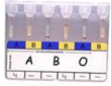




# Manual Prático de Imunohematologia

MARIA SOUSA E SANDRA MOTA  
Escola Superior de Saúde – P. Porto  
2020



## Ficha técnica

**Título:** Manual prático de imunohematologia

**Autores:** Maria Sousa e Sandra Mota

**Editor:** Maria Manuela Amorim Silva Sousa

**ISBN:** 978-989-33-0659-8

**DOI:** <https://doi.org/10.26537/y594-hs65>



## Conteúdo

1. Determinação do Grupo ABO .....	3
2. Determinação do Rh D em tubo.....	7
3. Pesquisa do Antígeno D fraco (D <sup>u</sup> ) em tubo .....	9
4. Determinação ABO e RH D em gel monoclonal .....	11
5. Determinação D <sup>u</sup> em gel monoclonal .....	13
6. Determinação do fenótipo Rh e Kell .....	15
7. Teste de Antiglobulina Humana .....	18
7.1 Teste de Antiglobulina Direto .....	19
7.2. Teste de Antiglobulina Direto Monoespecíficos .....	22
7.3. Determinação do título de IgG presente.....	23
7.4 Classificação da subclasse de IgG.....	24
8. Pesquisa de anticorpos irregulares .....	25
PAI em meio de AGH .....	26
PAI em meio salino .....	27
9. Identificação de anticorpos.....	29
Identificação de anticorpos em meio salino e/ou enzimas – Gel .....	30
10. Titulação de anticorpos.....	31
11. Prova de Compatibilidade .....	35
12. Estudo pré-transfusional .....	38
13. Método de Eluição Ácida .....	40
Anexo 1 – Suspensão de células 2-5%.....	41
Exercícios.....	42

## 1. Determinação do Grupo ABO

A descoberta do sistema ABO por Landsteiner, em 1901, marcou o início das transfusões de sangue seguras. Os antígenos ABO, embora fundamentais em relação às transfusões, também são expressos na maioria das membranas endoteliais e epiteliais e são importantes antígenos de histocompatibilidade.








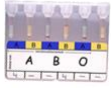
Blood Type (genotype)	Type A (AA, AO)	Type B (BB, BO)	Type AB (AB)	Type O (OO)
Red Blood Cell Surface Proteins (phenotype)	 A agglutinogens only	 B agglutinogens only	 A and B agglutinogens	 No agglutinogens
Plasma Antibodies (phenotype)	 b agglutinin only	 a agglutinin only	NONE No agglutinin	 a and b agglutinin

Figura 1 –Antígenos e anticorpos do grupo ABO.

No sistema ABO os indivíduos por volta dos 6 meses de idade, produzem anticorpos contra os antígenos de que estão isentos (Fig.1). Como consequência a determinação deste grupo sanguíneo deve ser realizada nos eritrócitos e no plasma. Os anticorpos do sistema ABO são principalmente da classe IgM.

A fenotipagem ABO baseia-se na determinação simultânea do grupo pela prova direta e pela prova reversa. A prova direta (ou prova celular) consiste em pôr em evidência os antígenos A e B presentes nas células da amostra (eritrócitos), por aglutinação destas células com antissoros conhecidos anti-A, anti-B e anti-A,B (este último não é obrigatório). A prova reversa (ou prova indireta) consiste em pôr em evidência os anticorpos anti-A e anti-B presentes no plasma da amostra com a ajuda de células conhecidas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B e O, não sendo obrigatória a utilização de células A<sub>2</sub> e O. As células A<sub>2</sub> são habitualmente usadas na identificação do anti-A<sub>1</sub>, no plasma de indivíduos do grupo A. As células O são utilizadas para identificação de aglutinações devidas a anticorpos não ABO.

Os eritrócitos dos recém-nascidos não possuem uma expressão completa dos antígenos A e B e, como tal, podem ser encontrados testes de determinação ABO ligeiramente mais fracos. Além disso, o plasma dos recém-nascidos dos grupos A, B ou O não contém necessariamente os anticorpos anti-A e/ou anti-B esperados.



Para se poder validar o grupo a prova direta e reversa têm que ser concordantes. Em caso de discrepância, o grupo ABO não pode ser definido, devendo realizar-se os estudos necessários para, de forma inequívoca, esclarecer a situação.

A determinação ABO é efetuada a dadores de sangue e a pacientes que vão ser submetidos a uma transfusão. Estes, devem também ser considerados aquando de um transplante de órgãos, questões de paternidade, investigações forenses e estudos genéticos.

Em caso de discrepância entre as provas globular e sérica, em situação de transfusão urgente, e na impossibilidade de fazer os estudos necessários em tempo útil, deve selecionar-se sangue do grupo O para realização de provas de compatibilidade, não devendo nunca assumir-se o resultado de nenhuma das provas (globular e sérica) individualmente.

A classificação, fenotipagem ou determinação sanguínea ABO pode ser realizada em lâmina, em tubo (metodologia de referência), em gel ou microplacas.

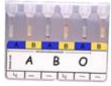
## Procedimento em Tubo

A determinação do grupo sanguíneo ABO em tubo é a metodologia de referência. No entanto, a metodologia em lâmina também pode ser utilizada, embora seja menos sensível.

### Material e equipamento

- Pipetas de Pasteur
- Tubos de hemólise
- Marcador
- Amostra colhida em EDTA
- Células A<sub>1</sub>, B
- Soros Anti-A, Anti-B e Anti-A,B
- Soro fisiológico

**Nota:** Consulte a bula anexa aos reagentes que vai utilizar, e siga criteriosamente as instruções do fabricante.



### Procedimento

1. Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
2. Identificar os tubos:
  - Com o número de identificação da amostra;
  - Com a identificação de cada reagente de fenotipagem ABO:
    - SC para a suspensão celular da amostra
    - PA para o plasma da amostra (facultativo)
    - Prova direta:
      - anti-A
      - anti-B
      - anti-AB
      - Controlo Negativo (Rh Control)
    - Prova reversa:
      - A<sub>1</sub>
      - B
3. Centrifugar a amostra (3500rpm 5min) e retirar o plasma da amostra para o tubo PA (facultativo).

### Prova direta (prova celular)

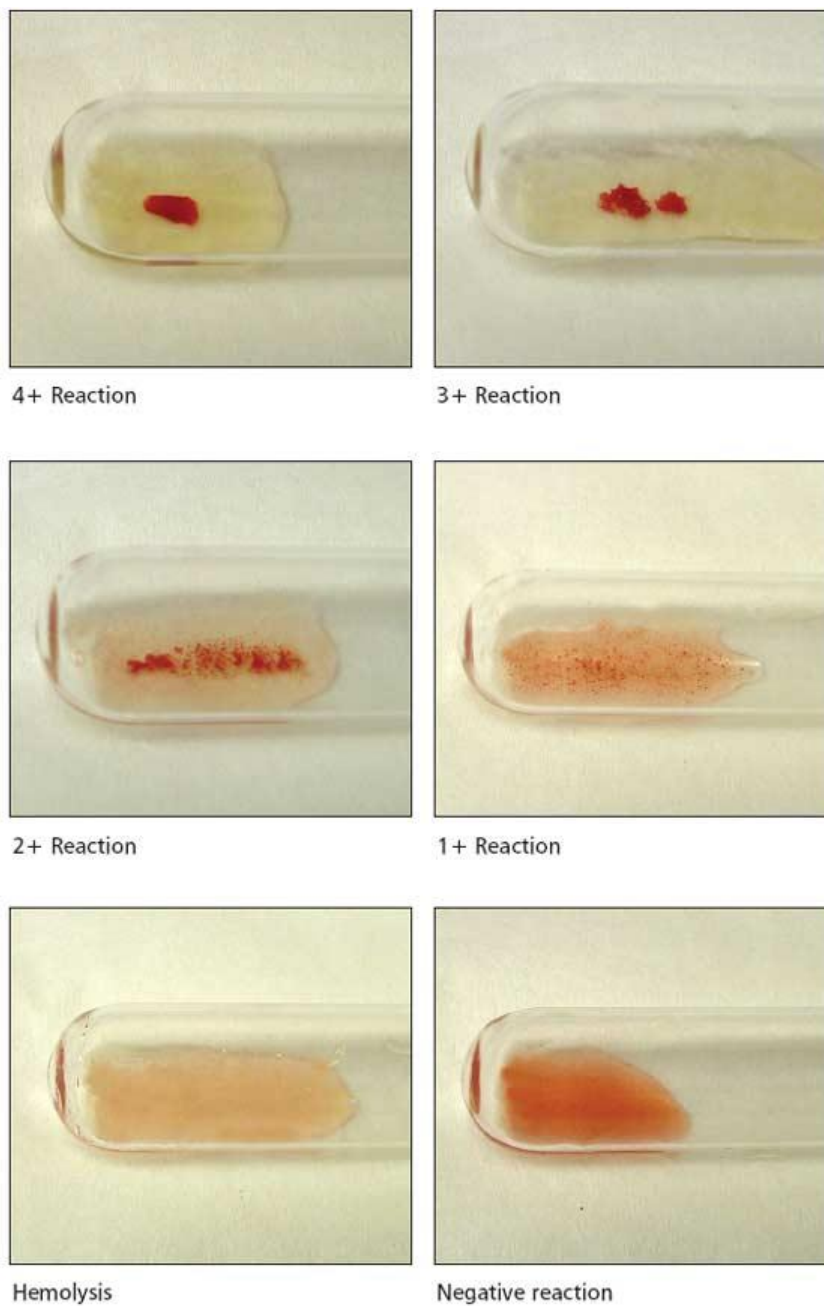
1. No tubo de hemólise SC transferir uma quantidade de células suficientes para preparar uma suspensão de células de 2-5%; **Anexo 1**
2. Pipetar uma gota (50 µL) de cada anti-soro para o respetivo tubo;
3. Adicionar a cada tubo uma gota (50 µL) da suspensão celular 2-5%;
4. Homogeneizar o conteúdo de cada tubo;

### Prova reversa (prova sérica)

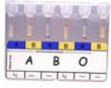
1. Pipetar duas gotas (100 µL) de plasma em cada um dos tubos da prova reversa;
2. Inverter suavemente todos os frascos de células reagente, as vezes necessárias até se obter uma ressuspensão completa dos eritrócitos;
3. Adicionar uma gota de cada uma das células reagentes aos respetivos tubos; Homogeneizar o conteúdo de cada tubo;

Passos comuns às duas provas

4. Centrifugar 20 segundos a 3400 rpm (ou 60 min em repouso à temperatura ambiente);
5. Ressuspender os botões celulares agitando suavemente cada tubo;
6. Registrar os resultados.
7. Comparar os resultados da prova direta e reversa. Os resultados de ambas devem ser concordantes.



**Figura 2 - Classificação da reação de aglutinação.**



## 2. Determinação do Rh D em tubo

O antígeno D (Rh D) é, depois do A e do B, o antígeno eritrocitário com maior importância na prática transfusional devido à sua potente antigenicidade. Ao contrário do que acontece no sistema ABO, os indivíduos que não possuem o antígeno D nas suas células, não têm anticorpos anti-D no seu soro.

A fenotipagem eritrocitária Rh D consiste na pesquisa do antígeno D nos eritrócitos, utilizando soros anti-D. A presença do antígeno D define o fenótipo Rh D positivo. A sua ausência o fenótipo Rh D negativo. A fenotipagem eritrocitária Rh D deve ser efetuada em todas as dádivas de sangue e em todas as amostras pré-transfusionais.

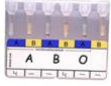
O antígeno D, por vezes, pode apresentar expressões mais fracas, de natureza quantitativa (D fraco) e/ou de natureza qualitativa (D parcial<sup>1</sup>). Ambas são consideradas como D variante. Os indivíduos com fenótipo D variante devem ser clarificados acerca do seu significado, já que ele difere consoante sejam dadores ou doentes. No caso dos dadores classifica-se como Rh D positivas as unidades de sangue com pesquisa positiva do antígeno D ou D variante e como Rh D negativas as unidades com pesquisa negativa do antígeno D e D variante. Por norma, são realizadas duas determinações com antissoros diferentes e em caso de discrepância entre os resultados obtidos com os dois soros anti-D, o teste deve ser repetido e, em caso de dúvida, a unidade deve ser classificada como Rh D positiva, podendo ser utilizada. A execução de estudos serológicos de investigação ou de biologia molecular para caracterização do antígeno Rh D não devem retardar a utilização da unidade.

No caso de doentes e grávidas sempre que persista alguma dúvida em relação ao resultado, o fenótipo Rh D destes deve ser considerado Rh D negativo.

Os resultados devem sempre comparar-se com registos anteriores e esclarecidas eventuais discrepâncias.

---

<sup>1</sup> D Parcial - O antígeno D do sistema Rh é atualmente considerado um mosaico de epítomos. Os indivíduos cujos eritrócitos carecem de parte do mosaico D podem, quando expostos a um antígeno D completo, criar anticorpos contra os epítomos ausentes dos eritrócitos do indivíduo.

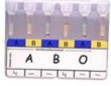


### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Soro fisiológico
- Centrífuga
- Cronómetro
- Células reagentes
- Soro anti-D (De preferência 2 clones diferentes)
- Controlo Rh(D)
- Amostra colhida em EDTA

### Procedimento

1. Identificar 4 tubos com as letras D, Dx, DCo, SC;
2. Preparar uma suspensão das células da amostra 2-5% (com células lavadas 1x);
3. Adicionar uma gota de cada anti-D ao respetivo tubo: D e D(x);
4. Adicionar uma gota de controlo RhD (Rh Control) ao tubo DCo;
5. Adicionar uma gota da suspensão de células a cada um dos tubos anteriores (D, D(x) e DCo);
6. Agitar cuidadosamente o conteúdo de cada um dos tubos;
7. Centrifugar 20 seg. a 3000rpm;
8. Ressuspender cuidadosamente cada botão de células e verificar se houve hemólise ou aglutinação;
9. Registrar os resultados;
10. Se o teste Rh D for negativo, poderá ser necessário pesquisar o antigénio D fraco (D<sup>u</sup>).



### 3. Pesquisa do Antígeno D fraco ( $D^u$ ) em tubo

Alguns eritrócitos possuem o antígeno D mas a sua expressão é tão fraca que as células não aglutinam diretamente com o anti-D. É necessário realizar um teste de antiglobulina indireto para identificar indivíduos com fenótipo D fraco ( $D^u$ ).

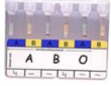
Este teste é realizado em todos os doadores Rh D negativo para assegurar que não possuem o antígeno D.

#### **Material, reagentes e equipamentos**

- Estufa ou banho-maria a 37°C
- Soro fisiológico
- Soro de Coombs
- Células controlo de Coombs
- Anti-D (IgG)

#### **Procedimento**

1. Utilizando os mesmos tubos (com amostra e anti-soro IgG) da fenotipagem Rh D, incubá-los (D(IgG) e DCo) a 37°C, 15-30 min;
2. Lavar o conteúdo de ambos os tubos uma vez com soro fisiológico;
3. Imediatamente após a rejeição do sobrenadante da última lavagem, adicionar 2 gotas do soro de Coombs (AGH) a cada um dos tubos;
4. Centrifugar 20seg. a 3000rpm;
5. Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
6. Ressuspender cuidadosamente cada botão de células (um tubo de cada vez) e verificar se houve hemólise ou aglutinação;
7. Registrar os resultados;
8. Confirmar a validade de todos os resultados negativos adicionando 1 gota de controlo de Coombs a todos os tubos sem aglutinação (células controlo sensibilizadas com IgG);
9. Centrifugar 20 seg. a 3000rpm;
10. Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
11. Ressuspender cuidadosamente e verificar a aglutinação.



**Nota:** Todos os resultados negativos deverão ser positivos após a adição de células controlo sensibilizadas com IgG, a inexistência de aglutinação invalida o teste devendo ser repetido todo o procedimento.

**Resultados:** Se após o teste de antiglobulina indireto (passo 6) houve:

- Aglutinação no tubo D e ausência de aglutinação no tubo DCo – resultado Rh (D) positivo;
- Ausência de aglutinação nos tubos D e DCo – resultado Rh (D) negativo;
- Aglutinação no tubo DCo – teste inválido



## 4. Determinação ABO e Rh D em gel monoclonal

A metodologia em gel apresenta grandes vantagens, comparativamente à metodologia em tubo e em lâmina. Possui maior sensibilidade e especificidade e uma maior facilidade na leitura e interpretação de resultados.

Várias casas comerciais apresentam reagentes e equipamentos apropriados para cada tipo de teste. Uma das casas comerciais com maior expansão no mercado laboratorial é a Biorad (anterior Diamed). Esta casa comercial baseia a sua metodologia em cards com vários micropoços que contêm um gel, Sephadex, ao qual podem ser adicionados outros reagentes, de acordo com o teste a efetuar.



Figura 3 – Exemplo de Cards Biorad para determinação do grupo ABO e RhD em gel.

Para a determinação da prova direta a Diamed disponibiliza cards cujos micropoços contêm anticorpos anti-A, anti-B e anti-A,B aos quais é adicionada a suspensão de células da amostra diluídas num diluente específico. O card utilizado para esta prova é o ID-Card “ABO/RhD”(Fig.3). Este card permite, num único passo, a determinação do perfil ABO/Rh D, incluindo a confirmação do Rh D. O primeiro anti-D pode comprovar a variante D<sup>VI</sup>, o segundo anti-D é negativo para a variante D<sup>VI</sup>. O micropoço ctl é o controlo negativo.

Para a prova reversa utiliza-se o ID-Card “Reverse grouping with antibody screening” (Fig.3), este card é usado com células teste (reagentes) “ID-DiaCell ABO/I-II” (Fig.4), permitindo a determinação da prova reversa e a deteção de anticorpos irregulares (Teste de Antiglobulina Indireto - PAI) à temperatura ambiente. O card possui 3 micropoços que apenas contêm gel neutro e 3 micropoços que contêm Antiglobulina Humana (AGH) juntamente com o gel.

Em alternativa ao card “Reverse grouping with antibody screening”, pode ser utilizado o ID-card “NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins” que é versátil, permitindo a realização de testes enzimáticos, em salino e a prova reversa.

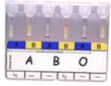


Figura 4.1 – Exemplo de ID-Card NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins para elaboração da prova reversa

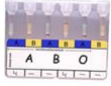
Figura 5 - ID-DiaCell ABO”



### Material e equipamento

- ID – Card “ABO/RhD”
- ID-Card “Reverse grouping with antibody screening”
- Células A<sub>1</sub> e B;
- Diluente 2
- Tubos de hemólise
- ID-centrífuga
- Amostra colhida em EDTA
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta

### Procedimento



- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Identificar os cards:
  - Com o n.º de identificação da amostra;
  - Com o n.º da célula referente a cada célula reagente;
- 3- Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços que serão utilizados;

Prova reversa (prova sérica)

- 4- Pipetar 1 gota (50 µL) das células reagente para o respetivo micropoço do *ID-Card NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins*;
- 5- Adicionar 50 µL de soro ou plasma da amostra em cada micropoço;
- 6- Incubar o card durante 10-15 minutos à temperatura ambiente (18-25°C);

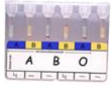
Prova direta (prova celular):

- 7- Preparar uma suspensão de células da amostra a 5% em diluente 2;
  - a. Pipetar 500 µL de diluente 2 para um tubo de hemólise;
  - b. Adicionar 25 µL de células concentradas;
  - c. Homogeneizar a suspensão;
- 8- Pipetar 10 ou 12.5 µL da suspensão anterior para cada um dos micropoços do *ID-Card DiaClon ABO/D*;
- 9- Centrifugar os cards (prova direta e reversa) durante 10 minutos na ID-Centrífuga;
- 10- Ler, interpretar e registar os resultados.

## 5. Determinação D<sup>u</sup> em gel monoclonal

**Material e equipamento**

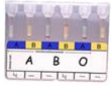
- ID – Card “Coombs Anti-IgG”
- ID – Anti-D
- Diluente 2
- Tubos de hemólise
- ID-Incubadora
- ID- centrífuga
- Amostra colhida em EDTA
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta



### Procedimento

1. Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
2. Identificar os cards com o número de identificação da amostra;
3. Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços que serão utilizados;
4. Preparar uma suspensão a 0,8% de células da amostra em diluente 2:
  - a. Pipetar 1000µL de diluente 2 para um tubo de hemólise;
  - b. Adicionar 10 ou 12.5µL de células concentradas ou 25µL de sangue total;
  - c. Homogeneizar a suspensão;
5. Pipetar 50 µL da suspensão anterior para o respetivo micropoço do ID-Card “Coombs Anti-IgG”;
6. Adicionar 50 µL de antissoro anti-D;
7. Incubar o card durante 15 minutos a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  na ID – Incubadora;
8. Centrifugar o card durante 10 minutos na ID-centrífuga;
9. Ler e interpretar os resultados;
10. Registrar os resultados.

**Nota:** Sempre que é feita a Pesquisa de D Fraco e o resultado é positivo, é necessário fazer o TAD. O Resultado do D Fraco positivo só é válido se o TAD for negativo.



## 6. Determinação do fenótipo Rh e Kell

A determinação do fenótipo Rh permite determinar a presença dos outros antígenos do sistema Rh (C, c, E, e) à superfície dos eritrócitos. Esta determinação pode ser efetuada em tubo ou em card, de forma semelhante à efetuada nas determinações anteriores. Os cards comerciais encontram-se impregnados com anticorpos de origem humana ou de origem monoclonal. Embora o antígeno K (Kell) não pertença ao sistema Rh, alguns cards possibilitam testar a presença ou ausência deste antígeno no mesmo card (Fig.5).

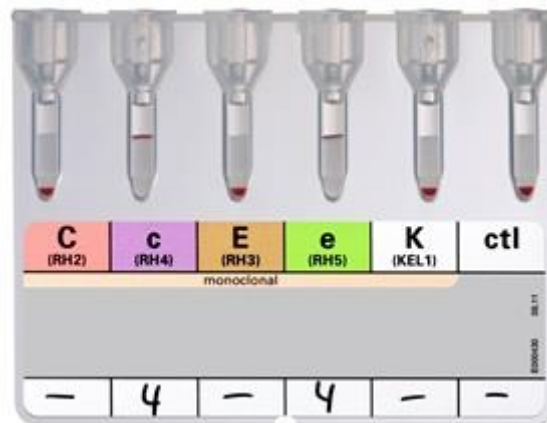
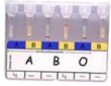


Figura 6 – ID card “DiaClon Rh + K Pheno II”

### Determinação em Tubo

#### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Soro fisiológico
- Centrífuga
- Cronómetro
- Antissoros anti-D, C, c, E, e, K
- Controlo Negativo RhD (Rh Control)
- Amostra colhida em EDTA
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta

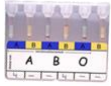


**Procedimento**

1. Preparar uma suspensão das células da amostra 2-5% (pré-lavadas 1x);
2. Marcar 6 tubos: D, C, c, E, e, K e DCo (para distinguir letras maiúsculas e minúsculas colocar um traço em cima das letras minúsculas);
3. Colocar uma gota de cada antissoro no respetivo tubo;
4. Colocar uma gota de controlo negativo (Rh Control) no tubo DCo;
5. Colocar uma gota da suspensão de células em cada um dos tubos;
6. Homogeneizar o conteúdo de cada tubo;
7. Centrifugar os tubos 20seg. a 3000rpm;
8. Ressuspender cuidadosamente cada botão de células e procurar aglutinação ou hemólise;
9. Registrar os resultados;

**Table 14-3. Determination of Likely Rh Phenotypes from the Results of Tests with the Five Principal Rh Blood Typing Reagents**

Anti-D	Reagent					Antigens Present	Probable Phenotype
	Anti-C	Anti-E	Anti-c	Anti-e			
+	+	0	+	+	D,C,c,e	R <sub>1</sub> r	
+	+	0	0	+	D,C,e	R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	
+	+	+	+	+	D,C,c,E,e	R <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	
+	0	0	+	+	D,c,e	R <sub>0</sub> R <sub>0</sub> /R <sub>0</sub> r	
+	0	+	+	+	D,c,E,e	R <sub>2</sub> r	
+	0	+	+	0	D,c,E	R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	
+	+	+	0	+	D,C,E,e	R <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	
+	+	+	+	0	D,C,c,E	R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	
+	+	+	0	0	D,C,E	R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	
0	0	0	+	+	c,e	rr	
0	+	0	+	+	C,c,e	r'r	
0	0	+	+	+	c,E,e	r''r	
0	+	+	+	+	C,c,E,e	r'r''	



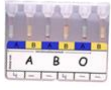
## Determinação em gel Monoclonal

### Material e equipamento

- ID Cards DiaClon Rh-subgroups+Kell
- ID – Diluente 2
- Pipeta automática
- Pontas
- Tubos de hemólise
- ID-Centrífuga
- Amostra colhida em EDTA
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta

### Procedimento

1. Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
2. Identificar os cards com o número de identificação da amostra;
3. Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços;
4. Preparar uma suspensão a 5% de células da amostra em diluente 2:
  - a. Pipetar 500 $\mu$ L de diluente 2 para um tubo de hemólise;
  - b. Adicionar 25  $\mu$ L de células concentradas ou 50  $\mu$ L de sangue total;
  - c. Homogeneizar a suspensão;
5. Pipetar 10 ou 12.5 $\mu$ L da suspensão anterior para cada um dos micropoços do ID Cards DiaClon Rh-subgroups+Kell;
6. Centrifugar os cards durante 10 minutos na ID-centrífuga;
7. Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
8. Ler e interpretar os resultados;
9. Registrar os resultados.



## 7. Teste de Antiglobulina Humana

O teste de Antiglobulina Humana (AGH) também designado de teste de Coombs, baseia-se na utilização de soro de antiglobulina humana ou soro de Coombs. Existem dois tipos de testes o Teste de Antiglobulina Humano Direto (TAD) e o Teste de Antiglobulina Humano Indireto (TAI).

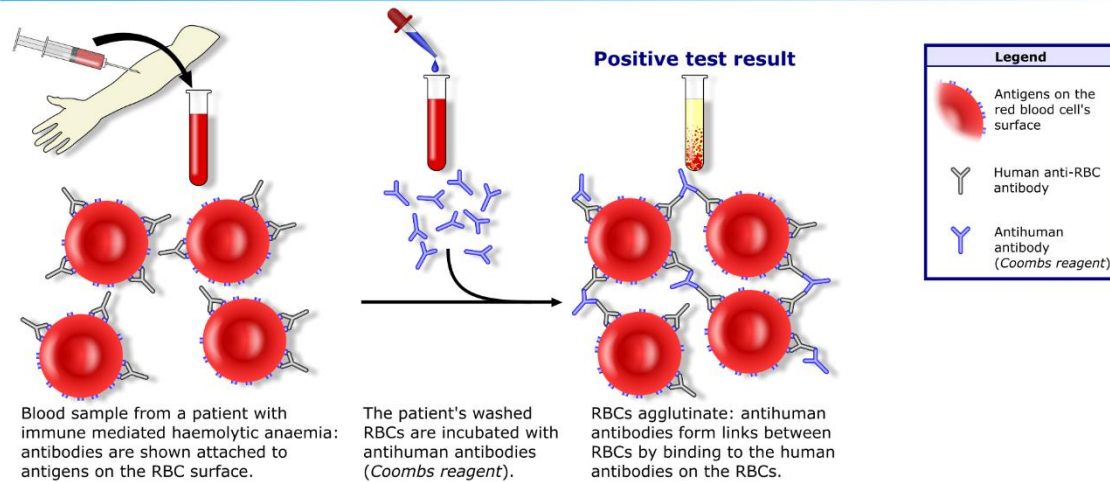
O Teste de Antiglobulina Direto (TAD) ou Teste de Coombs Direto permite evidenciar a presença de anticorpos adsorvidos aos eritrócitos circulantes, alo-anticorpos ou auto-anticorpos (eritrócitos sensibilizados “in vivo”). Neste teste são utilizados reagentes com características específicas, que possibilitam aumentar a força de reação entre antígenos e anticorpos. O soro de antiglobulina humana (ou soro de Coombs) está presente na realização deste teste, que ao reagir com os anticorpos que se encontram a sensibilizar as células, provoca aglutinação. Para potenciar estas forças, podem ainda ser adicionados outros reagentes que diminuam o potencial zeta entre antígenos e anticorpos. O objetivo deste teste é demonstrar “in vitro” eritrócitos sensibilizados por imunoglobulinas “in vivo” (Fig.6).

No TAI, por sua vez, o objetivo é a deteção “in vitro” de eritrócitos sensibilizados “in vitro”, e é realizado quando a sensibilização não origina aglutinação direta. Este é baseado numa reação em duas fases. Na primeira fase (sensibilização das células), o soro a estudar é posto em contacto com as células lavadas que possuem o(s) antígeno(s) correspondente(s) aos anticorpos pesquisados, e se o soro contiver o(s) anticorpo(s) correspondente(s), estes fixam-se seletivamente sobre as células que possuem o antígeno homólogo. Na segunda fase (TAI ou fase de revelação), verifica-se a sensibilização ocorrida na primeira fase, através da adição do soro de Coombs que serve de ligação entre as globulinas fixadas à superfície das células que são assim aglutinadas. O TAI inclui um passo de incubação a 37°C, de modo a que os anticorpos no soro reajam com os antígenos celulares “in vitro”. Após lavagem das células, usa-se soro de Coombs para detetar os anticorpos que cobrem as células.

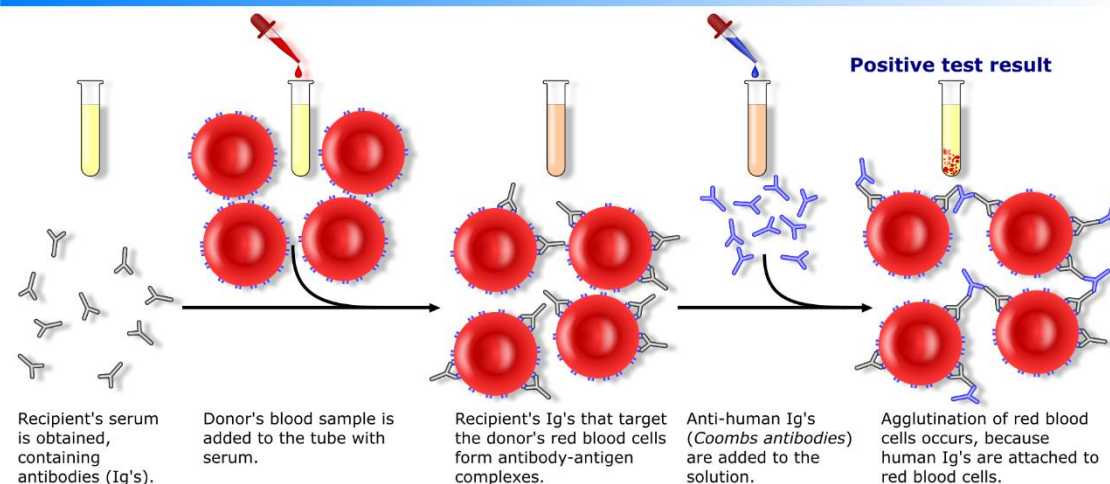
Aplicações do TAI:

- Na pesquisa e identificação de anticorpos irregulares
- Nas provas de compatibilidade
- Na pesquisa do D fraco
- Na fenotipagem de células

**Direct Coombs test / Direct antiglobulin test**



**Indirect Coombs test / Indirect antiglobulin test**

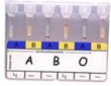


**Figura 7 - Teste de Antiglobulina Direto e Indireto.**

**7.1 Teste de Antiglobulina Direto**

Para efetuar este teste, podem ser utilizados dois tipos de cards, LISS/Coombs ou Coombs Anti-IgG. O primeiro é preferencialmente usado na rotina laboratorial. No card LISS/Coombs, o gel encontra-se impregnado com soro de antiglobulina humana poliespecífica, que permite detetar IgG e/ou C3d. Embora a sua principal função seja detetar IgG, a presença de anti-C3d é útil no estudo de anemias hemolíticas autoimunes. No card Coombs Anti-IgG, o gel encontra-se impregnado apenas com soro de antiglobulina humana anti-IgG, não havendo interferência de componentes do complemento não específicos.

Neste tipo de cards, um resultado positivo significa, então, que os antígenos se encontram sensibilizados “*in vivo*” com imunoglobulinas e/ou complemento. O TAD ou teste de



Coombs direto consiste em fazer reagir as células, cuidadosamente lavadas, com um soro antiglobulina humana (soro de Coombs).

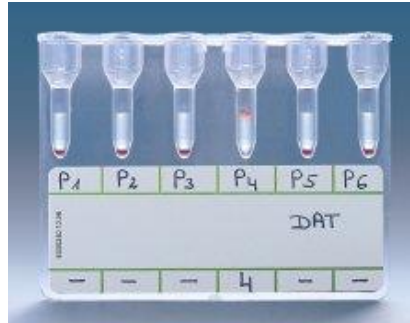


Figura 8 - Card LISS/Coombs

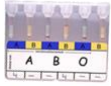
## Em Tubo

### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Soro fisiológico
- Centrífuga
- Cronómetro
- Soro de Coombs
- Células controlo de Coombs
- Amostra colhida em EDTA

### Procedimento

1. Preparar uma suspensão de células a 2-5% a partir de células pré-lavadas uma vez, da amostra em estudo;
2. Identificar o tubo: TAD e nº da amostra;
3. Colocar uma gota da suspensão celular no tubo;
4. Adicionar 2 gotas de soro de Coombs;
5. Homogeneizar cuidadosamente e centrifugar 20 seg a 3000rpm;
6. Verificar a presença de hemólise ou aglutinação e registar os resultados;
7. Se não houver aglutinação ou hemólise, observar microscopicamente (Com a Objetiva de 10x);
8. Confirmar os negativos adicionando uma gota de células controlo de Coombs;
9. Homogeneizar e centrifugar 20 seg a 3000rpm;
10. Ressuspender e procurar aglutinação, que tem que estar presente para validar o teste.



## Em Gel

### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga
- Cronómetro
- Amostra colhida em EDTA
- ID - Card Liss/Coombs
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta
- ID-Centrífuga

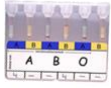
### Procedimento

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Identificar o card com o número de identificação da amostra;
- 3- Remover a folha de alumínio (proteção) do(s) micropoço(s) que forem utilizados;
- 4- Preparar uma suspensão de 0,8% de células da amostra em diluente 2:
  - Pipetar 1000  $\mu\text{L}$  de diluente 2 para o tubo de hemólise;
  - Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de células concentradas ou 25  $\mu\text{L}$  de sangue total;
  - Homogeneizar a suspensão;
- 5- Pipetar 50  $\mu\text{L}$  da suspensão para o respetivo micropoço do card “Liss coombs”;
- 6- Centrifugar o card durante 10 minutos da ID – centrifuga;
- 7- Ler e interpretar os resultados.

**NOTA:** No caso de um resultado positivo no TAD, é necessário continuar o estudo, classificando-o. Para tal, existem cards que possibilitam executar esta etapa:

- DC-Screening I
- DAT IgG1/IgG3
- DAT IgG-Dilution

Perante um teste de antiglobulina direto positivo, é necessário proceder à sua classificação, de forma a saber se a sensibilização in vivo é causada por imunoglobulinas ou complemento.



## 7.2. Teste de Antiglobulina Direto Monoespecíficos

De um modo geral, um Teste de Antiglobulina Direto (TAD) positivo com AGH poli-específica indica que os eritrócitos estão sensibilizados “in vivo” com imunoglobulina e/ou complemento. Para diferenciar a reação, são utilizados reagentes AGH monoespecíficos, tais como anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM e anti-C3c, anti-C3d. O ID-Card “DC Screening I” consiste em cinco reagentes diferentes de AGH monoespecíficos diferentes: anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3c e anti-C3d, em suspensão no gel (Fig. 8). A configuração deste card está estruturada de modo a fornecer respostas clinicamente significativas e permitir que esta importante investigação seja realizada com apenas um procedimento simples.

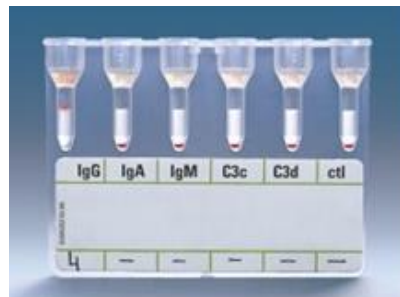


Figura 9 –ID card “DC Screening I”

### Procedimento

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Identificar o card com o número de identificação da amostra;
- 3- Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços;
- 4- Preparar uma suspensão de 0,8% de células da amostra em diluente 2 (suspensão já preparada no procedimento anterior):
  - Pipetar 1000  $\mu$ L de diluente 2 para o tubo de hemólise;
  - Adicionar 10 $\mu$ L de células concentradas ou 25  $\mu$ L de sangue total;
  - Homogeneizar a suspensão;
- 5- Pipetar 50  $\mu$ L da suspensão anterior para o respetivo micropoço do ID-Card “DC-Scening I”;
- 6- Centrifugar o card durante 10 minutos da ID centrífuga;
- 7- Ler, interpretar e registar os resultados.

No caso de um TAD positivo por IgG (como é o caso da imagem de exemplo acima apresentada), poderá ser importante saber qual o risco de hemólise eritrocitária “in vivo”. Para tal, devemos saber qual o título de anticorpo presente e a subclasse de IgG.



### 7.3. Determinação do título de IgG presente

O número de moléculas IgG por célula influencia a aceleração da destruição eritrocitária “in vivo”, como acontece na Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI), Doença Hemolítica do Recém-Nascido (DHRN) e em reações transfusionais. O card DAT IgG-Dilution fornece uma indicação da importância clínica de um resultado positivo no TAD. Este card caracteriza-se por diluições sucessivas de reagente monoespecífico anti-IgG, desde 1:1 até 1:1000.

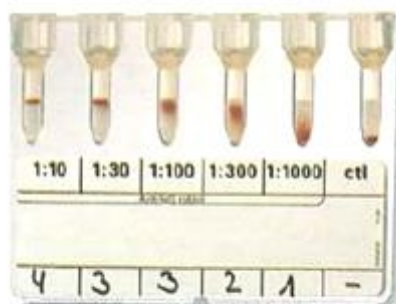
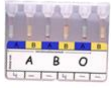


Figura 10 –Card DAT IgG-Dilution.

#### Procedimento

1. Identificar o card “DAT IgG-Dilution” com o número de identificação da amostra;
2. Preparar uma suspensão de células da amostra a 0,8% em diluente 2 (suspensão já preparada nos procedimentos anteriores):
  - Pipetar 1000  $\mu$ L de diluente 2 para o tubo de hemólise;
  - Adicionar 10  $\mu$ L de células concentradas ou 25  $\mu$ L de sangue total;
  - Homogeneizar a suspensão;
3. Pipetar 50  $\mu$ L desta suspensão para todos os micropoços.
4. Centrifugar o card durante 10 minutos da ID centrífuga;
5. Ler, registrar e interpretar os resultados

**NOTA:** O resultado do Título será o valor do **denominador** da última diluição que deu positivo. Quanto maior a diluição na qual se observa um resultado positivo, maior o risco de hemólise eritrocitária in vivo.



## 7.4 Classificação da subclasse de IgG

É também importante identificar a subclasse de IgG presente. Sabe-se que as diferentes subclasses apresentam diferente significado clínico. A mesma casa comercial apresenta um card para executar este teste, designado “DAT IgG1/IgG3”.

Este card possui duas diluições 1:1 e 1:100 para cada subclasse, IgG1 e IgG3. A presença de duas diluições permite diferenciar entre baixo e alto risco de hemólise eritrocitária.

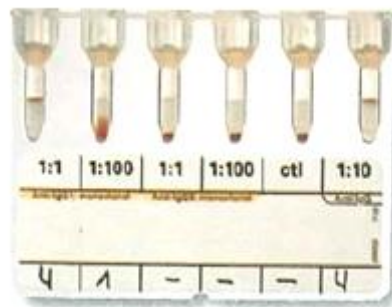
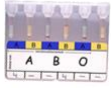


Figura 11 – ID card DAT IgG1/IgG3

### Procedimento

1. Identificar o card “DAT IgG1/IgG3” com o número de identificação da amostra;
2. Preparar uma suspensão de células da amostra a 0,8% em diluente 2 (suspensão já preparada nos procedimentos anteriores):
  - Pipetar 1000  $\mu$ L de diluente 2 para o tubo de hemólise;
  - Adicionar 10  $\mu$ L de células concentradas ou 25  $\mu$ L de sangue total;
  - Homogeneizar a suspensão;
3. Pipetar 50  $\mu$ L desta suspensão para todos os micropoços (não necessita de incubação);
4. Centrifugar o card durante 10 minutos da ID centrífuga;
5. Ler, registar e interpretar os resultados.



## 8. Pesquisa de anticorpos irregulares

A pesquisa de anticorpos irregulares (PAI), consiste em detetar um ou mais anticorpos fazendo reagir o soro ou plasma de uma amostra (ou eluído) com células com um perfil antigénico conhecido. Normalmente esta pesquisa é feita em meio AGH (obrigatório em termos de teste pré-transfusional), sendo assim denominada de Teste de Antiglobulina Indireto.

Para a pesquisa de anticorpos irregulares (em doentes) usa-se um painel de 3 células podendo estas ser suspensas em meio salino sem qualquer aditivo ou serem tratadas com enzimas proteolíticas, mais frequentemente a papaína. Estes kits de células vêm ainda acompanhados com um painel de leitura, para interpretação dos resultados.

Dado que existem anticorpos que são potenciados pela ação das enzimas e outros cuja ação enzimática tem capacidade de anular a reação antigénio-anticorpo através da destruição de alguns antigénios das células reagente, é importante a realização deste teste com ambos os conjuntos de células. A forma como um anticorpo se comporta com enzimas, em comparação com a PAI não enzimática, pode fornecer-nos pistas importantes para a sua identificação.

Para se obterem resultados com maior especificidade, este teste deverá executar-se com reagentes potenciadores da ligação entre antigénios e anticorpos.

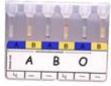


Figura 12 - Células reagentes utilizadas: ID – “DiaCell I-II-III” e ID – “DiaCell I-II-III”. Card LISS/Coombs + Enzyme Test

### PAI em Tubo

#### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise de vidro
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga



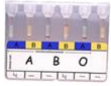
- Cronómetro
- Soro de Coombs
- Células controlo de Coombs
- Microscópio
- Lâminas
- Amostra colhida em EDTA

### **Procedimento**

1. Identificar o tubo: Célula Reagente (I,II e III) e nº da amostra;
2. Colocar duas gotas de plasma da amostra em cada um dos tubos;
3. Adicionar uma gota de cada célula reagente no respetivo tubo;
4. Homogeneizar o conteúdo de cada tubo;
5. Incubar 30-60 min. a 37°C na incubadora ou banho-maria;
6. Centrifugar 20 seg. a 3000rpm;
7. Ressuspender cuidadosamente cada botão de células (um tubo de cada vez) e verificar se houve hemólise ou aglutinação;
8. Registrar os resultados (**Nesta fase o resultado obtido refere-se à PAI em salino a 37°C**);
9. Lavar o conteúdo dos tubos 3 vezes com soro fisiológico;
10. Adicionar 2 gotas do soro de Coombs (AGH) a cada um dos tubos;
11. Centrifugar 20 seg. a 3000rpm;
12. Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
13. Ressuspender cuidadosamente cada botão de células (um tubo de cada vez) e verificar se houve hemólise ou aglutinação;
14. Registrar os resultados (**PAI em meio AGH**);
15. Se não houver aglutinação, observar microscopicamente (objetiva de 10x);
16. Confirmar os negativos adicionando uma gota de células controlo de Coombs;
17. Homogeneizar e centrifugar 20 seg a 3000rpm;
18. Ressuspender e procurar aglutinação, que tem que estar presente para validar o teste.

### **PAI em meio de AGH**

O card utilizado é o ID Card “LISS/Coombs”. Este card contém antiglobulina humana (AGH) poliespecífica (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal).



### **Material, Reagentes e Equipamentos**

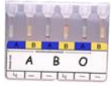
- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga
- Cronómetro
- Amostra colhida em EDTA
- ID - Card Liss/Coombs
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta
- ID-Incubadora
- ID-Centrífuga

### **Procedimento**

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Identificar o card:
  - Com o n.º de identificação da amostra;
  - Com o n.º de célula referente a cada célula reagente;
- 3- Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços que forem utilizados;
- 4- Inverter suavemente todos os frascos de células reagentes, as vezes necessárias até conseguir uma ressuspensão completa dos eritrócitos;
- 5- Pipetar uma gota (50 µL) das células reagentes para os respetivos micropoços do *ID Card “LISS/Coombs”*;
- 6- Adicionar 25 µL de plasma (ou 25 µL eluído) em cada micropoço;
- 7- Incubar o card durante 15 minutos a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  na ID-Incubadora;
- 8- Centrifugar o card durante 10 minutos na ID-Centrífuga;
- 9- Ler, interpretar e registar os resultados.

### **PAI em meio salino**

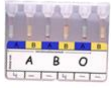
O meio salino é utilizado na pesquisa de anticorpos irregulares quando se pretende detetar anticorpos que reagem predominantemente a frio ou à temperatura ambiente. É também usado quando se pretende utilizar reagentes enzimáticos. O card “NaCl/enzyme test” contém gel neutro em suspensão. As técnicas salinas são utilizadas na deteção de anticorpos



que reagem sobretudo a 4°C ou a 18-25°C (temperatura ambiente), tais como anti-M, anti-N, etc.

### **Procedimento**

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
  - 2- Identificar o card ID-Card “NaCl/enzyme test”:
    - Com o número de identificação da amostra;
    - Com o número da célula referente a cada célula reagente;
- Nota:** Para salino a 4°C e salino a temperatura ambiente utilizar células ID-DiaCell I-II-III.
- 3- Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços que forem utilizados;
  - 4- Inverter suavemente todos os frascos de células reagentes, as vezes necessárias até conseguir uma ressuspensão completa dos eritrócitos;
  - 5- Pipetar uma gota (50 µL) de cada célula reagente, correspondente ao teste pretendido, para os respetivos micropoços do ID-Card “NaCl/enzyme test”;
  - 6- Adicionar 25 µL de plasma (ou 25 µL de eluído) em cada micropoço;
  - 7- Incubar o card:
    - Salino a 4°C – durante 30 minutos a 2-4°C em ambiente refrigerado;
    - ou
    - Salino à temperatura ambiente – durante 15 minutos à temperatura ambiente (18-25°C);
    - ou
    - Teste enzimático com células papaínizadas – durante 15 minutos a ± 37°C na ID – Incubadora;
  - 8- Centrifugar o card durante 10 minutos na ID-centrífuga;
  - 9- Ler, registar e interpretar os resultados.



## 9. Identificação de anticorpos

Perante um resultado positivo no teste anterior é necessário proceder à identificação do anticorpo. Determinar a especificidade de um anticorpo irregular é importante em testes pré-transfusionais e pré-natais. Se a especificidade do anticorpo é conhecida, é possível testar os eritrócitos da amostra para confirmar a ausência do antígeno correspondente.

Anticorpos irregulares nos doadores devem ser identificados também, embora em termos práticos as plaquetas e plasma sejam rejeitados independentemente do anticorpo encontrado, pode ser útil em termos estatísticos e/ou académicos para conhecer a população de doadores.

Em testes pré-natais, o conhecimento da especificidade do anticorpo presente na mãe ajuda a prever a possibilidade da Doença Hemolítica do Recém-nascido.

O objetivo deste teste é identificar anticorpos irregulares presentes em amostras que apresentem resultados de PAI positivas.

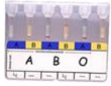
### Identificação de anticorpos em meio AGH

O card utilizado é o ID Card “LISS/Coombs”, este card contém antiglobulina humana poliespecífica (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal).

É utilizado por rotina um painel de 11 células comerciais, ID-DiaPanel, de origem humana com perfil antigénico conhecido, numa suspensão de 0,8%.

#### Procedimento

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Identificar os cards:
  - Com o número de identificação da amostra;
  - Com o número da célula referente a cada célula reagente;
- 3- Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços que forem utilizados;
- 4- Inverter suavemente todos os frascos de células reagentes, as vezes necessárias até conseguir uma ressuspensão completa dos eritrócitos;
- 5- Pipetar uma gota (50 µL) de cada célula reagente, para o respetivo micropoço;
- 6- Adicionar 25 µL de plasma da amostra (ou 25 µL de eluído) em cada micropoço;
- 7- Incubar os cards durante 15 minutos a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  na ID – Incubadora;
- 8- Centrifugar os cards durante 10 minutos na ID-centrífuga;



- 9- Ler, registar e interpretar os resultados na folha que acompanha o “ID – Dia Panel” / “ID-DiaPanel P”.

### Identificação de anticorpos em meio salino e/ou enzimas – Gel

O card “ NaCl/ Enzyme test” contem gel neutro em suspensão. O meio salino é utilizado na identificação de anticorpos irregulares que reagem predominantemente a frio, à temperatura ambiente, ou em presença de enzimas. São utilizados por rotina, painéis de células comerciais, ID – Dia Painel e ID – Dia Painel P (células tratadas com papaína), de origem humana com perfil antigénico conhecido, numa suspensão a 0,8% (Fig.24).

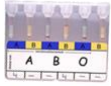
O tratamento das células com enzimas proteolíticas pode destruir alguns antígenos, inibindo ou potenciando a reatividade dos anticorpos.



Fig. 1 - ID-DiaPanel P.

#### Procedimento

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Identificar os cards:
  - Com o número de identificação da amostra;
  - Com o número da célula referente a cada reagente;
- 3- Remover a folha de alumínio dos micropoços necessários;
- 4- Pipetar 50 µL de cada uma das células reagente para os respetivos micropoços;
- 5- Adicionar 25 µL de plasma (ou 25 µL de eluído) a cada micropoço;
- 6- Incubar os cards:
  - Salino a temperatura ambiente Salino à temperatura ambiente – durante 15 minutos à temperatura ambiente (18-25°C);
  - ou
  - Teste enzimático com células papaínizadas durante 15 minutos a temperatura de 37°C na ID incubadora;
- 7- Centrifugar durante 10 minutos na ID centrífuga;



- 8- Ler, registar e interpretar os resultados na folha que acompanha o “ID – Dia Panel” / “ID-DiaPanel P”.

## 10. Titulação de anticorpos

A titulação de anticorpos permite determinar a concentração relativa de um determinado anticorpo em circulação. Depois de um determinado anticorpo ser identificado, e no caso de suspeita de este anticorpo ser causador de hemólise eritrocitária, é importante verificar se a sua concentração relativa poderá ser considerada crítica. Este é um método semi-quantitativo, no qual são efetuadas diluições sucessivas da amostra em estudo.

De acordo com as características do anticorpo em causa, pode efetuar-se o teste em diferentes meios: salino a frio, Coombs a 37°C ou teste enzimático com células papaínizadas a 37°C.

### Procedimento em Tubo

#### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Soro fisiológico
- Centrífuga
- Cronómetro
- Soro de Coombs
- Células controlo de Coombs
- Amostra colhida em EDTA

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Preparar diluições geométricas do soro ou plasma com soro fisiológico;
- 3- Identificar os tubos de hemólise:
  - Com o n.º de identificação da amostra;
  - Com o n.º da célula referente a cada célula reagente;
- 4- Pipetar soro fisiológico, plasma e seguir o esquema de transferência conforme a tabela para preparação de diluições;
  - Recomenda-se a substituição das pontas da pipeta após cada diluição;
- 5- Guardar a última diluição para continuar a titulação, se necessário;



- 6- Homogeneizar as diluições;
- 7- Adicionar a cada um dos tubos de diluição uma gota (50 µL) da célula reagente com o antigénio selecionado;
- 8- Incubar os tubos:
  - Salino a frio – durante 30 minutos a 2-4°C em ambiente refrigerado  
ou
  - Salino, Coombs, e teste enzimático com células papáinizadas – durante 60 minutos a ± 37°C;
- 9- Centrifugar 20 segundos a 3000 rpm ;
- 10- Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
- 11- Ressuspender os botões celulares agitando suavemente cada tubo;
- 12- Examinar a existência de aglutinação e registar os resultados;

**Tabela 1 - Tabela para preparação de diluições.**

Título/diluição	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Etc
Soro fisiológico (tubo) ou Dil. 2 (Gel)	—	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	Etc
Soro ou plasma	200µL									Etc
Transferir	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	Etc

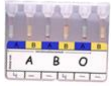


### Procedimento em Gel

As células reagentes selecionadas com o antigénio correspondente são as células ID – DiaCell I-II-III para teste de Coombs ou salino, as células ID – DiaCell I-II-IIIP para teste enzimático ou outras células reagentes se necessário. Os cards utilizados são o ID-Card “LISS/Coombs” para teste de Coombs e o ID-Card “NaCl/enzyme test” para teste enzimático ou salino.

### Material, Reagentes e Equipamentos

- Marcador
- Tubos de hemólise
- Suporte
- Pipetas de Pasteur
- Centrífuga
- Cronómetro
- Amostra colhida em EDTA
- ID - Card Liss/Coombs ou ID-Card “NaCl/enzyme test”
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta
- ID-Incubadora
- ID-Centrífuga



### Procedimento

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Preparar diluições geométricas de soro ou plasma, com Diluente 2:
  - Identificar tubos de hemólise para cada uma das diluições;
  - Pipetar Diluente 2, plasma e seguir o esquema de transferência conforme a tabela para preparação de diluições (apresentada anteriormente no procedimento em tubo);  
Recomenda-se a substituição das pontas após cada diluição.
- 3- Guardar a última diluição para continuar com a diluição;
- 4- Homogeneizar as diluições;
- 5- Identificar os cards:
  - Com o número de identificação da amostra
  - Com o número de diluição
- 6- Pipetar 50 µL da célula reagente selecionada para todos os micropoços;
- 7- Adicionar 25 µL de cada uma das diluições;
- 8- Incubar os cards:
  - Salino a frio – durante 30 minutos a 2-4°C em ambiente refrigerado;  
OU
  - Coombs a 37°C - durante 15 minutos a ± 37°C na ID – Incubadora;  
OU
  - Teste enzimático com células papaínizadas – durante 15 minutos a ± 37°C na ID – Incubadora
- 9- Centrifugar os cards durante 10 minutos na ID-centrífuga;
- 10- Ler, interpretar e registar os resultados;

O título de anticorpos em estudo deve corresponder à diluição mais alta onde se verifique aglutinação. Um título deve ser descrito como 64 ou 32, não 1 em 64 ou 1 em 32 como se pode observar no exemplo 1 e 2 da tabela apresentada a baixo.

Quando se verifica aglutinação na última diluição utilizada (exemplo 3) significa que o ponto final não foi encontrado, pelo que se deve prosseguir com as diluições e posterior titulação.

Uma reação negativa (ausência de aglutinação) indica que a amostra não contém anticorpos detetáveis contra qualquer um dos antígenos presentes nas células.

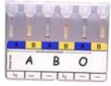
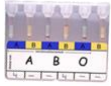


Tabela 2 - Exemplos de interpretação de resultados.

		Diluição do soro ou plasma									
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	título
Grau de aglutinação	Exemplo 1	3+	3+	3+	2+	2+	1+	±	0	0	64
	Exemplo 2	3+	2+	2+	1+	1+	±	0	0	0	32
	Exemplo 3	4+	4+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	—



## 11. Prova de Compatibilidade

A prova de compatibilidade consiste em pôr em contacto o soro do recetor com as células do(s) potenciais dador(es), de modo a detetar no recetor anticorpos suscetíveis de destruir as células do dador. Ou seja, tem por objetivo verificar “*in vitro*” a compatibilidade eritrocitária entre o dador e o recetor.

Para preparar uma transfusão sanguínea é necessário selecionar o componente sanguíneo mais adequado ao recetor da transfusão. Assim, uma prova de compatibilidade deve ser precedida por um estudo pré-transfusional.

Limitações: não consegue prever alo-imunização; não deteta erros Rh.

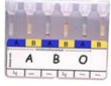
### Procedimento em Tubo

#### Material, Reagentes e Equipamentos

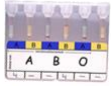
- Unidades de concentrados eritrocitários devidamente selecionados:
  - Isogrupais ou ABO Compatíveis;
  - Isentas de antigénio(s) correspondente ao(s) anticorpo(s), se presentes no soro ou plasma do doente em estudo
- Soro de Coombs
- Soro fisiológico
- Tubos de hemólise (preferencialmente de vidro para a reação)
- Microscópio
- Lâminas
- Centrífuga de tubos ou centrífuga lavadora
- Incubadora

#### Procedimento

- 1- Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
- 2- Retirar o segmento da tubuladura da(s) unidade(s) de concentrado eritrocitário selecionado;
- 3- Identificar um tubo com o número da unidade;
- 4- Perfurar o segmento da tubuladura por forma a que o seu conteúdo fique no tubo;
- 5- Lavar uma vez com soro fisiológico;
- 6- Para um tubo contendo soro fisiológico transferir uma quantidade de células, suficiente para fazer uma suspensão de 2-5%;



- 7- Identificar um tubo de hemólise de vidro:
  - com o número de identificação da amostra;
  - com o número de identificação da unidade que se pretende compatibilizar;
- 8- Pipetar 2 a 3 gotas de soro ou plasma da amostra para o tubo;
- 9- Adicionar uma gota (50 µL) de suspensão de células anteriormente preparada;
- 10- Homogeneizar o conteúdo do tubo;
- 11- Incubar durante 30-60 minutos a 37°C na ID-Incubadora;
- 12- Centrifugar 20 segundos a uma velocidade de 3000 rpm;
- 13- Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
- 14- Ressuspender os botões celulares agitando suavemente cada tubo;
- 15- Examinar a existência ou não de aglutinação;
- 16- Registrar os resultados, assinar e datar:
  - A leitura obtida neste passo constitui uma prova de compatibilidade em meio salino a 37°C ;
- 17- Lavar as células com soro fisiológico 3 vezes tendo o cuidado de decantar os tubos muito bem no fim de cada lavagem;
- 18- Adicionar 2 gotas de Soro de Coombs (AGH);
- 19- Centrifugar 20 segundos a uma velocidade de 3000 rpm;
- 20- Observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
- 21- Ressuspender os botões celulares agitando suavemente cada tubo;
- 22- Examinar a existência ou não de aglutinação;
- 23- Registrar os resultados:
  - A leitura obtida neste passo constitui uma prova de compatibilidade em meio AGH a 37°C;
- 24- Observar ao microscópio ótico todos os negativos;
- 25- Confirmar a validade dos resultados negativos:
  - adicionar a cada tubo com resultado negativo, uma gota das células controlo sensibilizadas com IgG;
  - centrifugar 20 segundos a uma velocidade de 3000rpm;
  - observar o líquido sobrenadante para verificar a presença ou não de hemólise;
  - ressuspender os botões celulares agitando suavemente cada tubo
  - examinar a existência de aglutinação;
- 26- Registrar os resultados.

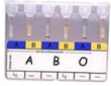


## Procedimento em Card

O card utilizado (“LISS/Coombs”) contém antiglobulina humana (AGH) poliespecífica (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal), ou seja é uma prova de compatibilidade em meio AGH.

### Procedimento

1. Colocar os reagentes à temperatura ambiente antes de usar;
2. Retirar o segmento da tubuladura da (s) unidade (s) de concentrado eritrocitário selecionado;
3. Identificar um tubo com o número da unidade;
4. Perfurar o segmento da tubuladura para que o seu conteúdo fique no tubo;
5. Identificar o card:
  - a. Com o número de identificação da amostra;
  - b. Com o número da (s) unidade (s) selecionada (s);
6. Remover a folha de alumínio (proteção) dos micropoços que forem utilizados;
7. Preparar uma suspensão de eritrócitos das tubuladuras das unidades a 0,8% em diluente 2:
  - a. Dispensar 1 mL de diluente 2 para um tubo de hemólise;
  - b. Adicionar 10 µL de células concentradas;
  - c. Homogeneizar a suspensão;
8. Pipetar 50 µL da suspensão anterior para o respetivo micropoço;
9. Adicionar 25 µL da amostra (recetor) em cada micropoço;
10. Incubar o card durante 15 minutos a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  na ID-Incubadora;
11. Centrifugar o card durante 10 minutos na ID-centrífuga;
12. Ler, interpretar e registar os resultados;



## 12. Estudo pré-transfusional

O principal objetivo de um estudo pré-transfusional é assegurar a compatibilidade serológica entre o dador e o recetor. No entanto, este estudo só se considera completo após a confirmação do grupo sanguíneo do doente (por prova celular e reversa), assim como a verificação do resultado da Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI). Em alguns casos, é ainda necessário realizar o Teste de Antiglobulina Direta (TAD) e determinar o fenótipo Rh.

### **Reagentes e equipamentos**

- Amostra do recetor / doente colhida em tubo seco ou de hemograma
- Amostra de concentrado de eritrócitos de dador
- Tubos de propileno
- ID-incubadora
- ID-centrífuga
- Pipeta “Multi-dispenser” Biorad
- Pontas Pipeta
- Cards e reagentes de todos os testes realizados

### **Grupo ABO/Rh**

### **Fenótipo Rh e K**

### **PAI (AGH) e IAI se a PAI é positiva**

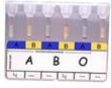
### **Prova de Compatibilidade**

### **ABD Confirmatório do CE**

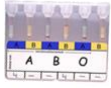
### **Interpretação de Resultados**

Após a realização deste estudo pré-transfusional, é necessário verificar a concordância de todos os resultados. Caso haja alguma discrepância ABO, PAI ou TAD positivo, assim como incompatibilidade entre o dador e o recetor, o estudo deverá prosseguir, no sentido de se avaliar as causas destes resultados inesperados. Poderá ser necessário:

- Solicitar nova amostra do doente
- Tomar conhecimento do historial clínico e transfusional do doente
- Selecionar um novo concentrado de eritrócitos
- Etc...



Em situações reais, um componente sanguíneo, nomeadamente concentrado de eritrócitos, não pode ser administrado enquanto todos os resultados inesperados não se encontrarem devidamente justificados.

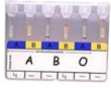


## 13. Método de Eluição Ácida

A eluição é um processo de recuperação de anticorpos ligados aos eritrócitos através da quebra das forças de ligação entre antígenos e anticorpos. O eluído ou eluado, obtido a partir das células sensibilizadas “in vivo” ou “in vitro”, pode ser utilizado para vários fins, sendo o mais comum a identificação de anticorpos que revestem glóbulos vermelhos em doentes com Teste de Antiglobulina Direta (TAD) Positivo.

Na técnica de eluição ácida, os glóbulos vermelhos revestidos com anticorpos são inicialmente lavados minuciosamente, de forma a remover qualquer vestígio de proteínas não ligadas, utilizando uma solução de lavagem que permite manter a ligação dos anticorpos. Após esta lavagem, os glóbulos vermelhos são suspensos numa solução de glicina de pH baixo, com o objetivo de dissociar os anticorpos. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo anticorpos dissociados é separado dos glóbulos vermelhos e neutralizado pela adição de uma solução tampão. Após uma rápida centrifugação para retirar alguns eritrócitos que possam ainda estar presentes, o eluído está então pronto para ser utilizado na deteção e/ou identificação de anticorpos.

**Procedimento** – seguir o procedimento da bula do kit a utilizar



## Anexo 1 – Suspensão de células 2-5%

As células a serem testadas devem ser lavadas de modo a remover soro ou plasma que pode conter proteínas que interferem com os testes, causando:

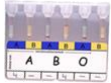
- 1-Aglutinação não específica;
- 2-Formação de rouleaux.

Além disso, a lavagem também remove o fibrinogénio, que pode originar pequenos coágulos.

A preparação de uma suspensão de células entre 2-5% proporciona uma concentração ótima de células para detetar anticorpos fracos. A razão soro/células afeta grandemente a sensibilidade dos testes de aglutinação.

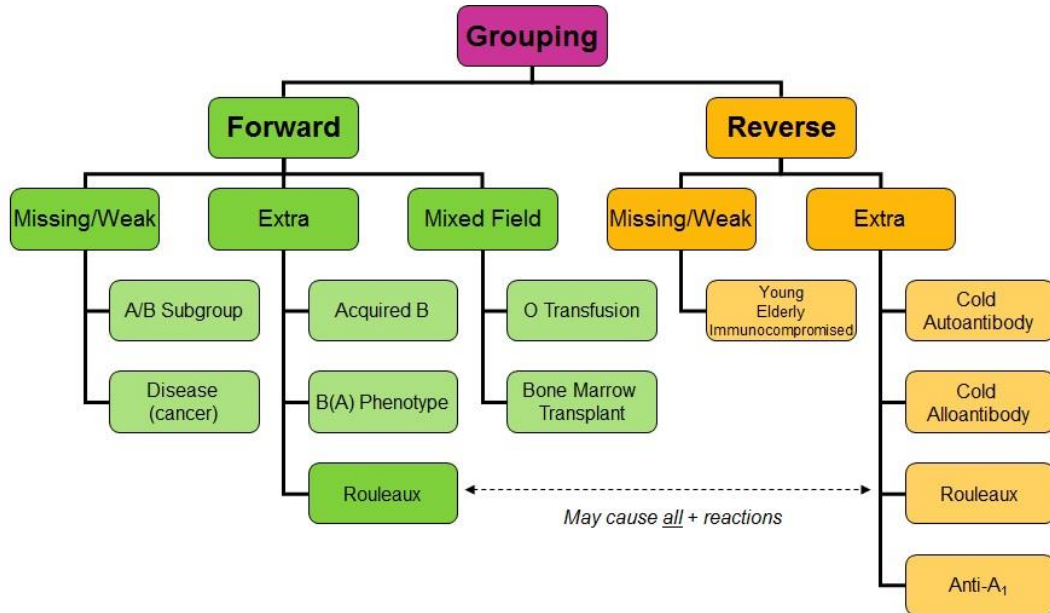
### Procedimento:

1. Identificar um tubo de hemólise com o número da amostra;
2. Com uma Pipeta de Pasteur de plástico transferir 10 gotas de células da amostra e encher o tubo com soro fisiológico (NaCl a 0,9%) até aos  $\frac{3}{4}$ ;
3. Centrifugar 60 seg. a 3500rpm;
4. Decantar o sobrenadante (com pipeta de Pasteur e agitar cuidadosamente para ressuspender completamente as células;
5. No caso de ser necessário mais do que uma lavagem, adicionar soro fisiológico até aos  $\frac{3}{4}$  do tubo e repetir o passo 3 e 4 (até 3 lavagens). Se se verificar hemólise, realizar mais lavagens até o sobrenadante estar límpido;
6. Para preparar a suspensão 2-5%, colocar num novo tubo de hemólise 500 $\mu$ L de soro fisiológico e adicionar 2 gotas de células lavadas (podem usar-se as quantidades em dobro caso esteja previsto fazerem-se muitos testes que usem esta suspensão, ex: ABO/Rh e Fenótipo Rh). Comparar a cor com as células reagente da mesma concentração.



## Exercícios

### Exercícios Disprepâncias ABO



#### Caso 1

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
3+	0	0	1+

Problema:

Causas:

Resolução:

#### Caso 2

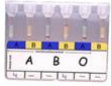
Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
3+	1+	0	4+

Problema:

Causas:

Resolução:

#### Caso 3



Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
2+	0+	1+	4+

Problema:

Causas:

Resolução:

#### Caso 4

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
0	0	0	3+

Problema:

Causas:

Resolução:

#### Caso 5

Anti-A	Anti-B	A1 Cells	B Cells
0	2+mf	3+	0

Problema:

Causas:

Resolução:



**Caso 6**

<b>Anti-A</b>	<b>Anti-B</b>	<b>A1 Cells</b>	<b>B Cells</b>
<b>4+</b>	<b>4+</b>	<b>0</b>	<b>1+</b>

Problema:

Causas:

Resolução:

**Caso 7**

<b>Anti-A</b>	<b>Anti-B</b>	<b>Anti-AB</b>	<b>A1 Cells</b>	<b>B Cells</b>	<b>O Cells</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4+</b>	<b>4+</b>	<b>4+</b>

Problema:

Causas:

Resolução:



## Exercícios Identificação de Anticorpos Irregulares

### Caso A

	Rh-hr					Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Xg	Resultados		
	D	C	E	c	e	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	P1	M	N	S	s	Lua	Lub	Xga	L/C	Enzi	4°C
1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	2+		
2	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	2+		
3	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	2+		
4	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	2+		
5	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0		
6	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0		
7	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0		
8	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	2+		
9	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0		
10	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0		
11	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0		

Anticorpo(s): \_\_\_\_\_



### Caso B

<b>DiaMed-ID</b> Micro Typing System 0123		<b>Antikörper-Suchtest</b> <b>Antibody screening</b> <b>Recherche d'anticorps</b>	<b>ID-DiaCell I-II-III</b> <b>ID-DiaCell I-II-III-P</b>																													
<b>Antigen-Tabelle</b> <b>Antigen-Table</b> <b>Table d'antigènes</b>																																
Rh-hr	Spender Donor Donneur	Rh-hr																		Spez. Antigene special types antigènes part.	Resultat Result Résultat											
		D	C	E	c	e	C <sup>s</sup>	K	k	Kp	Kp <sup>s</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>		P	M	N	S	s	L <sup>u</sup>	L <sup>v</sup>	Xg <sup>a</sup>	Xg <sup>b</sup>	LISS/ Coombs	Enzym Enzyme	4°C
I	C <sup>w</sup> CD.ee    R <sub>1</sub> <sup>w</sup> R <sub>1</sub>	073-1	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+				3+	4+	
II	ccD.EE    R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	073-2	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+				3+	4+	
III	ccddee    rr	073-3	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+				3+	0	
				Eigenkontrolle Autocontrol Autocontrôle																												

Die farbig gekennzeichneten Antigene können im Enzymtest unterdrückt oder zerstört werden.  
 Shaded columns indicate antigens destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment.  
 La réaction peut être inhibée avec les anticorps des systèmes MNSs, Duffy et Xg, si les hématies sont traitées aux enzymes protéolytiques.

s = stark/strong/fort  
 w = schwach/weak/faible  
 nt = nicht getestet/not tested/pas testé

	I-II-III	I-II-III-P	
<b>LOT</b> 10 mL	I 06084.30.x	06134.30.x	(Japan: 0608.30.xx/0613.30.xx)
	II 06094.30.x	06144.30.x	(Japan: 0609.30.xx/0614.30.xx)
	III 06104.30.x	06154.30.x	(Japan: 0610.30.xx/0615.30.xx)
<b>LOT</b> 5 mL	I 06084.30.x	06134.30.x	(Japan: 0608.30.xx/0613.30.xx)
	II 06094.30.x	06144.30.x	(Japan: 0609.30.xx/0614.30.xx)
	III 06104.30.x	06154.30.x	(Japan: 0610.30.xx/0615.30.xx)
Set I-II-III 10 mL	45184.30.x		(Japan: 4518.30.xx)
Set I-II-III 5 mL	45404.30.x		(Japan: 4540.30.xx)
Set I-II-III P 10 mL	45194.30.x		(Japan: 4519.30.xx)
Set I-II-III P 5 mL	45414.30.x		(Japan: 4541.30.xx)
	2005.10.03		(Japan: 03.10.05)

Name/name/nom _____ <i>Deme B</i>	Blutgruppe + Antigene Bloodgroup + antigens Groupe de sang + antigènes <i>B Rh négative</i>	Interpretation Interpretation Interprétation	Untersuchungsdatum Examined on Date de l'analyse
--------------------------------------	--	--	--





### Caso C

	Rh-hr					Kell		Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS				Luth.		Xg	Resultados		
	D	C	E	c	e	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	P1	M	N	S	s	Lua	Lub	Xga	L/C	Enzi	4°C
1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	2+	0	
2	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	+	3+	3+	
3	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	
4	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	1+	0	
5	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0	0	
6	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	2+	2+	
7	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	2+	0	
8	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	
9	0	0	0	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	1+	0	
10	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	
11	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	2+	0	

Anticorpo(s): \_\_\_\_\_