

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ – HEMOCE

*Eluição para Identificação de Anticorpos
Anti-eritrocitários pela Glicina Ácida*

Fátima Nazaré Galvão Sales

Fortaleza-Ceará
2002

Dr. Helen

Seleção para Identificação de Anticorpos Anti-eritrocitários pela Glicina Ácida

Fátima Nazaré Galvão Sales*

Monografia apresentada como requisito
final do XVII curso de especialização em
Hematologia e Hemoterapia

Orientadores: Dra. Vilany Franco Pereira
da Silva, Dra. Vânia Barreto Aguiar
Ferreira Gomes, Dra. Luciana Maria de
Barros Carlos

*Farmacêutica – Bioquímica e aluna do XVII Curso de Especialização em Hematologia
e Hemoterapia

Fortaleza-Ceará
2002

*“Há duas fontes perenes de alegria pura:
o bem realizado e o dever cumprido”*
E. Girão

*Ao meu Marido por tudo que representa na
minha vida, por compartilhar de todos os
meus momentos, inspirando-me e
incentivando-me para torna-los melhores.*

*Aos meus filhos, Luciana, João César Jr.
e especialmente a Liana, pela grandiosa
ajuda nos momentos difíceis.*

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Vilany Pereira Franco pela amizade, orientação e incentivo deste trabalho;
- À Dra. Luciana M^a Barros Carlos pela valiosa ajuda nas horas de incertezas e dúvidas;
- À Dra. Fca Vânia Barreto Aguiar Ferreira Gomes, pela orientação e generosa ajuda.
- Aos professores do curso pelos conhecimentos transmitidos, especialmente ao Dr. Herivaldo Ferreira da Silva e a Dra. Alana Jocelina M. de Castro;
- À Dra. Herene Barros M. Lucena pela amizade e ajuda na execução deste trabalho;
- Aos Drs. Annecy, Tânia e João, colegas de trabalho, pela colaboração e compreensão durante o curso.
- À Dra. Vitória, primeira a incentivar a realizar este curso;
- À Zilma, Solenis, Auxiliadora, Alexandra e todos os funcionários do setor de imunohematologia, pela colaboração na prática deste trabalho
- Aos meus colegas de curso, pela amizade, companheirismo e solidariedade, Regina, Gabriela, Natyele, Leda, Débora e João.
- Aos funcionários do Hemoce pela ajuda, amizade e compreensão no decorrer do curso, em especial: Cleidimar, Telma, Cecília, Viviane, Célia e Chiquinha.
- Todos que participaram, direta ou indiretamente para a realização deste

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- A “Deus”, que está acima de todas as coisas;
- Aos meus pais, Eliezer Ramos Galvão (in memoriam) e Maria Nazaré Galvão, que deram-me mais que a vida, ensinaram-me a viver.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE GRÁFICOS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
DISCUSSÃO.....	19
RESULTADOS.....	22
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	33

LISTA DE TABELAS

1. Distribuição das Amostras de Eluato com Glicina Ácida.....	22
2. Distribuição das Amostras Estudadas Quanto ao Sexo.....	23
3. Distribuição das Amostras de Eluato com Glicina Ácida (Quanto a Identificação dos Anticorpos)	24
4. Distribuição das Amostras de Eluato com Glicina Ácida Positivas (no Tai em Relação ao Sexo)	25
5. Distribuição das Amostras Estudadas..... (Quanto a Classe de Imunoglobulinas e da Fração do Complemento)	26
6. Distribuição dos Anticorpos Identificados Através do Eluato com Glicina Ácida (de acordo com a especificidade)	27

LISTA DE GRAFICOS

1. Distribuição das Amostras de Eluato com Glicina Ácida	22
2. Distribuição das Amostras Estudadas Quanto ao Sexo	23
3. Distribuição das Amostras de Eluato com Glicina Ácida	24
(Quanto a Identificação dos Anticorpos)	
4. Distribuição das Amostras de Eluato com Glicina Ácida Positivas	25
(no Tai em Relação ao Sexo)	
5. Distribuição Das Amostrar Estudadas.....	26
(Quanto a Classe de Imunoglobulinas e da Fração do Complemento)	
6. Distribuição dos Anticorpos Identificados Através do Eluato com Glicina.....	27
Ácida (de acordo com a especificidade)	

RESUMO

Foi realizado estudo com o objetivo de identificar anticorpos anti-eritrocitário em TAD positivo através do método de eluição pela glicina ácida.

De 84 eluatos, 53 foram negativos 31 foram positivo. Nas eluições positivas 26 tiveram panaglutinação e 5 anticorpos foram identificados.

Nós concluimos que a avaliação de um TAD positivo poderá ser restrita para aqueles pacientes com suspeita de hemólise imune.

ABSTRACT

The aim of the study realized was to identify the red blood cell antibody by the acid glicin elution. Of the 84 elutions, 53 were negatives, 31 were positives. In the positives elutions, 26 were panagglutions, and 5 had the red blood cell antibody identified.

INTRODUÇÃO

Em 1945 Coombs, Mourat e Race descreveram uma técnica já descrita por Moreschi em 1908 mas não divulgada, que permitia a detecção de anticorpos não aglutinantes “in vitro”, utilizando o soro antiglobulina humana — o teste de Coombs indireto (TAI).^(12, 14, 9)

No ano seguinte, os mesmos autores demonstraram a sensibilização “in vivo” dos eritrócitos anti-RH, na doença hemolítica peri-natal(DHPN), permitindo assim a elucidação de sua patogênese, através de uma técnica conhecida como teste de antiglobulina direta (TAD). O teste de antiglobulina (direto e indireto) pode, assim ser considerado a maior descoberta da medicina transfusional, depois do sistema ABO.^(12, 14, 01)

O teste de Coombs direto (TAD) positivo permite detectar “in vivo” o revestimento dos eritrócitos por imunoglobulinas ou frações do complemento . A sua importância não se restringe à DHPN, mas também ao estudo das reações transfusionais e no diagnóstico das anemias hemolíticas induzidas por drogas ou por outros auto-anticorpos, sendo a sua realização obrigatória sempre que existir em sinais de hemólise com suspeita de mecanismo imune.^(14, 09)

Porém, do mesmo modo que um resultado negativo não exclui a existência de anemia hemolítica, um resultado positivo não implica necessariamente na sua existência.^(14, 22)

A eluição é um processo pelo qual células que estão revestidas com anticorpos são tratadas, por uma variedade de técnicas químicas e imuno-químicas, levando ao rompimento das ligações entre o antígeno e o anticorpo, liberando-o e possibilitando sua identificação. O anticorpo pode ser eluído da superfície da hemácia e identificado utilizando-se a técnica do TAI. Portanto a partir de um TAD positivo e um TAI negativo existe a necessidade de identificação do anticorpo envolvido através de técnicas de eluição.^(13, 14)

As técnicas de eluição são associadas ao ataque das ligações covalentes do complexo Ag-Ac, com o objetivo de causar sua dissociação⁽¹³⁾. Esse ataque, às vezes pode não ser suficiente para realizar a dissociação, e em algumas circunstâncias essa ligação poderá não ser dissociada.

Existem fatores (Forças de Van de Waals, Forças eletrostáticas, Pontes de Hidrogênio, ligações hidrofóbicas.) responsáveis por prender o complexo Antígeno-Anticorpo, e através das técnicas de eluição, são modificados permitindo sua dissociação ^(04, 09, 20). A eluição pode ser feita por diversos processos: calor, modificação do pH e/ou da força iônica, solventes orgânicos etc, fornecendo energia ao sistema retirando os anticorpos das hemácias. ^(09, 13)

As técnicas de eluição agem quer alterando a termodinâmica da reação antígeno-anticorpo, quer neutralizando ou revertendo as forças de atração que mantêm junto o antígeno e o anticorpo, quer por outros meios. ⁽⁰⁹⁾

A eluição pelo método da glicina ácida pode ser usada para dissociar anticorpos moleculares da membrana do eritrócito. Este procedimento tem sido usado com sucesso em preparos de eluato. ⁽¹³⁾

O princípio da eluição pela glicina ácida é a modificação do pH do meio. Ela foi aperfeiçoada por Rekving and Hannestad que aplicaram solução de tampão de glicina ácida para células intactas e observaram que anticorpos de diferentes afinidades poderiam ser eluídos por redução do pH da solução tampão. ⁽⁰⁴⁾

O objetivo do presente trabalho foi identificar anticorpos anti-eritrocitários em TAD positivo, através da técnica de eluição pela glicina ácida.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 84 amostras de sangue de pacientes com TAD positivo, sem transfusões sangüíneas há pelo menos 4 meses no laboratório de imunohematologia do HEMOCE no período compreendido entre outubro/2002 e março/2003. A população estudada foi de ambos os sexos, com idade variando de 0 até 85 anos, com diferentes diagnósticos. Todos os pacientes foram identificados e registrados .

As amostras estudadas apresentaram resultados positivos para o teste de antiglobulina direta (TAD), com graus de aglutinação variando de 2+ a 4+ e as amostras foram coletadas com anticoagulante (EDTA) e sem anticoagulante, Não foi necessário nenhum preparo prévio do paciente para a coleta das amostras de sangue que foi feita usando as técnicas convencionais de flebotomia. Todas as amostras foram processadas com menos de 12 horas após a coleta. Foi feito também a classificação do anticorpo e fração do complemento envolvido na reação do TAD.

Em todas as amostras foi realizado o teste de eluição o qual elui anticorpos pela modificação do pH do meio e proporciona um eluato límpido e claro. ⁽¹¹⁾

As técnicas de eluição foram realizadas corretamente, evitando a remoção de eritrócitos, que pudessem prejudicar o resultado final. A lavagem foi cuidadosa de tal maneira que o último sobrenadante testado com a técnica do TAI resultou e negatividade (usada como controle negativo), indicando que o anticorpo foi eluído. O eluato foi então testado através do TAI usando hemácias teste I e II (ID-DiCell I-II) e cartelas "ID-Cartão LISS/Coombs" e NaCl/Enzimática. A partir da positividade deste testes eluato, foi testado contra dois painéis de onze hemácias fenotipadas para os principais sistemas de grupo sangüíneo (Painéis utilizados: ID-Diapanel e P-DiaPanel), utilizando as mesmas cartelas usadas para o TAI .

O procedimento do método de eluição utilizado, foi seguido de acordo com a recomendação do fabricante.

As técnicas utilizadas na pesquisa foram:

1. Eluição pela glicina ácida
2. Teste de Antiglobulina Direta (TAD) (técnica em gel teste)
3. Teste de Antiglobulina Indireta (TAI) (técnica em gel teste)
4. Teste de Coombs Direto com reativos monoespecíficos anti-imunoglobulina humanas, anti-IgG, -IgM, IgA, -C₃d, -C₃c.

TÉCNICAS UTILIZADAS NESTA PESQUISA

ELUIÇÃO ÁCIDA DE ANTICORPOS

Reativos:

- DiaCedel Solução Concentrada de Lavagem: frasco de 30 mL contendo tampão de glicina-NaCl. Conservante: 1,0% NaN₃.
- DiaCedel Solução de Eluição: frasco de 10 mL contendo tampão ácido de glicina com indicador de cor, pronto para uso.
- DiaCedel Solução Tampão: frasco de 10 mL contendo tampão Tris com albumina bovina(1,2%), pronto para uso. Conservante: 0,1% NaN₃.
- Reativo adicional necessário (Solução salina isotônica 0,9%)
- Amostras
- Preparação da solução de trabalho para lavagem
- Diluir a “DiaCedel – Solução Concentrada de Lavagem” a 1:10 com água destilada (1 parte de concentração + 9 partes de água).

PROCEDIMENTO DE ELUIÇÃO

- Lavar as hemácias que tenham apresentado reação positiva no teste de Coombs direto uma vez com solução salina isotônica, devendo-se obter, no mínimo, 1,0 mL de concentração de hemácias.
- Lavar 1,0 mL de concentrado de hemácias 4 vezes com “DiaCedel – Solução de Trabalho para Lavagem”.
- Após a última lavagem, decantar completamente o sobrenadante, separando parte deste sobrenadante para verificar a presença de anticorpos irregulares(ver a primeira observação).
- Adicionar 1,0 mL de “DiaCedel – Solução de Eluição” a 1,0 mL do concentrado de hemácias lavadas. Homogeneizar bem.
- Centrifugar imediatamente por 1 minuto a 900g.
- Transferir o eluato (sobrenadante) para tubo limpo.
- Adicionar 5 gotas de “DiaCedel – Solução Tampão” e homogeneizar. Observar o aparecimento de coloração azulada, indicando que o pH neutro de 7,0 ($\pm$ 0,5) foi

atingido. Se a coloração azulada não aparecer, adicionar mais tampão(1 gota de cada vez), homogeneizando sempre.

- Centrifugar o eluato por 1 minuto a 900g para remover completamente resíduos de células.
- Eluato está pronto para ser testado.
- Para pesquisa e identificação de anticorpos, proceder de acordo com as técnicas habituais.
- Sobrenadante da última lavagem deverá ser usado como controle negativo.

TESTE DE ANTIGLOBULINA DIRETA(TAD):

(Técnica em gel teste)

- Amostras com anticoagulante centrifugado por 10 minutos.
- Identificar a cartela com o nome ou o número do paciente.
- Preparar suspensão de hemácias a 0,8% em ID-Diluyente 2 (LISS modificado).
- ID-Diluyente 2 – colocar a temperatura ambiente (T.A.)
- Colocar no tubo de suspensão 1,0 mL de ID-Diluyente 2
- Pipetar 10 µL de concentrado de hemácia, homogeneizar cuidadosamente. A suspensão de hemácias deve ser usada imediatamente.
- Colocar em cartela ID-Cartão “ LISS/Coombs”
- 50 µL da suspensão
- centrifugar 10 minutos em centrífuga ID-centrífuga 12 SII(Micro Tiping System)1030rpm.

TESTE DE ANTIGLOBULINA INDIRETA(TAD):

(Técnica em gel teste)

- Amostra sem ou com anticoagulante.
- Centrifugar por 10 minutos.
- Reativos indicados: “ID-DiaCell I-II”
- As hemácias testes e amostras devem atingir temperatura antes do uso.
- Identificar o cartão ID-Cartão “LISS/Coombs” com nome ou número do paciente.
- Pipetar 50 µL de cada hemácia teste nos microtubos correspondentes.
- Adicionar 25 µL do soro ou plasma do paciente nos microtubos.
- Incubar por 15 minutos à 37° em ID-Incubadora.
- Centrifugar o cartão durante 10 minutos em ID-Centrífuga.

- Ler e anotar o resultado das reações.

IDENTIFICAÇÃO DA CLASSE DE IMUNOGLOBULINA E FRAÇÃO DO COMPLEMENTO:

(Técnica em gel teste)

- Reativos: exclusivamente para uso diagnóstico “in vitro”.
- ID-Cartão “Screening I” com 5 micro tubos diferentes contendo reagentes antiglobulinas humanas monoespecíficos, anti-IgG, -IgA, -IgM, -C3c e -C3d (suspensão em gel e um controle negativo[ctl])
- ID-Diluyente 2: LISS modificado para o preparo das suspensões de hemácias.
- Amostra: sangue com anticoagulante.
- Preparação da amostra: preparar a suspensão de hemácias a 0,8% em ID-Diluyente 2 com a seguinte técnica:
 1. Colocar no tubo da suspensão 1,0 mL de ID-Diluyente 2
 2. Pipetar 10-12,5 µL de concentrado de hemácias.
 3. Homogeneizar.
 4. A suspensão de hemácias pode ser utilizada imediatamente.
- Procedimentos:
- Identificar o ID-cartão “Screening I” com o nome ou número do paciente.
- Pipetar 50 µL de suspensão de hemácias nos microtubos correspondentes.
- Centrifugar o ID-Cartão durante 10 minutos na ID-Centrífuga.
- Ler e anotar o resultado das reações.

APARELHOS UTILIZADOS:

- Centrífuga ID-centrífuga 12 SII, (Micro Típing System) 1030 rpm
- Centrífuga Clay Adams, Sero 2002, 3200 rpm
- Estufa ID-Incubaton 37 SI, -DiaMED id, (Micro Típing System)

DISCUSSÃO

A positividade do TAD significa que eritrócitos “in vivo” estão ligados com IgG e/ou complemento. Geralmente, somente células ligadas com IgG apresentarão eluato positivo ^(01,03,14). A causa da positividade do TAD pode incluir uma reação transfusional aguda ou retardada, doença hemolítica do recém-nascido, transplante, anticorpos induzidos por drogas e administração de vários tratamentos com imunoglobulinas: intravenosa (IVIG), imunoglobulina Rh(RhIg), globulina anti-linfocítica, e globulina anti-timocítica. Essa positividade também pode aumentar secundária a doenças que atuam no ciclo celular, β -talassemia, doença renal, mieloma múltiplo, doenças auto-imunes, AIDS e outras com elevados níveis de globulinas séricas. Na sua positividade, o procedimento é realizar uma eluição usando uma das técnicas que possa identificar o anticorpo e a sua positividade não significa que seja uma anemia hemolítica. Podendo ocorrer em indivíduos hematologicamente normais. Em algumas situações ocorrem reações falsamente positivas, cujas causas são maioritariamente devidas à presença de células poliaglutináveis e à deposição de complemento in vitro e em outras situações, está implicado um auto-anticorpo IgG que pode ser identificado após eluição. ^(14, 23)

O TAD pode ser positivo de uma forma inespecífica acontecendo mais freqüentemente em doentes com patologias variadas especialmente em estados infecciosos ou em tratamento com diversos fármacos, onde o eluído obtido é freqüentemente não reativo, ainda podendo ser sem significado conhecido. Essa positividade pode manter-se indefinidamente sem qualquer significado patológico, regredir ou em um pequeno número de casos, evoluir para anemia hemolítica auto-imune (AHAI). Em indivíduos com anticorpos induzidos por drogas, o dado mais freqüentemente encontrado em estudo, foi o TAD positivo, estando presente no soro e/ou eluído, mas não havendo evidências de destruição acelerada dos eritrócitos. ⁽²²⁾

O TAD está indicado apenas em doentes com suspeita de hemólise imune, com fins diagnósticos, ou de monitorização terapêutica. Nestas situações, o TAD continua a ser um teste com um bom valor preditivo. ^(11, 22)

Quando um TAD é positivo e o TAI é negativo um eluato poderá ser preparado e testado contra um painel de hemácias. Estudos realizados por Harry Rubin na modificação de um método de Vos and Kelsall(1956) mostrou que o anticorpo é quase

mas não completamente eluído. Isto provou, no entanto, que embora o método de eluição não se complete ele quase chega a se completar. ⁽⁰⁴⁾

A eluição é a técnica de liberação das moléculas do anticorpo, dos eritrócitos onde elas estão fixadas. Várias técnicas são utilizadas para eluir anticorpos, todas com objetivo de dissociar os anticorpos da membrana dos eritrócitos. O processo é realizado em 2 etapas. Na etapa 1, lava-se as hemácias com salina, para retirar as globulinas. Na etapa 2, prepara-se o eluato, ou seja, retira-se os anticorpos das hemácias de acordo com a técnica usada. e reserva-se a última lavagem para controle negativo. ^(07, 11)

Existem várias técnicas de eluição. As mais usadas são: Calor(56°C), LUI (congelamento/ descongelamento), Glicina ácida, Glicina ácida/EDTA, Clorofórmio, mas não existe uma técnica eficaz para todos os casos. Com isso, os laboratórios devem escolher um procedimento de sua preferência, levando-se em conta a sensibilidade, as conveniências operacionais e disponibilidade do material. ^(11, 20, 07)

As várias técnicas utilizadas todas mostram vantagens e desvantagens.

Calor 56°C é de baixo custo e fácil execução, elui anticorpos IgM(anticorpos frios) e ABO, mas é inadequada para os anticorpos IgG(Rh, K, Fy, Jk).

LUI (congelamento/descongelamento) é de baixo custo e fácil execução, é a mais sensível para anticorpos ABO(IgM), mas inadequada para alo-anticorpos e auto-anticorpos IgG.

Clorofórmio é de baixo custo e fácil execução. Sensível para a maioria dos anticorpos dos sistemas de grupos sanguíneos. Seu uso é desaconselhável por tratar-se de solvente carcinogênico e tóxico (obrigado capela de exaustão).

Glicina ácida/EDTA e cloroquina elui anticorpos sem causar ruptura dos eritrócitos, porém inadequada para antígenos Kell. Se o tratamento com cloroquina for prolongado (2 horas ou mais) pode ocorrer enfraquecimento também dos antígenos Rh.

Glicina ácida proporciona eluato límpido e claro, podendo ser utilizada em qualquer técnica de identificação de anticorpo, age pela modificação do pH do meio. Inadequada para anticorpos do sistema Kell (enfraquece os antígenos Kell.) ^(07,11). A técnica usada no estudo das amostras foi a da glicina ácida que entre as outras é a mais aplicada. É muito simples e rápida, por isso é a mais usada na rotina da maioria dos bancos de sangue. Para seu procedimento é necessário uma quantidade pequena de sangue (1ml), uma das suas vantagens é proporcionar um eluato sem hemólises além de reduzir os riscos à exposições químicas perigosas. A reatividade dos eluatos obtidos através dessa técnica é superior comparando-se com as outras. ^(17, 11)

Os resultados obtidos com as amostras em estudo, apesar de ter sido identificado cinco anticorpos, aparentemente é um índice baixo, mas está de acordo com outros estudos realizados. Ronald E. Domen, Jean Grattan em estudo sobre a eficácia de eluição de anticorpos em pacientes com TAD positivo, estudaram 122 eluatos dos quais, 83 foram negativos(68%), 35 tiveram panaglutinação (28,7%), entre os demais houve casos inconclusivos, outros envolvidos com aloanticorpo.

Em outro estudo avaliando a técnica de eluição da glicina ácida, realizado no laboratório de Imunohematologia do HEMOCE (1998), mostrou que das 90 amostras de pacientes só foram identificados 4 anticorpos, entre eles: 2 anti-D, 1 anti-E, 1 anti-Kell e os demais não identificados.

Comparando o estudo realizado com os anteriores, o nosso estudo em 84 amostras de pacientes, o resultado está compatível com o encontrado na literatura.

Analisando as amostras dos pacientes em estudo, os diagnósticos clínicos foram variados como: anemia auto-imune, LLC, anemia hemolítica do recém nascido, PTI, mieloma múltiplo, pancitopenia, Sd. de Evans e outras.

Em virtude dos altos níveis de Imunoglobulinas, associados às patologias encontradas neste estudo, a aglutinação com quase todas as hemácias do painel pode estar justificada. No entanto, a possibilidade de haver auto-anticorpos não pode ser afastada.

Os anticorpos encontrados no estudo com especificidade anti-D, anti-E e anti-e, são produzidos contra os antígenos do sistema Rh. O outro anticorpo encontrado foi o anti-N produzido contra antígenos do sistema MNSs.

A pesquisa realizada sugere que novos estudos sejam realizados com várias técnicas de eluição para uma melhor avaliação, embora a técnica de eluição ácida mostre-se favorável para a maioria dos laboratórios de Imunohematologia. ^(17, 11)

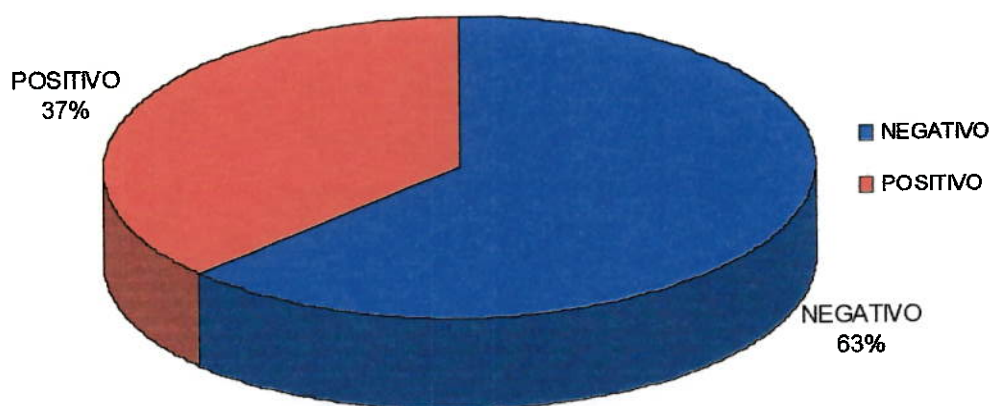
RESULTADOS

Em um total de 84 amostras, com TAD positivo, com grau de aglutinação de 2+ a 4+, foi realizado o TAI através da técnica de eluição com glicina ácida apresentando resultado negativo para 53 amostras (63%) e positivo para 31 amostras (37%). (Tab. 1)

**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ELUATO
COM GLICINA ÁCIDA POSITIVAS NO TESTE DE
ANTIGLOBULINA INDIRETO (TAI)
HEMOCE 2002**

	N	%
NEGATIVO	53	63
POSITIVO	31	37
TOTAL	84	100

**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ELUATO COM GLICINA ÁCIDA POSITIVAS NO
TAI . HEMOCE 2002**

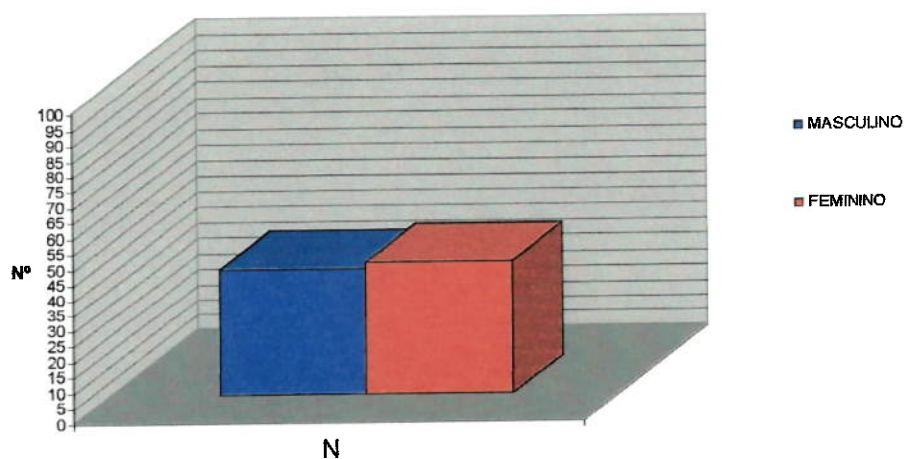


Dessas amostras 43 foram do sexo feminino (51%) e 41 do sexo masculino (49%).(Tab. 2)

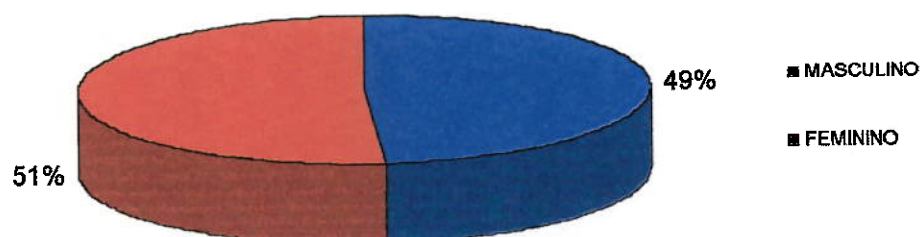
**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS
ESTUDADAS QUANTO AO SEXO.
HEMOCE 2002**

	N	%
MASCULINO	41	49
FEMININO	43	51
TOTAL	84	100

**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS QUANTO AO SEXO.
HEMOCE 2002**



**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS QUANTO AO SEXO.
HEMOCE 2002**



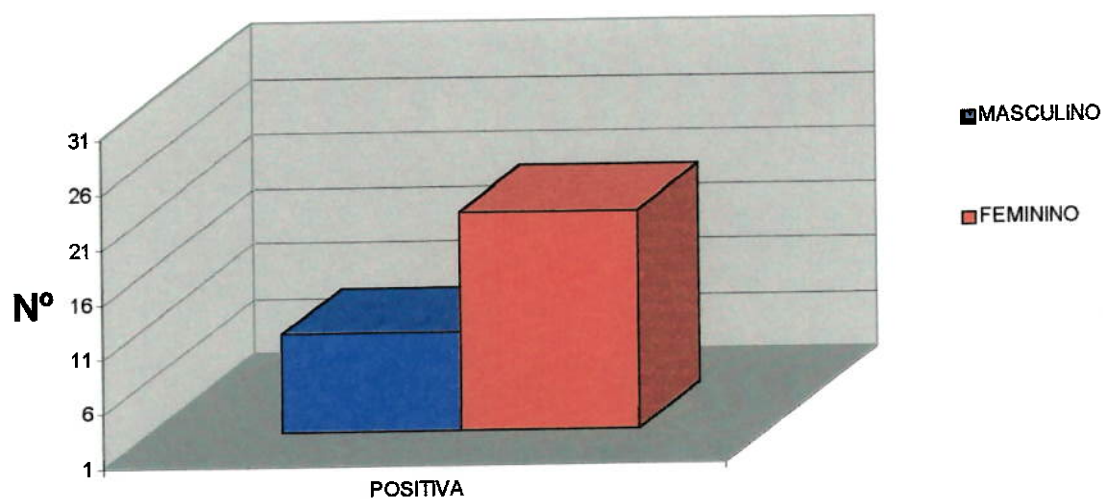
Das amostras positivas, 10 foram do sexo masculino (32%) e 21 amostras foram do sexo feminino. (Tab. 4)

**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ELUATO
COM GLICINA ÁCIDA POSITIVAS NO TAI EM
RELAÇÃO AO SEXO.**

HEMOCE 2002

	POSITIVA	%
MASCULINO	10	32
FEMININO	21	68
TOTAL	31	100

**DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ELUATO COM GLICINA ÁCIDA
POSITIVAS NO TAI EM RELAÇÃO AO SEXO. HEMOCE 2002**

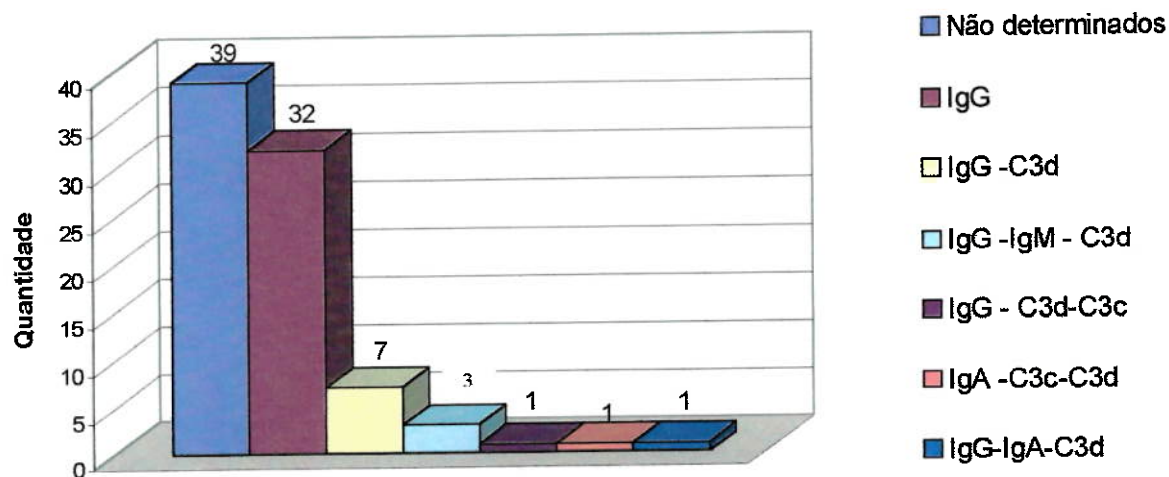


Em todas as 84 amostras com TAD positivo, foi realizado teste adicional para a classificação das imunoglobulinas e das frações do complemento envolvidos na reação, resultando em: 32 amostras (38%) demonstrando somente IgG ligada a membrana do eritrócito; 7 amostras (9%) foram demonstradas IgG-C3d; 3 amostras (4%) foram demonstradas IgG-IgM-C3d; 1 amostra (1%) foi demonstrada IgM-C3d-C3c; 1 amostra (1%) IgG-IgA-C3d-C3c; 1 amostra (1%) foi demonstrado IgG-IgA-C3d. Nas demais amostras não foram determinadas as classificações. (Tab. 5)

DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS (N= 84) QUANTO A CLASSE DE IMUNOGLOBULINAS E DA FRAÇÃO DO COMPLEMENTO

Classe de imunoglobulina/complemento	Número	%
Não determinados	39	46
IgG	32	38
IgG -C3d	7	9
IgG -IgM - C3d	3	4
IgM - C3d-C3c	1	1
IgA -C3c-C3d	1	1
IgG-IgA-C3d	1	1
TOTAL	84	100

DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS QUANTO A CLASSE DAS IMUNOGLOBULINAS E FRAÇÃO DO COMPLEMENTO

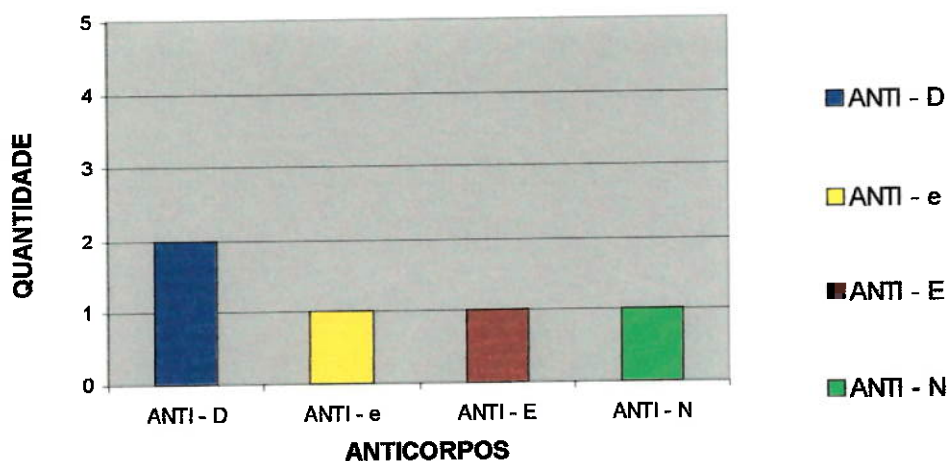


Todas as amostras analisadas, foram testadas após a última lavagem, mostrando reação negativa, quando testadas em paralelo com o eluato. Os eluatos quando positivos com o TAI foram testados contra dois painéis de 11 hemácias com fenótipos conhecidos e em seguida analisados por um antigramma (anexo) que possibilitava a identificação do anticorpo quando presente. Das amostras que tiveram os seus anticorpos identificados; 2 anticorpos tratava-se de anti-D de recém-nascidos de mães com anti-D ;1 anti-e ; 1 anti-E e 1 anti-N.

**DISTRIBUIÇÃO DOS ANTICORPOS IDENTIFICADOS
ATRAVÉS DO ELUATO COM GLICINA ÁCIDA DE
ACORDO COM A ESPECIFICIDADE.
HEMOCE 2002/03**

ESPECIFICIDADE	N	%
ANTI - D	2	7
ANTI - e	1	3
ANTI - E	1	3
ANTI - N	1	3
TOTAL	5	16

**DISTRIBUIÇÃO DOS ANTICORPOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DO ELUATO COM
GLICINA ÁCIDA DE ACORDO COM A ESPECIFICIDADE.**



No estudo realizado foi demonstrado que na maioria das amostras analisadas, a eluição de anticorpos foi clinicamente útil, embora não obrigatoriamente necessária. A maioria dos TAD positivos apresentaram eluato negativo, isso provavelmente secundário ao uso de drogas, doenças com níveis elevados de globulinas ou outras causadas por formação de alo-anticorpos.

CONCLUSÃO

Observamos, que o método de eluição , não pode ser usado como parâmetro único para identificação de anticorpos. Muitas vezes ele pode auxiliar, mas nem sempre a sua identificação é possível. Se uma amostra está sendo analisada na confirmação de uma hemólise mediada por auto-anticorpo, mais de um método de eluição poderá ser realizado na tentativa de identificá-lo.

O método utilizado na análise das amostras, apesar de ser considerado um dos melhores, apresentou um alto índice de negatividade. O ideal seria trabalhar no laboratório de Imunohematologia com mais de um método, como alternativa de rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONNOR, K. L. Sistema de grupo sanguíneo Rh. In: PITTIGLIO, D. H.; CALHOUN, L.; POLESKY, H. F. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2. ed. Philadelphia: F. A. Davis, 1992. cap. 6, p. 109.

CONNOR, K. L. doença hemolítica do recém-nascido. In: PITTIGLIO, D. H.; CALHOUN, L.; POLESKY, H. F. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2. ed. Philadelphia: F. A. Davis, 1992. cap. 19, p. 327-339.

DOMEN, R. E.; GRATTAN, J. Effi of performing red-cell antibody elutions in patients with a positive direct antiglobulin test. **Vox Sang.**, v. 51, p. 324-326, 1986.

HOWARD, P. L. Principles of antibody elution. **Transfusion**, v. 21, p. 477-482, 1981.

RUBIN, H. Antibody elution from red blood cells. **J. Clin. Path.**, v.16, p. 70-73, 1963.

LAPIERRE, Y. ; RIGAL, D. ; ADAM, J. et al. The gel test: a new way to detect red cells antigen-antibody reactions. **Transfusion**, v. 30, p.109-113, 1990.

SOMTH, S. F.; REA, A. E.; TREGELLAS, W. W. An evaluation of 11 red cell elution procedures. **Transfusion**, v. 26, p.167-170, 1986.

MELO, L.; SANTOS, A. J. **Imunohematologia eritrocitária: a reação antígeno-anticorpo e o complemento em imunologia eritrocitária**. V.1, p.17 – 23.1996.

DIAMED.BRASIL. A aglutinação de eritrócitos. Fas. 2, p.1-20, 1994. AZEVEDO B.C. e CUNHA C.F. e CASTILHO L. col.

BRASIL. Ministério da Saúde. Imunohematologia e testes pré-transfusionais, (tele-lab) Eluição de anticorpos . p.40 – 45. 2001.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Technical manual**. 13. ed. Cidade, 1999. p. 689-703.

LIMA, L. M. A. **Curso de imunohematologia**. São Paulo: UNESP, 1992. p. 205-209.

ABO - Editorial - Teste de antiglobulina direto. **Rev. Méd. Transf.**, n. 1, p. 7-14, mar. 2000.

Imunohematology. Journal of blood grup serology and education . V.14, n.2. p.53 – 58. 1998.

ABO - Revista de medicina transfusional - 2º Si... de imunohematologia, n.10, p. 104 – 106. junho , 2002.

NATHALANG, O.; STHABUNSAWASDIGARN, S.; BEJRACHANDRA, S.; SAIPIN, J.; SRIPHAISAL, T. A. Comparative study of three techniques for eluting red cell antibodies. **J. Med. Assoc. Thai.**, v. 80 suppl. 1, p. S5-8, 1997. (ESTAVA ENTRANDO PELA REVISTA)

LINCOLN, P. J.; DODD, B. E. The use of low ionic strength solution(liss) in elution experiments and in combination with papain-treated cells for the tritiation of various antibodies, including eluted antibody. **Vox Sang.**, v. 34, n. 4, p. 221-226, 1978.

Terapêutica Transfusional - MANUAL para médicos. 4. ed. A ABB, 1993. p.64-69.

MOLLISON, P.L. ; **Transfusion in clinical medicine** 10^a ed. cap. 8. p. 250-256. 1997.

POPOVSKY. M.A. **Transfusion reaction** . cap. 1. p.15-20. 1996.

GEHRS, B. C.; FRIEDBERG, R. C. Autoimmune hemolytic anemia. **Am. J. Hematol.**, v. 69, n. 4, p. 258-271, 2002. (ESTAVA ENTRANDO PELA REVISTA)

Elution-dissociation of antibody from red blood cells: theoretical and practical considerations. **Transf. Med. Rev.**, v. 13, n. 4, p. 297-310, 1993.

JUNQUEIRA, J. W. Elution techniques in summers. In: SUMMERS, S. H.; ROLIH, S. D.; WELLAND, D. L.(Eds.). **A handbook of serologic techniques for use in investigate immunohematology**.

GREEN, R. E. B. O teste da globulina anti-humana. In: PITTIGLIO, D. H.; CALHOUN, L.; POLESKY, H. F. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2. ed. Philadelphia: F.A. Davis, 1992 . cap. 4, p. 67.

JUDD, J. W. Elution techniques. In: SUMMERS, S. H.; ROLIH, S. D.; WELLAND, D. L. (Eds). **A handbook of serologic techniques for use in investigate immunohematology..**

MELO, L.; SANTOS, J. A. **Imunohematologia eritrocitária**. Belo Horizonte: IEA, 1996. cap. 2, p. 39-48.

NOKAMURA, R. M.; TUCKER, E. S. Os anticorpos como reagentes. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais**. 16. ed. São Paulo: Manole, 1983. v. 2, cap. 35, p. 1291-1322.

Rh/R BC methods/elute. Red blood cell related methods - RBC methods-HOME. Gamma ELU kit II Directions, Gamma Biologicals Inc. , Rev. 02/01.

MASSUT, L.; MARTIN, C.; RIBERA, A; ARGELAGUES, E.; DURAN-SUAREZ, J. R.; TRIGINER, J. Antibody elution from red blood cells by chloroform and Trichloroethylene. **Tranfusion**, v. 22, n. 5, p. 359-365, 1982 .

Antigen-Table

Tabela de antiáenos

Tabla de antígenos

05460.04.1

VERMILION.

10.

U-Diarralief

[illegible]

ID-DiaPanel cells 1-11 (except as indicated under «special types») are: As hemácias ID-DiaPanel 1-11 (exceto as indicadas como «antígenos especiais») são: ID-DiaPanel cells 1-11 (excepto las indicadas como «tipos especiales») son:	positive/positivo (+) PP₁ P^k (T₁^a) I^a U Vel	negative/negativo (0) V^w (Verweyst) W^r^a (Wright) D^{1a}	Shaded columns indicate antigens destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment. As columnas coloridas indicam os antígenos que são destruídos pelo tratamento com enzimas proteolíticas. Las columnas sombreadas indican los antígenos destruidos o con reactividad disminuida por tratamiento con enzimas.	s = strong/forte/fuerte w = weak/fraco/débil nt = not tested no analyzed
--	--	---	--	--

Name/nome/nombre _____	Bloodgroup + antigens Grupo sanguíneo + antígenos	Interpretation Interpretação Interpretación	Examined on Data do teste Examinado el
