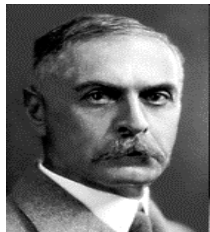


Tema SISTEMA ABO E DISCREPÂNCIAS NA CLASSIFICAÇÃO DIRETA E REVERSA

Elaboradora **Margarida de Oliveira Pinho**, Bióloga, Responsável pelo Setor de Imunohematologia e Coordenação da equipe técnica do Serviço de Hemoterapia do Instituto Nacional de Câncer-M.S. RJ, Título de Proficiência Técnica em Imunohematologia pela SBHH, Especialização em Hemoterapia - Instituto Fernandes Figueira - FioCruz.

Texto Introdutório



Karl Landsteiner, o pai da Imunohematologia Conferência Nobel, 1930

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1930/landsteiner-lecture.pdf

O **Sistema ABO**, foi o primeiro dos grupos sangüíneos a ser descoberto (1900-1901), no início do século XX, marcando assim o início de um período científico em busca de respostas para os insucessos relacionados a medicina transfusional até 1900. Landsteiner utilizou seu próprio sangue e amostras de seus colaboradores para fazer diferentes combinações, testando hemácias de uns com soro de outros. Durante o experimento, observou que células de uns reagiam (apresentavam aglutinação) com soro de outros e que algumas células não apresentavam reação de aglutinação. Assim, Landsteiner classificou os seres humanos em três grupos sangüíneos: A, B e O, e explicou por que algumas pessoas morriam depois de transfusões de sangue e outras não.

Em 1902, seus colaboradores von Decastello e Sturli encontraram e descreveram o grupo AB. O Sistema ABO continua sendo o mais importante de todos os grupos sangüíneos na prática transfusional. A transfusão de sangue realizada com incompatibilidade maior ABO pode resultar na morte do paciente.



Embora inadvertidamente, Landsteiner foi o primeiro a realizar a classificação direta e reversa, que são definidas como:

- Classificação direta – utilização de reagentes conhecidos, anti-soros com especificidade definida (anti-A e anti-B) para detectar antígenos nas hemácias de um indivíduo.
- Classificação reversa – utilização de hemácias reagentes com antígenos conhecidos (A₁ e B) para detectar anticorpo(s), relacionados ao sistema ABO, no soro e/ou plasma de um indivíduo.

Resultados de Classificação Sangüínea

Classificação direta (determina o antígeno)			Classificação reversa (determina o anticorpo) "natural"		Resultado
Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Hemácias A ₁	Hemácias B	Grupo Sangüíneo
+	0	+	0	+	A
0	+	+	+	0	B
+	+	+	0	0	AB
0	0	0	+	+	O

A partir das reações observadas, Landsteiner concluiu que os indivíduos possuíam "anticorpos naturais" contra o antígeno ABO que faltava na superfície de suas hemácias. No entanto, o termo "natural" é indevido. Evidências substanciais sugerem que a produção de anti-A e anti-B é estimulada por substâncias presentes na natureza. As bactérias mostram-se quimicamente similar aos antígenos ABO e podem atuar como fonte de estímulo para formação de anticorpos. A produção desses anticorpos é iniciada ao nascimento, mas geralmente só são detectáveis entre os três e seis meses de vida, com total produção dos 5 a 10 anos de idade. Em sangue de cordão umbilical e de recém-natos realizar somente a classificação direta. A classificação reversa não é indicada, uma vez que, os anticorpos do sistema ABO não estão presentes ao nascimento e quando encontrados são de origem materna.

Herança dos grupos sanguíneos ABO

- Descrita pela primeira vez por Bernstein em 1924.
- Demonstrou que cada indivíduo herda um gene ABO de cada genitor (pai e mãe) e que estes dois genes determinam quais antígenos ABO estarão presentes na membrana da hemácia.
- Sua posição, ou locus, está no cromossoma 9.
- O gene **O** é considerado amorfo, pois nenhum antígeno detectável é produzido em resposta à herança deste gene.
- As designações A e B se referem a fenótipos, enquanto que AA, BB e OO referem-se a genótipos.

Formação dos antígenos ABO

- Os genes ABO não codificam a produção de antígenos ABH, mas produzem glicosil-transferases específicas que acrescentam açúcares (monossacarídeos) a uma substância precursora básica na hemácia.
- A ação do gene H está intimamente relacionada com a formação dos antígenos ABO.
- A herança do gene H é independente da herança dos genes ABO, mas os antígenos A, B e H são todos formados a partir da mesma substância básica.
- A enzima fucosil-transferase adiciona uma fucose, dando origem ao chamado antígeno H.
- A substância básica tem um arcabouço protéico ou lipídico ao qual se fixam açúcares.
- Cada um dos genes H, A e B controlam a fixação de um açúcar diferente.

O gene A produz uma α -N-acetilgalactosaminiltransferase, adiciona o monossacarídeo N-acetilgalactosamina ao antígeno H, formando o antígeno A.

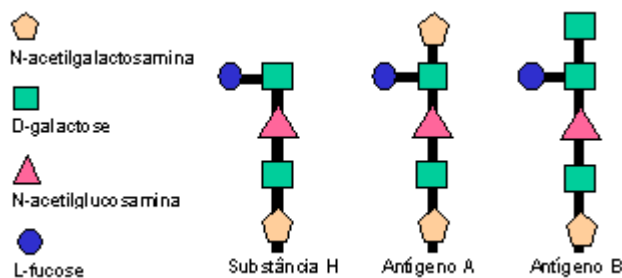
O gene B produz uma α -D-galactosiltransferase, que transporta uma D-galactose ao antígeno H, formando o antígeno B.

Conforme descrito acima, esses açúcares representam as partes terminais de glicolipídios e glicoproteínas da membrana eritrocitária, formando assim o antígeno (GENE \rightarrow ENZIMA \rightarrow AÇÚCAR).

O gene O é amorfo, não produzindo transferase, não acrescenta açúcar à substância H e apresenta a mais elevada concentração de antígeno H.

A substância H deve ser formada em primeiro lugar pela herança, a fim de se ligar a outros açúcares em resposta a um gene ABO herdado.

Os antígenos ABH podem ser encontrados na saliva e líquidos biológicos. São encontrados na maioria das células epiteliais e endoteliais (transplante de rim e pulmão). Todos esses antígenos estão expressos a partir do 37º dia de vida fetal. Além da idade, a expressão fenotípica dos antígenos ABH pode variar com raça, interação genética e os estados patológicos.

Formação dos antígenos ABH**Fenótipo Bombay (O_h)**

É muito raro e está diretamente relacionado com a presença do alelo h e não produz α -2-L-fucosiltransferase necessária para a formação da estrutura H. O genótipo hh ou H_{nullo} é extremamente raro e é conhecido como fenótipo Bombay ou O_h. As hemácias desses indivíduos não reagem com soros anti-A, anti-B, ou anti-H e seu soro contém anti-A, anti-B, anti-AB e anti-H. Os indivíduos Bombay são incompatíveis com todos os grupos ABO e só apresentam compatibilidade com sangue de indivíduos Bombay. Na tipagem sanguínea, apresenta classificação direta com **O** e na reversa, reage com as hemácias ABO devido ao genótipo homocigoto para hh e como consequência, a produção do anti-H que reage com as hemácias A, B, AB e **O**.

Discrepâncias entre as classificações direta e reversa

É considerada discrepância, a discordância entre a classificação direta e reversa. Segundo a RDC 153/2004 (M.S.), toda discrepância deve ser resolvida antes da liberação do resultado.

De acordo com a literatura, a causa mais freqüente das discrepâncias é o erro técnico e para ser descartado é necessário repetir a classificação direta e reversa verificando as principais causas abaixo:

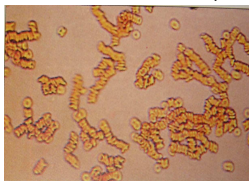
- Identificação inadequada da amostra;
- Suspensão de hemácias inadequadas, muito concentrada ou muito diluída;
- Erro de transcrição (clerical);
- Troca de amostras;
- Hemólise não observada;
- Falha ao colocar o reagente, deixar de colocar ou trocar;
- Não seguir a orientação do fabricante;
- Reagentes ou soluções contaminadas;
- Reagentes fora da validade;
- Centrífuga sem calibração;
- Temperatura inadequada (de armazenamento e centrifugação).

Após verificar todos os passos técnicos, repetir a classificação direta e reversa. Essa conduta resolve um grande percentual das discrepâncias relacionadas a erros técnicos. Caso não resolva, solicitar uma nova amostra com histórico do paciente para avaliar outras causas associadas a algumas patologias.

Vários estados patológicos podem causar discrepâncias entre a classificação direta e reversa. Para investigar e tentar solucionar a discrepância é fundamental ter acesso a algumas informações como: diagnóstico, história transfusional e/ou gestacional, uso de medicamentos e níveis de imunoglobulinas.

As discrepâncias ABO podem ser arbitrariamente divididas em quatro grandes categorias:

	Tipos de discrepâncias	Podem ocorrer nas seguintes situações:	Resolução
Grupo I	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Depois dos erros técnicos são as mais comuns; ▪ Depressão ou ausência de anticorpos do sistema ABO; ▪ Ausência de anticorpos do sistema ABO; ▪ Quimerismo. <p>* Raro ** Mais freqüente</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recém-natos, idosos, pacientes imunodeficientes, pacientes submetidos a transplante de medula óssea; ▪ Leucemias e linfomas com hipogamaglobulinemia; ▪ Em uso de drogas imunossupressoras que geram hipogamaglobulinemia; ▪ Agamaglobulinemia congênita. <p>*O verdadeiro quimerismo pode ocorrer em gêmeos por dispermia (dois espermas fertilizando em um mesmo óvulo) e se manter durante toda a vida.</p> <p>**São os artificiais que geram população de campo misto resultante de transfusões de sangue "O" em pacientes de grupo A, B ou AB, transplante de medula óssea; transfusões de troca (exsangüíneotransfusão) e sangramento feto-materno.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incubar o soro do paciente com hemácias reagente A₁ e B à temperatura ambiente durante aproximadamente 15 a 30 minutos; • Se a discrepância persistir, incubar o teste a uma temperatura de 4°C durante 15 a 30 minutos. <p>*Quando detectada a causa, é importante estabelecer uma conduta para transfusão de hemocomponentes e o paciente deve ser orientado e receber um laudo com a conduta transfusional.</p> <p>** Estes casos geralmente são de ocorrência temporária. Para pacientes submetidos a transplante de medula óssea com incompatibilidade ABO, deve-se previamente definir uma conduta transfusional, além de repetir a classificação sangüínea sempre que o paciente for submetido a transfusão de hemocomponentes. Na grande maioria, essas discrepâncias se mantêm por longo tempo e o cuidado deve ser redobrado. É importante sempre buscar a história do paciente, como transfusões recentes com sangue "O" em pacientes de outros grupos (transfusões de troca). Sabendo-se que as hemácias tem uma sobrevivência de 120 dias <i>in vivo</i>, recomenda-se repetir a classificação após esse período.</p>

Grupo II	<ul style="list-style-type: none"> Antígenos com fraca reatividade ou ausentes. 	<p>Subgrupos de A e/ou B</p> <ul style="list-style-type: none"> Leucemias podem ser a causa de antígenos A ou B fracos; Doença de Hodgkin; Quantidade excessiva de substância solúvel específica de grupo sanguíneo presente no plasma em associação com carcinoma de estômago e pâncreas; Fenômeno de "B" adquirido, associado à obstrução intestinal ou neoplasia de estômago ou intestino; Anticorpos para antígenos de baixa incidência nos reagentes anti-A ou anti-B. 	<ul style="list-style-type: none"> Incubar o teste à temperatura ambiente por 30 minutos; Se a discrepância persistir, incubar o teste a uma temperatura de 4°C de 15 a 30 minutos; Tratar as hemácias em teste com enzima; Lavar as hemácias do paciente para remover a substância grupo específica que é capaz de neutralizar os reagentes comerciais; B adquirido (pseudo-antígeno) aparece em paciente do grupo A e apresenta reação de campo misto com soro anti-B; Checar história clínica do paciente; Utilizar reagentes de lotes e marcas diferentes é uma boa alternativa; Não apresentam reação com anti-B, pH superior a 8,5 ou inferior a 6,0; Repetir o teste com soro anti-B acidificado pH 6,0, deve aglutinar somente o antígeno B verdadeiro; Pacientes secretores com B adquirido não secretam B.
	<ul style="list-style-type: none"> Ocorrem por anormalidades das proteínas ou do plasma e resultam na formação <i>Rouleaux</i> ou empilhamento de hemácias. <p>Observado ao microscópio</p> 	<ul style="list-style-type: none"> Amostra de sangue de cordão com geléia de Wharton, que é um mucopolissacarídeo; Pacientes com hipergamaproteinemia. 	<ul style="list-style-type: none"> Lavar as hemácias de cordão de 6 à 8 vezes; Lavar as hemácias do paciente pelo menos três vezes antes de realizar os testes; Diluir o soro em salina pode resolver, permitindo que apenas a aglutinação verdadeira permaneça; Preferencialmente utilizar o método em tubo.
	<ul style="list-style-type: none"> Podem ocorrer por diversas causas. 	<p>Poliaglutinação, alo e auto-anticorpos frios, auto-anticorpos quentes, isoaglutininas ABO irregulares, complexo antígeno-anticorpo que podem ser absorvidos pelas hemácias do paciente (ex. auto-anticorpos contra acriflavina, corante amarelo utilizado em reagentes anti-B). As hemácias com "fenótipo AB" cis (uma ocorrência rara) expressam um antígeno A fracamente reativo (análogo às células A₂) e um antígeno B fraco. Anti-B fraco (presente na maioria dos indivíduos "cis-AB") leva a uma discrepância ABO na classificação reversa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Fazer uma pesquisa de anticorpos (PAI); Painel de identificação de anticorpo; Realizar testes de auto-adsorção ou absorção com hemácias tratadas com enzimas; Retestar à 4°C ou realizar teste pré-aquecido; A escolha do teste depende da discrepância e do resultado da Pesquisa de Anticorpos.

Utilizar em paralelo um autocontrole e um controle de células do grupo O. Os testes para resolução das discrepâncias somente serão validados quando os resultados dos controles forem negativos.

O questionário com as imagens coloridas, encontra-se no site www.controllab.com.br, na área de clientes *Offline*.

Rotina Básica para Esclarecimento das Discrepâncias mais Frequentes

1. Repetir a classificação direta e reversa;
2. Lavar as hemácias do paciente por pelo menos três vezes antes da repetição;
3. Se for sangue de cordão, lavar no mínimo 6 vezes;
4. Verificar se o soro e/ou plasma estão límpidos, sem hemólise, sem fibrina e sem hemácias;
5. A suspensão das hemácias deve estar na concentração adequada a técnica utilizada;
6. Para repetição do teste, recomenda-se utilizar o método em tubo;
7. Os reagentes devem estar em temperatura ambiente para não interferir nos testes;
8. Realizar em paralelo a Pesquisa de Anticorpo Irregular (PAI) para verificar a presença de anticorpo irregular que pode ser responsável pela discrepância;
9. Realizar em paralelo o Teste de Antiglobulina Direto (TAD) para verificar a presença de anticorpos na superfície das hemácias e que possam causar as discrepâncias;
10. Se possível, utilizar hemácias A₂ para classificação reversa, que auxiliam na identificação de anti-A₁ formados principalmente por indivíduos do subgrupo A₂.

Após essa conduta, se a discrepância persistir, é necessário utilizar técnicas mais específicas encontradas na bibliografia indicada.

Questão 1

Segundo a literatura, assinale a causa mais freqüente de discrepância na classificação ABO:

1. Ausência de anticorpos;
2. Quimerismo;
3. Presença de aloanticorpo;
4. Erro técnico.

Questão 2

Para rastrear a causa de uma discrepância na classificação ABO e um possível erro técnico, é indispensável:

1. Checar a identificação da amostra;
2. Refazer a suspensão de hemácias e repetir o teste;
3. Seguir corretamente a orientação do fabricante dos reagentes;
4. Todas as alternativas estão corretas.

Questão 3

São causas mais freqüentes de erros técnicos, **exceto**:

1. Reagentes ou soluções contaminadas;
2. Centrífuga descalibrada;
3. Reagentes aprovados pelo controle de qualidade;
4. Reagentes armazenados em temperatura fora dos parâmetros preconizados pelo fabricante.

Questão 4

A depressão e/ou ausência de anticorpos do sistema ABO, é a segunda causa mais freqüente de discrepância na classificação ABO reversa e é comum encontrar em amostras de:

1. Doadores de sangue;
2. Recém-natos;
3. Adultos saudáveis;
4. Adolescentes saudáveis.

Questão 5

O Quimerismo verdadeiro, embora raro, é causa de discrepância na classificação ABO direta, apresentando duas populações de células (campo misto) e se mantém por toda vida. Assinale a opção que pode indicar um possível Quimerismo:

1. Pesquisa de anticorpo irregular;
2. Teste de Antiglobulina Direto;
3. Colher a história do paciente, principalmente para saber se é gêmeo;
4. Testar com lecitina anti-A₁.

Questão 6 O *Rouleaux* ou pseudo-aglutinação é causa de discrepância na classificação ABO, principalmente em amostras de pacientes com hipergamaproteinemia e sangue de cordão com geléia de Wharton. Que recurso técnico é indicado para possível resolução da discrepância?

1. Lavar as hemácias do paciente pelo menos três vezes;
2. Lavar as hemácias de cordão no mínimo 6 vezes com salina;
3. Utilizar preferencialmente a técnica em tubo;
4. Todas as alternativas estão corretas.

Questão 7 O açúcar imunodominante responsável pela especificidade do grupo A é:

1. L-fucose;
2. D-galactose;
3. N-acetilgalactosamina;
4. Todas as alternativas estão corretas.

Questão 8 A classificação ABO de um paciente apresenta as seguintes reações:

Classificação direta			Classificação reversa	
Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Células A ₁	Células B
4+	Neg.	4+	2+	4+

A pesquisa de anticorpo irregular e o teste direto de antiglobulina humana foram realizados como testes complementares e os resultados foram negativos. O que poderia justificar a discrepância encontrada?

1. Paciente A₁B com anti-A₁;
2. Paciente é A₁ com B adquirido;
3. Paciente é A₂ com anti-A₁;
4. Alta concentração de proteínas.

Questão 9 A classificação ABO de um paciente apresenta as seguintes reações:

Classificação direta			Classificação reversa			Controle
Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Células A ₁	Células B	Células O	Auto-controle
4+	Neg.	4+	2+	4+	2+	Neg.

O que poderia ser feito para resolver essa discrepância?

1. Fazer pesquisa de anticorpo irregular e painel de identificação;
2. Lavar as hemácias do paciente;
3. Verificar a idade e os níveis de imunoglobulina do paciente;
4. Fazer auto-absorção.

Questão 10 Paciente com história de obstrução intestinal apresenta discrepância na classificação ABO.

Classificação direta			Classificação reversa			Controle
Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Células A ₁	Células B	Células O	Auto-controle
4+	1+ (cm)	4+	Neg.	4+	Neg.	Neg.

Qual seria a principal suspeita?

1. Grupo A com antígeno B adquirido;
2. Reação transfusional hemolítica;
3. As alternativas 1 e 2 estão corretas;
4. Subgrupo de A.

<p>Questão 11</p>	<p>No caso de suspeita de antígeno “B adquirido”, qual seria a melhor conduta para resolver a discrepância?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Usar reagente de qualidade, principalmente em relação ao título e especificidade; 2. Checar a história do paciente, à procura de problemas gastrointestinais baixos; 3. Acidificar reagente de tipagem anti-B e repetir o teste; 4. As alternativas 2 e 3 estão corretas. 																					
<p>Questão 12</p>	<p>Assinale a causa mais provável dos resultados abaixo:</p> <table border="1" data-bbox="470 571 1348 705"> <thead> <tr> <th colspan="3">Classificação direta</th> <th colspan="3">Classificação reversa</th> <th>Controle</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Anti-A</td> <td>Anti-B</td> <td>Anti-A,B</td> <td>Células A₁</td> <td>Células B</td> <td>Células O</td> <td>Auto-controle</td> </tr> <tr> <td>Neg.</td> <td>Neg.</td> <td>Neg.</td> <td>Neg.</td> <td>Neg.</td> <td>Neg.</td> <td>Neg.</td> </tr> </tbody> </table> <ol style="list-style-type: none"> 1. Anticorpo frio presente no soro do paciente; 2. Doador de sangue; 3. Paciente idoso com hipogamaglobulinemia; 4. Gestantes. 	Classificação direta			Classificação reversa			Controle	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Células A ₁	Células B	Células O	Auto-controle	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Classificação direta			Classificação reversa			Controle																
Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	Células A ₁	Células B	Células O	Auto-controle																
Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.																
<p>Questão 13</p>	<p>Em relação ao controle de qualidade em imunohematologia, segundo a RDC 153 de 14 de junho de 2004 da ANVISA, é incorreto afirmar:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Os reativos devem ser armazenados de acordo com as instruções do fabricante; 2. Realizar o controle de qualidade em cada lote recebido; 3. Os reagentes que não apresentarem especificidade devem ser liberados para uso; 4. O Controle de Qualidade dos soros reagentes deve ser feito com hemácias comerciais. 																					
<p>Questão 14</p>	<p>O soro de um indivíduo Bombay contém anti-A, anti-B, anti-A,B e anti-H. Caso necessite de transfusão, que tipo sanguíneo deverá ser selecionado?</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. A; 2. Bombay; 3. AB; 4. O. 																					
<p>Questão 15</p>	<p>Foi solicitada transfusão de concentrado de hemácias para um paciente que apresentou discrepância na classificação ABO. Após investigação, verificou-se que o paciente é subgrupo de A (A₂ com anti-A₁). Assinale a melhor opção de concentrado de hemácias para transfusão desse paciente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. O; 2. A₁; 3. A₁,B; 4. B; 																					

Referências Bibliográficas:

- DANIELS, G. Human Blood Groups. 2ª ed. Blackwell Science - 2002.
- HARMENING, D. Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ª ed - Editora Revinter,2006.
- RDC 153, de 14 de Junho de 2004.