

VILANY FRANCO PEREIRA DA SILVA

USO DA PAPAÍNA NA PESQUISA DE ANTI-
CORPOS IRREGULARES EM DOADORES DE
SANGUE.

Trabalho apresentado como
requisito final ao curso de
Especialização em Hematolo-
gia e Hemoterapia, convênio
UFC-MEC-BID III

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza - Ceará

1986

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

AOS MESTRES:

JOSÉ MURILO MARTINS, MARIA DA SILVA PITOMBEIRA,
MARIA NEUMANN DE ALENCAR CUNHA E MARIA PIEDADE CALMON VERGNE.

AOS DOUTORES:

MARFISA NEVES FUGITA E ORMANDO RODRIGUES CAMPOS.

AGRADEÇO A COMPREENSÃO, CARINHO E APOIO
DE MEU ESPÔSO E FILHOS.

INDICE

- I - INTRODUÇÃO
- II - MATERIAL E MÉTODOS
- III - RESULTADOS
- IV - DISCUSSÃO
- V - CONCLUSÃO
- VI - BIBLIOGRAFIA

USO DA PAPAÍNA NA PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES EM DOADORES DE SANGUE**

Vilany Franco Pereira da Silva*

Pesquisa realizada em 200 doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), introduzindo o uso da papaína obtida a partir do leite do mamão, para detecção de anticorpos irregulares.

I - INTRODUÇÃO

Em 1947, Morton e Pickles, introduziram as técnicas enzimáticas para detecção de anticorpos incompletos(7). A maioria dos anticorpos naturais são do tipo IgM e completos(aglutinam em salina), os imunes são IgG e incompletos (não aglutinam em salina). Para a detecção de IgG,devemos usar artifícios tais como: o aumento da concentração proteica do meio,pelas técnicas de albumina, antiglobulina humana e enzimas proteolíticas(2).

* Trabalho realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará(HEMOCE).

** Farmacêutica da Universidade Federal do Ceará, lotada no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará(HEMOCE).

As enzimas mais utilizadas nas investigações imunohematológicas são: a Bromelina (obtida do abacaxi, Ananás sativus), a Ficina (Ficus ~~ma~~ CARICA) ⁽¹⁰⁾ e a Papaína (do mamão Carica papaya) (1)(2)(26)(30). Todas com ação proteolítica, agindo a nível da membrana globular, reduzindo o potencial Zeta em solução salina isotônica, depois de modificar os sítios antigênicos, pela remoção dos grupamentos carboxílicos do ácido siálico da superfície das hemácias(5-21-27-28).

As técnicas enzimáticas são sensíveis para detecção de anticorpos anti-Rh, bem como para outros anticorpos incompletos, embora os receptores de células vermelhas M,N,S,Fy^a,Fy^b, e Xg^a sejam por elas destruídas(22)(26)(27). ^{Pr}

Neste tocante a utilização das enzimas, facilitará em parte a identificação de anticorpos irregulares quando não positivos pela reação enzimática.

A finalidade do presente trabalho, foi testar a possibilidade do emprego da técnica de obtenção da papaína, diretamente do mamão papaia e estudar a viabilidade na pesquisa de anticorpos irregulares.

II - MATERIAL E MÉTODOS

Soro obtido a partir de amostras de sangue, coletados aleatoriamente de 200 doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará(HEMOCE), para pesquisa de anticorpos irregulares.

A referida pesquisa foi feita por técnicas enzimáticas, em paralelo com a já tradicionalmente usada, TCI ou antiglobulina humana. A enzima utilizada, foi a papaína colhida do mamão verde, por escoriações superficiais leves(29). A coleta foi feita em placa de Petri e desidratada em estufa a 37°C por 48 h, até completa secagem. Trituramos em um gral e preparamos uma solução a 1%, em salina fisiológica a 0,9%, o PH foi 5,8(12-15). Colocamos em B.M. a 37°C durante 1 hora agitando várias vezes. Dividimos em pequenas alíquotas e guardamos em freezer a -20°C. A solução permanecerá estável durante 4 meses aproximadamente(1). Para uso da solução de papaína realizamos uma curva de atividade enzimática Figura(1), sendo a mesma repetida a cada nova solução de papaína preparada.

TABELA II

Atividade enzimática nos diversos sistemas sanguíneos

Sistemas sanguíneos	Rh	Kell	Duffy	Kidd	Xg	Lewis	MNS	P	Lutheran	Hy	Gy
Atividade	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+

(*)(+) Reage pela atividade enzimática

(*)(*)(-) Não reage fracamente ou não reage pela atividade enzimática

Preparamos um "Pool" de sangue O^+ do dia e papainizamos as hemácias (1 gota de papaína para 1 gota de hemácia).

Em 15 tubos previamente numerados, colocamos 1 gota de hemácia papainizada mais 2 ml de salina 0,9%. Incubamos por 15 minutos a $37^{\circ}C$, cronometrados, a cada minuto retiramos um tubo em ordem crescente. Após os 15 minutos centrifugamos todos os tubos, decantamos a salina parcialmente. Retiramos 01 (uma) gota da hemácia papainizada e colocamos em tubo de hemólise com 2 (duas) gotas de soro previamente testado como positivo com antiglobulina humana.

Centrifugamos 20 s a 3.500 rpm, anotamos os resultados da aglutinação de 0 a + 4 Fig. 1. A observação da leitura é macroscópica.

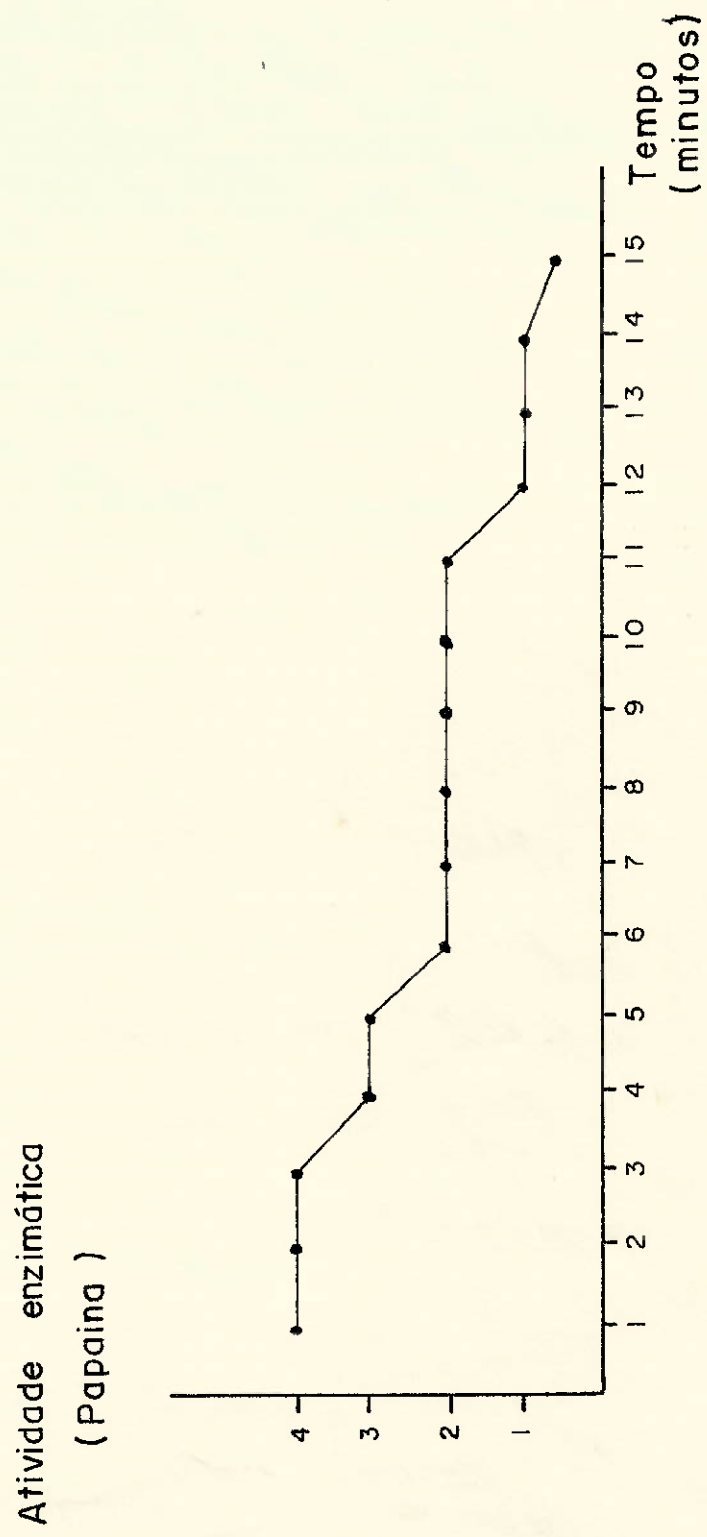
- TÉCNICA DO EMPREGO DA PAPAÍNA -

Para detecção de anticorpos em nossa pesquisa.

- 1º) - Diluímos a solução estoque de papaína de 1:20(20)(26).
- 2º) - Preparamos um "Pool" de O^+ de sangue do dia.
- 3º) - Papainizamos as hemácias (1 gota de pool de O^+ para uma gota de papaína).
- 4º) - Colocamos 1 gota de hemácia papainizada em tubo de hemólise e levamos ao B.M. por 2 minutos (tempo ideal por nós considerado).
- 5º) - A seguir colocamos 2 gotas de soro do doador, centrifugamos por 20 s a 3.500 rpm, vemos macroscopicamente em espelho côncavo. A sensibilidade do teste para diversos tipos de anticorpos está expresso na tabela 2. Todos os nossos soros examinados pelo teste da papaína, foram submetidos ao teste de Coombs como grupo controle.

Utilizamos soros de pacientes com anticorpos irregulares testado pelo TCI como positivo.

FIGURA I



III- RESULTADO

Em nossos testes a atividade melhor observada foi de 1 a 3 minutos.

Dos 200 doadores examinados para pesquisa de anticorpos irregulares pelo método das hemácias papaínizadas, 100% apresentaram resultados negativos.

As mesmas amostras de soro submetidas ao teste de "Coombs" indireto, mostraram idênticos resultados (controle negativo).

Quando a técnica pela papaína foi empregada em soros inicialmente positivos pelo TCI houve confirmação dos anticorpos irregulares (controle positivo).

Obtivemos resultados positivos de pesquisa com hemácias papaínizadas com pacientes com Lúpus, cujo anticorpos irregulares anti-Le^b e anti- $\tilde{s}$ havia sido identificado previamente por antiglobulina humana.

TABELA I

Medida da atividade enzimática a 37° C durante 15 minutos

Tempo (minutos)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Atividade (*) enzimática	+++	++++	++++	++++	++++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+ —

(*) Atividade enzimática em cruzeiros.

V - CONCLUSÃO

Devido a pequena mostragem de doadores, não encontramos presença de anticorpos irregulares em nenhum dos testes examinados.

Mesmo com a simplicidade na preparação da papaína, sem uso da L-cisteína e do tampão de Sorensen não tivemos dúvidas quanto à atividade da papaína nas reações realizadas, pois outros testes foram feitos em pacientes já comprovadamente positivos para anticorpos irregulares.

Estes resultados iniciais nos animaram a colocar em credibilidade os resultados com uso da papaína para pesquisa de anticorpos irregulares obtida de modo simples e ^abaixo custo, incentivando-nos a continuar nosso trabalho para ampliação da amostragem.

IV - DISCUSSÃO

A vantagem de enzimas tratadas para detecção de anticorpos atípicos, é bem conhecida(4).

Trabalhos tem mostrado o largo emprego da papaína em complementação às técnicas com albumina, antiglobulina humana, muitas vezes com melhor realce, frente a anticorpos raros, como no caso do anti-Holley detectado após uma transfusão de sangue incompatível(3).

Diferentes técnicas sempre evidenciando a importância do uso da papaína frente a determinados métodos de pesquisa é bem mostrado na literatura(8-9-10-17-18-19-23-24-25-).

Na anemia AHAI também sua ação está comprovada frente as técnicas enzimáticas(11).

Em sistema ABO e Rh as enzimas mostram sua importância na detecção de anticorpos naturais, imunes ou adquiridos(6-13-14-16).

Diante de tantas evidências é imprescindível o uso de enzimas em nossos estudos.

SUMMARY

We studied 200 blood donnors from Hematology
and Hemoterapy Center.

VI - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

01. ALLEN, N.K. Manual Hyland de Immunohematologia Travenol laboratories, inc. California 1963.
02. AMERICAN ASSOCIATION OF THE BLOOD BANKS - Technical Manual Eight Edition. I.B. Lippincott Co.; Publ, 442 p, Philadelphia, 1981.
03. BEATTIE, K.M. & CASTILLOS, S A Casa report of a Hemolytic transfusion reaction caused by anti-Holley. Transfusion, 15(6):476-80,1975.
04. BELL, C.A, ZWICKER, H. & NEVIVS, D.B. Nonspecific Warm Hemolysins of papain - treated cells: Serologic charecte - rization and transfusion risk. Transfusion, 13(4): 207-13,1973.
05. BRYANT, N.J. AN INOTRODUCTION TO IMMUNOHEMATOLOGY. 2 ed. Philadelphia,W.B. Sanders, 1982.
06. BRYANT, N.J.; SHANAHAN, L.S.; SUTTON, D.M. A rapid tube technique for fetal cell typing. Transfusion, 19(2): 190-1, 1979.
07. DACIE, J.V. & LEWIS, S.M. Hematologia Preatice - 2 ed. Barcelone Ediciones Toray 1970.
08. DALE, I. A Method for preservation of papainized and Rh - sensitized red cells. Transfusion, 13(3): 135-7, 1973.
09. DREW, S.I; CASTER, B.M; GUIDERA, D.; LEE,K.E.; SASAKI,M.; TERASAKI,P.I. & GALE,R.P. Further aspects of microgranulocytotoxicity. transfusion, 19(4): 434-43, 1979.
10. GARRATTY, HAFFLEIGH; DALZIEL J.; PETZ, D.An IgG anti-I^T detected in causin american Transfusion, 12(5): 325-9,1972.
11. GOLDFINGER, D.; ZWICKER, H.; BELKIN,G.A. ISSITT, P.D. An autoantibody with ant-Wr^b specificity in a paticut with warm autoimmune hemolytic anemia transfusion, 15(4):351-2, 1975.
12. GOUDEMOL, M & DELMAS MARSALET, Elemento de immuno - hematologia. S.N.T. P. 243.
13. HEISTO, H & FAGERHOL, M.K. A strong antibody reacting with enzyme modified E positive red blood cells.transfusion, 19(5): 545-7, 1979.
14. HEISTO, H, Pretransfusion blood group serology limited value of the anti-globulin phase of the crossmatch when a careful sereeming test for unexpected antibodies is performed. Transfusion, 19(6): 761-3, 1979.
15. IMMUNO hematologe pratique: Techriques d'immuno - hematologie. Paris Service d'Immunologie, s.d. 4 T. T.1.

16. ISSITT, DC; ZELLNER, D.C.; ROLIH, S.D.; DUCKETT, J.B. Autoantibodies mimicking alloantibodies. Transfusion 17(6): 531-8, 1977
17. ISSITT, P.D.; ISSITT, C.H.; MOULDS, J.; BERMAN, J. Some observations on the T, Tn and sd^a antigens and the antibodies that define them. Transfusion, 12(4): 217-21, 1972.
18. KITAGAWA, S; LEE, C.L.; BEHZAD, O. Donor antibody - detection using plasma in place of serum. Transfusion, 19(1): 61-1, 1979.
19. LEIKOLA, J. & PERKINS, A. Red cell antibodies and low ionic strength: A study with enzyme-linked antiglobulin test. Transfusion, 20 (2): 224,8, 1980.
20. LOW, B. "A practical method using papain and incomplete Rh antibodies in routine Rh blood - grouping" Vox Sang; (Brasileia) 5,94-1955
21. MARLETTA, J. Hemoterapia e imunohematologia. Buenos Aires, Científico Técnicas Americanas, 1979, 367 p. cap. 21. p. 301-4.
22. MOLLISON, P. J. Blood Transfusion in clinical medicine 7 ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1983, 988 p. cap. 6 p. 252 - 7. cap. 11 497-501.
23. MOLLISON, P.L.; MOORE, H.C. Use of a Low ionic strength medium in manual tests for antibody detection. Transfusion, 16(4) 291-6, 1976.
24. MOREHEAD, K; ANDERSON, K; GRUNEWALD, S; CASSEY, D; MCCULLOUGH, J.A. Comparison of autoanalyzer and manual methods for red cell antibody Screening. Transfusion, 15(6): 586-9, 1974.
25. MURRAY, S. & DEWAR, P.J. Low molecular weight dextran and matching by enzyme techniques. Transfusion, 11(6): 378-80 1975.
26. PELLIZZA, S.M.; BERTHIER, M.E.O.; GONZAGA, A.L. Manual de imunohematologia. Rio de Janeiro, Centro de Hematologia Santa Catarina, 1976.
27. PELLIZZA, S.M.; BERTHIER, M.E.O. GONZAGA, A.L. Manual de imunohematologia. Rio de Janeiro, Centro de Hematologia Santa Catarina. Rio de Janeiro - 1977 Vol. 1.
28. PITTIGLIO, DH, BALDWIN, A J. SOHMER P.R. Modern blood banking and transfusion practices. 2 ed. F.A. Davis company. Philadelphia, 1984.
29. VERGNE, M.P.C. Comunicação Pessoal, 1985.
30. WIMTROBE, M.M.; LEE, G.R.; BOGGS, D.R.; BITHELL, T.C.; FOESTER, J.; ATHENS, J.W.; LURENS, J. Transfusion of blood and blood components. In: Clinical hematology. 8 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1981. Cap. 19. p. 499.

