemácias
com teste direto da antiglobulina positivo

Célia Kazue Abiko

RIBEIRÃO PRETO

2017

Aplicação da técnica da glicina-ácida/EDTA e avaliação da eficácia no tratamento de hemácias com teste direto da antiglobulina positivo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

RIBEIRÃO PRETO

2017

CÉLIA KAZUE ABIKO

Aplicação da técnica da glicina-ácida/EDTA e
avaliação da eficácia no tratamento de hemácias
com teste direto da antiglobulina positivo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Hemoterapia e Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

APROVADO: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra Fabíola Traina

Prof. Dr Amauri Antiquera Leite

Prof^ª. Dra Ana Paula Costa Nunes da Cunha Cozac

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos Pedro e Maria, que sirva de incentivo para a busca do conhecimento, sucesso e realização profissional.

Aos colegas de trabalho Ana Paula, Cristiane, Igor, Mara, Rita e Simone pelo companheirismo e pela agradável convivência no dia dia.

A todos os colegas do Hemonúcleo de Araçatuba e aos profissionais da área da saúde que amam a profissão, trabalham com ética e que se dedicam buscando o bem estar dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo dom da vida e a graça de colocar em minha vida pessoas especiais que me ajudaram a chegar até aqui,

Aos meus pais que me ensinaram respeito, honestidade, perseverança e pelo incentivo aos estudos,

A dra Flávia Leite Souza Santos que me ajudou durante todo o trabalho e contribuiu de forma valiosa com todas as suas orientações,

Ao meu esposo, Abidias que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem me apoiando nos momentos de dificuldade,

Ao dr Dimas Tadeu Covas pela oportunidade de poder realizar este trabalho e pela ajuda na definição do tema,

A dra Eugenia Amorim Ubiali pelo apoio e pela prestreza em ajudar sempre que necessitei,

Ao dr Wolney Gois Barreto diretor do Hemonúcleo de Araçatuba pelo incentivo para realização do mestrado,

A minha irmã Leda, que apoiou e ajudou nas horas em que precisei, e que não foram poucas,

A Raquel Botelho pela sua atenção e prontidão para ajudar,

Aos colegas do mestrado aos com os quais convivi durante todo o ano de 2014, e que guardarei eternamente em minha memória,

A Émile que me ajudou com as amostras e as valiosas informações.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TESTES PRÉ-TRANSFUSIONAIS	1
1.1.1 TIPAGEM ABO/Rh	2
1.1.2 ANTICORPOS ANTI-ERITROCITÁRIOS	3
1.1.3 PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IRREGULARES	4
1.1.4 PROVA DE COMPATIBILIDADE	5
1.1.5 FENOTIPAGEM PARA OUTROS SISTEMAS	6
1.2 METODOLOGIAS APLICADAS À ROTINA IMUNO-HEMATOLÓGICA	7
1.2.1 MÉTODOS DE FASE FLÚIDA	8
1.2.2 COLUNAS DE GEL	9
1.2.3 BIOLOGIA MOLECULAR	9
1.3 TESTE DA ANTIGLOBULINA	10
1.3.1 TESTE DIRETO DA ANTIGLOBULINA	11
1.3.2 TESTE INDIRETO DA ANTIGLOBULINA	12
1.3.3 CONDIÇÕES CLÍNICAS COM TDA POSITIVO	13
1.3.4 ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE	15
1.3.5 TRATAMENTO DE HEMÁCIAS COM TDA POSITIVO	16
1.3.5.1 TÉCNICA DE BLOQUEIO	17
1.3.5.2 TRATAMENTO DE HEMÁCIAS COM ZZAP	17
1.3.5.3 CLOROQUINA	17
1.3.5.3 GLICINA-ÁCIDA/EDTA	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 JUSTIFICATIVA	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 AMOSTRAS DE DOADORES	22
4.1.1 FENOTIPAGEM	23
4.1.2 SENSIBILIZAÇÃO DAS HEMÁCIAS	24
4.1.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS	25
4.2 PREPARO DA GLICINA ÁCIDA-EDTA	25
4.2.1 TÉCNICA DA GLICINA-ÁCIDA/EDTA	26
4.3 PREPARO DA CLOROQUINA	26
4.3.1 TÉCNICA DA CLOROQUINA	26
4.4 VERIFICAÇÃO DA EFETIVIDADE DOS TESTES	27
4.5 TESTE DO ELUATO	27
4.6 AMOSTRA DE PACIENTE	27
5 RESULTADOS	28

5.1 REAGENTES	28
5.2 AMOSTRAS DE DOADORES	28
5.2.1 SENSIBILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	28
5.2.2 TRATAMENTO DAS HEMÁCIAS	29
5.2.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS	30
5.2.4 TESTAGEM DO ELUATO	33
5.2.5. EFEITO DA ELUIÇÃO SOBRE OS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS	34
5.2.6 AMOSTRA DE PACIENTE.....	35
5.2.7 TEMPO DE EXECUÇÃO DA TÉCNICA DA GLICINA-ÁCIDA/EDTA	36
5.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO.....	45
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	46
9 ANEXOS	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Princípio da técnica direta da antiglobulina.....	página 11
Figura 2 - Princípio da técnica indireta da antiglobulina.....	página 13
Figura 3 – Teste da solução da última lavagem após sensibilização das hemácias.....	página 29
Figura 4 - TDA das amostras após sensibilização com anticorpos.....	página 30
Figura 5 - Resultados do TDA após o tratamento das hemácias com cloroquina.....	página 31
Figura 6 – Resultados do TDA após o tratamento das hemácias com glicina-ácida/EDTA	página 32
Figura 7 - Painel do eluato da amostra 21 apresentando especificidade anti-C.....	página 34
Figura 8 - Painel do eluato da amostra 47, apresentando especificidade anti-K.....	página 34
Figura 9 - Fenotipagem das amostras 24 e 50 para antígeno K após tratamento com glicina-ácida/EDTA.....	página 36
Figura 10 – TDA monoespecífico. Amostra sensibilizada ” <i>in vivo</i> ” com anticorpo anti-IgG.....	página 38
Figura 11 – TDA após o tratamento.....	página 38
Figura 12 – Resultado da fenotipagem da amostra sensibilizada “ <i>in vivo</i> ” por anti-IgG:.....	página 39
Figura 13 – Painel do eluato pós tratamento com glicina-ácida/EDTA.	página 39
Figura 14 – Painel do eluato pós tratamento com glicina-ácida/EDTA.	página 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado geral do tratamento das hemácias com glicina e cloroquina.....	página 32
Tabela 2 - Resultados do TDA após tratamento da hemácias sensibilizadas por anticorpo sensibilizado.....	página 33
Tabela 3 - Resultado após o segundo tratamento das hemácias com glicina-ácida/EDTA.....	página 33
Tabela 4 - Resultado do Eluato das amostras tratadas com glicina-ácida/EDTA.....	página 34
Tabela 5 – Verificação da interferência do tratamento da hemácias com cloroquina e glicina-ácida/EDTA nos antígenos Fy ^a , Fy ^b , Jk ^a , Jk ^b , S e s.....	página 35
Tabela 6 - Resultado da sensibilização das amostras, efetividade do tratamento com cloroquina, glicina e o eluato pós tratamento com glicina.....	página 37

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 - Número de amostras sensibilizadas por especificidade de anticorpo.....	página 31
Gráfico 2 - Teste de correlação múltipla entre as técnicas aplicadas.....	página 41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Preparo dos Reagentes da glicina-ácida/EDTA.....	página 25
Quadro 2 - Preparo da Cloroquina.....	página 26
Quadro 3 - Resultados comparativos entre as técnicas utilizadas	página 40

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fluxograma da pesquisa utilizando as amostras de doadores.....página 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABO	Sistema Sanguíneo ABO
AHAI	Anemia Hemolítica Autoimune
Bg	Antígeno Bg
c	Antígeno c
C	Celsius
C	Antígeno C
C3	Complemento
C3b	Fração do complemento
C3d	Fração do complemento
D	Antígeno D
DHFRN	Doença Hemolítica do Feto e do Recém-nascido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
E	Antígeno E
e	Antígeno e
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
Fc	Porção do anticorpo
Fy^a	Antígeno Duffy a
Fy^b	Antígeno Duffy b
HCl	Ácido clorídrico
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
Mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de sódio
PA	Puro para análise
PAI	Pesquisa de anticorpos irregulares
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
Rh	Sistema sanguíneo Rh
rpm	Rotações por minuto
S	Antígeno S
s	Antígeno s
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
SBS	Sistema de banco de sangue
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDA	Teste direto da antiglobulina
TIA	Teste indireto da antiglobulina
TRIS	Hidrometil aminometano
ZZAP	Sulphydryl-Proteolytic Enzyme
µL	Microlitros

RESUMO

Os testes pré-transfusionais são o conjunto de técnicas imuno-hematológicas aplicadas nas amostras do receptor e do doador com a finalidade de fornecer uma unidade de hemácias compatível e segura para a transfusão. Além da fenotipagem ABO e Rh obrigatória nos testes pré-transfusionais, a determinação do perfil antigênico de outros antígenos eritrocitários de importância clínica, melhora a segurança transfusional, especialmente para pacientes previamente aloimunizados ou candidatos à transfusão crônica. Para tais pacientes, conhecer o fenótipo eritrocitário permite a seleção de concentrados de hemácias com o mesmo fenótipo, o que previne reações transfusionais hemolíticas, assim como nova aloimunização. Indivíduos que apresentam as hemácias sensibilizadas “*in vivo*” por anticorpos anti-eritrocitários, como ocorre na anemia hemolítica autoimune (AHAI), terão o teste direto da antiglobulina (TDA) positivo, dificultando a realização da fenotipagem. O TDA positivo provoca resultados falsos positivos especialmente quando são utilizados para a fenotipagem soros comerciais da classe IgG que exigem a fase de antiglobulina humana, ou teste indireto da antiglobulina (TIA), para leitura. Em 1982 Edwards, Moulds e Judd propuseram a utilização da técnica da cloroquina para dissociar os complexos de antígeno-anticorpo preservando a membrana eritrocitária e permitindo a fenotipagem. Atualmente é a técnica mais utilizada nos centros brasileiros. A técnica da glicina-ácida/EDTA foi primeiramente descrita por Louie, Jieng e Zeroulis em 1986, porém é pouco utilizada por não haver os reagentes prontos comercialmente no mercado brasileiro. O presente estudo avaliou a técnica da glicina-ácida-EDTA com reagentes preparados “*in house*” em paralelo à técnica da cloroquina, que é atualmente a técnica aplicada no Hemocentro de Ribeirão Preto. Para isso, amostras de hemácias de doadores (n=50) com fenótipo conhecido foram sensibilizadas com anticorpos humanos de especificidade conhecida e ambas as técnicas foram aplicadas. Foi verificado ainda o efeito da técnica sobre a expressão dos antígenos eritrocitários (Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s) através da fenotipagem das amostras que tiveram o TDA negativado. A viabilidade dos anticorpos presentes no eluato recuperado após tratamento com a glicina-ácida/EDTA também foi testada. A glicina-ácida/EDTA foi efetiva em negativar o TDA em 33 amostras (66%), comparável com a cloroquina que negativou 28 amostras (56%). O eluato apresentou-se viável no tratamento com a glicina-ácida/EDTA e não foi constatada destruição dos antígenos eritrocitários após o tratamento. Concluímos que a técnica da glicina-ácida/EDTA pode ser utilizada como uma opção no tratamento de hemácias com TDA positivo com a vantagem de seu tempo de execução ser inferior ao da cloroquina (2 minutos x 30 a 120 minutos), o que lhe torna útil em situações de maior urgência. Quando ambas as técnicas são utilizadas em hemácias diferentes de uma mesma amostra a efetividade está significativamente aumentada (p<0,05).

Palavras chave: Glicina-ácida/EDTA, Teste direto da antiglobulina, AHAI, fenotipagem

ABSTRACT

The pre-transfusion tests are the group of immunohematology techniques applied in the receptor and donor samples in order to provide a unit of red blood cells compatible and safe for transfusion. In addition to the obligatory ABO and Rh phenotyping in the pre-transfusion tests, the determination of the antigenic profile of other red cells antigens of clinical importance improves transfusion safety, especially for patients previously alloimmunized or candidates for chronic transfusion. For such patients, knowing the phenotype allows the selection of red blood cell concentrates with the same phenotype, which prevents hemolytic transfusion reactions, as well as new alloimmunization. Individuals who have antibody-coated red blood cells sensitized *in vivo*, such as in autoimmune hemolytic anemia (AHAI), will have a direct antiglobulin test (DAT) positive, making it difficult to perform phenotyping. Positive DAT causes false positive results especially when commercially available IgG serums which require the human antiglobulin phase or indirect antiglobulin test (IAT) for reading are used for phenotyping. In 1982 Edwards, Molds and Judd proposed the use of the chloroquine technique to dissociate antigen-antibody complexes by preserving the erythrocyte membrane and allowing phenotyping. It is currently the most used technique in Brazilian centers. The EDTA/glycine-acid technique was first described by Louie, Jieng and Zeroulis in 1986, but it is little used because commercially available reagents are not available in the Brazilian market. The present study evaluated the EDTA/glycine-acid technique with reagents prepared in house in parallel to the chloroquine technique, which is currently the technique applied at the Hemocentro de Ribeirão Preto. For this, donor red cells samples ($n = 50$) with known phenotype were sensitized with human antibodies of known specificity and both techniques were applied. The effect of the technique on the expression of erythrocyte antigens (Fy^a , Fy^b , Jk^a , Jk^b , S and s) was also verified by the phenotyping of the samples that had negative DAT. The viability of the antibodies present in the recovered eluate after treatment with EDTA/glycine-acid. A was also tested EDTA/glycine-acid was effective in negatively affecting DAT in 33 samples (66%), comparable to chloroquine that negated 28 samples (56%). The eluate was viable in treatment with EDTA/glycine-acid and no destruction of erythrocyte antigens after treatment. We conclude that the EDTA/ glycine-acid technique can be used as an option in the treatment of red cells with TDA positive, with the advantage that its execution time is inferior to that of chloroquine (2 minutes x 30 to 120 minutes), which makes it useful in emergency situations. When both techniques are used in different erythrocytes of the same sample, the effectiveness is significantly increased ($p < 0.05$).

Key words: EDTA/glycine-acid, direct antiglobulin test, AIHA, phenotyping

1 INTRODUÇÃO

A transfusão de hemácias é um recurso terapêutico muito importante e eficaz e tem se mostrado como um grande aliado no tratamento de diversas patologias, auxiliando na melhoria da sobrevida e qualidade de vida de diversos pacientes, quando indicada de forma correta. É provavelmente a modalidade de terapia mais utilizada no mundo, sendo considerada a forma mais antiga de terapia celular. A transfusão de hemácias em pacientes com anemia grave ou sangramento agudo reestabelece o nível de hemoglobina, molécula responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos, melhorando a isquemia tecidual (BARJAS-CASTRO, 2013; ZAGO, 2014).

A transfusão de componentes celulares, como o concentrado de hemácias, deve ser bem avaliada quanto aos riscos e benefícios. Os testes pré-transfusionais são parte obrigatória do processo transfusional e têm como função assegurar que o melhor hemocomponente seja selecionado para o paciente, reduzindo assim a chance de transfusões incompatíveis e reações transfusionais (BARJAS-CASTRO, 2013).

1.1 TESTES PRÉ-TRANSFUSIONAIS

Os testes pré-transfusionais têm a finalidade de evitar a ocorrência de reações hemolíticas no receptor decorrentes da transfusão de hemácias incompatíveis do doador (DOWNES e SHULMAN, 2011). Tem como propósito selecionar hemácias que após transfusão deverão ter sobrevida normal ou mais próxima do normal (MELO, 2007).

Os testes pré-transfusionais, que consistem no conjunto de técnicas imunohematológicas aplicadas às amostras do receptor e doador, devem ser realizados antes de toda transfusão. A aplicação desses testes tem como finalidade fornecer uma unidade de hemácias compatível e elevar a segurança da transfusão. Os testes pré-transfusionais, aliados a utilização de novas tecnologias, tem historicamente evitado reações transfusionais hemolíticas, garantindo a segurança transfusional em cerca de 95% dos pacientes que recebem transfusão. É imprescindível porém a execução correta das técnicas envolvidas nos testes pré-transfusionais, e ainda garantir a identificação correta do receptor e das amostras de sangue, e das unidades de hemácias. (CASTILHO, 2000; MELO, 2007; BARJAS-CASTRO, 2013).

Todos os testes que compõem a rotina pré-transfusional usam métodos sorológicos que envolvem a reação antígeno x anticorpo. Ao testar a presença de um antígeno na superfície da hemácia é necessário dispor de um soro com especificidade conhecida para aquele antígeno. Por outro lado, testar a presença de um determinado anticorpo no soro ou no plasma exige o uso de hemácias com perfil antigênico conhecido. Os testes pré-transfusionais incluem tipagem ABO (direta e reversa), tipagem Rh, pesquisa de anticorpos irregulares no sangue do receptor, retipagem ABO e Rh do hemocomponente e prova de compatibilidade entre as hemácias do doador e soro ou plasma do receptor em caso de transfusão de hemácias ou hemocomponentes que contenham mais de 2 mL de volume eritrocitário, como o concentrado de granulócitos (BRASIL, 2016; GANZELLA, 2014; SANTOS, 2014).

Além dos testes regularmente realizados, a determinação do fenótipo para outros antígenos eritrocitários do doador e do receptor pode ser indicada. A fenotipagem eritrocitária determina o perfil antigênico para outros antígenos de importância clínica além do sistema ABO e do antígeno RhD. Ela pode auxiliar a confirmação de uma especificidade de anticorpo encontrada no soro do paciente, uma vez que espera-se que a sua hemácia não expresse o antígeno correspondente, e simultaneamente é utilizada para selecionar um concentrado de hemácias negativo para o respectivo antígeno, evitando reações hemolíticas transfusionais. A fenotipagem de candidatos a transfusões crônicas também é recomendada, pois esse grupo de pacientes deve se beneficiar com a transfusão profilática de unidades de hemácias com mesmo fenótipo, evitando assim a aloimunização assim como reações hemolíticas provocadas por anticorpos previamente existentes e em baixo título, não identificados pela triagem de anticorpos (CASTILHO, JUNIOR e REID, 2015; DOWNES e SHULMAN, 2011).

1.1.1 TIPAGEM ABO/Rh

O sistema ABO (ISBT001) foi o primeiro sistema de grupo sanguíneo a ser descoberto. Ele foi descrito em 1900 por Karl Landsteiner, e é considerado o sistema de maior importância na prática transfusional. Ele é composto por quatro antígenos: A1 (ABO1), B (ABO2), AB (ABO3) e A1 (ABO4) e é caracterizado pela presença dos anticorpos naturais, ou seja, anticorpos que surgem sem a exposição prévia aos antígenos através de transfusão ou gestação. Os anticorpos ABO são predominantemente da classe IgM, são capazes de fixar o complemento e de provocar hemólise grave intravascular caso ocorra transfusão ABO incompatível. Por apresentar essa característica peculiar, a tipagem do sistema ABO é composta de duas etapas: a prova direta e a prova reversa. Na prova direta é realizada a pesquisa dos antígenos na superfície das hemácias, que são testadas com soros comerciais

Anti-A e Anti-B. A prova reversa por sua vez pesquisa a presença de anticorpos ABO ao testar o soro ou plasma do paciente/doador com hemácias A1 e B. Ambas as provas são obrigatórias e devem ser concordantes para interpretação do fenótipo ABO (COOLING, 2011; SANTOS, 2014).

O sistema Rh (ISBT004) é o maior e mais complexo sistema de grupos sanguíneos, compreendendo atualmente 54 antígenos (ISBT, 2016). São cinco os principais antígenos do sistema Rh: D (RH1), C (RH2), E (RH3), c (RH4) e e (RH5). Esses antígenos possuem alta capacidade imunogênica e seus respectivos anticorpos estão envolvidos na doença hemolítica perinatal e em reações transfusionais hemolíticas. Os autoanticorpos quentes, como ocorre na anemia hemolítica quente, são representados em grande parte por anticorpos contra antígenos públicos do sistema Rh (CASTILHO, 2007, CHOU e WESTHOFF, 2011; BARJAS-CASTRO, 2013). A tipagem RhD pesquisa o antígeno D na membrana eritrocitária ao testar a hemácia com antissoros comerciais. Atualmente a maior parte dos soros Anti-D comercializados são monoclonais.

1.1.2 ANTICORPOS ANTI-ERITROCITÁRIOS

Anticorpos são proteínas presentes no plasma também denominadas imunoglobulinas. São produzidas pelo sistema imune em resposta a um determinado antígeno. Podem ser classificadas de acordo com suas características e propriedades em cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgE e IgD (BARJAS-CASTRO, 2013).

A ligação entre o antígeno e o anticorpo envolvem ligações não covalentes que são reversíveis. Vários tipos de interações não covalentes podem contribuir para a ligação do antígeno pelo anticorpo, incluindo forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2008).

As interações antígeno-anticorpo são constituídas por ligações dinâmicas que sofrem interferência de alterações físico-químicas no meio, como mudanças na temperatura, na força eletrostática, na concentração do antígeno e do anticorpo e no pH. O melhor pH para a reação é em torno de 7,0, no entanto raros anticorpos podem exigir acidificação do meio para serem identificados (SANTOS, 2014).

Em imunohematologia são pesquisados os anticorpos que reconhecem os antígenos eritrocitários de grupo sanguíneo. “*in vivo*”, esses anticorpos, dependendo de seu significado clínico, são capazes de reconhecer seus respectivos antígenos sobre a hemácia, podendo levar a sua destruição por dois mecanismos: fagocitose por macrófagos no sistema

reticuloendotelial ou por ativação do sistema complemento com a formação do complexo de ataque a membrana e hemólise intravascular. As duas classes de anticorpos de maior importância em imunohematologia são as imunoglobulinas IgG e a IgM (SANTOS, 2014).

Devido a sua estrutura pentamérica, os anticorpos da classe IgM se ligam aos antígenos localizados na superfície da membrana de hemácias próximas e promovem aglutinação das mesmas em meio salino “*in vitro*”. Anticorpos da classe IgG, por sua vez, são denominados “não aglutinantes” ou “incompletos”, pois sua estrutura de monômero é pequena, o que desfavorece a aglutinação direta, uma vez que uma mesma molécula de IgG não alcança antígenos alvos em duas hemácias próximas. Os anticorpos IgM, além de terem um tamanho maior, apresentam 750 vezes maior eficiência de aglutinação que os anticorpos IgG, permitindo maior facilidade nas ligações entre as hemácias (CARRUCIO e WISE, 2012; GREEN e KLOSTERMANN, 2012).

Nos testes “*in vitro*” são simulados reações que poderiam ocorrer “*in vivo*”, causando reações indesejáveis. A fase de sensibilização, em que o anticorpo se liga ao antígeno correspondente, não é identificada macroscopicamente, porém, uma vez que o anticorpo aproxima as hemácias e vence a força eletrostática que naturalmente as repele, chamada de potencial zeta, ocorre a aglutinação. Dependendo das características do anticorpo e de sua capacidade de fixar complemento, pode ocorrer também a hemólise (SANTOS, 2014).

1.1.3 PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IRREGULARES

A pesquisa de anticorpos irregulares é teste obrigatório nos testes pré-transfusionais e tem a finalidade de detectar anticorpos “*in vitro*” que possam causar reação “*in vivo*”.

Dependendo da população estudada (pacientes x doadores) e ainda da sensibilidade do teste, a frequência de anticorpos irregulares pode variar de 0,3% a 38%. A imunização pode ocorrer por transfusão, gestação, transplante ou injeção de material imunogênico (WALKER, 2011).

Os anticorpos irregulares podem ser classificados como aloanticorpos, que são voltados contra antígenos ausentes na hemácia autóloga, ou como autoanticorpos, os quais reconhecem antígenos eritrocitários próprios. Os autoanticorpos antieritrocitários surgem em decorrência da desregulação da autotolerância imune, relacionada à condições diversas como doenças hematológicas, doenças inflamatórias autoimunes, neoplasias, infecções e uso de medicações. A presença do autoanticorpo associado a um quadro de anemia hemolítica caracteriza a anemia hemolítica autoimune (AHAI), seja ela primária ou secundária à outra

patologia. Até 12 a 40% dos pacientes com autoanticorpos quentes podem apresentar aloanticorpos de significado clínico mascarados pelos autoanticorpos (SHIREY *et al.*, 2002).

É importante detectar a presença de anticorpos no plasma/soro de um receptor de transfusão para garantir que seja transfundido sangue compatível. Quando a pesquisa de anticorpo irregular resultar positiva para um ou mais anticorpos de relevância clínica, é necessário confirmar a ausência do respectivo antígeno na hemácia do receptor, assim como selecionar para transfusão concentrados de hemácias também negativos para aqueles antígenos, evitando assim reações transfusionais (WALKER, 2011).

A detecção de um anticorpo irregular é inicialmente realizada pela triagem de anticorpos, na qual o soro/plasma do receptor é testado com 2 a 3 hemácias do tipo “O”. O conjunto de fenótipos dessas hemácias deve contemplar os antígenos de maior importância clínica. Como os anticorpos irregulares de maior interesse clínico são na maior parte das vezes imunes, portanto da classe IgG, é obrigatória a fase de antiglobulina (AGH) do teste, ou teste indireto da antiglobulina (TIA), uma vez que esses anticorpos são incompletos (CASTILHO, JUNIOR e REID, 2015). O teste de triagem estando positivo deve-se fazer a identificação da especificidade do anticorpo utilizando um painel com maior número de hemácias fenotipadas.

1.1.4 PROVA DE COMPATIBILIDADE

A prova de compatibilidade é um teste obrigatório em caso de transfusão de componentes eritrocitários. Também chamada de prova de compatibilidade maior deve ser realizada antes da administração de sangue total ou concentrado de hemácias utilizando-se hemácias obtidas do tubo coletor da bolsa a ser transfundida e o soro ou plasma do receptor (BRASIL, 2016).

É definido como o procedimento para excluir a incompatibilidade entre o doador e o receptor. Tem o objetivo de detectar anticorpos que podem não ter sido encontrados na pesquisa de anticorpos devido a ausência ou pouca expressão de antígenos no painel de hemácias, além da possibilidade de terem ocorrido erros técnicos ou notacionais durante a realização da pesquisa (MELO, 2007).

1.1.5 FENOTIPAGEM PARA OUTROS SISTEMAS

Além da pesquisa de ABO/Rh que é realizado rotineiramente, a fenotipagem para outros sistemas, também denominado “fenotipagem estendida” determina a presença ou ausência de antígenos considerados de importância clínica. A fenotipagem não é obrigatória nos testes pré-transfusionais porém a legislação atual recomenda a realização da fenotipagem eritrocitária dos antígenos C (RH2), E (RH3), c (RH4), e (RH5), K (KELL1), Fy^a (FY1), Fy^b (FY2), Jk^a (JK1), Jk^b (JK2), S (MNS3) e s (MNS4) para pacientes aloimunizados e pacientes com indicação de transfusão crônica (BRASIL, 2016).

A seleção de concentrados de hemácias com o mesmo fenótipo do receptor para transfusão pode evitar reações transfusionais hemolíticas no paciente previamente aloimunizado, também previne a sensibilização por outros antígenos, o que normalmente torna as transfusões seguintes ainda mais complicadas. A fenotipagem do paciente também auxilia na identificação dos anticorpos, pois espera-se que nas hemácias do paciente o antígeno seja negativo para o anticorpo encontrado, servindo de guia para teste de exclusão de anticorpos (SANTOS, 2014; WALKER, 2011).

A incidência de aloanticorpos aumenta com o número de transfusões, no entanto a implantação de rotina de fenotipagem com transfusão profilática de hemácias com fenótipo compatível para pacientes candidatos à politransfusão, como os portadores de doença falciforme, talassemia, anemia aplástica, doenças linfó e mieloproliferativas, renais crônicos e anemias refratárias, pode contribuir para o baixo índice de sensibilização nessas populações (FLUIT, KUNST e DRENTHE-SCHONK, 1999; MARTINS *et al.*, 2008 e VICHINSKY *et al.*, 2001). Outro grupo de pacientes que se beneficia com a transfusão de mesmo fenótipo são os pacientes com AHAI, uma vez que o autoanticorpo pode mascarar a presença de um aloanticorpo de significado clínico em até 40% dos casos. Mesmo com as técnicas utilizadas “*in vitro*” para remover a interferência do autoanticorpo no soro, um aloanticorpo pode não ser identificado, e dessa forma, transfundir o mesmo fenótipo do paciente evitaria reação hemolítica pelos anticorpos voltados contra antígenos de maior importância clínica e de frequência intermediária. Além disso, os pacientes com AHAI são fortes respondedores e a transfusão profilática do mesmo fenótipo previne a aloimunização (SHIREY *et al.*, 2002).

Além de fenotipar o receptor, é importante também que os bancos de sangue tenham rotinas de fenotipagem de doadores para atender as necessidade dos pacientes aloimunizados ou em esquema de transfusão crônica (PINTO, BRAGA e SANTOS, 2011).

Rotineiramente é inviável estabelecer o fenótipo eritrocitário completo de um indivíduo pela grande diversidade de sistemas sanguíneos descritos. Até junho de 2015, já haviam sido classificados 308 antígenos atribuídos a 36 sistemas, definidos pela Sociedade Internacional de Transusão de Sangue (ISBT) (CASTILHO, JUNIOR e REID, 2015). Portanto, o paciente é normalmente fenotipado para os antígenos de maior importância clínica.

Alguns fatores podem limitar a realização da fenotipagem eritrocitária. Um dos fatores é a transfusão alogênica realizada há menos de 90 dias. Neste caso, podem ocorrer resultados falso positivos para determinados antígenos devido à presença de hemácias do doador (LAINE *et al.*, 2000).

Outro fator é a presença de anticorpo sensibilizando a hemácia do paciente e provocando positividade do teste direto da antiglobulina humana (TDA). Os soros normalmente utilizados para fenotipagem, especialmente para os antígenos Fy^a (FY1), Fy^b (FY2), Jk^a (JK1), Jk^b (JK2), S (MNS3) e s (MNS4), necessitam da fase de antiglobulina humana (AGH) para que ocorra aglutinação. Amostras que apresentam o TDA positivo aglutinam após reação com a AGH, não pela real presença do antígeno em sua superfície, mas pela interação da AGH com o anticorpo que está sensibilizando o eritrócito. A interferência do TDA positivo pode ser anulada através de algumas técnicas capazes de dissociar o anticorpo, como por exemplo o tratamento da hemácia sensibilizada com cloroquina ou com glicina-ácida-EDTA (BRANCH e PETZ, 1999; SHIREY *et al.*, 2002 e LEGER, 2011).

1.2 METODOLOGIAS APLICADAS À ROTINA IMUNO-HEMATOLÓGICA

Todos os testes que compõem a rotina pré-transfusional usam métodos sorológicos que envolvem a reação antígeno-anticorpo e tem como objetivo determinar o perfil antigênico eritrocitário do receptor e do doador, assim como identificar em seu soro a presença de anticorpos contra antígenos eritrocitários que possam comprometer a sobrevivência das hemácias transfundidas. Para testar o antígeno na superfície da hemácia é necessário dispor de um antissoro com especificidade conhecida para aquele antígeno. Por outro lado, para testar a presença de um determinado anticorpo no soro ou plasma do receptor, é necessário o uso de hemácias com perfil antigênico conhecido (SANTOS, 2014).

Diversas metodologias são aplicadas nos laboratórios de imunohematologia. Cada serviço de hemoterapia faz a escolha do método que será aplicado de acordo com o perfil do laboratório, com o volume de exames diários e também com o custo envolvido. Todas essas

técnicas têm como objetivo comum demonstrar a reação entre antígeno e anticorpo, no entanto elas se baseiam em diferentes princípios. Muitas metodologias são atualmente aplicadas à imunohematologia, entre elas o sistema de fase sólida, a tecnologia de hemácias magnetizadas, a biologia molecular e até mesmo a citometria de fluxo, no entanto, os métodos mais tradicionais são aqueles baseados no princípio de hemaglutinação.

1.2.1 MÉTODOS DE FASE FLÚIDA

Os métodos de fase fluída são testes baseados na hemaglutinação e incluem o teste em tubo e o teste em microplacas. Uma suspensão de hemácias é adicionada ao plasma ou soro, em seguida é realizada a centrifugação e por fim é feita a leitura do resultado que é considerado positivo se for observado algum grau de aglutinação ou hemólise. A intensidade de aglutinação é graduada de acordo com o tamanho dos agregados desprendidos da superfície após agitação delicada do tubo ou microplaca. Os métodos de hemaglutinação são aplicados a todos os testes pré-transfusionais. Como os anticorpos ABO são aglutininas frias, a tipagem é realizada em temperatura ambiente (22°C), no entanto, ao investigar a presença de anticorpos irregulares, que como já mencionado é na maioria das vezes anticorpos incompletos da classe IgG, é essencial que a reação seja incubada a 37°C. As reações são facilitadas com a utilização de potencializadores e da antiglobulina humana (WALKER e HARMENING, 2012; AABB, 2011).

Nos métodos de fase fluída nos quais a AGH é empregada, a fase de lavagem é fundamental. Após a incubação do soro com as hemácias deve ser realizada a lavagem da reação para remover o excesso de anticorpos não ligados às hemácias já que os anticorpos livres podem bloquear a AGH quando ela é adicionada e levar a resultados falso negativos (AABB, 2011).

Os testes de hemaglutinação são os mais tradicionais entre os métodos ainda hoje aplicados à rotina de bancos de sangue. A vantagem desses métodos é o baixo custo quando comparado às técnicas mais modernas, mas apresentam também desvantagens. A técnica em tubo por exemplo, não permite automação, é trabalhosa e exige mão-de-obra bastante treinada na execução das diversas etapas do teste e, mesmo assim, pode haver subjetividade na interpretação dos resultados, além de resultados falso-negativos (DOWNES, 2011; ZANTEK *et. al.*, 2012).

1.2.2 COLUNAS DE GEL

A técnica em gel, iniciada na década de 90, representou uma grande revolução na rotina laboratorial, tornando-se muito popular. Além de ser sensível, a técnica dispensa a fase de lavagem antes da adição da AGH, assim como a agitação do teste para leitura, reduzindo o número de resultados falsos negativos decorrentes dessas duas etapas e o tempo para execução dos testes (LAPIERRE *et al.*, 1989; NOVARETTI, *et al.*, 2000, NOVARETTI, *et al.*, 2004). Os reagentes são comercializados na forma de cartões plásticos contendo microtubos preenchidos por gel composto por microesferas de acrilamida-dextran. Nesta metodologia, também baseada na hemaglutinação, a suspensão de hemácias e o soro são depositados em uma câmara acima da coluna de gel e, em seguida, procede-se com a centrifugação dos cartões. As microesferas atuam como uma malha que permite a passagem em direção ao fundo do microtubo apenas das hemácias não aglutinadas, enquanto as hemácias aglutinadas ficam retidas na parte superior da coluna, ou ao longo dela (GREEN e KLOSTERMANN, 2012). Portanto, quanto maior a agregação, mais hemácias ficam retidas no topo da coluna. Dependendo do tipo de teste a ser realizado pode ser utilizado gel neutro, ou gel específico impregnado pelo anticorpo desejado e o gel contendo antiglobulina humana, que são utilizados para os testes diretos e indiretos da antiglobulina (LAPIERRE *et al.*, 1989). A coluna de gel ainda permite a visualização clara de duas populações distintas de hemácias, como em pacientes recém transfundidos.

1.2.3 BIOLOGIA MOLECULAR

A biologia molecular ou genotipagem está sendo cada vez mais aplicada aos grupos sanguíneos pois fornece resultados seguros e precisos, especialmente nos casos em que não é possível a realização da fenotipagem, como em pacientes recém-transfundidos e pacientes com TDA positivo. Na genotipagem é possível determinar através do DNA do paciente, extraído de seus leucócitos de sangue periférico, o fenótipo eritrocitário deduzido, sem qualquer interferência do anticorpo que sensibiliza a hemácia ou de hemácias alogênicas transfundidas. Sua realização, no entanto, exige o treinamento de equipe especializada e capaz de interpretar os resultados em conjunto com os achados sorológicos (JUNIOR e OLIVATO, 2007).

Apesar de ser uma ferramenta de grande importância hoje na imuno-hematologia ainda está restrito aos grandes centros de hemoterapia, no Brasil poucos serviços públicos de saúde dispõem desse recurso e utilizam técnicas de genotipagem de grupos sanguíneos para atendimento a seus pacientes. Esta abordagem porém, vem sendo introduzida em algumas

instituições de reconhecida competência na hemoterapia, mas sua disponibilização deve tornar-se mais generalizada, através da formação de centros de referência para atendimento das diversas unidades de hemoterapia (MARTINS *et al.*, 2009). Dessa forma, muitas decisões transfusionais, especialmente em urgências, ainda devem ser tomadas sem o resultado da genotipagem eritrocitária.

1.3 TESTE DA ANTIGLOBULINA

Coombs, Mourant e Race descreveram em 1945, uma técnica com utilizando soro de coelho contendo antiglobulina humana (AGH) que posteriormente foi chamada de “soro de Coombs”. O método foi desenvolvido inicialmente para ampliar o efeito de aglutininas fracas do sistema Rh, anticorpos “incompletos”, que normalmente não apresentavam aglutinação visível. O teste foi concebido como um instrumento de investigação de doença hemolítica do recém-nascido e de reações transfusionais causadas por anticorpos Rh que estavam presentes no soro dos paciente, porém que não eram demonstráveis pelas técnicas até então existentes.

A maior parte dos anticorpos de significado clínico, assim como seus respectivos antígenos, foram descritos após o surgimento do “soro de Coombs” em 1945, sendo assim, o teste da antiglobulina representa até hoje a forma mais importante de aglutinação artificial em imunohematologia, permitindo revelar a presença de anticorpos na membrana da hemácia. A antiglobulina humana é constituída por anticorpo específico contra a porção Fc de outro anticorpo. Quando um anticorpo “incompleto” sensibiliza a hemácia, normalmente não provoca aglutinação visível. Após a adição da AGH ao meio, esta reconhece e se liga às porções Fc dos anticorpos que sensibilizam a hemácia, formando assim uma malha e provocando aglutinação visível (BARJAS-CASTRO, 2013).

Os reagentes de antiglobulina podem ser poliespecíficos ou monoespecíficos. Os poliespecíficos são uma mistura de anticorpos anti-IgG e anti-C3d (fração C3d do complemento). Os reagentes monoespecíficos podem ser anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-complemento, podendo ser anti-C3d e anti-C3b.

O teste da antiglobulina pode ser usado para detectar hemácias sensibilizadas com aloanticorpos IgG, autoanticorpos IgG e componentes do complemento. A sensibilização pode ocorrer “*in vivo*” ou “*in vitro*”. O uso do AGH para detectar a sensibilização “*in vitro*” tem dois estágios e é denominado teste indireto da antiglobulina. A sensibilização “*in vivo*” é detectada em procedimento de um único estagio chamado teste direto da antiglobulina (TDA).

Os testes direto e indireto são até hoje amplamente aplicados como princípio de inúmeros testes sorológicos em imuno-hematologia (GREEN e KLOSTERMANN, 2012).

1.3.1 TESTE DIRETO DA ANTIGLOBULINA

O teste direto da antiglobulina humana revela a presença de anticorpo e/ou fração do complemento ligados à superfície das hemácias. As sensibilização das hemácias, ocorrida “*in vivo*”, não é visualizada, mas após a adição da antiglobulina humana, ocorre a aglutinação que é visualizada macroscopicamente (Figura 1).

Figura 1 - Princípio da técnica direta da antiglobulina: Teste utilizado para demonstrar a sensibilização “*in vivo*” das hemácias. O sangue total é coletado do paciente em tubo contendo anticoagulante EDTA. Na técnica realizada em tubo, uma suspensão de hemácias 5% em solução de salina é preparada. Uma gota dessa suspensão é lavada 3 vezes com solução fisiológica para retirada de anticorpos que estão livres no plasma. Toda solução é retirada e adiciona-se o soro de Coombs (antiglobulina humana). O soro de Coombs reconhece os anticorpos que estão ligados à superfície das hemácias, fazendo com que ocorra aglutinação visível macroscopicamente.

Apesar de não ser um teste pré-transfusional obrigatório, o TDA é um dos testes mais importantes para investigar e classificar quadros hemolíticos como de origem imune ou não imune. O seu valor preditivo positivo em vigência de anemia hemolítica é de 83%, porém não havendo sinais de hemólise, seu valor preditivo é apenas 1,4%. É por esse motivo que a interpretação do TDA positivo deve levar em consideração a história clínica e os resultados dos outros exames laboratoriais. A realização do TDA é obrigatória na investigação

laboratorial de diversos quadros hemolíticos, entre eles a anemia hemolítica autoimune (AHAI), a reação hemolítica imune pós-transfusional, a síndrome do linfócito passageiro, a doença hemolítica perinatal e a hemólise droga-dependente (LEGER, 2011).

Resultados de TDA positivos foram também observados em indivíduos com níveis séricos elevados de IgG ou complemento, sem evidência de anemia hemolítica imune, como em pacientes com doença falciforme, talassemia, doença renal crônica, mieloma múltiplo, doenças autoimunes e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Além disso, pequenas quantidades de IgG (5 a 90 moléculas por hemácia) e complemento (5 a 40 moléculas por hemácia) podem estar presentes nas hemácias de indivíduos saudáveis, sem associação com redução na sobrevida das mesmas. A positividade do TDA depende da população estudada e pode variar de 0,1% entre doadores de sangue sem qualquer sinal clínico de hemólise, até 15% em pacientes hospitalizados (CASTILHO, JUNIOR e REID, 2015; LEGER, 2011).

Indivíduos que apresentam TDA positivo, seja às custas de IgG e/ou complemento, com ou sem sinais clínicos de hemólise, terão a fenotipagem eritrocitária prejudicada. A fenotipagem de indivíduos com TDA positivo, especialmente quando utilizado o teste indireto da antiglobulina, pode acarretar resultados falsos positivos e levar a seleção de fenótipo incorreto para transfusão.

1.3.2 TESTE INDIRETO DA ANTIGLOBULINA

O teste indireto da antiglobulina (TIA) é utilizado para revelar a sensibilização “*in vitro*” das hemácias e é aplicado a diversos testes sorológicos em imunohematologia, entre eles a pesquisa de anticorpos, identificação de anticorpos, testes de compatibilidade, fenotipagem eritrocitária e titulação de anticorpos. Na técnica indireta a hemácia que contém o antígeno é colocada em contato “*in vitro*” com o anticorpo, que se liga mas não promove a aglutinação visível. A adição da AGH forma uma malha entre os anticorpos que sensibilizam as hemácias e provoca a aglutinação macroscópica (figura 2).

Caso a amostra de hemácia estudada seja previamente sensibilizada, resultados falsos positivos podem ser obtidos no TIA, já que a AGH reagirá com a molécula que sensibilizava anteriormente a hemácia, mesmo se o anticorpo específico não tiver se ligado ao antígeno correspondente.

1.3.3 CONDIÇÕES CLÍNICAS COM TDA POSITIVO

O TDA positivo deve ser interpretado cuidadosamente, sempre em conjunto com o quadro clínico do paciente. A positividade isolada do TDA não significa hemólise. A interpretação do teste positivo requer o conhecimento do diagnóstico do paciente, da presença de sinais e sintomas sugestivos de hemólise, assim como de seu histórico transfusional, gestacional e de informações sobre o uso recente de medicações (LEGER, 2011).

Figura 2 – Princípio do teste indireto da antiglobulina. O TIA pode ser utilizado na pesquisa de anticorpos de especificidades desconhecidas livres no soro/plasma, como é o caso da pesquisa e identificação de anticorpos irregulares. Ele é também utilizado para determinar a presença de antígenos na membrana da hemácia quando são empregados soros de especificidades conhecidas da classe IgG. No primeiro caso o soro/plasma-contendo o anticorpo desconhecido é colocado em contato com hemácias cujo perfil antigênico é conhecido. No segundo caso, utiliza-se soro de especificidade conhecida da classe IgG para determinar a presença ou ausência de um antígeno na membrana. O anticorpo encontra o antígeno correspondente e ocorre a ligação do anticorpo à hemácia, mas não ocorre aglutinação. Após a adição da AGH, que se liga aos anticorpos formando uma malha, ocorre a aglutinação visível.

O TDA positivo é um achado clássico de algumas condições clínicas como a reação transfusional hemolítica, a doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN), a anemia hemolítica induzida por drogas, a síndrome do linfócito passageiro e a anemia hemolítica autoimune (AHAI). Portanto, o TDA positivo pode ser decorrente da sensibilização da hemácia autóloga por um autoanticorpo, ou por um aloanticorpo ligado à hemácia alogênica circulante. A positividade do TDA pode ainda ocorrer de forma passiva em pacientes que

recebem imunoglobulinas humanas ou ainda pela transfusão de plaquetas ABO não idêntico (LEGER, 2011; RALPH, 2012; ZANTEK *et al.*, 2012).

Nas reações transfusionais hemolíticas imunes o aloanticorpo do receptor sensibiliza as hemácias transfundidas do doador e reduz sua sobrevivência ao removê-la precocemente da circulação pela fagocitose no sistema retículo-endotelial ou pela hemólise intravascular. As reações podem ser agudas, se ocorrem até 24 horas, ou tardias, quando ocorrem após 24 horas da transfusão. A gravidade das reações hemolíticas pode variar de um simples rendimento transfusional inadequado à quadros graves de hemólise intravascular, evoluindo até mesmo com choque vascular e óbito. O TDA pode resultar negativo caso toda massa eritrocitária transfundida tenha sido destruída (LEGER, 2011; ZANTEK *et al.*, 2012).

Na doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN) anticorpos maternos da classe IgG atravessam a barreira placentária e sensibilizam as hemácias fetais, que serão destruídas precocemente levando à anemia fetal. Apesar da incompatibilidade ABO feto-materna ser a causa mais frequente de DHFRN, raramente ela é responsável pela ocorrência de quadros graves. Por outro lado, anticorpos contra antígenos do sistema Rh e Kell, especialmente Anti-D (Anti-RH1), Anti-c (Anti-RH4) e Anti-Kell (Anti-KELL1) são conhecidos por causar DHFRN severa. Raramente outros anticorpos também podem estar implicados na DHFRN como os anticorpos contra antígenos do sistema Kidd, Duffy, MNS e Diego (ZANTEK *et al.*, 2012)

A hemólise droga-dependente é causada pela produção de um anticorpo voltado contra a droga ligada à membrana eritrocitária, ou ainda, contra o complexo droga-membrana. A classe de medicações mais comumente envolvida é a dos antimicrobianos betalactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), mas outras classes como quimioterápicos e anti-inflamatórios também são descritos (LEGER, 2011; ZANTEK *et al.*, 2012).

Após transplante de células progenitoras hematopoiéticas em que o doador possui anticorpos contra antígenos eritrocitários do receptor, o linfócito de memória do doador pode resistir ao esquema imunossupressor utilizado e continuar a produção de anticorpos que reconhecem a hemácia incompatível do receptor ainda circulante. O quadro clínico pode variar de um simples TDA positivo, sem outros sinais ou sintomas, até um quadro hemolítico grave e abrupto (LEGER, 2011).

1.3.4 ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOIMUNE

A anemia hemolítica autoimune é caracterizada pela destruição precoce das hemácias autólogas por autoanticorpos que sensibilizam as hemácias e levam à fagocitose pelos macrófagos no sistema reticulo-endotelial ou hemólise intravascular. O diagnóstico da AHAI baseia-se na presença de hemólise clínica associada à evidência de fator imune, representado pelo TDA positivo. As classes de anticorpos envolvidas em quadros de AHAI são IgG, IgM e raramente IgA (LEGER, 2011; ZANTEK *et al*, 2012). São raros os casos de AHAI com TDA negativo, que podem estar relacionados a um autoanticorpo de baixa avidéz, de densidade inferior à detecção do método, ou ainda de classe de imunoglobulina não avaliada pelo método utilizado para o teste (GARRATY, 2005).

A AHAI pode ser classificada em dois grupos principais de acordo com a melhor temperatura de reação do autoanticorpo. As anemias hemolíticas causadas por anticorpos quentes, que reagem melhor a 37°C e geralmente IgG, representam 80% dos casos de AHAI. Nas AHAI por anticorpo quente o TDA pode ser positivo para IgG mais complemento (67%), somente IgG (20%), ou somente por complemento (13%). As anemias causadas por anticorpos frios, geralmente da classe IgM e que reagem melhor em temperatura ambiente ou a 4°C, representam aproximadamente 20% dos casos de AHAI. Por exibirem amplitude térmica, esses anticorpos ligam-se às hemácias ao atingirem a circulação nas extremidades do corpo, fixam o complemento e desprendem-se da hemácia após retornar para partes mais quentes. Por esse motivo, em AHAI por anticorpos frios, o TDA é positivo apenas às custas de C3 e normalmente o IgM não é detectado. (LEGER, 2011; ZANTEK *et al*, 2012).

A presença do autoanticorpo IgG pode ser confirmada através da eluição do anticorpo da hemácia. Tipicamente o eluato na AHAI por anticorpo quente reage com todas as células testadas de um painel de hemácias alogênicas do tipo “O” ou pode, eventualmente, exibir uma especificidade conhecida, como Anti-e (Anti-RH5). Nas AHAI a frio por sua vez, espera-se um eluato negativo (LEGER, 2011).

Os autoanticorpos são com frequência encontrados livres no plasma e não somente ligados às hemácias autólogas. Eles podem interferir em todas as fases dos testes pré-transfusionais nas quais o plasma é testado, especialmente os autoanticorpos quentes, que acarretam resultados positivos em todos os testes levados à fase de antiglobulina humana. Esses anticorpos, portanto, positivam a pesquisa de anticorpos irregulares e mascaram a presença de aloanticorpos de significado clínico. Aproximadamente 60% dos pacientes que apresentam AHAI a quente apresentam anticorpos que reagem em meio salino, mas se forem

levados em conta métodos mais sensíveis, como PEG, enzima e estudo em gel, a positividade pode ser superior a 90% (LEGER, 2011).

Além da eficácia da transfusão ser comprometida pela diminuição da vida-média das hemácias, a presença do autoanticorpo dificulta a realização dos testes pré-transfusionais e compromete a segurança transfusional. Os autoanticorpos reagem normalmente como panaglutininas, pois são normalmente voltados contra antígenos públicos, na maior parte das vezes contra antígenos do sistema Rh. Por apresentarem essas características, podem ainda mascarar a presença de aloanticorpos de significado clínico e levar a testes de compatibilidade positivos, exigindo uma avaliação criteriosa da necessidade da transfusão (BRANCH e PETZ, 1999; JUNIOR e OLIVATO, 2004).

Remover a interferência do autoanticorpo para avaliar a presença de aloanticorpos mascarados nem sempre é possível, mesmo utilizando técnicas de autoadsorção ou aloadsorção, que, além de tudo, são demoradas e exigem de 2 a 6 horas para conclusão (GARRATY e GEORGE, 2002). Nesses casos, a fenotipagem eritrocitária do paciente é de extrema utilidade, especialmente em situações de urgência. A definição do fenótipo do paciente para os antígenos de maior importância clínica pode auxiliar a seleção de unidades de hemácias com mesmo fenótipo, o que garante que eventuais aloanticorpos não identificados sejam respeitados e também evita nova sensibilização (JUNIOR e OLIVATO, 2004; SHIREY *et al*, 2002).

1.3.5 TRATAMENTO DE HEMÁCIAS COM TDA POSITIVO

O TDA positivo impede a fenotipagem eritrocitária por métodos que exigem a fase de AGH, uma vez que a aglutinação ocorrerá devido à interação da AGH com o autoanticorpo que sensibiliza a hemácia do paciente, levando a resultados falso positivos. Em algumas situações, como na AHAI por anticorpo quente, a fenotipagem é especialmente importante, pois o autoanticorpo interfere na triagem e identificação de anticorpos, assim como no teste de compatibilidade, e dificultam a detecção de aloanticorpos de significado clínico que obrigatoriamente devem ser respeitados. Nessas situações, a fenotipagem eritrocitária determina o perfil antigênico do paciente e possibilita o fornecimento de unidades de hemácias com o mesmo fenótipo para a transfusão, evitando a sensibilização para novos antígenos, assim como reações hemolíticas transfusionais. No entanto, é necessário aplicar métodos que não sofram interferência do TDA positivo, ou seja, métodos que não necessitem da fase de AGH ou métodos de bloqueio do anticorpo sem bloquear o antígeno. Uma opção é a utilização de soros monoclonais IgM (salinos ou de meio proteico não concentrado), mas

nem sempre esses reagentes estão disponíveis especialmente os reagentes monoclonais para os antígenos dos sistemas Duffy (Fy^a, Fy^b) , Kidd (Jk^a, Jk^b) e MNS (S, s) (JUNIOR e OLIVATO, 2004). Outra opção é a técnica de bloqueio que pode ser utilizada para tratar hemácias para posterior fenotipagem em casos de TDA positivos com reatividade $\leq 2+$.

Em casos onde a positividade do TDA é maior que 2+, está indicada a tratamento químico para remoção da interferência do autoanticorpo antes de realizar a fenotipagem. Entre as técnicas utilizadas atualmente estão o ZZAP, a cloroquina e a glicina ácida/EDTA.

1.3.5.1 TÉCNICA DE BLOQUEIO

A técnica de bloqueio se baseia na utilização de anti-IgG (Coombs monoespecífico) para tratar as hemácias com TDA positivo. O anticorpo anti-IgG se liga aos anticorpos que estão sensibilizando a hemácias, porém sem o bloquear os antígenos. Os antígenos que não estão sensibilizados podem ser detectados através dos antissoros específicos (SERERAT, VEIDT E DUTCHED, 2000).

1.3.5.2 TRATAMENTO DE HEMÁCIAS COM ZZAP

O *Sulphydryl-Proteolytic Enzyme* (ZZAP) que é uma mistura de ditioneitol (DTT) mais papaína ativada com cisteína, é um reagente capaz de dissociar imunoglobulinas da classe IgG ligadas a membrana dos eritrócitos, enquanto trata enzimaticamente as hemácias. O tratamento enzimático também potencializa a ligação do autoanticorpo ao antígeno e acelera o processo de autoadsorção. O ZZAP pode desnaturar os antígenos do sistema Duffy, MNS e Kell, o que limita sua aplicação para fins de fenotipagem (BRANCH e PETZ, 1982).

1.3.5.3 CLOROQUINA

Em 1982 Edwards, Moulds e Judd propuseram a utilização da técnica da cloroquina que dissociava os complexos antígeno-anticorpo e mantinha a membrana das hemácias íntegras. Os derivados quinolênicos já haviam sido descritos anteriormente por Domokos e Aszody em 1964 e Holtz, Mantel e Buck em 1973 (*apud* Edwards, Moulds e Judd, 1982) pela sua capacidade de separar imunocomplexos e inibir as reação antígeno-anticorpo, reduzindo as cargas elétricas das superfícies das hemácias. A técnica é uma das mais utilizadas nos centros brasileiros para remover a interferência do autoanticorpo e é também a técnica atualmente adotada pelo laboratório de imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Edwards, Moulds e Judd (1982) demonstraram que a técnica da cloroquina para dissociação de anticorpos é uma técnica simples, efetiva e confiável para dissociar imunoglobulina das hemácias. Desde que a membrana das hemácias permaneça intacta, não há perda da reatividade dos antígenos e a sua maior aplicação é a fenotipagem de hemácias com TDA positivo. Os autores verificaram que em 83% das amostras sensibilizadas *in vivo* e 22 amostras (no total de 40) sensibilizadas “*in vitro*” apresentaram TDA negativo e puderam ser fenotipadas. A técnica porém, não consegue remover os componentes do complemento na maioria dos casos

Champagne e colaboradores (1999) testaram a técnica da cloroquina para dissociar antígenos Bg comparando com a técnica da glicina-ácida/EDTA e verificaram vantagem em relação ao uso de um único reagente diminuindo a manipulação e verificou que o mesmo não destrói antígeno Kell.

A cloroquina também mostrou-se pouco efetivo em remover anticorpos do sistema Duffy da superfície das hemácias (EDWARDS, MOUDS e JUDD, 1982; ROZIERIS e SQUALI, 1997).

1.3.5.3 GLICINA-ÁCIDA/EDTA

A afinidade e a estabilidade entre a ligação antígeno-anticorpo é definida como a resultante entre forças atrativas e repulsivas entre ambos (CARUCIO e WISE, 2012) e resulta da somatória de forças químicas dinâmicas e fracas (não covalentes) como pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, força de Van der Waals e pontes hidrofóbicas. A estabilidade dessa ligação é facilmente abalada por alterações químicas e físicas no meio da reação, como a alteração do pH. A técnica da glicina-ácida/EDTA se baseia na mudança do pH para a quebra da ligação antígeno-anticorpo (KOSANKE, 2012).

A técnica da glicina-ácida/EDTA foi primeiramente descrita em 1986 por Louie, Jieng e Zeroulis que utilizaram 50 amostras de doadores sensibilizados “*in vitro*” com anticorpos. A técnica foi efetiva em 48 amostras permitindo o estudo do eluato, assim como a fenotipagem das hemácias. Os autores testaram também a técnica em 100 hemácias TDA positivo, que puderam ser utilizadas para técnicas de autoadsorção.

Byrne (1991) descreveu a técnica da glicina-ácida/EDTA modificada e também verificou como uma opção para o tratamento de hemácias com TDA positivo que deixava as hemácias intactas e o eluato viável para ser fenotipado.

Roziers e Squali (1997) e Katharia e Chaudhary (2013) compararam a técnica da glicina-ácida/EDTA com as técnicas da cloroquina e do aquecimento. Verificaram maior eficiência da glicina-ácida/EDTA em relação as outras duas técnicas, pois com uma mesma quantidade de amostra, produzia as hemácias livres de anticorpo e também o eluato. Mostrou-se ainda superior devido ao menor tempo exigido para sua realização, o que favorece seu uso em situações de urgência e emergência.

As duas desvantagens da técnica, porém, é o fato de destruir os antígenos do sistema Kell e o fato de não remover frações do complemento ligadas à hemácia (PALLAS, WILER e McGEE, 1991; ROZIERES e SQUALLI, 1997; CHAMPAGNE *et al*, 1999; KOSANKE, 2012 e KATHARIA e CHAUNDHARY, 2013)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

2.1.1 Avaliar a eficácia da glicina-ácida/EDTA em remover os anticorpos ligados às hemácias sensibilizadas por anticorpos da classe IgG.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Preparação dos reagentes utilizados na técnica da glicina-ácida/EDTA, verificação da estabilidade dos mesmos e avaliar custos.

2.2.2 Testar a técnica da glicina-ácida/EDTA em amostras de hemácias sensibilizadas por anticorpos antieritrocitários humanos.

2.2.3 Comparar a efetividade da técnica da glicina-ácida/EDTA com a técnica da cloroquina quanto a capacidade de remover a interferência do anticorpo ligado a hemácia.

2.2.4 Testar o eluato das amostras tratadas com glicina-ácida/EDTA

2.2.5 Verificar se houve destruição dos antígenos eritrocitários após o tratamento com glicina-ácida/EDTA e com cloroquina

2.2.6 Verificar se o tempo de execução da técnica da glicina-ácida/EDTA descrito nos textos de referência é reprodutível

3 JUSTIFICATIVA

Algumas condições clínicas podem levar ao depósito “*in vivo*” de anticorpos e/ou frações do complemento sobre as hemácias. Entre elas estão as reações hemolíticas pós-transfusionais, a doença hemolítica perinatal, o uso de medicamentos e principalmente a AHAI. Na AHAI, um anticorpo, normalmente da classe IgG ou IgM, reconhece antígenos próprios na membrana eritrocitária e reduz a sobrevivência da hemácia, levando a sua destruição pelos macrófagos no sistema reticulo-endotelial ou à ativação do complexo de ataque à membrana e à lise intravascular. Os autoanticorpos são voltados na maioria das vezes contra antígenos eritrocitários de alta frequência populacional, conhecidos como antígenos públicos, e por este motivo reconhecem tanto hemácias autólogas quanto alogênicas.

Devido à presença do autoanticorpo livre no plasma e também do anticorpo e/ou complemento ligado à hemácia, o banco de sangue pode encontrar dificuldades em todas as fases dos testes pré-transfusionais do paciente com AHAI e deve utilizar técnicas que auxiliem na escolha do melhor hemocomponente melhorando a segurança transfusional. Essas técnicas visam remover a interferência do autoanticorpo livre no soro e do autoanticorpo ligado à hemácia, permitindo a detecção de aloanticorpos associados e a realização da fenotipagem eritrocitária, respectivamente.

A finalização dos testes pré-transfusionais na presença de autoanticorpo pode levar algumas horas e nem sempre o paciente poderá aguardar. Nesse contexto, torna-se vantajosa a aplicação de técnicas de rápida execução.

O presente estudo propõe aplicar e avaliar a eficácia da técnica da glicina-ácida/EDTA em remover os anticorpos ligados à hemácia, o que permite a fenotipagem eritrocitária estendida e a seleção de concentrados de hemácias com mesmo fenótipo do paciente.

Atualmente, no Hemocentro de Ribeirão Preto, a técnica utilizada para esse fim é o tratamento das hemácias com difosfato de cloroquina, cujo tempo de execução pode demorar até duas horas, enquanto a técnica da glicina-ácida/EDTA pode ser realizada em apenas dois minutos, o que a tornaria opção de escolha especialmente em situações de urgência. Ao contrário da cloroquina, a glicina-ácida/EDTA permite também o estudo do eluato das hemácias tratadas.

4 METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS DE DOADORES

Foram coletados 50 amostras de doadores de sangue que compareceram ao Hemonúcleo de Araçatuba no período de junho a agosto de 2016. Foram convidados a participar da pesquisa doadores de repetição do tipo sanguíneo “O”, RhD positivo, cadastrados no sistema de banco de sangue (SBS) do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Todos os doadores que concordaram em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

No momento da doação foram coletados adicionalmente 5 mL de sangue total em solução anticoagulante EDTA (ácido dietilenoaminoacético), dispensando punção venosa adicional para coleta da amostra. O fluxograma 1 resume as etapas desenvolvidas no projeto.

Fluxograma 1 - Fluxo da pesquisa utilizando as amostras de doadores.

4.1.1 FENOTIPAGEM

Foram verificados se os doadores já tinham fenotipagem para outros sistemas de grupos sanguíneos além do sistema ABO/Rh que é realizado rotineiramente.

A fenotipagem eritrocitária para outros sistemas ou fenotipagem estendida é realizada para identificar a presença ou ausência de antígenos considerados de importância clínica. No Hemonúcleo de Araçatuba uma parcela de doadores de repetição são fenotipados para os antígenos dos sistemas de grupo sanguíneo Rh (antígenos C, c, E e e), Kell (antígeno K), Duffy (antígenos Fy^a e Fy^b), Kidd (antígenos Jk^a e Jk^b) e sistema MNSs (antígenos S e s).

A fenotipagem para o Rh e Kell é realizada por metodologia de microplaca utilizando 25 µL de hemácia lavada e diluída a 5% em salina e 25 µL do antissoro comercial específico. A reação é incubada 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas para leitura. Para os antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s a metodologia utilizado é gel contendo antiglobulina humana (gel Liss/Coombs poliespecífico) da marca BIO-RAD onde se utiliza suspensão de hemácia em LISS (Solução de baixa força iônica). A suspensão é preparada através da diluição de 10 µL de hemácia em 1000 µL de LISS. Pipetado 50 µL dessa diluição no gel e adicionado 25 µL do antissoro específico. Incuba-se em banho seco por 15 minutos a 37 ° Celsius e é centrifugado em centrífuga específica. Os antissoros utilizados eram das marcas Fresenius e Lorne.

Foi verificado a fenotipagem do doador no banco de dados do Hemocentro. Os registros dos fenótipos dos doadores ficam armazenadas no sistema de banco de sangue (SBS). Para doadores que não tinham fenotipagem estendida prévia para antígenos do sistema Rh (C, c, E e e) e Kell (K), foi realizada a fenotipagem para esses antígenos.

O tratamento das hemácias com glicina-ácida/EDTA e cloroquina para dissociar anticorpos pode inativar, enfraquecer ou destruir os antígenos presentes nas hemácias alterando assim os resultados da fenotipagem. Para verificar se houve destruição dos antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a e Jk^b, S e s, nas amostras que tiveram o TDA negativado após tratamento foram novamente fenotipadas ao final para os antígenos que eram inicialmente positivas.

A repetição da fenotipagem foi realizada nas amostras que apresentaram efetividade no tratamento da técnica da glicina-ácida/EDTA e/ou da cloroquina e a detecção do antígeno na amostra pré-tratamento.

4.1.2 SENSIBILIZAÇÃO DAS HEMÁCIAS

As hemácias foram sensibilizadas com antissoros policlonais humanos de amostras de plasma fresco congelado de doadores com resultado de pesquisa de anticorpo irregular positivos.

A escolha do anticorpo para sensibilizar as hemácias foi definida de acordo com o fenótipo do doador que deveria ser positivo para o respectivo antígeno.

Para a sensibilização, um volume de antissoro (1 mL) e um volume (1 mL) de hemácias lavadas quatro vezes com solução fisiológica foram adicionadas a um tubo de 12 x 75 mm. A mistura foi homogeneizada e incubada em banho maria (BM) a 37° C por 60 minutos. A seguir, as hemácias foram novamente lavadas 4 vezes com solução fisiológica para retirada dos anticorpos que não se ligaram. A solução da última lavagem foi testada como controle negativo. O teste da última lavagem é importante para assegurar que os anticorpos que poderão ser detectados no eluato após o tratamento com a glicina-ácida/EDTA sejam aqueles que estavam ligados às hemácias e não aqueles livres no plasma. O controle negativo mostra que todo o anticorpo livre foi retirado (LEGER, 2011).

Para o teste de presença de anticorpo na solução da última lavagem foram incubadas com hemácias de triagem de anticorpos irregulares (ID-Diacell BIO-RAD) contendo os antígenos específicos. Realizado a técnica em gel Liss/Coombs com anti-IgG+C3d. Incubado no tempo de 15 minutos a temperatura de 37° C e centrifugado 10 minutos em centrífuga própria.

As 50 amostras de doadores foram sensibilizadas com os anticorpos policlonais humanos.

Após sensibilizadas "*in vitro*" e lavadas, as hemácias foram diluídas em solução de baixa força iônica (LISS) na quantidade de 10 µL de hemácia para 1000 µL de solução. A suspensão foi pipetada (50 µL) em coluna-gel-teste Liss/Coombs (BIO-RAD) que contém antiglobulina poliespecífico (IgG+C3d) e centrifugada em baixa rotação conforme orientação do fabricante, durante 10 minutos.

As amostras deveriam apresentar aglutinação com reatividade 3 a 4+ no TDA. As amostras que apresentaram reação menor que 3+ foram novamente sensibilizadas com nova alíquota do antissoro.

4.1.3 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras sensibilizadas apresentando o TDA positivo 3 ou 4+ foram divididas em duas alíquotas e submetidas a duas técnicas diferentes com o objetivo de dissociar o anticorpo ligado. Uma alíquota da amostra foi tratada com solução de difosfato de cloroquina, enquanto a outra alíquota foi tratada com glicina-ácida/EDTA.

4.2 PREPARO DA GLICINA ÁCIDA-EDTA

A técnica da glicina-ácida/EDTA utiliza 3 soluções diferentes: a glicina ácida, o EDTA e o tampão TRIS.

Os reagentes foram preparados utilizando os sais para análise (PA) de EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), TRIS ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Glicina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$), NaCl e a solução de ácido clorídrico (HCl) 12 N, todos reagentes da marca SYNTH (quadro 1).

Para o preparo do tampão glicina-ácida é necessário o ajuste do pH para 1,5. Para esse ajuste utiliza-se ácido clorídrico (HCl) concentrado. O pH foi medido com fitas reativas de pH com escala de 1 a 14 da marca MERCK. Posteriormente, a solução foi enviada ao laboratório de controle de qualidade do Hemocentro de Ribeirão Preto, e o pH medido no peagâmetro. O tampão glicina-ácida foi armazenado a 4° e o tampão tris e o EDTA em temperatura ambiente controlada (20 a 24° Celsius).

Após o preparo e durante a realização dos testes foram feitas inspeções visuais para verificação de turvação do meio e presença de precipitados.

Reagente	Material	Quantidade	Preparo e Conservação
EDTA	EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	5 gramas	Mistura até dissolução do sal e conserva em temperatura ambiente
	Água Destilada	50 ml	
Tris	TRIS ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	12.1 gramas	Conservar em temperatura ambiente
	NaCl	5,25g	
	Água destilada	100ml	
Glícina-ácida	Glicina ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$)	1,5 gramas	Conservar a 4°C
	NaCl	1,16gramas	
	Água Destilada	200ml	
	HCL 12N	Ajustar o pH para 1,5	

Quadro 1 - Preparo dos Reagentes da técnica da glicina-ácida/EDTA
Fonte - Manual técnico AABB, 2011.

O tampão glicina-ácida e o tampão TRIS são estáveis por 7 meses. O reagente EDTA precipitou mesmo estando em temperatura em ambiente controlado. Houve necessidade de preparo de novo reagente.

4.2.1 TÉCNICA DA GLICINA-ÁCIDA/EDTA

1. Em um tubo de ensaio 12x75 mm é adicionado 0,8 mL da solução de glicina-ácida. A esta solução adiciona-se 0,2 mL de EDTA e mistura.
2. Adiciona-se 0,2 mL de hemácias sensibilizadas (lavada 4 vezes). A mistura é homogeneizada e incubada por exatamente 2 minutos.
3. A seguir, 0,1 mL de tampão TRIS é adicionado à mistura que é novamente homogeneizada e centrifugada por 2 minutos a 3400 rpm. O pH deve estar entre 7 a 7,5.
4. Após centrifugação, separa-se em outro tubo o sobrenadante (eluato), e as hemácias que permanecem são lavadas 4 vezes com solução fisiológica para retirada de todo o reagente e anticorpos livres

4.3 PREPARO DA CLOROQUINA

A cloroquina é diluída em tampão PBS na concentração de 20% (Quadro 2) e armazenado a 4° Celsius, sua validade após o preparo é de 1 mês.

A técnica da cloroquina já está padronizada para rotina do laboratório de imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto e suas unidades.

Reagente	Reagentes	Quantidade	Preparo/Conservação
Cloroquina	Difosfato de cloroquina ($C_{18}H_{32}ClN_3O_8P_2$)	20 gramas	Conservar a 4° Celsius
	Tampão PBS	100ml	
	NaOH 0,1 N	Acertar o pH para 5,1	

Quadro 2 - Preparo da Cloroquina

Fonte - Manual técnico da AABB, 2011

4.3.1 TÉCNICA DA CLOROQUINA

1. 4 partes da solução pronta é adicionada a uma parte de hemácias lavadas 4 vezes com solução fisiológica
2. A mistura é incubada em temperatura ambiente por até duas horas.
3. Centrifugar a 3400 rpm por 2 minutos.

4. Remover o sobrenadante, lavar as hemácias novamente com solução fisiológica 4 vezes.

4.4 VERIFICAÇÃO DA EFETIVIDADE DOS TESTES

Após tratamento pelas duas técnicas, o TDA foi repetido em todas as amostras para verificar se os tratamentos foram efetivos e houve a dissociação do anticorpo. Para as amostras tratadas pela técnica da glicina-ácida/EDTA que permaneceram com TDA positivo, novo tratamento foi realizado.

4.5 TESTE DO ELUATO

O eluato resultante das amostras tratadas com glicina-ácida/EDTA foi testado com hemácias de triagem. A solução do eluato foi incubada com as hemácias de triagem de anticorpos (ID-Diacell BIO-RAD) pela técnica em gel Liss/Coombs. O teste foi incubado 15 minutos a 37° Celsius e centrifugado por 10 minutos em centrífuga própria para a técnica em gel. Os eluatos que apresentaram resultados positivos foram testados em painel de 11 hemácias (ID-Diapanel BIO-RAD) para a identificação do anticorpo.

4.6 AMOSTRA DE PACIENTE

Foi incluída uma amostra de paciente que apresentou TDA positivo por IgG e pesquisa de anticorpo irregular positivo com presença de autoanticorpo com reatividade panaglutinina. A amostra foi tratada em paralelo pelas duas técnicas descritas e foi enviada para o Hemocentro para genotipagem eritrocitária, que foi realizado por metodologia PCR em tempo real no equipamento *Real-time system PCR 7500* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) .

5 RESULTADOS

5.1 REAGENTES

Para aplicação da técnica da glicina-ácida/EDTA são necessários 3 diferentes reagentes que podem ser encontrados em forma de kit pronto para uso. No entanto esses kits não estão disponíveis no Brasil. Os reagentes são: tampão glicina-ácida, o EDTA e o tampão Tris.

Todos os reagentes foram preparados "*in house*" a partir dos sais e soluções PA (puro para análise) da marca SYNTH que foram adquiridos para a pesquisa. O custo estimado para cada teste foi aproximadamente R\$ 0,20 reais.

Após o preparo os reagentes poderiam ser armazenados em condições adequadas pelo período de 1 ano (AABB, 2011). Ao final do preparo e durante o período de armazenamento, de fevereiro a setembro de 2016, foi realizada inspeção visual para verificar a presença de precipitados ou turvação. A solução de glicina e o tampão TRIS mostraram-se estáveis até o final do período. Por sua vez, o reagente EDTA precipitou, mesmo estando armazenado em temperatura ambiente controlada, e foi necessário novo preparo.

5.2 AMOSTRAS DE DOADORES

5.2.1 SENSIBILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após incubação da hemácia com o antissoro, a mesma foi lavada 4 vezes para retirada dos anticorpos livres. A solução da última lavagem foi testada. Caso houvesse positividade na solução da última lavagem, a etapa era repetida (figura 3). Das 50 amostras sensibilizadas, a última lavagem foi positiva somente em 3 delas. Nas 3 amostras o anticorpo utilizado para sensibilização foi o anti-K. Após repetido nova etapa de lavagem os resultados se apresentaram negativos.

Em todas as amostras sensibilizadas "*in vitro*" o TDA foi testado e verificado a intensidade do teste. Entre as 50 amostras, 47 alcançaram TDA com intensidade 3-4+ após a primeira sensibilização, enquanto 3 amostras necessitaram uma segunda incubação com anticorpo (figura 4).

A escolha dos anticorpos para sensibilizar as hemácias foi feita de acordo com o fenótipo do doador e foram utilizados sete diferentes especificidades de anticorpos policlonais humanos conforme mostra o gráfico 1.

Figura 3 - Solução da última lavagem. A solução da última lavagem foi testada com hemácia de triagem de anticorpos em gel Liss/Coombs (BIO-RAD). A finalidade é verificar a presença de anticorpos livres na suspensão que possam interferir na pesquisa do eluato. As soluções de lavagem das amostras na figura a tiveram resultados negativos. Na figura b duas amostras a 47 e 50 apresentaram resultado positivo. Nova etapa de lavagem foi realizada e o resultado final foi negativo.

5.2.2 TRATAMENTO DAS HEMÁCIAS

Após a sensibilização e obtenção de resultados de TDA com intensidade de 3 a 4+, cada uma das amostras foi dividida em duas alíquotas e tratada separadamente pelas técnicas de glicina/ácida-EDTA e cloroquina.

As técnicas foram consideradas efetivas quando obteve-se a completa dissociação do anticorpo, verificada através do TDA negativo na amostra pós tratamento, conforme figuras 5 e 6. Dentre as amostras tratadas com cloroquina, 28/50 tiveram o TDA negativado. A glicina-ácida/EDTA negativou o TDA em 33 das 50 amostras tratadas. Apenas 17 amostras tratadas com glicina-ácida/EDTA permaneceram com o TDA positivo e foram submetidas a um novo tratamento.

Gráfico 1- Número de amostras sensibilizadas por especificidade de anticorpo: Entre as 50 amostras, 12 foram sensibilizadas com anti-D, 10 com anti-C, 9 com anti-E, 8 com anti-c, 7 com anti-S, 3 com anti-K e 1 com anti-Di^a. As especificidades dos anticorpos foram definidas de acordo o fenótipo do doador.

Figura 5 – Resultados do TDA após o tratamento das hemácias com cloroquina: Nas amostras onde houve a dissociação do anticorpo (2, 21 a 23, 26, 39 a 42, 45, 46 e 49) a hemácia se deposita no fundo no microtubo após a centrifugação (TDA negativo) . As amostras em que a dissociação não foi efetiva (1, 3, 24, 25, 43, 44, 47, 48 e 50), o anticorpo ligado às hemácias é alvo da AGH presente no gel (TDA positivo).

Figura 6 – Resultados do TDA após o tratamento das hemácias com glicina-ácida/EDTA. Nas amostras onde houve a dissociação do anticorpo (4, 6, 7, 12 a 15, 17, 34, 35 37 e 38) a hemácia se deposita no fundo do microtubo após a centrifugação (TDA negativo) . As amostras em que a dissociação não foi efetiva (5, 16, 18, 19, 20, 33 e 36), o AGH presente no gel se liga ao anticorpo ligado às hemácias, que ficam retidas no gel (TDA positivo).

Tabela 1-Resultado geral do tratamento das hemácias com glicina e cloroquina

Técnica utilizada	TDA negativo	TDA positivo	Total
Glicina-ácida/EDTA	33	17	50
Cloroquina	28	22	50

A glicina-ácida/EDTA conseguiu negatizar mais amostras sensibilizadas com Anti-D e anti-K que a cloroquina. Para as hemácias sensibilizadas com anti-E, Anti-S e Anti-Di^a ambas as técnicas dissociaram o anticorpo em 100% das amostras. Os resultados, detalhados por especificidade do anticorpo, após o primeiro tratamento com glicina-ácida/EDTA e com cloroquina, estão na tabela 2.

Para as amostras que permaneceram positivas (17 amostras) após o tratamento com a glicina-ácida/EDTA foi realizado um novo tratamento. Houve dissociação do anticorpo em 3 amostras (18%) após a segunda tentativa. Nas demais 14 (82%) amostras tratadas pela segunda vez, 3 (18%) permaneceram positivas e 11 (65%) sofreram hemólise.

Tabela 2 - Resultados do TDA após tratamento das hemácias sensibilizadas, por anticorpo sensibilizado

ANTICORPOS SENSIBILIZADOS	1º TRATAMENTO COM GLICINA		TRATAMENTO COM CLOROQUINA		TOTAL
	TDA NEGATIVO	TDA POSITIVO	TDA NEGATIVO	TDA POSITIVO	
Anti-D	8	4	0	12	12
Anti-C	6	4	10	0	10
Anti-E	9	0	9	0	9
Anti-c	0	8	1	7	8
Anti-S	7	0	7	0	7
Anti-K	2	1	0	3	3
Anti-Di ^a	1	0	1	0	1
TOTAL	33	17	28	22	50

A hemólise foi verificada durante o procedimento de lavagem final das hemácias com solução fisiológica para a retirada dos reagentes. As soluções de lavagem ficaram avermelhadas e as hemácias com coloração escura. As amostras foram descartadas. Dentre as 6 amostras que ainda puderam ser testadas para o TDA três amostras negativaram, sendo 1 sensibilizada com anti-D e 2 com anti-C (tabela 3).

Tabela 3 - Resultado após o segundo tratamento das hemácias com glicina-ácida/EDTA

Tratamento com glicina-ácida/EDTA	TDA Negativo	TDA Positivo	Hemólise	Total
Segundo tratamento	3	3	11	17

5.2.4 TESTAGEM DO ELUATO

Após o tratamento com a técnica da glicina-ácida/EDTA a solução do eluato foi testada para verificar a viabilidade dos anticorpos que foram dissociados ou eluídos. Dentre as 50 amostras, 41 apresentaram eluato positivo. As nove amostras cujos eluatos foram negativos haviam sido sensibilizadas com as seguintes especificidades de anticorpos: anti-E, 6 amostras (67%), anti-S, 2 amostras (40%) e anti-D, 1 amostra (8%) (tabela 4). O eluato de todas as amostras sensibilizadas com os anticorpos anti-C, anti-c, Anti-K e Anti-Di^a foram positivos. Os eluatos positivos na triagem de anticorpos foram testados com painéis de identificação para confirmar a especificidade e a viabilidade dos anticorpos (figuras 7 e 8).

5.2.5. EFEITO DA ELUIÇÃO SOBRE OS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

Para verificar o efeito do tratamento com a glicina-ácida/EDTA e com a cloroquina sobre a expressão dos antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s, foi realizada a fenotipagem das amostras que tiveram o TDA negativado após tratamento com ambas as técnicas. Foi avaliado se o tratamento destruiu os antígenos expressos antes do tratamento.

Tabela 4- Resultado do Eluato das amostras tratadas com glicina-ácida/EDTA

Anticorpos	Eluato positivo	Eluato negativo	Total
Anti-D	11	1	12
Anti-C	10	0	10
Anti-E	3	6	9
Anti-c	8	0	8
Anti-S	5	2	7
Anti-K	3	0	3
Anti-Di ^a	1	0	1
Total	41	9	50

Figura 7 – Painel do eluato da amostra 21: A amostra foi sensibilizada com anticorpo anti-C que foi recuperado no eluato.

Figura 8 – Painel do eluato da amostra 47. A amostra foi sensibilizada com anticorpo anti-K que foi recuperado no eluato.

Dentre as 50 amostras, 26 eram previamente fenotipadas para os antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s. Dentre elas 20 alcançaram TDA negativo após tratamento com a glicina-ácida/EDTA e 20 negativaram após tratamento com cloroquina (tabela 5). Após ambas as técnicas os antígenos originalmente expressos permaneceram positivos, comprovando que não houve destruição dos mesmos.

Tabela 5 – Verificação da interferência do tratamento da hemácias com cloroquina e glicina-ácida/EDTA sobre os antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s.

AMOSTRAS COM FENOTIPAGEM PRÉVIA	TRATADAS COM CLOROQUINA		TRATADAS COM GLICINA	
	Tratamento efetivo	Amostras concordantes com a fenotipagem prévia	Tratamento efetivo	Amostras concordantes com a fenotipagem prévia
26	20	20	20	20

As amostras 24, 47 e 50 eram positivas para o antígeno K. A cloroquina não dissociou o anticorpo em nenhuma das 3 amostras, enquanto a glicina-ácida/EDTA foi efetiva nas amostras 24 e 50. Foi testada a expressão do antígeno K nas amostras 24 e 50 após o tratamento utilizando método indireto em gel contendo AGH. Apesar de não ter sido avaliado a intensidade de reação de expressão dos antígenos podemos verificar na figura 9 que nas duas amostras em que a técnica foi efetiva e dissociou o anticorpo, a expressão do antígeno K continua presente, mas a reatividade observada pode ser considerada 1+, sugerindo que houve diminuição da expressão do antígeno, quando comparado com a expressão observada em hemácia não tratada.

Os resultados individuais de cada amostra em ambas as técnicas encontram-se resumidas na tabela 6.

5.2.6 AMOSTRA DE PACIENTE

Foi incluída uma amostra de paciente onde foi constatada a presença de autoanticorpo a quente da classe IgG pelo TDA monoespecífico (figura 10). O autoanticorpo também interferia na pesquisa e identificação de anticorpos irregulares, pois apresentava característica de panaglutinina. As hemácias da paciente, sensibilizadas “*in vivo*” foram tratadas com cloroquina e com glicina-ácida/EDTA.

Figura 9 – Fenotipagem das amostras 24 e 50 para antígeno K após tratamento com glicina-ácida/EDTA. O teste positivo indica a presença do antígeno, porém a reatividade fraca (1+) sugere que houve enfraquecimento de sua expressão. À direita a expressão forte (4+) do antígeno Kell em hemácia controle não tratada, utilizada como controle positivo.

A cloroquina não foi efetiva na retirada do anticorpo ligado às hemácias, ao contrário do tratamento com a glicina-ácida/EDTA que dissociou o anticorpo (figura 11).

A hemácia tratada com glicina foi fenotipada para os antígenos Fy^a , Fy^b , Jk^a , Jk^b , S e s (figura 12). A fenotipagem para o sistema Rh (C, c, E e e) e Kell foi realizada em gel específico monoclonal sem interferência do TDA positivo (controle da reação negativo).

O eluato resultante do tratamento com glicina-ácida/EDTA foi testado em gel com hemácias de painel de identificação de anticorpos e apresentou resultado positivo com todas as células (figura 13 e 14).

A amostra foi enviada para genotipagem e o resultado da genotipagem confirmou o resultado da fenotipagem após tratamento com glicina-ácida/EDTA.

5.2.7 TEMPO DE EXECUÇÃO DA TÉCNICA DA GLICINA-ÁCIDA/EDTA

O tempo de reação da glicina-ácida/EDTA é de 2 minutos. Todas as amostras foram tratadas obedecendo ao tempo descrito na literatura, demonstrando que o mesmo é reprodutível.

Tabela 6- Resultados individuais por amostra.

Amostra	Especificidade dos anticorpos	Intensidade do TDA após sensibilização	Tratamento efetivo com cloroquina	Tratamento efetivo com glicina	Eluato pós glicina
1	D	4+	Não	Não	4+
2	Dia	3+	Sim	Sim	3+
3	D	4+	Não	Não	4+
4	D	4+	Não	Sim	4+
5	c	3+	Não	Não	3+
6	E	3+	Sim	Sim	Negativo
7	S	4+	Sim	Sim	3+
8	E	3+	Sim	Sim	1+
9	E	3+	Sim	Sim	2+
10	c	3+	Não	Não	3+
11	D	4+	Não	Sim	4+
12	D	4+	Não	Sim	4+
13	S	3+	Sim	Sim	3+
14	S	3+	Sim	Sim	3+
15	D	3+	Não	Sim	3+
16	c	3+	Não	Não	2+
17	E	3+	Sim	Sim	(+)
18	c	3+	Não	Não	2+
19	D	4+	Não	Não	3+
20	c	3+	Não	Não	2+
21	C	3+	Sim	Sim	4+
22	C	3+	Sim	Sim	4+
23	C	3+	Sim	Sim	4+
24	K	4+	Não	Sim	4+
25	D	3+	Não	Não	Negativo
26	E	4+	Sim	Sim	Negativo
27	S	3+	Sim	Sim	3+
28	C	3+	Sim	Não	4+
29	C	3+	Sim	Sim	4+
30	C	3+	Sim	Sim	4+
31	c	3+	Não	Não	2+
32	E	3+	Sim	Sim	Negativo
33	C	3+	Sim	Não	4+
34	S	3+	Sim	Sim	Negativo
35	S	3+	Sim	Sim	Negativo
36	C	4+	Sim	Não	4+
37	c	4+	Não	Não	4+
38	D	4+	Não	Sim	4+
39	S	3+	Sim	Sim	3+
40	c	4+	Sim	Não	2+
41	C	4+	Sim	Não	4+
42	E	3+	Sim	Sim	Negativo
43	D	3+	Não	Sim	2+
44	D	3+	Não	Sim	2+
45	E	3+	Sim	Sim	Negativo
46	C	3+	Sim	Sim	4+
47	K	4+	Não	Não	4+
48	D	3+	Não	Sim	2+
49	E	3+	Sim	Sim	Negativo
50	K	4+	Não	Sim	4+
TOTAL		50	28	33	41

Figura 10 – TDA monoespecífico da amostra de paciente. Hemácias sensibilizadas por anticorpo da classe IgG.

Figura 11 – TDA após o tratamento com glicina-ácida/EDTA (esquerda) e cloroquina (direita). A glicina negativou completamente o TDA, enquanto a hemácia tratada com cloroquina persistiu positiva (1+).

Figura 12 – Fenotipagem da amostra tratada com glicina-ácida/EDTA: Fy(a+b+), Jk(a-b+), S+s+

Figura 13 – Paineis em gel (Liss/AGH) do eluato após tratamento com glicina-ácida/EDTA. Reatividade de intensidade 4+ em todas as células.

Figura 14 – – Paineis enzimáticos (hemácias tratadas com bromelina) do eluato em gel neutro após tratamento com glicina-ácida/EDTA. Reatividade de intensidade 4+ em todas as células.

5.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quanto a efetividade das técnicas em negativar o TDA foi verificado que a glicina-ácida/EDTA foi efetiva em 66% das amostras testadas no primeiro tratamento (33/50 amostras), enquanto a cloroquina conseguiu negativar 56% (28/50). Esses resultados não apresentam diferença significativa ($p>0,05$), demonstrando que a técnica da glicina-ácida/EDTA não é superior, mas é tão efetiva quanto a da cloroquina.

Quando aliamos os resultados de ambas as técnicas, verificamos que em 76% (38/50) das amostras o TDA foi negativedo. Esse dado indica que ainda que uma técnica não seja eficaz na remoção do anticorpo, é uma boa alternativa tentar a segunda técnica já que a falha em remover o anticorpo utilizando uma delas, não prevê necessariamente a falha com a outra. Quando se utiliza o teste de correlação múltipla (gráfico 2) para comparar a utilização das duas técnicas com o resultado de cada uma isolada (somente a cloroquina ou somente a glicina) verificamos que os resultados apresentam diferença significativa ($p<0,05$) (quadro 3).

TRATAMENTO EFETIVO COM	TOTAL	PORCENTAGEM
Glicina ou cloroquina	38	76%
Glicina e cloroquina	23	46%
Glicina apenas	10	20%
Cloroquina apenas	5	10%
Nenhuma das técnicas	12	24%

Quadro 3 - Resultados comparativos entre as técnicas utilizadas

Gráfico 2 - Teste de correlação múltipla entre as técnicas aplicadas A- Glicina e Cloroquina; B-Cloroquina; C- Glicina (* $p < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

Os reagentes utilizados na técnica da glicina-ácida/EDTA podem ser adquiridos em forma de kit comercial prontos para uso, porém não estão disponíveis no Brasil. A preparação dos reagentes “*in house*”, a partir de sais comerciais adquiridos, se mostrou viável. Os reagentes glicina e o tampão Tris, armazenados de forma correta, se mantiveram estáveis por um período de 7 meses. Somente o reagente EDTA precipitou mesmo armazenado em condições adequadas, sugerindo que o mesmo deve ser preparado em menor quantidade e armazenado em alíquotas. A solução de cloroquina também pode ser preparada “*in house*” e pode ser armazenado por um mês. A legislação brasileira autoriza a utilização de reagentes preparados a partir de sais comerciais como a cloroquina e a glicina-ácida/EDTA, desde que os sais tenham autorização da vigilância sanitária para a comercialização (BRASIL, 2001).

A comparação quanto a efetividade em dissociar anticorpos em amostras com TDA positivos entre a técnica da glicina e a técnica da cloroquina, mostrou que não há diferença estatística entre elas e que ambas são igualmente eficientes. Se utilizadas conjuntamente, há maior possibilidade de elucidação dos casos.

Uma vantagem da técnica da glicina-ácida/EDTA é que ela permite numa mesma amostra eluir o anticorpo ligado á hemácia, assim como fenotipar a hemácia tratada. Devido a sua dupla utilidade, a técnica é vantajosa principalmente em pacientes em que pouco volume de amostra pode ser coletado, como em casos de crianças e recém-nascidos.

A fenotipagem pós tratamento se mostrou viável já que os antígenos de maior importância não sofreram alterações. Nas 20 amostras que foram fenotipadas antes e após tratamento para verificar a influência dos reagentes na expressão dos antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s, não houve destruição dos mesmos por nenhuma das duas técnicas.

Para as amostras positivas para o antígeno Kell (3/50) e sensibilizadas com o respectivo anticorpo, a técnica da glicina foi efetiva em negativar o TDA em apenas duas delas, mas após o tratamento foi verificada uma fraca reatividade da reação antígeno-anticorpo sugerindo que houve um enfraquecimento da expressão do antígeno, conforme esperado e descrito na literatura (BYRNE, 1991, PALLAS, WILER E MCGEE, 1991, ROZIERIS e SQUALI, 1997, CHAMPAGNE *et al.*, 1999, KOSANKE, 2012 e KATHARIA e CHAUDHARY, 2013). A ação da glicina sobre o antígeno Kell não representa impedimento para seu uso uma vez que na impossibilidade de testar o antígeno Kell, o banco de sangue consegue facilmente atender a solicitação de transfusão com unidades de hemácias Kell

negativas, já que é um antígeno de baixa prevalência na população, variando de 1.5% na população africana a 9% nos europeus (DANIELS, 2011).

A solução resultante da dissociação do anticorpo pela técnica da glicina pode ainda ser utilizada como eluato podendo substituir a técnica de eluição com reagentes comerciais (kits de eluição ácida) que tem alto custo, aproximadamente entre R\$20,00 a R\$25,00 por teste.

Em 41 amostras (82%) houve a dissociação e recuperação do anticorpo que estava sensibilizando as hemácias. Em 9 amostras (18%) os anticorpos foram eluídos porém apresentaram reação negativa quando testadas com hemácias de triagem, entre eles o anti-E (6), anti-S (2) e Anti-D (1). É possível que a correção pH do meio (WALKER, 2011) não tenha sido adequada, o que pode ter desfavorecido a reatividade do anticorpo.

Para as amostras tratadas com glicina-ácida/EDTA nas quais não houve dissociação do anticorpo pelo primeiro tratamento (17/50), o segundo tratamento não se mostrou eficaz já que 3 (18%) permaneceram positivas e 11 (65%) sofreram hemólise. O tempo de armazenagem não parece ter influenciado já que todas as amostras foram testadas dentro de 48 horas após a coleta. Outros fatores que não foram verificados podem ter levado a hemólise. Apesar da literatura (LOUIE, JIENG e ZEROULIS, 1986 e BYRNE, 1991) recomendar um segundo tratamento, ele é pouco eficaz tendo negativado apenas 3 das 17 amostras testadas.

A amostra de paciente que apresentou sensibilização “*in vivo*” mostrou melhor efetividade da técnica da glicina-ácida/EDTA sobre a da cloroquina, possibilitando fenotipagem para os antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S e s, que não foram destruídos após o tratamento, comprovado através da genotipagem.

A presença de autoanticorpo a quente com presença de hemólise (AHAI) ou não pode mascarar a presença de aloanticorpo, interferindo na rotina sorológica da fenotipagem que é uma importante ferramenta para auxiliar na seleção de hemácias para transfusão (SHIREY *et al.*, 2002). Esses pacientes frequentemente possuem aloanticorpos associados ao autoanticorpo e a prevalência de aloimunização entre eles varia entre 12% a 40% (LEGER e GARRATY, 1999; BRANCH e PETZ, 1999) o que dificulta ainda mais a escolha do melhor componente a ser transfundido além de aumentar a possibilidade reações hemolíticas imunes pós-transfusionais.

Nesses casos as técnicas de dissociação de anticorpos são importantes para tratar amostras de pacientes, e a técnica da glicina-ácida/EDTA pode ser usada como uma opção pois se mostrou eficaz na dissociação anticorpo ligado às hemácias, deixando livre a superfície das mesmas, permitindo a fenotipagem por antisoros IgG. Paralelamente, os

anticorpos eluídos também puderam ser estudados. O mesmo não ocorre com a cloroquina, que permite apenas a fenotipagem, e tampouco com os kits de eluição ácida, disponíveis no mercado nacional, que são destinados a realização do eluato, mas destroem as hemácias.

O tempo de tratamento na técnica da glicina-ácida/EDTA também é uma vantagem pois foi possível reproduzir no tempo determinado de 2 minutos, enquanto a cloroquina demora até duas horas.

Ainda que a aplicação das técnicas por biologia molecular estejam cada vez mais presentes na rotina imuno-hematológica e possibilitam estabelecer o fenótipo deduzido do genótipo, elas não estão disponíveis na maioria dos centros e sua realização exige algumas horas. A resolução imediata do problema transfusional necessita dos resultados sorológicos, pois com frequência não é possível aguardar o resultado do teste molecular. Dessa forma, apesar da crescente importância da genotipagem eritrocitária, técnicas sorológicas aplicadas corretamente e no momento propício são de grande utilidade para resolver problemas imuno-hematológicos, como ocorre com a fenotipagem em pacientes com TDA positivo.

7 CONCLUSÃO

A técnica da glicina ácida/EDTA mostrou-se efetiva em remover os anticorpos que sensibilizavam as hemácias e pode ser utilizada com segurança antes da fenotipagem eritrocitária. Por ser uma técnica de rápida execução, é uma alternativa aplicável principalmente em casos urgentes de pacientes que apresentam autoanticorpos.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H. e PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª. ed. Rio de Janeiro, Elsevier. 2008. p. 75-96.
- BARJAS-CASTRO, M. L. Imuno-Hematologia do Doador e do Receptor. *In*. **Técnico em Hemoterapia**: livro texto/Ministério da Saúde. Brasília, 2013. p. 143-170.
- 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.
- BRANCH, D. R.; PETZ L. D. Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. **Transfusion**. v. 39, jan. 1999, p. 6-10.
- BRASIL. Portaria nº 158, 04 de fev. 2016. **Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos**. Diário Oficial da União nº 25, Seção 1, pág. 37, Brasília: 05 de fevereiro de 2016.
- BRASIL. LEI nº 10.205/2001 (LEI ORDINÁRIA) 21 de mar. 2001. Regulamenta o § 4º do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 22 de mar, 2001. Seção 1. p. 1.
- BYRNE, P. C. Use of a modified acid/EDTA elution technique. **Immunohematology**. v. 7, nº 2, 1991. p. 46-47.
- CARUCCIO, L.; WISE, S. Fundamentals of Immunology. *In*: Harmening, D. M. **Modern Blood Banking & Transfusion Practices**. 6ª. ed. Philadelphia: F A Davis Company, 2012. p. 45-76.
- CASTILHO, L. Sistema de Grupo Sanguíneo Rh. *In* Bordin, J. O; Júnior, D. M. L. e Dimas, T. C. **Hemoterapia Fundamentos e Prática**. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p 137-145.
- CASTILHO, L. JUNIOR, J. L.; REID, M. E. Anticorpos, antígenos e sistemas. *In*. **Fundamentos da Imuno-hematologia**. 1ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, 2015, p.1-24.
- CASTILHO, L. Testes pré-transfusionais frente a novas tecnologias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. nº 22 (suplemento 2), 2000, p. 240-241.
- CHAMPAGNE, K *et al*. EDTA/glicine-acid versus chloroquine diphosphate treatment for stripping Bg antigens from red blood cells. **Immunohematology**. v.15, n. 2, 1999. p. 66-68.
- CHOU, S. T. e WESTHOFF, C. M. The Rh System. **Technical manual AABB**. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks: 2011. p. 389-410.
- COOLING, L. ABO, H, and Lewis Blood Groups and Structurally Related Antigens. **Technical manual AABB**. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks: 2011. p. 363-388.

COOMBS, R. R. A; MOURANT, A. E; RACE, R. R. A new test for the detection of weak and “incomplete” Rh agglutinins. **The British Journal of Experimental Pathology** Aug vol. 26(4), 1945, p. 255-266.

COOMBS, R. R. A; MOURANT, A. E; RACE, R. R. Detection of weak and “incomplete” Rh agglutinins: a new test. **The Lancet**. 1945. ii, p. 15-16.

DANIELS, G. Other Blood Groups. **Technical manual AABB**. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks: 2011. p. 411-436.

DOWNES, K.A; SHULMAN, A. Pretransfusion Testing. **Technical manual AABB**. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks: 2008. p. 437-462.

EDWARDS, J. M; MOULDS, J. J.; JUDD, W.J. Chloroquine dissociation of antigen-antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. **Transfusion**. v. 22. 1982. p. 59-61.

FLUIT, C. R. M. G, KUNST, V. A. J. M., DRENTHE-SCHONK, A. M. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. **Transfusion**. v. 30, n. 6, 1990, p. 532-535.

GANZELLA, M. Administração de transfusão. In Covas, D. T., Ubialli, E. M. A., Santis, G. C. **Manual de Medicina Transfusional**. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2014, p. 63-67.

GARRATY, G. e PETZ, L. D. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with autoimmune hemolytic anemia. **Transfusion**. v. 42, nov. 2002, p. 1390-1392.

GARRATY, G. Immune Hemolytic Anemia Associated with negative routine serology **Seminars in Hematology**. v. 42, 2005, p. 156-164.

GREEN, R. E. B e KLOSTERMANN, D. A. The Antiglobulin Test. In: Harmening, D. M. **Modern Blood Banking & Transfusion Practices**. 6ª. ed. Philadelphia: F A Davis Company, 2012. p. 101-118.

JUDD W. J., JOHNSON, S. T., e STORRY, J. Judd’s Methods in **Immunohematology** [Internet]. Third. AABB Press; 2008 [cited 2016 Jan 20]. Available from: https://books.google.com.br/books/about/Judd_s_Methods_in_Immunohematology.html?id=SmNyOgAACAAJ&pgis=1

JUDD, W. J. Elution-Dissociation of Antibody From Red Blood Cells: Theoretical and Practical Considerations. **Transfusion Medicine Reviews**. v. 13, n°4 (October), 1999, p. 297-310.

JUNIOR, D. M. L.; OLIVATO, M. C. A. Transfusão em Anemia Hemolítica Auto-imune. In Bordin, J. O; Júnior, D. M. L., Dimas, T. C. **Hemoterapia Fundamentos e Prática**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p 401-415.

KATHARIA R; CHAUDHARY R. K. Removal of antibodies from red cells: Comparison of three elution methods. **Asian Journal Transfusion Science**. v. 7(1), 2013, p. 29-32.

KOSANKE, J. EDTA glicine acid treatment of red blood cells. **Immunohematology**, v. 28, n°3, 2012. p. 95-96.

LAINE E. P. *et al*. In vitro studies of the impact of transfusion on the detection of alloantibodies after autoadsorption. **Transfusion**. 2000 Nov;40(11): p.1384-1387.

LAPIERRE, Y. *et al.* The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. **Transfusion**. v. 30, n 2, 1990. p. 109-113

LEGER, R. M. Blood Groups Terminology and the Other Blood Groups. In: Harmening, D. M. **Modern Blood Banking & Transfusion Practices**. 6ª. ed. Philadelphia: F A Davis Company, 2012. p. 172-215.

LEGER, R. M. The positive Direct Antiglobulin Test and Immune-Mediated Hemolysis. **Technical manual AABB**. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks: 2011. p. 497-522.

LEGER, R. M. e GARRATY, G. Evaluation of methods for detecting alloantibodies underlying warm autoantibodies. **Transfusion**, v. 39, 1999, p. 11-16.

LOUIE, J. E., JIENG, A. F. e ZEROULIS, C. G. Preparation of intact antibody-free red blood RBCs in autoimmune hemolytic anemia (abstract). **Transfusion**, 26, p.550, 1986.

MARTINS, P. R. J. *et al.* Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2008; 30(4):272-276

MARTINS, L. M. *et al.* 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; 31(4): p. 252-259

MELO, L. Testes de Compatibilidade Sanguínea. In Bordin, J. O; Júnior, D. M. L. e Dimas, T. C. **Hemoterapia Fundamentos e Prática**. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2007, p. 171-176.

NOVARETTI M.C.Z., *et al.* Comparison of tube and gel techniques for antibody identification. **Immunohematology** v. 16, 2000, p.138-141.

NOVARETTI, M. C. Z. *et al.* Comparison of Conventional Tube Test Technique and Gel Microcolumn Assay for Direct Antiglobulin Test: A Large Study. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v.18, 2004, p. 255-258.

PALLAS, C; WILER, M. e McGEE, B. Comparison of glycine acid-EDTA to chloroquine diphosphate for IgG removal. **Transfusion** (abstract). v. 31, 1991, 27S.

PINTO, P. C. A., BRAGA, J. A. P., SANTOS, A. M. N. Fatores de risco para aloimunização em pacientes com anemia falciforme. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 2011; 57(6). p. 668-673.

RALPH, E. B.; GREEN, e KLOSTERMANN, D. A. The Antiglobulin Test. In: Harmening, D. M. **Modern Blood Banking & Transfusion Practices**. 6ª. ed. Philadelphia: F A Davis Company, 2012. p. 101-118.

ROBACK, J.D. *et al.*, **Technique Manual AABB**, 17ª ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 2011.

ROZIER, N. B; SQUALLI, S. Removing IgG antibodies from intact red cells: comparison of acid and EDTA, heat, and chloroquine elution methods. **Transfusion**. v. 37, 1997, p. 497-501.

SANTOS, F. L. S. Testes pré-transfusionais. *In* Covas, D. T., Ubialli, E. M. A., De Santis, G. C. **Manual de Medicina Transfusional**. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2014, p. 47-62.

SERERAT, T. S., VEIDT, D. e DUTCHED. A. A quick and simple method for phenotyping IgG-sensitized red blood cells. **Imunohematology**, v. 16, 2000, p. 154-156.

SHIREY, R. S. *et al.* Prophylactic antigen-matched donor blood for patients with warm autoantibodies: an algorithm for transfusion management. **Transfusion**, v. 42. 2002, p. 1435-1441.

VICHINSKY, E. P. *et al.* Prospective RBC phenotype matching in a stroke-prevention trial in sickle cell anemia: a multicenter transfusional trial. **Transfusion**. v. 41, September, 2001, p.1086-1092.

WALKER, P. S. Identification of Antibodies to Red Cell Antigens **Technical manual AABB**. 17th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks: 2011.p. 463-496.

WALKER, P. S. e HARMENING, D. M. Other technologies and Automation. *In*: Harmening, D. M. **Modern Blood Banking & Transfusion Practices**. 6ª. ed. Philadelphia: F A Davis Company, 2012. p. 273-287.

ZANTEK, N. D. *et al.* The direct antiglobulin test: A critical step in the evaluation of hemolysis. **American Journal of Hematology**. Test of the month, 2012.

ZAGO, M. A. Apresentação. *In* Covas, D. T., Ubialli, E. M. A., De Santis, G. C. **Manual de Medicina Transfusional**. 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

9 ANEXOS

FUNDAÇÃO HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da pesquisa: Aplicação da técnica da glicina ácida-EDTA e avaliação da eficácia no tratamento de hemácias com teste direto da antiglobulina positivo

Pesquisadora responsável: Célia Kazue Abiko

Orientador: Prof. Dimas Tadeu Covas

Co-orientadora : Dra. Flávia Leite Souza Santos

Objetivo da pesquisa: Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem como objetivo padronizar uma nova técnica para auxiliar na tipagem sanguínea de pacientes. A tipagem sanguínea pode sofrer interferência da presença de anticorpos ligados aos glóbulos vermelhos do sangue. Nessas situações é difícil selecionar o melhor sangue para o paciente e é preciso a utilização de técnicas adicionais para remover essas interferências.

Esta pesquisa tem como objetivo estudar outra técnica para remover esses anticorpos e compará-la com a técnica atualmente utilizada. Para isso precisamos de amostras de pacientes e doadores voluntários.

Se você é um doador é necessário que você autorize a coleta de 5 ml (1 tubo) a mais de seu sangue.

Se você é um paciente não haverá necessidade de nova amostra, pois utilizaremos as amostras já coletadas para os testes pré-transfusionais e os resultados encontrados nesta pesquisa não irão interferir na escolha da (s) bolsa (s) de sangue que você possa vir a receber.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias rubricando todas as páginas deste termo de consentimento. Uma via original assinada e rubricada por você e pela pesquisadora ficará com você.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e não haverá armazenamento de material para pesquisas posteriores. Os seus dados serão usados apenas neste estudo e, quando o trabalho for publicado, seu nome e qualquer outra informação que possam identificá-lo, não serão revelados.

É pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você assim como não poderemos dar nada em troca pela sua participação na pesquisa.

Nosso objetivo com esta pesquisa é que os resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro. Os riscos da participação são mínimos. Se você é um doador de sangue, a amostra será coletada no momento da doação, não exigindo punção venosa adicional.

É seu direito ter acesso aos resultados dos testes da pesquisa. Esses resultados não serão fornecidos automaticamente a você, mas caso você se interesse em saber o resultado, ou tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo, deverá entrar em contato com Célia Kazue Abiko pelo telefone (18) 99718-3551.

Você tem total liberdade de optar por não participar da pesquisa. Caso aceite participar, poderá desistir a qualquer momento ou retirar seu consentimento, mesmo após ter coletado o sangue. Para cancelar sua participação basta avisar a pesquisadora e os seus dados serão retirados do projeto.

Qualquer dúvida ética sobre a pesquisa poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CAMPUS UNIVERSITÁRIO, bairro Monte Alegre, CEP 14048-900, Ribeirão Preto-SP, Telefone (16) 3602-2228, FAX (16) 3633-1144, e-mail cep@hcrp.usp.br)

Consentimento de participação:

A. Consentimento do participante

Li as informações acima sobre o estudo e recebi explicações sobre a participação no estudo. Portanto, dou o meu consentimento para participar do estudo.

Nome completo

Assinatura

Data

Nome completo da pesquisadora

Assinatura

Data