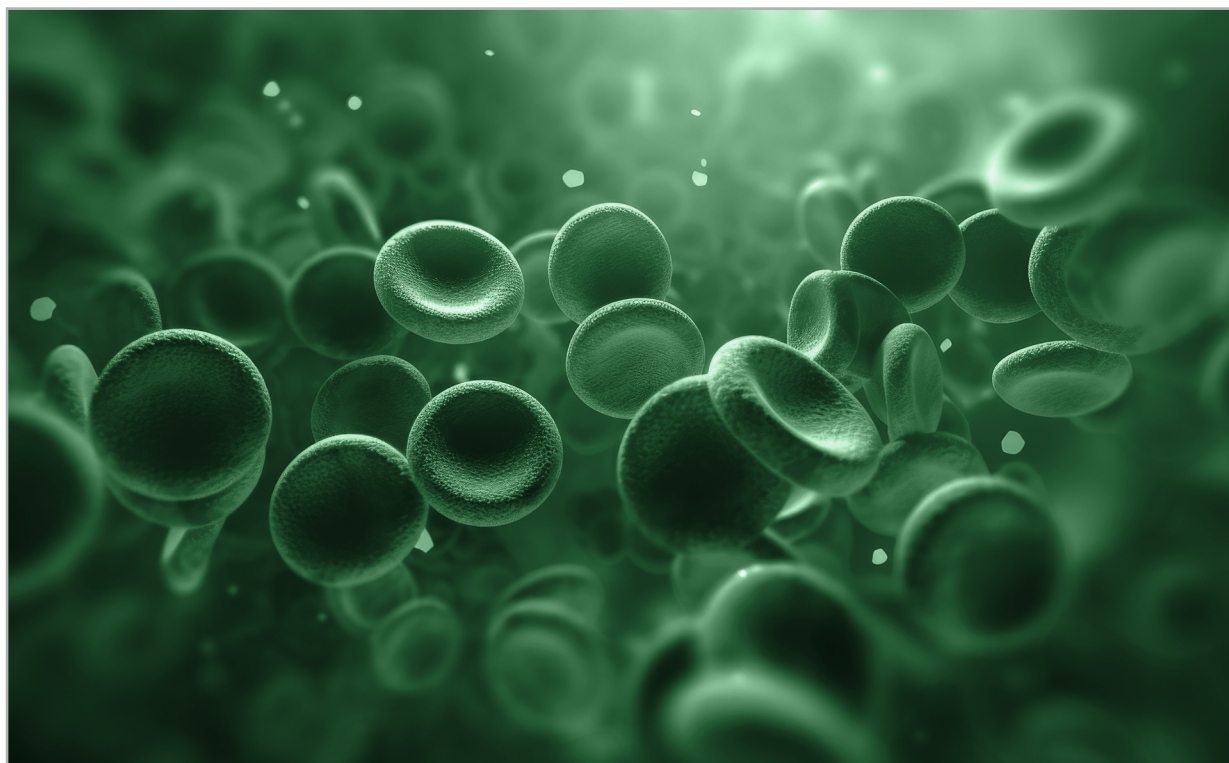




Bio-Rad Laboratórios – Brasil

MATERIAL DE APOIO

Algoritmo para resolver Discrepâncias na Fenotipagem ABO

BIO-RAD



APRESENTAÇÃO

Olá, imuno-hematoloucos & imuno-hematolovers!

Cansados de entrar em pânico com discrepâncias ABO?

Se você quase arrancou os cabelos tentando decifrar resultados ABO que mais parecem hieróglifos, relaxa!

Na nossa live “CIÊNCIA NA WEB: Discrepâncias na fenotipagem ABO” (**se você perdeu, corre lá no replay!¹**), vimos que esse vilão assombra muitos heróis da bancada, geralmente naquele plantão de sexta-feira a noite. Mas calma, que o desespero acaba aqui!

Neste guia, vamos te transformar num(a) detetive do sangue, pronto para desvendar qualquer mistério ABO sem gastar rios de reagentes, amostras (e paciência!). Chega de testar tudo aleatoriamente! Com nossos algoritmos e dicas infalíveis, você vai:

- Dominar a arte da solução de problemas ABO como um DETETIVE
- Preservar sua paz interior (e seus preciosos reagentes!)
- Impedir que os fios de cabelo abandonem o seu couro cabeludo prematuramente

Então, respire fundo, prepare o café e vamos juntos desvendar os segredos por trás das discrepâncias ABO! Neste guia, você encontrará o “mapa da mina” para identificar as pistas, desvendar os enigmas por trás dos resultados inesperados e sair da rotina de testes aleatórios e partir para a ação certa!

Prepare-se para se tornar o Sherlock Holmes da imuno-hematologia!

¹**Webinar #02_24**. Discrepâncias nas tipagens ABO, gravada dia 29/04/2024, com Silvia Leão Bonifácio e Ana Lúcia Girello. Disponível em <https://evts.at/49ENMDM>

SUMÁRIO

1 ALGORITMO PARA RESOLVER DISCREPÂNCIAS NA FENOTIPAGEM ABO...4

- 1.1 - Definições 4
- 1.2 - Causas de Discrepâncias 4

2 O PROBLEMA:

Observamos uma reação atípica/inesperada na tipagem direta e/ou reversa ABO

E AGORA, O QUE FAZER?.....6

- Passo 1:** Verificação Inicial 6
- Passo 2:** Avaliação do Histórico do Paciente. 6
- Passo 3:** Revisão de Procedimentos Laboratoriais para descartar erros técnicos 6
- Passo 4:** Análise de possíveis causas de discrepâncias “verdadeiras” 7
- Passo 5:** Realização de Testes Complementares. 7
- Passo 6:** Tomada de Decisão Baseada nos Resultados 11

3 O QUE PODE ESTAR SOBRANDO..... 12

- 3.1 Ganho de anticorpos 12
- 3.2 “Ganho” de antígeno: o que está sobrando? 12
- 3.3 Perda de anticorpos: o que está faltando? 13
- 3.4 Perda de antígeno: o que está faltando? 13

4 E AQUELE CASO MUITO ESPECIAL (ESTRANHO MESMO!):14

- Em tubos 14
- Em cartelas 15
- Causas. 15

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....17

1.1 DEFINIÇÕES

Discrepâncias ABO ocorrem quando os resultados da tipagem direta (antígenos nas hemácias) não coincidem com os da tipagem reversa (anticorpos no soro).

É obrigatório resolver qualquer discrepância antes de liberar os resultados, segundo a Portaria que rege os Serviços de Hemoterapia no Brasil atualmente em vigor².

1.2 CAUSAS DE DISCREPÂNCIAS

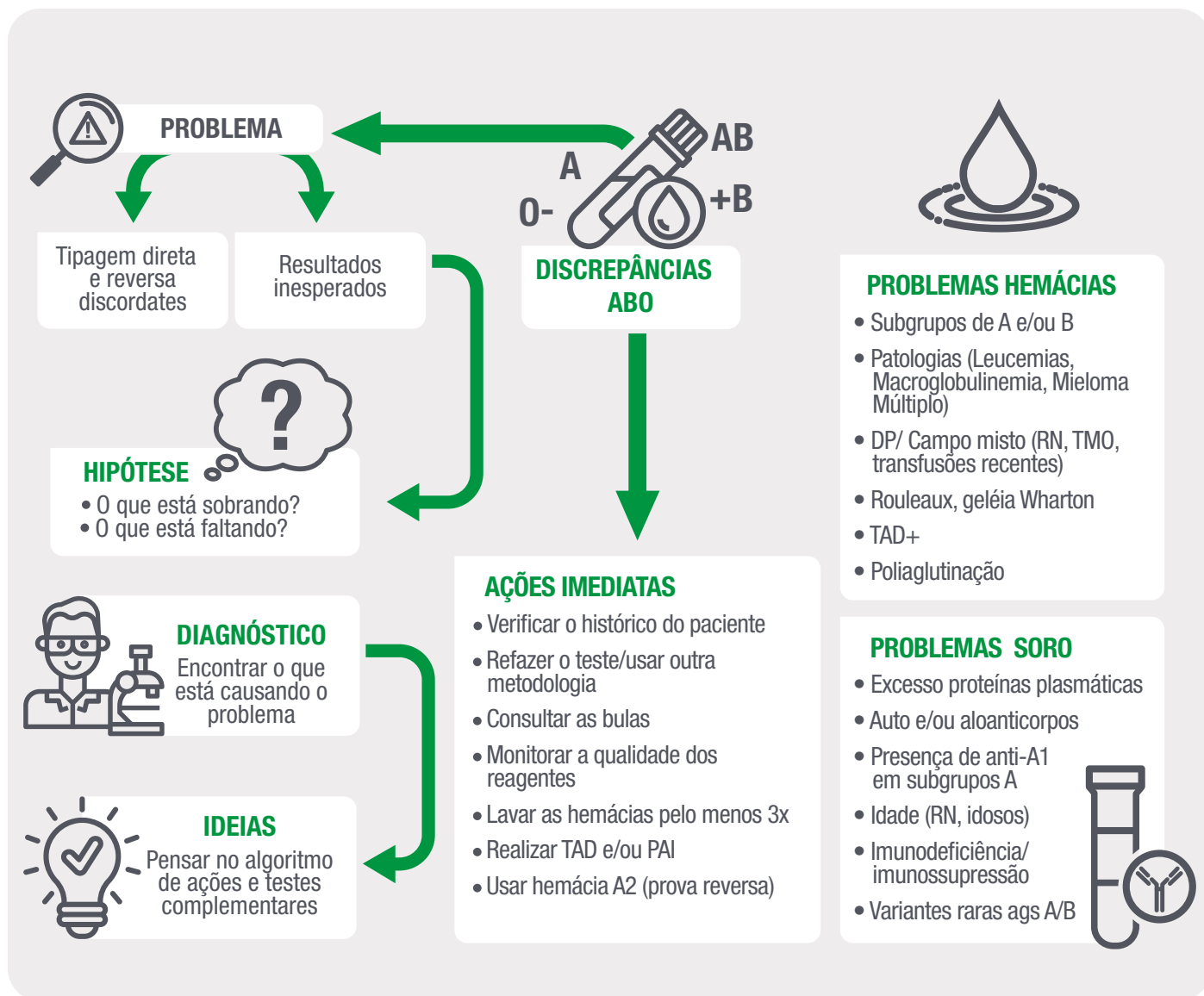
1. Erros Técnicos

2. Discrepâncias Verdadeiras

- Problemas com hemácias
- Problemas com soro

²**Portaria da Consolidação Número 5 do Ministério da Saúde (2017)**, Em vigor no ano da publicação deste documento. Disponível em http://www.portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Legislacoes/Portaria_Consolidacao_5_28_SETEMBRO_2017.pdf. Último acesso em 02 jul 2024.

COMO RESOLVÊ-LAS?



MAPA MENTAL: Etapas importantes da resolução de discrepâncias ABO.

Autoria: Ana Lúcia Girello.

PASSO 1 VERIFICAÇÃO INICIAL

- **Repetir o Teste:** Utilize a mesma metodologia para confirmar os resultados.
- **Mudar a metodologia:** Se a discrepância persistir, utilize um método alternativo* (ex. gel, tubo, fase sólida).

**testes em lâminas não devem ser realizados.*

PASSO 2 AVALIAÇÃO DO HISTÓRICO DO PACIENTE

- **Histórico Clínico:** Verifique idade, histórico de transfusões, transplantes, doenças hematológicas, e imunossupressão.
- **Histórico Laboratorial:** Revise resultados anteriores de tipagem ABO e outros testes, como dados do hemograma, bioquímica, e qualquer notação relevante.

PASSO 3 REVISÃO DE PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA DESCARTAR ERROS TÉCNICOS

A causa mais frequente é o erro técnico e para ser descartado é necessário repetir os testes. Em caso de persistência dos resultados discrepantes, recomenda-se verificar/ checar a possibilidade de ocorrência de:

- Identificação inadequada das amostras
- Suspensão de hemácias inadequada, muito concentrada ou muito diluída
- Erro de transcrição ou interpretação dos resultados
- Possível troca de amostras (e somente neste caso, solicitar uma nova coleta da amostra)
- Verificar as condições da amostra: presença de proteínas em excesso (fibrina, geléia de Wharton nas amostras obtidas de cordão umbilical), hemólise, lipemia, aglutinação espontânea
- Falha ao adicionar o reagente; contaminação cruzada entre os microtubos (tipagem em cartelas);
- Verifique a validade e a qualidade dos reagentes;
- Não seguir a orientação do fabricante contida nas bulas dos reagentes
- Reagentes contaminados, hemolisados, fora da validade
- Erros de centrifugação (super ou sub centrifugação)
- Temperatura inadequada de armazenamento da amostra e reagentes
- Equipamentos inadequados (descalibrados ou fora de especificação)

PASSO 4

ANÁLISE DE POSSÍVEIS CAUSAS DE DISCREPÂNCIAS “VERDADEIRAS”

- Fraca reatividade de anticorpos
- Fraca reatividade de antígenos
- Anormalidades proteicas ou plasmáticas
- Presença de (alo e/ou auto) anticorpos irregulares.

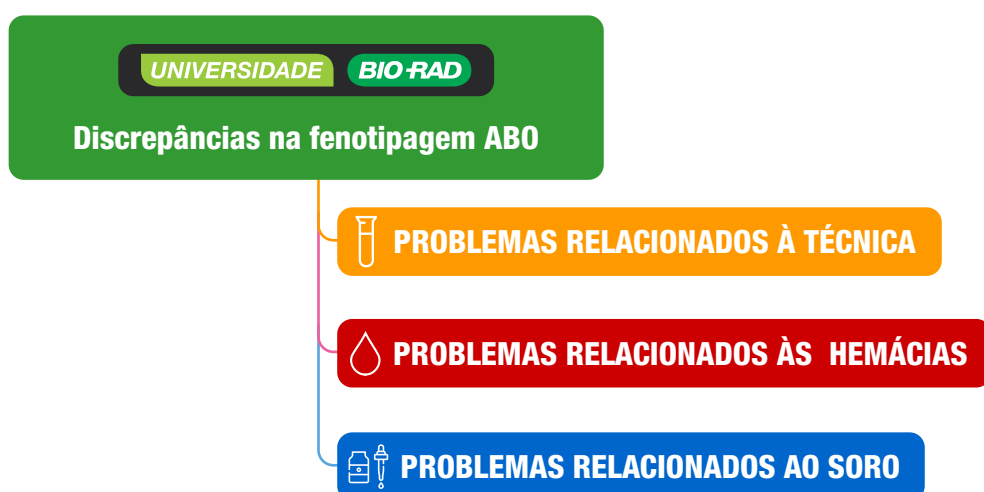
PASSO 5

REALIZAÇÃO DE TESTES COMPLEMENTARES:

Neste algoritmo criado especialmente para você, identificada a causa da Discrepância, indicamos os melhores caminhos a seguir!

IMPORTANTE:

Não gastar toda a amostra em testes aleatórios! Desperdiça-se tempo, dinheiro e amostra do seu cliente/ paciente/ doador!



Discrepâncias na fenotipagem ABO



PROBLEMAS RELACIONADOS À TÉCNICA

Causas

Resultados Falsos Negativos	Resultados Falsos Positivos
Reagente ou soro teste não adicionado ao tubo	Centrifugação acima do recomendado
Hemólise não identificada como uma reação positiva	Uso de reagentes, glóbulos vermelhos ou salina contaminados
Quantidade inadequada de soro (ou reagente) adicionado aos glóbulos vermelhos	Uso de tubos sujos
Centrifugação abaixo do recomendado	Interpretação ou anotação dos resultados incorretamente
Incubação a temperatura acima de 20-24°C	
Interpretação ou anotação dos resultados incorretamente	



Conferir bulas e procedimentos

Identificação inadequada das amostras

Suspensão de hemácias inadequada, muito concentrada ou muito diluída

Erro de transcrição ou interpretação dos resultados

Possível troca de amostras (e somente neste caso, solicitar uma nova)

Verificar as condições da amostra: presença de proteínas em excesso (fibrina, geléia de Wharton nas amostras obtidas de cordão umbilical), hemólise, lipemia, aglutinação espontânea

Não seguir a orientação do fabricante contida nas bulas dos reagentes

Reagentes contaminados, hemolisados, fora da validade

Erros de centrifugação (super ou sub centrifugação)

Temperatura inadequada de armazenamento da amostra e reagentes

Equipamentos inadequados (descalibrados ou fora de especificação)



Quem é o dono desta amostra?

Idade

Dados clínicos

Dados laboratoriais

Dados transfusionais

Diagnóstico (doença de base)

Qualquer informação relevante



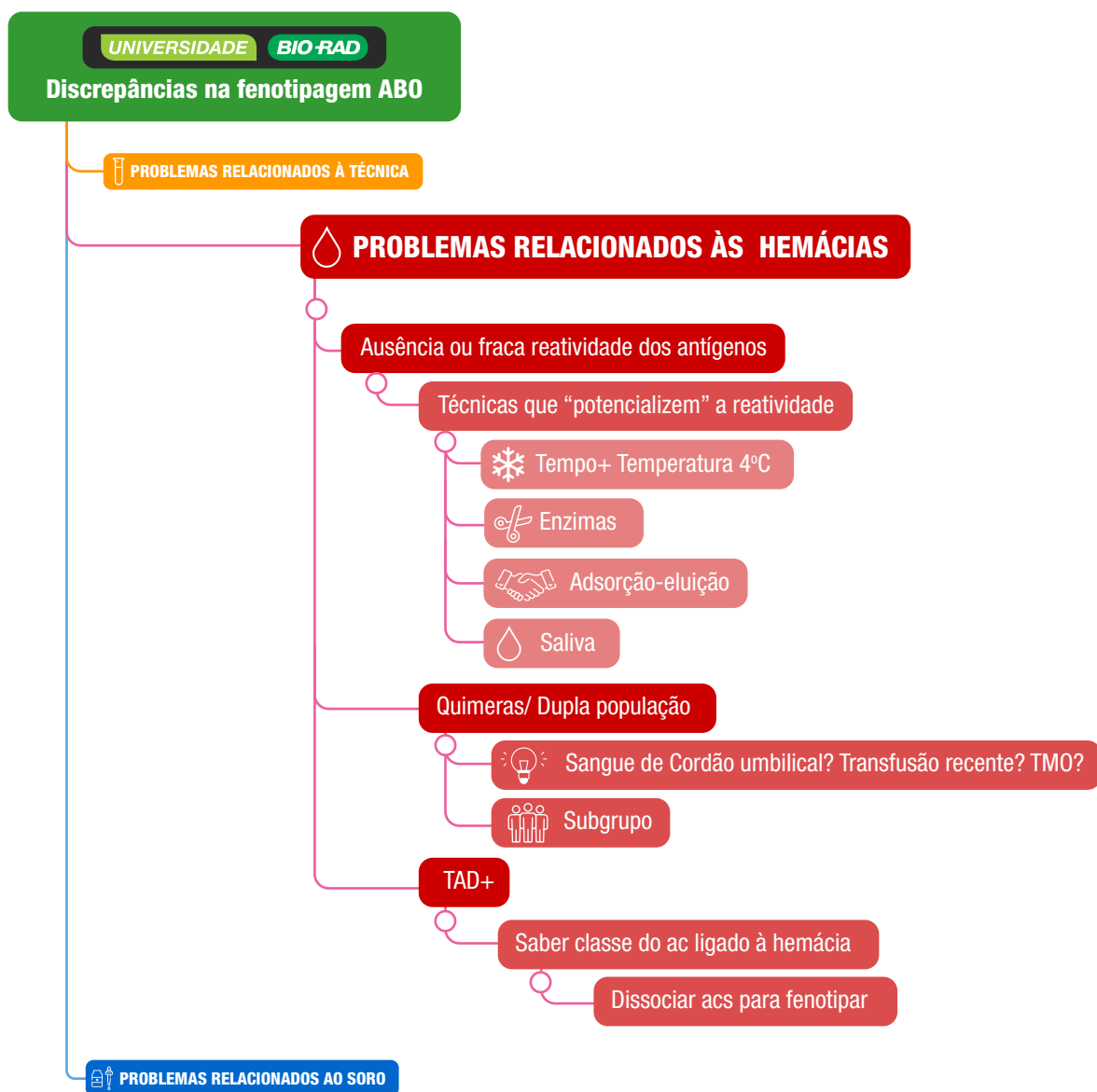
REPETIR OS TESTES

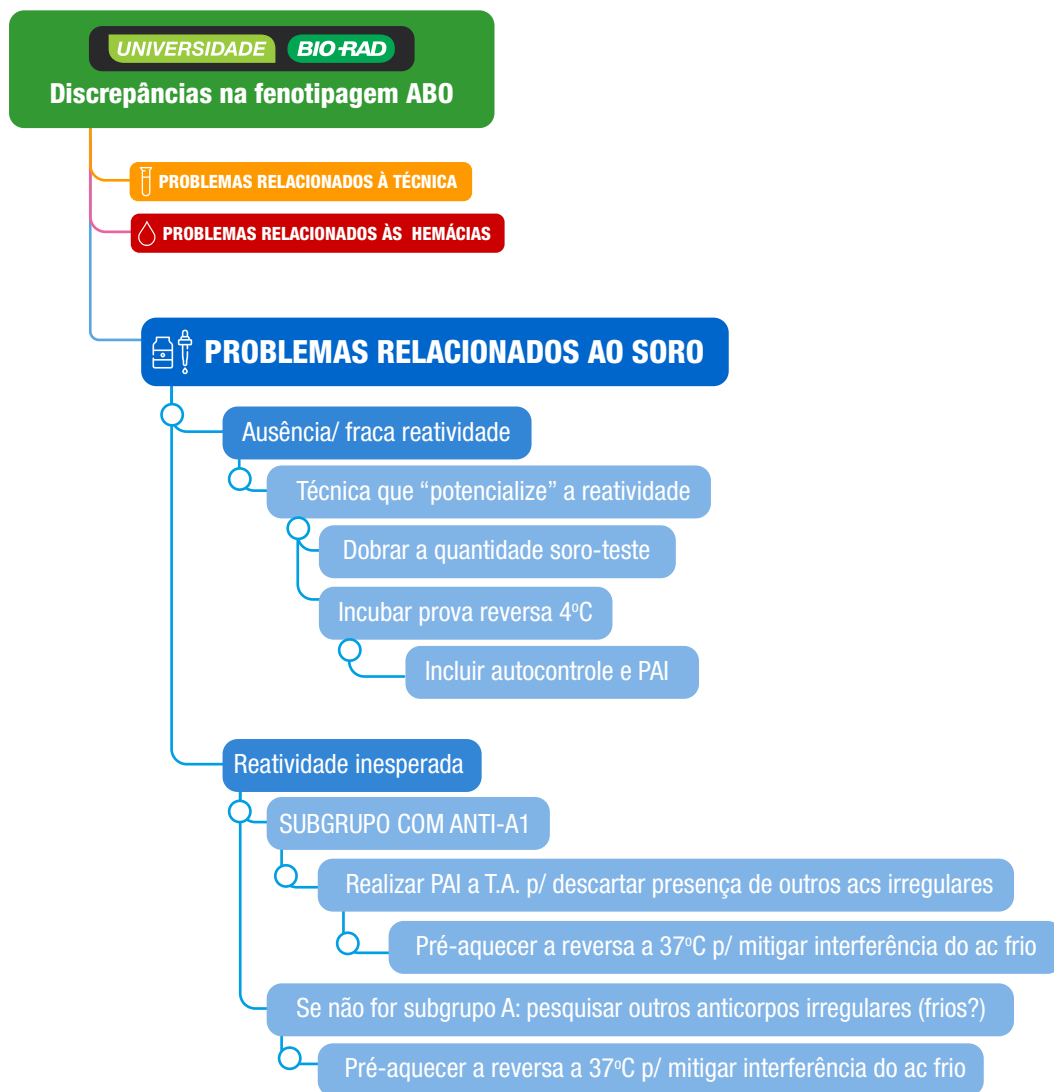


PROBLEMAS RELACIONADOS ÀS HEMÁCIAS



PROBLEMAS RELACIONADOS AO SORO





Design Instrucional e gráfico: Ana Lúcia Girello (Byoline Corporation)
Revisão e Co-autoria: Sílvia Leão Bonifácio
Produzido para a Universidade Bio-Rad de Imuno-hematologia (2024)



PASSO 6 TOMADA DE DECISÃO BASEADA NOS RESULTADOS

- **Confirmar Grupo Sanguíneo:** Com base nos resultados dos testes adicionais, confirme o grupo sanguíneo.
- **Transfusões:** Em casos de urgência, utilize hemácias tipo O até a resolução da discrepância.
- **Documentação:** Registre detalhadamente todos os passos e resultados obtidos durante a investigação.

PERDAS OU GANHOS?

Dica imuno-hematológica: faça sempre essa pergunta infalível!

“O que está sobrando x o que está faltando?”

As causas para resultados inesperados em testes de tipagem sanguínea são diversas e podem ser um desafio diagnóstico. É crucial avaliar o contexto clínico do paciente para determinar a causa da discrepância e realizar testes adicionais para resolvê-las.

3.1

“GANHO” DE ANTICORPOS:

Anticorpos Inesperados no Plasma Sanguíneo.

Possíveis causas:

- **Anti-A1 em subgrupos ABO:** alguns indivíduos subgrupos de A podem apresentar anti-A1 no soro.
- **Anticorpos reativos a frio:** Anticorpos que se ligam a antígenos em baixas temperaturas (Ex: anti-M, anti-I).
- **Rouleaux/hipergamaglobulinemia:** Condições que causam agregação anormal de hemácias, simulando a presença de anticorpos.
- **Transusão de plasma, plaquetas:** Transferência passiva de anticorpos presentes no plasma ou plaquetas transfundidas.
- **DEVH:** Doença do Enxerto contra o Hospedeiro, onde o sistema imune do doador ataca o receptor.
- **Transplante de Medula Óssea:** Reação do sistema imune contra antígenos do órgão transplantado.

3.2

“GANHO” DE ANTÍGENO: O QUE ESTÁ SOBRANDO?

Reações inesperadas na prova direta ABO; presença de antígenos “inesperados” na superfície das hemácias.

Possíveis causas:

- **Transplante de Medula Óssea:** Quimerismo após transplante de células-tronco hematopoiéticas, com o receptor expressando antígenos do doador.
- **Rouleaux:** Aglomerados de hemácias podem mimetizar a presença de antígenos extras.
- **Antígeno B Adquirido:** Modificação do antígeno A em pacientes com doença gastrointestinal, mimetizando o antígeno B.
- **B(A) ou fenótipo A(B):** Expressão fraca de um antígeno ABO que pode ser confundido com o outro.
- **Transusão recente não-isogrupo:** Presença de hemácias transfundidas com antígenos diferentes do receptor.
- **Quimera:** Indivíduos com duas populações de células geneticamente distintas, podendo apresentar antígenos extras.

“PERDA” DE ANTICORPOS: O QUE ESTÁ FALTANDO?

Fraca reatividade/ ausência de anticorpos ABO esperados no plasma sanguíneo.

Possíveis causas:

- **Idade:** Sistema imune imaturo (em recém-nascidos) ou em declínio, com menor produção de anticorpos (idosos).
- **Imunossupressão:** Pacientes com sistema imune debilitado, seja por condição congênita ou adquirida.
- **Leucemia/linfoma/mieloma:** Cânceres que afetam as células do sistema imune, comprometendo a produção de anticorpos.
- **Subgrupo ABO:** Alguns subgrupos ABO podem apresentar níveis baixos de anticorpos.
- **Transplante:** Imunossupressão pós-transplante para evitar rejeição pode levar à diminuição de anticorpos.
- Pós transfusão de plasma ou transfusão de troca pode haver uma diluição do plasma e a consequente diminuição dos anticorpos ABO.

“PERDA” DE ANTÍGENO: O QUE ESTÁ FALTANDO?

Antígenos ABO esperados na superfície das hemácias.

Possíveis causas:

- **Transplante de Medula Óssea:** Quimerismo após transplante de células-tronco hematopoiéticas, com o receptor expressando apenas os antígenos do doador.
- **Transfusão maciça:** Hemácias transfundidas diluindo as células do receptor, levando à aparente perda de antígenos.
- **Subgrupos A ou B:** Alguns subgrupos podem expressar o antígeno de forma fraca, levando à dificuldade de detecção.
- **Leucemia/linfoma:** Cânceres que afetam a medula óssea podem levar à produção anormal de hemácias, com falta de antígenos. Presença de Cromossomo Philadelphia.
- **Substância solúvel excessiva do grupo sanguíneo:** Alguns tipos de câncer podem liberar grande quantidade de antígenos ABO solúveis, neutralizando os anticorpos (antissoros) utilizados na testagem, causando reações falso-negativas na prova direta.

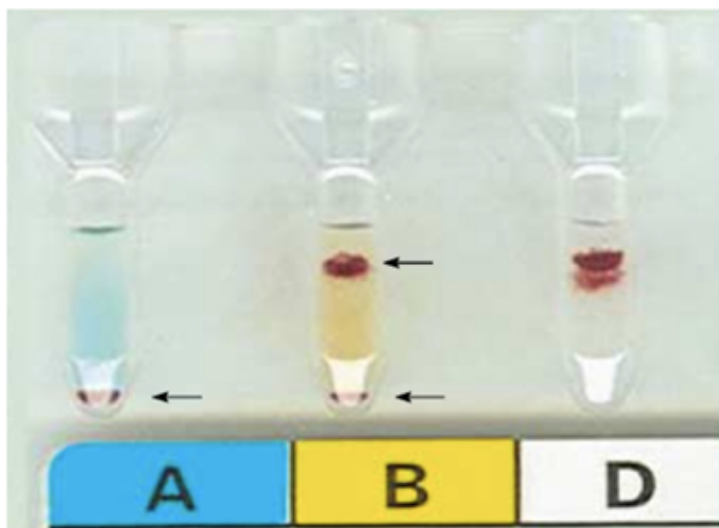


Fig 1. Cartela contendo gel e antissoros monoclonais demonstram a reação em “campo misto” (no microtubo contendo anti-B e identificado pela seta), sugerindo a presença de dois tipos de populações de hemácias.

Fonte: A Dispermic Chimera with Mixed Field Blood Group B and Mosaic 46,XY/47,XYX Karyotype - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Monoclonal-gel-card-demonstrating-the-mixed-field-agglutination-arrows-presents-on-the_fig1_6240211 [accessed 2 Jul, 2024]

Um caso sempre tão especial: fenômeno de “**campo misto ou dupla população**” em reações de aglutinação de hemácias.

A presença de duas populações distintas de hemácias em um único indivíduo, caracterizada pela presença de células aglutinadas e não aglutinadas, é chamada de “dupla população” ou “campo misto”. Este fenômeno indica a presença de dois tipos sanguíneos diferentes coexistindo no mesmo organismo.

Visualmente:

- **em tubo:** Observa-se a formação de grumos (hemácias aglutinadas) suspensos na solução, junto com hemácias livres ressuspensas no fundo.



Fig 2. Campo misto observado em tubo.

Fonte: Canal de Chelsey G., <https://youtu.be/30vYpX-oRxI?si=WG9jrvacsoywakxR>

- **em cartelas:** As hemácias que reagem com o anticorpo ficam retidas na parte superior do microtubo, enquanto as que não reagem migram para o fundo durante a centrifugação.

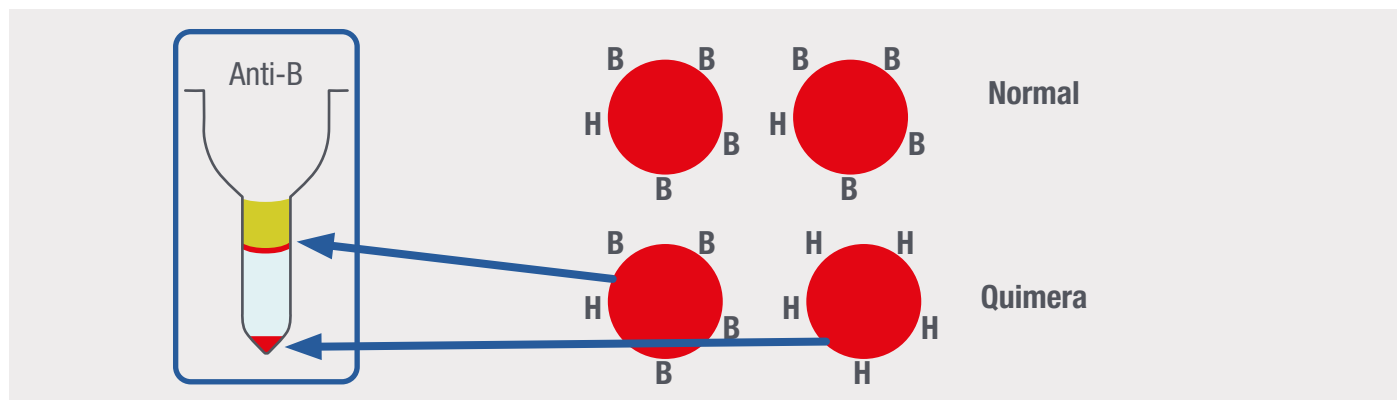


Fig 3. Esquema exemplificando o campo misto observado em cartelas.

Fonte: Nicole Draper. Cases of ABO Typing Discrepancies. Disponível em: <https://slideplayer.com/slide/9174836/>

Causas:

1. Duas populações de hemácias diferentes:*

- Transfusão recente: O indivíduo recebeu sangue de fenótipo diferente*
- Transplante de medula óssea alogênico: O indivíduo recebeu células-tronco hematopoéticas de um doador com grupo sanguíneo diferente.
- Quimeras gêmeares (raro): resultado da fusão de dois zigotos em um único indivíduo.

2. Expressão antigênica fraca:

- Recém-nascidos: possuem menor quantidade de antígenos ABO na superfície das hemácias, levando a reações mais fracas em A e/ou B, podendo apresentar este efeito de campo misto (dupla população).

3. Subgrupos ABO:

- Indivíduos subgrupos de A e/ou B podem apresentar reações mais fracas com os antissoros, simulando um campo misto. Frequentemente observado nos subgrupos A3 e B3.

***IMPORTANTE:**

Este efeito de CM (DP) ocorre quando fazemos não somente as tipagens ABO e RhD, mas também quando fenotipamos para os demais antígenos de grupos sanguíneos eritrocitários!

A identificação da dupla população de hemácias é crucial para:

- Evitar erros de interpretação em testes de fenotipagens eritrocitárias
- Determinar o real tipo sanguíneo do cliente/ doador/paciente
- Monitorar pacientes transplantados: A presença persistente ou o reaparecimento da dupla população pode indicar rejeição ao transplante.

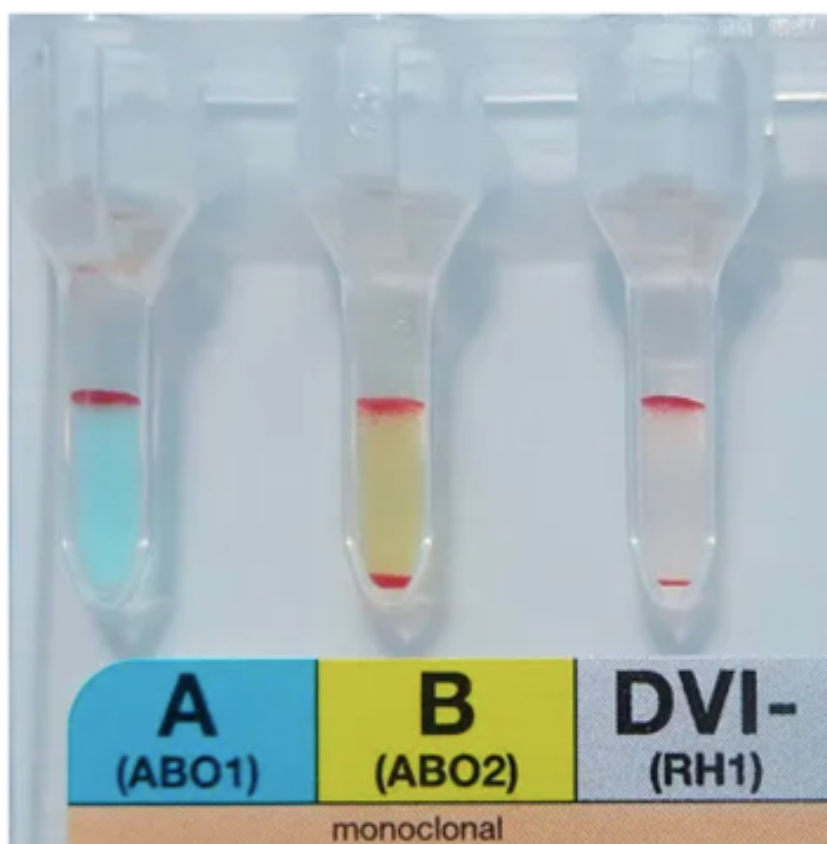


Fig 3: Cartela de aglutinação em coluna mostrando a aglutinação em campo misto ou dupla população.*

*Observar os segundo e terceiro microtubos.

Fonte: <https://oncohemakey.com/laboratory-aspects-of-blood-transfusion-2/>



Liu, Feng & Li, Guining & Mao, Xiaolu & Hu, Lihua. (2011). Detection of IgG anti-A/B is essential for safe transfusion support in patients undergoing ABO incompatible allogeneic HSCT. *Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis*. 44. 123-7. 10.1016/j.transci.2011.01.006.

Bianco, T., Farmer, B. J., Sage, R. E., & Dobrovic, A. (2001). Loss of red cell A, B, and H antigens is frequent in myeloid malignancies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(11), 3633-3639.

Olsson, M. L., Irshaid, N. M., Hosseini-Maaf, B., Hellberg, Å., Moulds, M. K., Sareneva, H., & Chester, M. A. (2001). Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 98(5), 1585-1593.

A Dispermic Chimera with Mixed Field Blood Group B and Mosaic 46,XY/47,XYY Karyotype - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Monoclonal-gel-card-demonstrating-the-mixed-field-agglutination-arrows-presents-on-the_fig1_6240211 [accessed 2 Jul, 2024]

Banerjee, Soumee & Puttattaiah, Parimala & Jacob, Anupapa & Subramanian, Sitalakshmi. (2019). Discrepancies in Immunohaematological Testing-Importance of Use of Multiple Modalities of Testing. *NATIONAL JOURNAL OF LABORATORY MEDICINE*. 8. 10.7860/NJLM/2019/42548:2369. <https://journals.indexcopernicus.com/api/file/viewByFileId/853915>

Miola, M. P., Lopes, A. G., Silva, A. P., Gomes, E. G., Machado, L. A., Veloso, W. A., ... & de Mattos, L. C. (2019). Hematopoietic chimera in a male blood donor and his dizygotic twin sister. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(4), 276-281. <https://karger.com/tmh/article-pdf/46/4/276/3573461/000495583.pdf>

JOE CHAFFIN. Site BLOOD BANK GUY. <https://www.bbguy.org/2018/08/01/abo/>. <https://www.bbguy.org/2018/08/01/054/>

Nicole Draper. Cases of ABO Typing Discrepancies. Disponível em: <https://slideplayer.com/slide/9174836/>

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

*Grupo de
Diagnóstico Clínico*

*Web site bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 43 1 877 89 01 177 Belgium 32 (0)3 710 53 00 Brazil 55 11 3065 7550
Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 420 241 430 532 Denmark 45 44 52 10 00 Finland 358 09 804 22 00
France 33 01 47 95 69 65 Germany 49 89 31 884 0 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 36 1 459 6100 India 91 124 4029300
Israel 972 03 963 6050 Italy 39 02 216091 Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Mexico 52 555 488 7670 The Netherlands 31 (0)318 540 666
New Zealand 64 9 415 2280 Norway 47 23 38 41 30 Poland 48 22 331 99 99 Portugal 351 21 472 7700 Russia 7 495 721 14 04
Singapore 65 6415 3188 South Africa 27 (0) 861 246 723 Spain 34 91 590 5200 Sweden 46 08 555 12700 Switzerland 41 026 674 55 05
Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 662 651 8311 United Arab Emirates 971 4 8187300 United Kingdom 44 020 8328 2000*