

Procedimentos de Titulação

Um Guia para Boas Práticas de Laboratório



Identificação

Documento

Procedimentos de Titulação - Um Guia para Boas Práticas de Laboratório
2019/10 - v. PTBR. 06/2023

Direitos Autorais e Isenção de Responsabilidade

Direitos Autorais 2018, DiaMed GmbH, Pra Rond 23, 1785 Cressier FR, Suíça.

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida de qualquer forma ou por qualquer meio sem a permissão prévia por escrito do editor. Embora todas as precauções tenham sido tomadas durante a preparação do documento, o editor não assume nenhuma responsabilidade por erros ou omissões.

Também não é assumida qualquer responsabilidade por danos resultantes do uso das informações aqui contidas.

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. em certas jurisdições.

IH-500 é uma marca registrada da Bio-Rad Europe, GmbH em certas jurisdições.



Conteúdo

Procedimentos de Titulação

Identificação	2
Capítulo 1: Introdução	4
Capítulo 2: Boas Práticas de Laboratório	5
2.1 Preparação das Diluições	5
2.2 Controles	5
2.3 Escolha das Hemácias-Teste	6
2.4 Anticorpo Deve Ser Identificado Antes da Titulação	6
2.5 Interpretação dos Resultados	6
2.6 Pontuação (score) e Reporte dos Resultados	7
2.7 Exemplos	7
Capítulo 3: Perguntas Frequentes	14

1 ■ Introdução

A titulação de anticorpos é um método semiquantitativo de determinação da concentração de anticorpos e pode ser realizado por vários motivos:

- Para monitorar aloanticorpos de potencial importância em mulheres grávidas. Esta é a razão mais comum para a titulação de anticorpos.
- A titulação de anticorpos ABO é realizada para permitir a avaliação clínica da viabilidade do transplante ABO incompatível e o monitoramento do tratamento para reduzir o título de anticorpos em preparação para o transplante ABO incompatível.
- Para investigar os chamados anticorpos “HTLA” de alto título e baixa avidéz. Por exemplo, anticorpos agora conhecidos por pertencerem ao sistema de grupo sanguíneo Knops.
- Para determinar a especificidade relativa de autoanticorpos na Anemia Hemolítica Autoimune à quente (AHA), por exemplo em um eluato. Na Síndrome da Aglutinina Fria, a titulação pode ajudar a elucidar a especificidade do autoanti-I exibindo uma ampla faixa térmica.
- Para determinar o status do antígeno em hemácias com Teste da Antiglobulina Direto (TAD) positivo, quando os reagentes para a remoção do IgG das hemácias a serem tipadas não estiverem disponíveis ou não forem bem sucedidos.
- Para avaliar a densidade antigênica de reagentes de hemácias, embora isso tenha sido amplamente substituído por métodos mais precisos, como citometria de fluxo.
- Para avaliar as características de um novo antissoro ou comparar um novo lote com um anterior.

2 ■ Boas Práticas de Laboratório

A titulação geralmente é descrita como um “procedimento inerentemente impreciso”.

Como para qualquer outro método laboratorial, a padronização é, portanto, indispensável para minimizar variáveis que possam interferir com um resultado

preciso e significativo. Os resultados também dependem da constante de equilíbrio do próprio anticorpo além de sua concentração, tornando muito importante o controle dos parâmetros do teste. Os principais fatores a serem considerados incluem os seguintes itens.

2.1 Preparação das Diluições

A titulação usa uma diluição em série, na razão 2, da amostra pura (não diluída), 1:2, 1:4, ... até 1:2048 (12 tubos). O número de diluições preparadas pode ser adaptado ao que for mais conveniente para o método a ser seguido.

As titulações são mais precisas quando volumes maiores são usados ao preparar as diluições.

Os tubos - como os contidos nas racks do ID-System - devem estar sem uso, limpos e devem ter tamanho

suficiente para permitir a mistura completa de cada diluição da série.

Uma pipeta volumétrica devidamente calibrada com uma ponteira limpa deve ser usada para preparar cada uma das diluições da série.

No IH-500, é usado a ID-Titration Rack (rack dedicada). O equipamento contém uma “pipeta devidamente calibrada e precisa” e as agulhas são devidamente lavadas ao fazer as diluições seriadas.

2.2 Controles

Recomenda-se titular um anticorpo padrão de concentração conhecida ou com um título “esperado” para validar o procedimento de titulação (ver tabelas com os exemplos nas páginas seguintes). Isso também pode ser realizado como um controle de rotina do método. Isso ajudará a minimizar a variabilidade que afeta o desempenho técnico.

Quando a titulação está sendo realizada para o acompanhamento da gravidez, a primeira amostra - geralmente por volta da 12^a semana - estabelece o título base. Todas as titulações subsequentes devem ser realizadas em paralelo com a amostra anterior. Novamente, isso minimizará a variação inerente à técnica e proporcionará um reflexo mais preciso do título do anticorpo.

As amostras devem ser armazenadas congeladas (a -20°C ou menos). Atenção especial deve ser dada ao descongelar amostras: gradientes de concentração são produzidos durante o descongelamento, pois a solução concentrada derrete primeiro e depois desce dentro do tubo ao longo da parede interna.

Após o descongelamento, o tubo deve ser invertido várias vezes. Antes do teste, o tubo deve ser examinado quanto à presença de qualquer material não dissolvido. Quando presente, aquecer cuidadosamente a amostra à 37°C¹ pode ser útil.

¹ Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC: AACC Press; 1997: 4- 180, 181,533

2.3 Escolha das Hemácias-Teste

Sempre que possível, a mesma fonte de antígeno deve ser usada todas as vezes, pois há grande heterogeneidade na expressão do mesmo antígeno entre hemácias de mesmo fenótipo, aparentemente.

Por exemplo, hemácias R₁R₂ (DCcEe, RH:1,2,3,4,5) podem ter entre 23.000 e 31.000 cópias² do antígeno D. Como é impossível para a maioria dos laboratórios ter as mesmas hemácias disponíveis para acompanhamento durante toda a gravidez, recomenda-se a utilização de um pool de três hemácias (volume a volume) do mesmo fenótipo. Juntamente com a realização da titulação com a amostra anterior, em paralelo, isso minimiza a variabilidade.

As hemácias selecionadas devem ser preparadas com precisão de acordo com o método de teste usado, por exemplo 0,8% no diluente apropriado para o ID-System. Recomenda-se fortemente o uso de reagentes de hemácias

prontos para uso. Os volumes apropriados devem ser dispensados usando uma pipeta volumétrica calibrada.

Há um grande debate se as hemácias usadas para titulação devem possuir antígenos em dose única ou dupla, em particular durante a gravidez. A maioria dos países, mas não todos, recomendaria o uso de hemácias em dose única (expressão heterozigótica). O raciocínio por trás disso é que o feto de uma mãe aloimunizada nunca será homozigoto para o gene em questão. Portanto, o uso de hemácias em dose única irá simular melhor a situação *in vivo*.

Duas coisas são claras:

- Os laboratórios devem usar as hemácias recomendadas por suas diretrizes locais.
- A chave para a padronização é usar sempre o mesmo fenótipo como um procedimento padrão.

2.4 Anticorpo deve ser identificado antes da titulação

Não faz sentido realizar a titulação apenas com base em um teste de triagem de anticorpos positivo.

Conforme explicado na seção 2.3, uma escolha adequada das hemácias-teste só pode ser feita quando o anticorpo for devidamente identificado.

Além disso, pode haver múltiplos anticorpos presentes e, se não forem devidamente identificados, podem interferir no resultado da titulação.

Se mais de um anticorpo estiver presente, a seleção das hemácias-teste para titulação deve ser feita com cuidado, para garantir que o título de cada anticorpo seja avaliado independentemente.

Por exemplo, uma mistura de anti-K+Fy^a (anti-KEL1+FY1), duas titulações independentes devem ser feitas, a primeira utilizando hemácias K-;Fy(a+b+) / (KEL:-1;FY:1,2) e a segunda utilizando hemácias K+k+;Fy(a-) / (KEL:1.2;FY:-1).

2.5 Interpretação dos Resultados

Ao dispensar as diluições devidamente preparadas, recomenda-se começar com a diluição mais alta e terminar com a amostra pura (não diluída), para evitar qualquer possibilidade de carregamento devido a um anticorpo forte.

Pontos finais claros devem ser definidos. Normalmente, a última diluição que produz um resultado 1+ (+ no ID-System) é considerada o ponto final. O recíproco deste ponto final definido é então o título do anticorpo na amostra: se esta diluição for 1:32, então o título é 32 (e não 1:32).

Geralmente, são observadas reações mais fracas além desta diluição com resultado 1+ (+ em ID): elas são avaliadas ao relatar a pontuação (score), em vez de título (consulte as tabelas com os exemplos descritos nas próximas páginas).

² Daniels, G., 2013. *Human Blood Groups*. 3rd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons

2.6 Pontuação (score) e Reporte dos Resultados

Os títulos são frequentemente relatados simplesmente como o recíproco do ponto final definido, por exemplo um título de 64. No entanto, isso nem sempre reflete a verdadeira força de um anticorpo ou aponta para um aumento significativo no título. A pontuação (score) das reações pode ajudar a superar este problema. Os métodos de score diferem, alguns usando valores

de 12 a 0 (mais comum), outros de 5 a 0. O método utilizado não é importante, desde que o mesmo sistema seja sempre usado. O sistema de pontuação deve ser incorporado ao POP do laboratório, juntamente com a definição do que é um aumento significativo no título, e um aumento significativo na pontuação.

2.7 Exemplos

Exemplo 1 ■ Títulos e Pontuações (Scores)

		Diluição da Amostra										Título	Ponto Final	Score
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512			
Amostra 1	Força da Reação	3+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	+/-	+/-	-	64		
	Score	10	10	10	8	8	8	5	2	2	0		1:256	63
Amostra 2	Força da Reação	4+	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	+/-	-	128		
	Score	12	12	12	10	10	10	8	5	2	0		1:256	81
Amostra 3	Força da Reação	1+	1+	1+	1+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	8		
	Score	5	5	5	5	2	2	2	2	2	0		1:256	30

No exemplo acima, todas as três amostras estão mostrando reações até e incluindo a diluição 1:256.

A última diluição mostrando uma reação 1+ é diferente para cada uma delas, levando a títulos diferentes relatados para cada amostra.

A atribuição de pontuações (scores) a todas as forças de reação individuais leva a três pontuações (scores) diferentes.

A amostra 3 é um exemplo de um anticorpo HTLA (consulte o exemplo 4 na página 10).

Exemplo 2 ■ Interpretação: Aumento significativo no título, por ex. na gravidez

	Título da amostra atual	Título da amostra anterior	Título do padrão, título esperado = 32	Conclusão
a	4	4	32 > ✓	Sem aumento de título Título de 4
b	32	4	32 > ✓	Aumento significativo do título de 4 para 32
c	16	16	64 > ✓	Sem aumento de título Título de 16
d	8	4	32 > ✓	Sem aumento de título 1 título não é considerado aumento

É necessário que o laboratório estabeleça um título base usando um padrão com um título esperado específico para o método.

No exemplo acima, o título esperado do padrão é 32; este título deve ser reprodutível dentro de ± 1 diluição, isto é, 16-32-64 são títulos aceitáveis, conforme ilustrado. Observe que a amostra “anterior”, armazenada congelada, é novamente titulada em paralelo com a nova amostra coletada (por exemplo, 2 semanas depois).

Amostra a: o padrão mostra um título de 32 > ✓; tanto a amostra anterior quanto a amostra recém-colhida mostram um título de 4.

Conclusão: sem aumento de título.

Amostra b: o padrão mostra um título de 32 > ✓; a amostra anterior mostra um título de 4, a nova amostra tem um título de 32.

Conclusão: um aumento significativo (mais de 2 diluições) do título.

Amostra c: o padrão mostra um título de 64 > ✓; tanto a amostra anterior quanto a amostra recém-colhida mostram um título de 16.

Conclusão: sem aumento de título.

Amostra d: o padrão mostra um título de 32 > ✓; a primeira amostra mostra um título de 4, a nova amostra tem um título de 8.

Conclusão: um aumento de 1 diluição não é significativo, nenhum aumento de título é considerado.

Nota: Na GB³, alguns anticorpos são quantificados (IU/ml) em vez de titulados.

- Anti-D (RH1) inferior a 4 IU/ml > DHPN improvável
 - Anti-D (RH1) entre 4-15 IU/ml > Risco moderado de DHPN
 - Anti-D (RH1) mais de 15 IU/ml > Alto risco de hidropisia fetal
-
- Anti-c (RH4) inferior a 7,5 UI/ml > continue a monitorar
 - Anti-c (RH4) entre 7,5 a 20 UI/ml > Risco de DHPN moderado, consultar unidade especializada
 - Anti-c (RH4) superior a 20 UI/ml > Risco de DHPN grave, consulte a unidade especializada

³ <https://www.transfusionguidelines.org/red-book> (accessed Jan 24, 2018)

**Exemplo 3 ■ Titulação ABO no contexto de transplantes de órgãos ABO incompatíveis (ABOi) (rins e outros).
Transplantes de células-tronco hematopoiéticas ABOi e Doença Hemolítica Perinatal (DHPN)**

Na maioria dos países, há falta de rins disponíveis para transplante. O uso de rins ABOi foi investigado como uma possível solução: de um modo geral, a correspondência HLA é mais importante do que a correspondência ABO e agora existe um consenso de que “o resultado do transplante renal (TR) ABOi é comparável ao TR ABO compatível”⁴. A avaliação do título de anticorpos anti-A/B é crucial no TR-ABOi. Ele orienta a eficácia do pré-requisito operatório e determina o período permitido para o transplante. Além disso, o monitoramento pós-transplante ajuda na detecção precoce de rejeição mediada por anticorpos.

Os protocolos de transplante são diferentes entre os centros de transplante, entre as regiões e entre os países. Esforços estão em andamento para estabelecer títulos mínimos de anticorpos ABO para candidatos a transplante. Os títulos gerais variam de 32 a 128 (método de gel). Quando os títulos estão acima desses limites, os pacientes são tratados para “dessensibilizar” os anticorpos ABO com medicação, imunoadsorção antígeno-específica, troca de plasma ou plasmáfereze de dupla filtração.

Ao realizar titulações de anticorpos ABO, é importante perceber que as amostras sempre irão conter misturas de IgM e IgG. A maioria dos laboratórios realizará as titulações em ambas as temperaturas, temperatura ambiente (aglutinação direta à temperatura ambiente) e em TAI (Teste da Antiglobulina Indireto).

É imprescindível entender que:

- Os testes à temperatura ambiente detectarão preferencialmente IgM, mas, ocasionalmente, alguns aglutinarão diretamente IgG
- TAI detectará preferencialmente IgG, mas ocasionalmente haverá alguma aglutinação por IgM

Alguns laboratórios desejam avaliar especificamente IgG. Nesse caso, a amostra deve ser tratada com DTT (ou 2-ME). Essas moléculas inativarão as moléculas de IgM sem afetar as moléculas de IgG. No lado negativo, é preciso entender que o próprio método introduz outra causa de variabilidade no sistema.

Relatórios de testes no Reino Unido (referência NEQAS a ser adicionada ao workshop de outubro de 2014) estão mostrando:

- Uma técnica padrão é recomendada usando ID-Cartões TAI e Neutro:
 - permite resultados mais reprodutíveis
 - os resultados mostram um intervalo mais restrito, ou seja, mais próximo da mediana do método
- TAI é mais reprodutível que em temperatura ambiente
- DTT introduz variabilidade
- É recomendável desenvolver um padrão

Esse padrão foi desenvolvido e está disponível no NIBSC (High titre anti-A and anti-B in serum - WHO Reference Reagent 14/300⁵).

O teste de replicata da diluição seriada em ambos, 14/300 e as amostras, é recomendado para considerar a variação intralaboratorial em titulações repetidas.

Por fim, é importante garantir que um teste de detecção de anticorpos seja feito. Qualquer aloanticorpo presente pode interferir na titulação ABOi caso o antígeno para o qual o anticorpo é direcionado esteja presente nas hemácias usadas para titulação.

Por exemplo, quando um aloanti-K (KEL1) está presente, deve-se garantir que os reagentes de hemácias sejam K-, ao titular usando o TAI.

Por exemplo, quando um aloanti-P1 reativo a frio (P1PK1) está presente, deve-se garantir que os reagentes de hemácias sejam P1- (P1PK:-1), ao titular em temperatura ambiente.

⁴ Muramatsu M et al., 2014. ABO incompatible renal transplants

⁵ http://www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=14/300 (accessed Jan 24, 2018)

Exemplo 4 ■ HTLA (High Titre, Low Avidity – Alto Título, Baixa Avidéz)

O “termo” HTLA é uma declaração coloquial destinada a descrever “bastante grosseiramente” os resultados sorológicos deste grupo de anticorpos e não pretende definir a especificidade do anticorpo (citação do falecido JJ Moulds).

As características comuns são: reações fracas e variáveis no TAI e, em alguns casos, difíceis de reproduzir. Os antígenos são de alta frequência, então quase sempre o painel de identificação mostra reações fracas no TAI com todas as hemácias, dificultando as conclusões.

A maioria dos anticorpos neste “grupo” é clinicamente insignificante. As especificidades incluem anti-Ch, anti-Rg, anti-JMH, anti-Cs^a, anti-Yk^a e outros.

As titulações podem fornecer uma pista sobre a probabilidade do anticorpo exibir características HTLA, ou seja, geralmente reações 1+ (baixa avidéz) em TAI e títulos > 32.

Diluição	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Baixo Título Baixa Avidéz	+/-	0	0	0	0	0	0	0
Baixo Título Alta Avidéz	2+	2+	1+	0	0	0	0	0
Alto Título Baixa Avidéz	1+	1+	1+	+/-	+/-	+/-	+/-	0
Alto Título Alta Avidéz	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	+/-

Nesta tabela, a característica HTLA (azul escuro) é claramente demonstrada: é “inesperado” observar que um anticorpo fracamente reativo apresente reações até a diluição 1:64.

Exemplo 5 Auto-anticorpos⁶ ■ Reações de um típico Auto-Anti-I associado a CAS (Cold Agglutinin Syndrome - Síndrome da Aglutinina Fria)

Temp	Tipo de Hemácias	Título											
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096
4°C	Adulto	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0
	Cordão	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	0	0
RT	Adulto	4+	4+	3+	3+	3+	2+	1+	0.5+	0	0	0	0
	Cordão	1+	1+	0.5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37°C	Adulto	1+	0.5+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cordão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Neste exemplo, 6 titulações são realizadas em três temperaturas diferentes, usando hemácias de adultos (I⁺, i⁺^w) e cordão (I⁺^w, i⁺^s).

Os títulos com ambas as hemácias são mais elevados a 4°C, mais baixos à temperatura ambiente e, ainda mais baixos a 37°C. Em cada uma das diferentes temperaturas, o título das hemácias adultas é maior do que o título das hemácias de cordão.

⁶ Petz, LD and Garratty G, 2004. *Immune Hemolytic Anemias*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone

Exemplo 6 ■ Reações de um Eluato ou Soro/Plasma mostrando Anti-e (RH5) “Especificidade Relativa”

Fenótipo Rh	Título							
	2	4	8	16	32	64	128	256
dce/dce rr RH:-1,-2,-3,4,5	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
DCe/DCe R ₁ R ₁ RH:1,2,-3,-4,5	4+	3+	3+	2+	2+	1+	0	0
DcE/DcE R ₂ R ₂ RH:-1,-2,3,4,-5	3+	2+	1+	0	0	0	0	0

Neste exemplo, a amostra é titulada contra hemácias E-e+ (rr e R₁R₁) e E+e- (R₂R₂). Os resultados podem ser interpretados como mostrando “especificidade relativa” para o antígeno “e”(RH5).

Tal reação deve ser confirmada testando contra mais exemplos, neste caso, hemácias “e+” (RH:5) e “e-” (RH:-5).

Exemplo 7 ■ Fenotipagem de hemácia TAD+ ao usar reagentes reativos no TAI

Como primeiro passo, os laboratórios tentariam dissociar os autoanticorpos IgG, por ex. usando cloroquina. Às vezes, esse tratamento não terá sucesso.

Nesses casos, a tipagem pode ser realizada medindo a quantidade de anticorpo específico deixado no reagente de tipagem após a adsorção com as hemácias do paciente e comparando o resultado com adsorções em hemácias conhecidas de dose única e dupla.

Hemácias utilizadas para adsorver o reagente anti-Fy ^a	Diluições de reagente anti-Fy ^a adsorvido						
	Puro	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Score
Fy(a+b+) / Fy:1,2	2+	1+	1+	+/-	0	0	21
Fy(a+b-) / Fy:1,-2	1+	1+	0	0	0	0	10
Fy(a-b+) / Fy:-1,2	3+	3+	2+	2+	1+	0	41
Paciente	2+	1+	0	0	0	0	13

Esses resultados indicam que o paciente é provavelmente Fy(a+) / (Fy:1).

Exemplo 8 ■ Microtitulação de Anti-D (RH1) expresso em ng/ml

A microtitulação do anti-D (RH1) permite distinguir o aloanti-D do anti-D adquirido passivamente (RH1) após a injeção de imunoglobulina anti-D (profilaxia).

Particularmente na França, esta microtitulação é indicada quando mulheres grávidas ou puérperas apresentam:

- Nenhuma diminuição na força da reação entre dois testes consecutivos de detecção de anticorpos (triagem de anticorpos)
- Não há informações disponíveis sobre uma possível injeção pré-natal com imunoglobulina anti-D (RH1)

- Uma força de reação incoerente em relação à data de injeção da imunoglobulina anti-D (RH1) (por exemplo, > 3+ por mais de 1 mês, > 2+ se mais de 50 dias após a injeção, > 1+ se mais de 70 dias após a injeção)

Neste método, um padrão conhecido, geralmente 28 ng/ml, é titulado junto com a amostra.

Os cálculos são realizados com base em Brossard *et al.*⁷

					Cálculos				
	Diluições	1:4	1:8	1:16	A	x	B	=	C
Padrão 28 ng/ml	Concentração (ng/ml)	7	3,5	1,75	Recíproco da última diluição reativa da amostra (< +++)*		Concentração do padrão mostrando a mesma força de reação que (A)		Concentração de anti-D (RH1) na amostra
	Força de Reação	++++	+++	+					
Amostras	1	+	0	0	4		1,75		7 ng/ml
	2	++++	++++	+++	16		3,5		56 ng/ml
	3	++++	++++	++++	> 16		7		> 112 ng/ml
	4	+++	+	0	8		1,75		14 ng/ml

- Observe que, neste procedimento, as amostras e o padrão não são testados para o ponto final de titulação normal com resultado "+"; a força da reação da última diluição reativa da amostra está relacionada à concentração da diluição do padrão exibindo a mesma força da reação.
 - **Amostra 1:** a "última" diluição reativa é 1:4 com uma força de reação de + e a concentração da diluição do padrão exibindo a mesma força de reação de + é 1,75 ng/ml. Logicamente, a concentração na amostra é: $4 \times 1,75 \text{ ng/ml} = 7 \text{ ng/ml}$.
 - **Amostra 3:** as forças de reação da diluição da amostra são +++. Para observar reação < +++, a amostra teria que ser mais diluída. Isso não é feito; a conclusão é simplesmente > 16, e o cálculo então se torna: $> 16 \times 7 \text{ ng/ml} = > 112 \text{ ng/ml}$.
- Os valores calculados são interpretados usando tabelas com as concentrações esperadas de anti-D (RH1), levando em consideração:
 - A concentração do anti-D (RH1) injetado, por ex. 200 µg ou 300 µg.
 - O número de doses injetadas.
 - O atraso (dias) entre a data da injeção e a data da coleta da amostra.

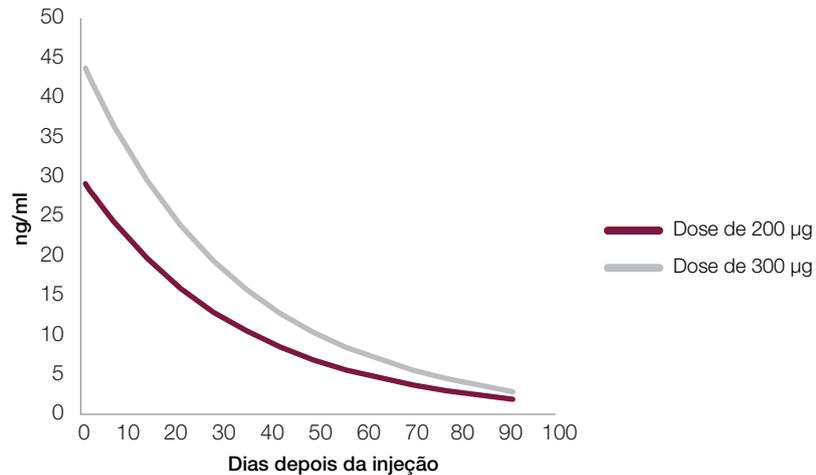
⁷ Brossard, Y, 2002. M. Diagnostic et suivi prénatals des allo-immunisations érythrocytaires. Feuille Biol, 43, 11-17

- O gráfico abaixo (Figura 1) representa os valores esperados pós-injeção após 1 dose de anti-D (RH1) de 200 µg (vermelho escuro) e 300 µg (cinza).
- Possíveis interpretações:
 - Se a concentração de anti-D (RH1) na amostra for claramente < que o valor esperado, então é bastante provável que o anti-D (RH1) seja o anticorpo adquirido passivamente.
 - Se a concentração de anti-D (RH1) na amostra for claramente > que o valor esperado, uma nova amostra deve ser testada algumas semanas depois (geralmente 2 semanas), porque um anti-D (RH1) de aloimunização pode estar se formando.

Caso não haja informação sobre a data exata da injeção da dose profilática, deve-se ter cuidado com a forma como o resultado é relatado. Em última instância, uma nova amostra - com informações adequadas sobre as datas - deve ser testada.

- Finalmente, conforme indicado no capítulo 2.4, é importante certificar-se de que foi testado a presença de qualquer outro aloanticorpo.

Figura 1



3 ■ Perguntas Frequentes

Perguntas

Obterei títulos diferentes ao realizar a titulação no IH-500 diluindo as amostras com a ID-Titration Solution?

Por que em um contexto de gravidez é tão importante comparar os títulos da amostra anterior e da nova amostra?

Por que dois títulos obtidos em diferentes condições de teste não podem ser comparados?

Por que devo redefinir meus valores limites se eu mudar meu método de titulação?

Se eu quiser restabelecer meus títulos limites, como devo proceder?

Por que devo realizar uma nova identificação de anticorpo em cada nova amostra?

Respostas

É uma boa prática de laboratório revisar e redefinir os valores “normais” quando houver uma alteração significativa em um procedimento de teste. Pode haver implicações nas ações que os médicos assistentes podem tomar. Isso também é válido para as titulações.

Isso significa que títulos críticos para anticorpos detectados durante a gravidez, ou títulos ABO em caso de incompatibilidade ABOi, devem ser revisados e comunicados aos médicos.

A titulação da amostra anterior em paralelo com a nova deve ser feita para verificar se a alteração do título não se deve à variabilidade do método.

Como explicado anteriormente, a variabilidade na titulação é uma realidade, tanto entre as diferentes técnicas quanto dentro de uma mesma técnica. Títulos obtidos em testes diferentes são inerentemente tendenciosos e não devem ser comparados.

A tecnologia utilizada terá impacto no título; como os títulos obtidos com diferentes métodos de teste não devem ser comparados, os títulos limiares (ou títulos críticos) devem ser restabelecidos.

A titulação deve ser realizada com um número significativo de anticorpos com o antigo e o novo método. Deve-se tomar cuidado para selecionar adequadamente os anticorpos pela classe da imunoglobulina: IgG ou IgM (se relevante, como em transplantes ABOi). Também é importante incluir anticorpos com títulos próximos ao título limiar.

Pacientes imunizados são mais propensos a produzir novos anticorpos. Esses anticorpos recém-formados podem interferir na titulação conforme explicado na seção 2.4 na página 6; por isso é importante confirmar ou excluir a sua presença ou ausência.





**Bio-Rad
Laboratories**

Grupo de
Diagnósticos
Clínico

Website www.bio-rad.com/diagnostics **Australia** +61(2)9914-2800 **Austria** +43-1-877-8901 **Belgium** +32(3)710-53-00 **Brazil** +55(31)3689-6600
Canada +1 514 334-4372 **China** +86-21-61698500 **Czech Republic** +420-241-430-532 **Denmark** +45-4452-1000 **Finland** +358-9-804-22-00
France +33 1 47 95 60 00 **Germany** +49(0)89-318-840 **Greece** +30-210-7774396 **Hong Kong** +852-2789-3300 **Hungary** +36-1-459-6100
India +1-800-180-1224 **Israel** +972-3-9636050 **Italy** +39-02-216091 **Japan** +81-3-6361-7070 **Korea** +82-2-3473-4460 **Mexico** +52(55)5488-7670
The Netherlands +31-318-540666 **New Zealand** +64-9-415-2280 **Norway** +47-23-38-41-30 **Poland** +48-22-3319999 **Portugal** +351-21-472-7700
Russia +7-495-721-14-04 **Singapore** +65-6415-3170 **South Africa** +27-11-442-85-08 **Spain** +34-91-590-5200 **Sweden** +46-8-555-127-00
Switzerland +41 26 674 55 05/06 **Taiwan** +886-2-2578-7189 **Thailand** +662-651-8311 **United Kingdom** +44(0)20-8328-2000