

SIGNIFICADO CLÍNICO DO TESTE DE COOMBS DIRETO NA ROTINA PRÉ-TRANSFUSIONAL

BÁRBARA APARECIDA MEIRA FEITOSA¹
ALEXANDRE GOMES VIZZONI²

1. Pós-Graduanda do Curso de Pós-graduação em Imunoematologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.
2. Docente do Curso de Pós-Graduação de Imunoematologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ.

Autor responsável: B.A.M.Feitosa. E-mail: barbareira@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Este presente estudo de cunho monográfico e bibliográfico tem o objetivo de analisar o Significado Clínico do Teste de Antiglobulina Direto na Rotina Pré-Transfusional.

O teste de antiglobulina direto (TAD) também é chamado de teste de Coombs direto. Consta da pesquisa de anticorpos (auto-anticorpos) ou fração do complemento, adsorvidos nas hemácias do paciente "in vivo".

Por intermédio deste exame é possível realizar o diagnóstico diferencial das anemias hemolíticas auto-imunes ou por drogas, e na doença hemolítica do recém-nascido, decorrentes de incompatibilidade materno fetal aos sistemas de grupo sanguíneo, principalmente o Rh.

Segundo Gale Enciclopédia de Medicina (2002) os testes de coombs são testes sanguíneos que identificam as causas da anemia. Já Rakel (2005) relata que existem duas formas do teste de Coombs: os diretos e os indiretos.

O TAD é usado para detectar auto-anticorpos e/ou fração de complemento na superfície dos glóbulos vermelhos. Muitas doenças e drogas (quinidina, metildopa e procainamida) podem levar à produção destes anticorpos.

Estes anticorpos vezes destroem os glóbulos vermelhos e causar anemia Este teste é realizado por vezes a diagnosticar a causa da anemia ou icterícia. Pontua-se que os anticorpos não aglutinantes são aqueles que se ligam às hemácias que possuem antígenos específicos, mas não as aglutinam em meio salino. Os anticorpos IgM são capazes de aglutinar hemácias nessas condições. Já os anticorpos IgG não são capazes de promover aglutinação, pois necessitam de mecanismo artificial de aglutinação, já que, por serem pequenas moléculas, não conseguem superar as forças de repulsão entre as hemácias. O soro de Coombs contém anticorpos anti-humanos, que podem reagir com qualquer imunoglobulina humana (não somente as eritrocitárias).

A maioria dos anticorpos de classe IgM, quando ligados aos antígenos específicos, são capazes de diminuir as forças de repulsão, a ponto de atingir o potencial zeta crítico, e assim, resultar em aglutinação em meio salino. O teste de Coombs Direto é um método que permite a identificação da presença de anticorpos fixados as hemácias. Tecnicamente, baseia-se no fato de que os anticorpos que recobrem as hemácias podem ser identificados pela adição de anticorpos antiglobulina humana. Quando positivo, ou seja, indicando a presença de anticorpos aderidos às hemácias, formam-se pontes entre elas, levando ao fenômeno visível de aglutinação. Neste trabalho será abordado **Como o teste de Coombs pode contribuir diretamente para o diagnóstico da anemia auto-imune.**

Fundametação Teórica

Teste de Coombs

De acordo com Zarandona (2005) o teste de antiglobulina foi descrito primeiramente por Coombs em 1945 e é referido freqüentemente como o teste de Coombs. Ele é executado para detectar o IgG eritrócito-dirigido no plasma ou IgG ou revestimento do complemento na superfície dos eritrócitos de circulação.

O sistema de grupo sanguíneo Rh e sua associação com a doença hemolítica do recém-nascido tinham sido descritos alguns anos antes, sendo que o teste foi rapidamente introduzido para a investigação desta doença. Em 1946, Coombs e colaboradores descreveram o emprego da globulina anti-humana para detectar a sensibilização in vivo de hemácias de neonatos que sofriam da doença hemolítica do recém-nascido. Embora, o teste fosse inicialmente de grande valor na investigação da doença hemolítica Rh do neonato, não demorou muito para que sua versatilidade na detecção de anticorpos incompletos de

outros grupos sanguíneos se tornasse evidente. O primeiro dos anticorpos do sistema de grupo sanguíneo Kell e seu antígeno associado foram relatados apenas algumas semanas após Coombs terem descrito o teste. O rápido aumento da popularidade do procedimento do teste logo o levou a ser chamado de teste de Coombs. Embora Coombs e seus colaboradores fossem os instrumentos na introdução do teste para sorologia do grupo sanguíneo, o princípio do teste tinha sido, de fato, descrito por Moreschi em 1908. Os estudos de Moreschi envolviam a utilização do soro de anti-cabra de coelho para aglutinar eritrócitos de coelho, os quais tinham sido sensibilizados em baixas doses, não aglutinantes, de soro hemático anti-coelho de cabra.

O procedimento de Coombs envolveu a injeção de soro humano em coelhos, a fim de produzir soro anti-humano. Depois da adsorção para retirar anticorpos hetero-específicos, o anti-soro foi diluído até uma concentração apropriada, de tal modo que a pró-zona fosse evitada, enquanto ainda retinha atividade suficiente de anticorpo para permitir a ligação cruzada das hemácias adjacentes sensibilizadas com os anticorpos incompletos. A ligação cruzada de eritrócitos com a globulina anti-humana produzia hemaglutinação, indicando que as hemácias tinham sido sensibilizadas por um anticorpo, o qual havia reagido com um antígeno presente na superfície celular. O uso da globulina anti-humana para detectar a sensibilização in vitro de eritrócitos é referido como o teste indireto,

enquanto o teste direto é empregado para detectar a sensibilização in vivo. A técnica original de Coombs foi um procedimento laborioso, empregando uma concentração de eritrócitos entre 15 a 25%, volume a volume (v/v). Por muitos anos, o procedimento refinado permaneceu como método de escolha, principalmente no Reino Unido. No início da década de 1950, a técnica de tubo foi introduzida e, atualmente é a técnica padronizada mundialmente. Antes da disponibilidade de reagentes comerciais, muitos hospitais e bancos de sangue produziam suas próprias globulinas anti-humanas. Nos Estados Unidos, a produção comercial começou no final da década de 1940, sendo que, em 1949, todos os reagentes se tornaram sujeitos às regulamentações de licença, após a publicação de um documento intitulado "Requisitos Mínimos: Soro anti-humano para o teste da globulina anti-humana".

Nenhumas destas moléculas podem fazer com que a aglutinação direta dos eritrócitos, detecte sua presença, a globulina *antiglobulina humana monoclonal* (AHG) com especificidade para IgG ou as várias proteínas de complemento são adicionadas a uma suspensão dos eritrócitos. O reagente do AHG é suficientemente potente para causar a aglutinação dos eritrócitos que são revestidos com o IgG.

Segre et al (1985) estudaram a frequência de Recém-Nascidos (RN) com teste de Coombs direto positivo em sangue de cordão, nascidos no Serviço de Neonatologia do Hospital dos Servidores de Pernambuco (HSPE) no

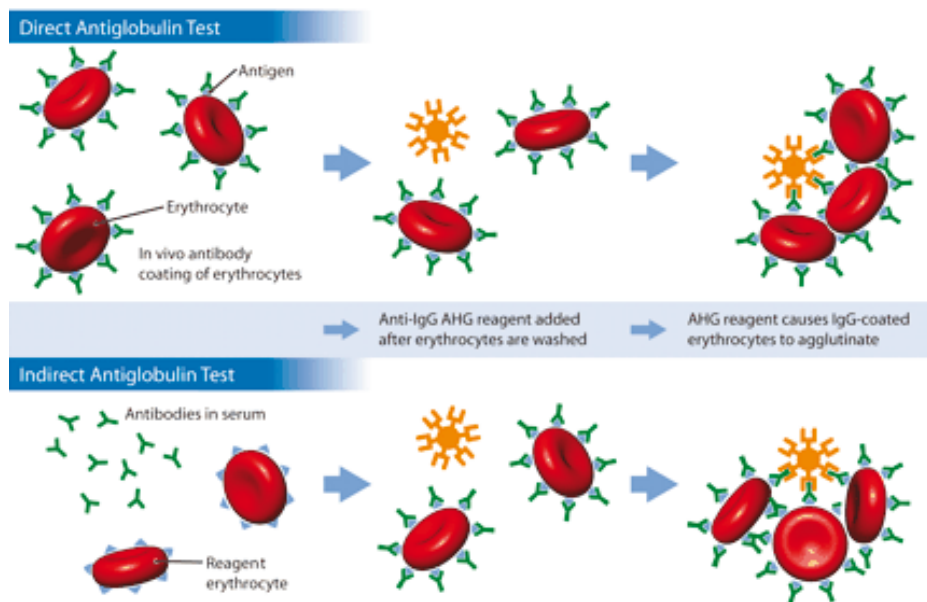


Figura 1. O teste direto do antiglobulina (DAT) e teste indireto do antiglobulina (IAT). AHG = *globulina antihumana*. O DAT reflete in vivo a sensibilização do anticorpo dos eritrócitos. Os eritrócitos são levados para remover todos os anticorpos, e o anti-IgG reagente do AHG é adicionado então. Os anticorpos de IgG não podem causar a aglutinação direta do eritrócito, mas se os eritrócitos são revestidos com os anticorpos de IgG, o AHG que o reagente fará com que aglutinem. Este teste pode igualmente ser executado usando o reagente *anti-complemento* do AHG. Os eritrócitos do reagente são incubados na presença do soro. Após o período de incubação os eritrócitos são lavados para remover os anticorpos. O anti-IgG reagente do AHG é adicionado e fará com que os eritrócitos IgG-revestidos aglutinem. Fonte: Zarandona (2005)

período de janeiro de 1979 a dezembro de 1982. Constataram que a doença hemolítica foi diagnosticada em 100% dos casos, sendo que a incompatibilidade ABO esteve presente em 66,3% das vezes, a incompatibilidade Rh em 30,4% e os restantes 3,3% foram devido a outros grupos (C,E e Lewis). A população portadora de teste de Coombs direto positivo no sangue do cordão mostrou risco aumentado de prematuridade, anoxia perinatal e parto operatório, para o grupo com incompatibilidade Rh. Icterícia e/ou anemia ocorreram na maioria dos casos. Maior mortalidade neonatal foi observada no grupo com incompatibilidade Rh. A detecção precoce de doença hemolítica, com conseqüente acompanhamento desses RNs, permite o diagnóstico e as intervenções adequadas, propiciando a diminuição da morbi-mortalidade perinatal.

Já Ghilardi et al (1995) pesquisaram a rotina imuno-hematológica materno-fetal de 4.340 partos, objetiva correlacionar os resultados positivos dos testes de Coombs Indireto com uma possível icterícia na clínica evolutiva dos recém-nascidos. A rotina consiste na análise do sangue materno (tipagem ABO/Rh-fenotipagem Rh e Kell-Teste de Coombs indireto) e do sangue do recém-nascido (tipagem ABO/Rh-fenotipagem Rh e Kell – Teste de Coombs Direto) obtidos pela metodologia em gel-centrifugação. Em 4340 partos, foram identificados 135 (3,1 por cento) testes de Coombs positivos. As especialidades dos anticorpos encontrados foram às seguintes: 94 (69,6 %) no sistema ABO; 16 (11,8 %) nos vários sistemas, tais como Kell, Duffy, MNSs e HI; 14 (10,4 %) no sistema Rh (CcDEe); e 11 (8,2 %) no sistema Lewis. Dos 135 testes de Coombs positivo, 104 apresentaram Teste de Coombs direto positivo, onde 87 (83,7 por cento) dos recém-nascidos desenvolveram icterícia. Do total de 135 casos apenas nove (6,7 %) apresentaram positividade para ambos os testes de Coombs, com 100 % dos recém-nascidos apresentando icterícia. Os resultados obtidos foram de grande valia, pois com o diagnóstico da hemólise eritrocitária pela causa imuno-hematológica, obtidos pela utilização de uma técnica mais sensível, observamos a predominância na positividade do Coombs direto (104 casos – 72,2 %), independente do sistema sanguíneos materno, mostrando que é aconselhável manter o recém-nascido sob observação por um período mínimo de 72 horas para melhor avaliação da evolução clínica laboratorial da doença hemolítica perinatal.

Pontua-se que o primeiro caso de doença hemolítica descrito na literatura foi publicado em 1609, na França, em dois gêmeos. Um deles nasceu com quadro de edema generalizado (hidropisia), falecendo logo após o parto; o outro nasceu em melhores condições de saúde, porém desenvolveu icterícia importante, evoluindo com sintomas neurológicos (“kernicterus”), e óbito após três dias. Somente em 1932, concluiu-se que estas duas condições

(hidropisia fetal e kernicterus) eram dois aspectos diferentes de uma mesma doença. Em 1938, Ruth Darrow, uma patologista clínica de Chicago, aventou a hipótese de que a causa desta doença seria hemólise do sangue fetal decorrente de anticorpo materno. Também propôs que o antígeno fetal implicado na sensibilização da mãe seria a hemoglobina fetal. Em 1940 Landsteiner e Wiener descobriram o sistema Rh. Em 1941 Levine demonstrou que o antígeno D era o antígeno implicado na patogênese da doença hemolítica do feto e recém-nascido. Em 1968 foi licenciado nos Estados Unidos e Europa imunoglobulina anti-Rh, que passou a ser usada profilaticamente para prevenção da imunização com antígeno D.

Antes da introdução da prevenção da sensibilização ao antígeno D, a doença hemolítica perinatal (DHPN) por anticorpos anti-D era causa de 10.000 morte anuais de recém-nascidos nos Estados Unidos.

A transferência de anticorpos da mãe para o feto somente ocorre através da placenta e somente anticorpos da classe IgG são transferidos, pois são anticorpos de moléculas pequenas. Nas primeiras 12 semanas de gestação somente quantidade mínimas de IgG são transferidas. Com cerca de 20 semanas de gestação pode chegar a 1,8 g/L e crescerá exponencialmente até o final da gestação, quando os níveis de IgG podem ser tão altos quanto os níveis maternos. Estes anticorpos se ligam a um receptor Fc da membrana placentária, sendo um processo ativo que somente ocorre da mãe para o feto e não na direção reversa.

Embora todos os subtipos de IgG tenham sido encontrados no sangue de cordão umbilical, parece haver menor transferência de IgG2. Estes achados são consistentes com a observação de que os receptores Fc do tecido placentário têm maior afinidade com IgG1 do que IgG2.

A importância do Coombs direto

- Método que pesquisa a presença de hemácias sensibilizadas por anticorpos e/ou frações de complemento;
- Importante no auxílio ao diagnóstico de AHAI, DHPN, hemólise induzida dor;
- Drogas, reações hemolíticas pós-transfusionais;
- Lavar as hemácias é importante, pois outras globulinas presentes no plasma podem neutralizar o soro antiglobulina, provocando falsos resultados. Outro composto responsável por interferências neste teste é a geléia de Wharton presente no sangue coletado de cordão umbilical.
- A demora na realização do teste pode ocasionar falsos resultados, pois as amostras estocadas há muito tempo e em condições diferentes das ideais tendem a eluição natural dos anticorpos que inicialmente estavam ligados à hemácia. A centrifugação inadequada pode promover falsos resultados.

A avaliação de um TAD positivo

A interpretação de um TAD (+) exige o conhecimento do diagnóstico do paciente, avaliação das medicações em uso, gravidez e história transfusional, assim como a informação de presença de anemia hemolítica auto-imune. Somente o resultado sorológico do teste não é diagnóstico, devendo ser avaliado em conjunto com os dados clínicos e demais dados laboratoriais, tais quais, hematócrito, bilirrubina, haptoglobina e contagem de reticulócitos.

Testes pré-transfusionais em pacientes com auto-anticorpos podem apresentar os seguintes problemas:

1. Auto-anticorpos reativos a frio podem apresentar auto-aglutinação, causando tipagens ABO e Rh errôneas.

2. Eritrócitos fortemente cobertos por globulinas podem sofrer aglutinação espontânea com reagentes usados para tipagens.

3. A presença de auto-anticorpos livres no soro pode dificultar a identificação de anticorpos irregulares e a realização de provas cruzadas.

Embora a resposta a estes problemas sorológicos seja importante, o adiamento da transfusão na esperança de encontrar sangue sorologicamente compatível, pode em alguns casos, causar um dano maior ao paciente. Somente o julgamento clínico pode resolver este dilema. O diálogo com o médico do paciente também é importante.

De acordo com Duran (2000) o Teste de Antiglobulina Direto (TAD), volvidos 50 anos após o desenvolvimento do soro antiglobulina Transfusão Sanguínea, constitui, ainda, um método elementar e simples para a demonstração da presença de IgG e/ou complemento revestindo a superfície dos eritrócitos *in vivo*. Da mesma forma se refere o Guia para a preparação, uso e garantia de qualidade do complemento revestindo a superfície dos eritrócitos *in vivo*. A presença de um TAD positivo não significa que um indivíduo tenha uma anemia hemolítica. O TAD é por vezes, positivo em indivíduos hematologicamente normais. Em algumas situações ocorrem reações falsamente positivas, cujas causas são na maioria dos casos devidas à má técnica laboratorial.

Lopes e Duran (2003) analisaram a importância do TAD na prática transfusional de rotina. Segundo os autores o estudo imunohematológico efetuado ao receptor, que antecede a terapia transfusional, deve seguir uma metodologia que permita administrar sangue compati-

vel para os sistemas ABO e Rh(D) e detectar anticorpos eritrocitários com significado clínico. Assim, na rotina pré-transfusional são incluídos testes, tal como a fenotipagem ABO e Rh(D), a pesquisa de anticorpos irregulares e a prova de compatibilidade. A realização do Teste de Antiglobulina Direto (TAD), como rotina, nos testes pré-transfusionais, tem originado controvérsia e divergência de opiniões quanto ao seu valor. Existem, no entanto, situações específicas que obrigam à sua realização. O presente estudo pretende avaliar se a realização deste teste contribui, de fato, para melhorar a segurança e a eficácia transfusional.

Neste estudo procurou-se determinar-se a frequência e anticorpos com significado clínico na avaliação das incongruências entre a pesquisa de anticorpos irregulares e o TAD por comparação de dois protocolos, um que inclui o TAD e outro que o exclui.

Como resultados o estudo avaliou que sendo as amostras estudadas não independentes e os protocolos diferentes, e tendo em conta as situações específicas que obrigam à realização do TAD, os resultados obtidos foram os mesmos, quer aplicando um protocolo, quer outro. Existe evidência suficiente para que os laboratórios reavalie a necessidade da realização do TAD, como rotina, nos testes pré-transfusionais, com vista ao aumento da eficiência e à otimização de recursos.

TAD positivo nas reações hemolíticas transfusionais¹

CLASSIFICAÇÃO

Aguda => ocorre dentro de 24 horas após a transfusão

Tardia => ocorre após 24 horas da transfusão

Ou ainda:

Intravascular => caracterizada por hemoglobinemia e hemoglobinúria

Extravascular => ausência de hemoglobinemia e hemoglobinúria, caracterizada pelo seqüestro das hemácias transfundidas da circulação, com acúmulo de produtos resultantes da quebra do heme, tais como aumento de bilirrubina.

¹ É a lise ou retirada acelerada das hemácias transfundidas da circulação devido à incompatibilidade imunológica entre o receptor e o doador. Tipicamente, Reação hemolítica transfusional ocorre quando hemácias antígeno-positivo são transfundidas em receptor que tem um aloanticorpo.

Abaixo se encontram os grupos sanguíneos associados com Reação Hemolítica Transfusional (RHT).

Grupo sanguíneo	Anticorpos considerados clinicamente significantes	Comentários e exceções
ABO, H	todas	Anti-A ₁ , -H =. Não reativos a 37°C, em geral benignos
Lewis	Le ^a , Le ^b +Le ^a	Um caso de Le ^a causando RHT
P	P, P ₁ , P ₁ +P ^k	Raramente P ₁
I, i	I, i	-H, -IA, -IB, -IH, -IP não reativos a 37°C, em geral benignos
Rh	todas	
Duffy	todas	
MNSs	todas	-N não usual, alguns complexos Mi
Lutheran	Lu ^a	
Kell	todas	
Kidd	todas	
Cartwright	Y ^a	
Diego	D ^a , D ^b	
Colton	C ^a	
Dombrock	D ^a , D ^b	
Augustine	A ^a	
Vel	Vel	
Lan	Lan	
Sid	Sid	RHT não usual, pode causar sobrevida diminuída das hemácias

Fonte: Popovsky, MA. Transfusion Reaction. 2ª ed. 2001

GRUPOS SANGÜÍNEOS NÃO ASSOCIADOS COM HTR
Xg
Scianna
Chido/Rogers
Cost/York
Knops/McCoy
JMH
Holly/Gregory
Bg

Fonte: Popovsky, MA. Transfusion Reaction. 2ª ed. 2001

O Sistema de Grupos Sanguíneos ABO

De acordo com Oliveira (2003) o Sistema ABO foi descoberto em 1900 por Landsteiner. Em 1902, Von de Castello e Sturli descobriram o grupo AB. Nesses exper-

imentos, verificou-se que ocorria uma aglutinação dos glóbulos vermelhos devido à fixação de anticorpos aos antígenos específicos localizados na membrana. Os antígenos do Sistema ABO são produtos secundários dos genes ABO. Os produtos primários são enzimas (glicosiltransferases) capazes de adicionar carboidratos sobre uma estrutura precursora da membrana da hemácia. O Sistema ABO é o mais importante na prática transfusional: como primeira e mais importante regra, nunca se deve transfundir sangue contendo um antígeno ABO ao receptor que não o possua, devido à presença de anticorpos naturais e regulares em seu plasma. A reação hemolítica será intravascular, seguida de alterações imunológicas e bioquímicas, podendo ser fatal.

Segundo Oliveira (2003) cada antígeno presente na hemácia corresponde ao anticorpo no soro e/ou plasma, de especificidade contra o antígeno que o indivíduo não possui, conforme tabela a seguir:

Tabela 1. Sistema ABO

Grupo ABO	Antígeno ABO (hemácia)	Anticorpos (soro/plasma)	Genótipos possíveis
O	Nenhum	Anti-A, - B.-AB	OO
A ¹	A ¹	Anti-B	A ¹ A ¹ ; A ¹ A ² ; A ¹ O
B	B	Anti-A	BB; BO
A ¹ B	A ¹ e B	Nenhum	A ¹ B
A ²	A ²	Anti-B; eventual anti-A ¹	A ² A ² ; A ² O
A ² B	A ² e B	Nenhum; eventual anti-A ¹	A ² B

Fonte: Oliveira (2003)

Os testes imunohematológicos pré-transfusionais

Segundo Oliveira (2003) os testes imunohematológicos pré-transfusionais têm como objetivo fundamental garantir a compatibilidade sanguínea entre o doador e o receptor, a fim de que os componentes transfundidos tenham sobrevida aceitável e não causem dano ao receptor. Para atingir essa segurança, algumas etapas devem ser seguidas, tão logo seja indicada a transfusão:

- Requisição de transfusão e coleta de amostra de sangue do receptor.
- Tipagem ABO/Rh da amostra do receptor.
- Pesquisa de anticorpos irregulares na amostra de soro ou plasma do receptor.
- comparação dos resultados laboratoriais atuais com resultados prévios.

e) Confirmação de tipagem ABO/Rh no hemocomponente (em caso de sangue total / concentrado de hemácia).

f) Seleção de hemocomponentes respeitando-se a compatibilidade ABO/Rh.

g) Realização de prova de compatibilidade.

h) Identificação dos hemocomponentes com os dados de identificação do receptor.

i) Liberação dos hemocomponentes para transfusão.

Em relação aos procedimentos, Oliveira (2003) pontua que é necessário:

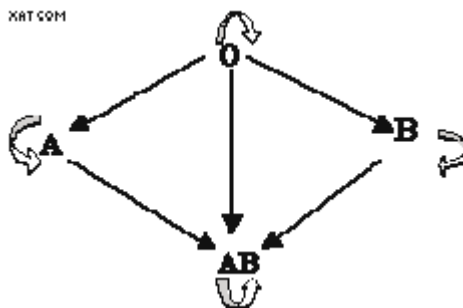
Requisição de Transfusão: o pedido de transfusão deve conter a maior quantidade possível de dados clínicos do paciente para avaliação da indicação, além de identificação clara e segura do receptor. Deve ser sempre assinada por médico, com nome completo e número do CRM. Deve conter de maneira legível, nome e registro hospitalar do paciente, hemocomponente solicitado e quantidade, quadro clínico e/ou diagnóstico, e característica da liberação, ou seja, rotina ou urgência, ou ainda se para uso em cirurgia ou para reserva cirúrgica. Dependendo do grau de urgência, e se o quadro clínico do paciente exigir transfusão imediata, o médico que solicita a transfusão deverá autorizar por escrito liberação de hemocomponentes sem a realização de provas de compatibilidade ou em andamento. Nessas situações, deve o médico solicitante estar ciente dos riscos a que estará sujeitando o receptor. Nos casos em que nem o tipo sanguíneo do paciente é possível realizar, sempre será transfundido hemocomponentes de compatibilidade "universal", ou seja, glóbulos vermelhos O negativo e plasma AB negativo, por exemplo.

Amostra do paciente: a amostra do paciente deve ser coletada por profissional habilitado e esta deve ser identificada com nome e registro do paciente, que devem obrigatoriamente estar de acordo com a requisição de transfusão, data e assinatura de quem coletou a amostra. É importante lembrar que o paciente quando internado em hospital, seja em Unidades de Terapia Intensiva ou em leitos comuns, deve conter pulseiras de identificação, para que o profissional que irá coletar a amostra possa identificá-lo com segurança. Nos serviços em este procedimento não é estabelecido, deve tomar muito cuidado no caso de pacientes confusos ou inconscientes, que não têm condições de responder o próprio nome completo ou quando não há acompanhantes que possa confirmá-lo, pois a coleta da amostra do paciente correto é muito importante para que seja realizada uma transfusão segura. Esta etapa é crítica, visto que, apesar de todos os avanços tecnológicos, as estatísticas mostram que a maior parte dos óbitos associados à transfusão ainda é resultado de falha de identificação da amostra/receptor.

Aproximadamente uma em cada seis transfusões incompatíveis ABO resultam de troca de amostra para os teste pré-transfusoriais. Por isso, os tubos coletados (um com anticoagulante e outro sem anticoagulante) devem ser rotulados no ato da coleta, e de preferência o profissional que coletou a amostra deveria instalar a transfusão. Para a realização dos testes pré-transfusoriais a amostra deve ser estocada entre 1 e 6°C e coletada até 48 horas antes da transfusão programada, após esse período outra amostra deverá ser solicitada. Após a transfusão a amostra será armazenada por um período de 7 dias pelo Banco de Sangue.

As transfusões podem ser:

- Isogrupo – quando doador e receptor são do mesmo grupo ABO
- Heterogrupo – doador e receptor são de grupo sanguíneo diferente



Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

Figura 2. A compatibilidades das transfusões

Terminologia ISBT

A terminologia internacionalmente aceita é a da ISBT (International Society of Blood Transfusion). O ISBT estabeleceu: 29 sistemas de grupos sanguíneos, 5 coleções de antígenos, a série 700 de antígenos de baixa frequência e a série 900 com antígenos de alta incidência.

Essa terminologia é baseada em números e estruturada em bases genéticas dos grupos sanguíneos para o agrupamento, sendo que a cada nova descoberta esses números são rearranjados e sua numeração original torna-se obsoleta e nunca é reutilizada.

Terminologia dos antígenos eritrocitários

Inicialmente os antígenos eritrocitários tinham a sua nomenclatura atribuída a letras (A, B, M, N, P). Depois, abreviações de nomes de indivíduos que tinham o anticorpo ou o antígeno reagente foram usadas (ex: Fy

para Duffy, Jk para John Kidd). Especificidades alternativas foram designadas por letras sobrescritas ou números subscritos (Jk, P), de acordo com sua frequência ou em ordem de descoberta.

EXEMPLOS DE TERMINOLOGIA CORRETA E INCORRETA

Descrição	Terminologia Correta	Terminologia Incorreta
Fenótipo	Fy(a+)	Fy ^a , Fy ^{ab} , Fy ^b , Fy ^{a+} , Fy ^{ab+} , Duffy ^{a+} , Duffy ^{ab} -positivo
Fenótipo	Fy(a+b-)	Fy ^{ab} , Fy ^{ab-} , Fy ⁽⁺⁾⁻ , Fy ^{MMO}
Anticorpo	Anti-Fy ^a	Anti Fy ^a Anti-DuffyA
Antígeno	K	Kell (nome do sistema)
Anticorpo	Anti K	Anti Kell (nome do sistema)
Fenótipo	K1+, K1-	K1+, K1+, K(1), K(1), K1-, K1-, K1- negativo
Fenótipos	ARh+, ERh-	A+ (significa antígeno A positivo) B- (significa antígeno B negativo)
Fenótipo	M+N	M(+), MM (infero genótipo)
Fenótipo	Rh-1,-2,-3,4,+5	Rh-1,-2,-3,+4,+5 Rh-1,-2,-3,-4,+5+

Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

Sistemas de grupos sanguíneos

De acordo com o Curso Teórico e Prático de Imunohematologia Eritrocitária na rotina de um laboratório de Imunohematologia encontramos alguns anticorpos que de maneira geral pertencem aos principais sistemas de grupos sanguíneos, e que os antígenos correspondentes normalmente estão descritos no diagrama de células dos painéis comerciais. Conhecer estes sistemas e saber as características de cada um dos antígenos e anticorpos é fator determinante para o bom desenvolvimento de uma identificação de anticorpos adequada. Abaixo, descrever-se-ão alguns sistemas:

c) Sistema de Kell

Terminologia ISBT

	Sistema		Principais antígenos						
	Kell	Kx	K	K (celano)	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Kx
Símbolo	KEL	XK	KEL1	KEL2	KEL3	KEL4	KEL6	KEL7	XK1
Número	006	019	006.001	006.002	006.003	006.004	006.006	006.007	019.001

Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

Figura 3. Sistema de Kell

Os antígenos do sistema Kell apresentam um polimorfismo marcado. Cada indivíduo herda dois complexos de três antígenos. K, e k, Kp e Kp, Js e Js de modo idêntico ao sistema Rh. Estudos sorológicos subsequentes revelaram o polimorfismo complexo do sistema do grupo sangü-

íneo Kell. A importância da associação de Kell e Kx foram deduzidos nos estudos de Ko (null) e fenótipos McLeod com o reconhecimento dos sintomas clínicos que acompanham o fenótipo McLeod. A ligação bissulfídica entre Kell e Kx foi demonstrada como ocorrendo entre Kell Cys 72 e Kx Cys347 (conforme mostra a figura). Por esta razão, os antígenos do sistema Kell são altamente suscetíveis à destruição com reagentes thiol. O significado funcional desta interação proteína-proteína permanece um mistério. A glicoproteína Kell é um membro da subfamília das endopeptidases do zinco cuja função principal é a ativação de peptídeos bioativos através da clivagem proteolítica específica de polipeptídeos precursores inativos. Preferencialmente é clivada a endotelin-3, um polipeptídeo de 41 aminoácidos, em Trp21-Ile22, criando a endotelin-3 bioativa (potente vasoconstritor). Um modelo da proteína de Kell baseada na estrutura do ectodomínio da endopeptidase neutra (NEP – enzima que apresenta participação na regulação da pressão sanguínea) indica que Kell e a NEP usam os mesmos aminoácidos homólogos na coordenação do zinco e na hidrólise peptídica, mas aminoácidos diferentes na ligação ao substrato.

d) Sistema KIDD

Terminologia ISBT

	Sistema	Antígenos		
	Kidd	Jk ^a	Jk ^b	Jk3
Símbolo	JK	JK1	JK2	JK3
Número	009	009.001	009.002	009.003

Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

Figura 4. Sistema KIDD

É um sistema de locus único, apresentando dois antígenos (Jk e Jk). Existem quatro fenótipos possíveis: Jk(a-b-); Jk(a+b-); Jk(a-b+); Jk(a+b+). Jk (a-b-) é um fenótipo raro. A proteína que carrega os antígenos do grupo sanguíneo Kidd é um produto de um único gene, JK ou SLC1A1 (conhecido anteriormente como HUT11) da família dos transportadores de uréia. O gene é organizado em 11 exons distribuídos em 30kb. É uma glicoproteína integral da membrana com 10 domínios. Como um transportador de uréia, ela pode assumir o papel de preservar a estabilidade osmótica e deformabilidade do eritrócito. O gene transportador de uréia no eritrócito possui uma sequência 61% idêntica ao gene transportador de uréia

dos rins em humanos. A base molecular dos antígenos Kidd foi descoberta recentemente, mas a participação do antígeno Kidd no transporte de uréia é conhecida há pelo menos duas décadas.

e) Sistema DUFFY

Terminologia ISBT

	Sistema	Antígenos				
	Duffy	Fy ^a	Fy ^b	Fy3	Fy5	Fy6
Símbolo	FY	FY1	FY2	FY3	FY5	FY6
Número	008	008.001	008.002	008.003	008.005	008.006

Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

Figura 5. Sistema DUFFY

Os antígenos Fy e Fy são o produto de alelos co-dominantes que residem em uma glicoproteína ácida (gp-Fy), que transpassa a membrana sete vezes e tem um N-Terminal no domínio extracelular e um C-terminal no domínio intracelular. Estão descritos 5 antígenos neste sistema, como mostra a tabela acima. A transcrição do Duffy abrange 1572 nucleotídeos, incluindo o exon 1 de 55 nucleotídeos, um único intron de 479 nucleotídeos e o exon 2 de 1038 nucleotídeos. O exon 1 codifica os sete resíduos que estão na estrutura com os 329 resíduos no exon 2. A característica mais notável da glicoproteína é ser um receptor para o Plasmodium vivax, o parasita da malária.

f) Sistema MNS

	Sistema	Principais antígenos							
	MNS	M	N	S	s	U	He	V ^m	
Símbolo	MNS	MNS1	MNS2	MNS3	MNS4	MNS5	MNS6	MNS9	
Número	002	002.001	002.002	002.003	002.004	002.005	002.006	002.009	

Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

O Sistema MNS é o segundo mais complexo grupo sanguíneo levando em consideração o número de antígenos atribuídos a este sistema, aproximadamente 40. Os antígenos são expressos em duas glicoforinas A e B, sendo produto de dois genes homólogos (GYPE é uma glicoforina hipotética). Os antígenos M e firmemente ligados GYPA, GYPB N estão localizados na glicoforina A, e S e s na glicoforina B (ver figura). GPA e GPB são proteínas da membrana do tipo I. GPA compreende a maioria das

principais sialoglicoproteínas da membrana do eritrócito, apresentando-se com aproximadamente um milhão cópias por célula; É composta por aproximadamente 50% de carboidratos, situados em seu domínio extracelular. O nível de GPB na superfície da membrana é um décimo menor, apresentando a mesma disposição de GPA. As glicoforinas ligadas à membrana eritrocitária, conferem à célula (na região do glicocálix) uma carga elétrica negativa. Estas cargas impõem forças de repulsão entre os eritrócitos (verificar potencial zeta). Devido à ocorrência de homologia com a maioria dos primatas, a designação pode incluir um H (humano) na frente do nome da proteína ou do gene.

g) Sistema DIEGO

Terminologia ISBT

	Sistema	Principais antígenos			
	Diego	Di ^a	Di ^b	Wr ^a	Wr ^b
Símbolo	DI	DI1	DI2	DI3	DI4
Número	010	010.001	010.002	010.003	010.004

Fonte: Curso Teórico e Prático de Imuno-Hematologia Eritrocitária

Figura 7. Sistema DIEGO

Os antígenos estão ancorados na glicoproteína Banda 3, a principal proteína integral da membrana eritrocitária, produto de um único gene, SLC4A1. A Banda 3 eritrocitária faz parte de uma família de três proteínas que realizam troca de ânions AE1, AE2 e AE3 expressas em vários tecidos. A Banda 3 consiste de dois domínios estrutural e funcionalmente muito independentes descritos logo a seguir. A mutação 166A>G no gene SLC4A1 (AE 1) que codifica a banda 3 dá origem a uma proteína variante, chamada banda 3-Memphis. Podem ser distinguidos dois tipos de banda 3 Memphis: variantes I e a e apresenta maior II. A banda 3 Memphis II está associada à presença do antígeno Di DIDS do que a Memphis I e a banda 3 normal. afinidade de reação covalente com o H 2 a está sempre associado à presença da banda 3-Memphis, caracterizando a O antígeno Di a b variante Memphis II. Até 1990, somente os antígenos Di e Di eram conhecidos.

Pacientes com teste de Coombs direto positivo

Ferreira et al (2007) determinaram a prevalência de anticorpos anti-eritrocitários de grupo sanguíneo foram analisadas 247 amostras de sangue de pacientes com malá-

ria vivax e falciparum com teste de Coombs direto positivo atendidos na Fundação de Medicina Tropical Manaus-Amazonas no período entre setembro/99 a março/2000. Realizaram-se os testes laboratoriais de Coombs direto, dosagens de hemoglobina, bilirrubina e eletroforese de proteínas. Das amostras testadas, 13,3 % apresentaram Coombs direto positivo, sendo o anticorpo da classe IgG (33,3 %) o mais freqüente. Dos pacientes com malária vivax e Coombs direto positivo, 17% apresentaram anemia possivelmente devido à hemólise por auto-imunidade com o envolvimento da gamaglobulina IgG. Não foram detectados anticorpos contra antígenos de grupos sanguíneos nem aloanticorpos séricos. Torna-se necessário a realização de outras pesquisas para avaliação da existência de associação entre a positividade do Coombs direto e anemia ou se a mesma interfere ou não com o curso da doença.

Carlos et al (2002) relatam um caso sobre um paciente masculino, 21 anos, pardo, electricista, atendido no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HC – UFC) em fevereiro de 2001 com história de episódios de icterícia e urina escura há 12 meses. Relatava também palidez progressiva, fraqueza e dispnéia aos médios esforços. Referiu antecedentes de infecção por Herpes zoster há oito anos, exposição à radiação eletromagnética durante quatro anos e transfusões sanguíneas. Apresentava antecedente familiar de leucemia em um primo. Além de moderada palidez cutâneo-mucosa e de discreta icterícia, não exibia outra alteração ao exame físico. Exames laboratoriais revelaram: Hb=6,8g/dl, Ht=20,8%, VCM=104fl, anisocitose, anisocromia, macrocitose, poiquilocitose, policromasia, pontilhado basófilo; L=3,8x10⁹/L (1% bastão, 60% segmentados, 37% linfócitos, 2% monócitos); P=24x10⁹/L; reticulócitos corrigidos=2,6%. Teste de Coombs direto positivo (IgG, C3d). Sorologia positiva apenas para anti-HBc. Mielograma: aspirado medular hipoplásico com depósito de ferro presente. Pesquisa de hemossiderina na urina negativa. Biópsia óssea: medula óssea com as três linhagens presentes, hiperplasia eritróide, ausência de condensação na rede de reticulina. Teste de Ham positivo. Citometria de fluxo: não expressão de CD55 e CD59 em cerca de 50% dos granulócitos e 30% dos eritrócitos, cerca de 50% dos monócitos não expressa o CD14. O paciente foi encaminhado para realização de transplante alogênico de medula óssea. Ressalta-se que a anemia ferropriva é com freqüência uma característica dos pacientes com HPN de larga evolução e é secundária e hemoglobinúria e hemossidénúria. No caso relatado, o paciente não apresentou anemia ferropriva, e sim anemia hemolítica auto-imune (AHAI), confirmada pelo teste de Coombs direto positivo.

Cianciarullo et al (2003) verificaram a prevalência de marcadores imunohematológicos, representados pelos testes de Coombs indireto, direto e de eluição com

identificação do anticorpo detectado; incidência de doença hemolítica e de tratamento entre os recém-nascidos sensibilizados. Em relação aos métodos pontua-se que o Estudo do tipo Coorte foi de janeiro de 1996 a julho de 1998, consistiu na descrição da análise dos perfis imunohematológicos de 1698 pares de mães e recém-nascidos como fator de risco para doença hemolítica, subdivididos de acordo com os marcadores. A metodologia empregada para identificação dos marcadores foi o da microplaca com hemácias de triagem, soro antiglobulina humana e gel centrifugação. Para tipagens e fenotipagens utilizou-se o método de microplaca com soros monoclonais. Para o estudo da incidência e seguimento neonatal foram realizadas bilirrubinas totais e frações, por método enzimático colorímetro, hemoglobina e hematócrito, automatizado e reticulócitos, por coloração supra vital, azul cresil brilhante e leitura por microscopia óptica.

Como resultado observou-se a prevalência de marcadores imunohematológicos associados à doença hemolítica foram de 9,07%. Por grupos estratificados obtivemos no grupo com Coombs indireto (grupo I) 0,43%; no grupo com Coombs direto (grupo D), 4,10% e no grupo com eluição (grupo E) 4,53%. A incidência de doença hemolítica no estudo foi de 36,23%. Quando estratificada por grupos, obtivemos no grupo I, 33,56%, no grupo D, 44,43% e no grupo E, 29,24%. O tratamento com fototerapia foi necessário em 36,23% dos RN, sendo maior sua indicação no grupo D e a exsangüíneotransfusão foi necessária em 0,88% dos RN, sendo maior sua indicação no grupo I.

Concluiu-se que o grupo I, onde se concentram as incompatibilidades Rh, apresentou maior incidência de doença hemolítica e maior necessidade de tratamento com exsangüíneotransfusão, o que mostra ainda a gravidade deste sistema em nosso meio. O grupo D, onde se concentram as incompatibilidades ABO, apresentou maior incidência de doença hemolítica e tratamento com fototerapia e menor necessidade de exsangüíneotransfusão.

CONCLUSÕES

O teste de Coombs contribui diretamente para o diagnóstico da anemia auto-imune, pois sua positividade confirma que o anticorpo foi fixado in vivo à hemácia do paciente, auxiliando dessa forma o diagnóstico diferencial com outras anemias hemolíticas, como as causadas por alterações da hemoglobina ou da estrutura da hemácia. É importante também no diagnóstico das anemias hemolíticas do recém-nascido e das anemias induzidas por drogas. Embora o teste de Coombs seja extremamente sensível, um resultado negativo não exclui a presença de anticorpos ligados às hemácias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIL, M e CASAIS, C. Anemia hemolítica auto-imune problemas de diagnóstico e tratamento em apresentação pouco frequentes: discussão de 5 casos clínicos. Revista ABO, n.1. março, 2000.
- AMIL, M e CASAIS, C. Particularidades técnicas no estudo de doentes com teste de antiglobulina direto positivo e hemólise. Revista ABO, n1. março, 2000.
- CIANCIARULLO et al. Prevalência de marcadores imunohematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo. Rev. Assoc. Med. Bras. v.49, n.1, 2003
- DURAN, JA, RODRIGUES, MJ. Teste de antiglobina: ausência de significado clínico como teste pré-transfusional. Revista ABO. n.1, março, 2000.
- FERREIRA et al. Anticorpos anti-eritrocitários em pacientes com Coombs direto positivo infectados com malária por *P.vivax* e *P. falciparum*. Rev. Bras. Na. Clin. v.39, n.4, p.311-314, 2007.
- GHILARDI et al. Análise clínica laboratorial na sensibilização eritrocitária perinatal com a realização de estudo imunohematológico pela gel-centrifugação. Bol. Soc. Bras. Hematol. Hemoter. v.17, n.170, p.59-63, 1995.
- LOPES, C, DURAN, JA. Importância do teste de antiglobulina direto na proteína transfusional de rotina. Revista ABO. Número 15. Setembro, 2003.
- OLIVEIRA, R. R. Imunohematologia e transfusões. Academia de Ciência & tecnologia [monografia]. Curso de Pós-Graduação Lato-Sensu em Imunologia Clínica. Abril, 2003.
- NOVARETTI et al. Resolvendo um caso de ABO discrepante através da genotipagem rápida por PCR-RFLP. J. bras. patol. v.37, n.3, p.175-176, 2001.
- NOVE DE JULHO. Curso Teórico e prático de imunohematologia eritrocitária. Módulo I. 2008.
- PROCIANOY et al. Teste de Coombs Direto e teste quantitativo do eluato no diagnóstico da doença hemolítica ABO do recém-nascido. J. pediatr. v.63, n.2, p.98-100, 1987.
- ROOSE. Hemolytic Anemias and Acute Blood Loss. In Harrison's Principles of Internal Medicine, edited by Anthony S. Fauci, et al. New York: McGraw-Hill, 1997
- RUIZ et al. Frequência de aloanticorpos e auto-anticorpos em pacientes politransfundidos atendidos pelo Hemonúcleo de Catanduva (Hemorede-Funfarme) Disponível em: http://www.crbm1.com.br/bio67/artigocien_67.asp. Acessado em agosto de 2008.
- SEGRE ET al. Estudo de uma população com teste de Coombs direto positivo em sangue do cordão: análise de 92 casos. Rev. paul. pediatr. v.3, n.10, p.21-5, 1985.
- ZARANDONA et al. The role of the Coombs test in evaluating hemolysis in adults. Department of Pathology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa.; †Medical Director, RBC Serology Reference Laboratory, Centralized Transfusion Service, Institute for Transfusion Medicine, Department of Pathology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pa.