



10º Congresso de Pós-Graduação

QUALIDADE ANALÍTICA DOS TESTES LABORATORIAIS ATUALMENTE PROPOSTOS PARA O DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DE ANEMIA HEMOLÍTICA AUTO-IMUNE

Autor(es)

NATÁLIA FERREIRA BOLDRIN

Orientador(es)

JADSON OLIVEIRA DA SILVA

1. Introdução

A Anemia hemolítica auto-imune (AHAI), é uma doença auto-imune em que auto-anticorpos se ligam a antígenos eritrocitários causando hemólise, via sistema complemento e Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) (Campbell e Marik, 2005). A real incidência pode ser maior do que a atualmente registrada, já que os casos de doença secundária, mais frequentes, não são adequadamente documentados (Valent e Lechner, 2008). O pico de incidência está entre os pré-escolares (Sackey, 1999). Os óbitos são geralmente relacionados à doença crônica de base, embora a septicemia pós-esplenectomia seja uma causa frequente (Heisel e Ortega, 1983). Os auto-anticorpos encontrados na AHAI são, geralmente, anticorpos do tipo quente ou do tipo frio (Valent e Lechner, 2008), originados de uma disfunção generalizada do sistema imune que ocorre com a quebra do mecanismo de tolerância a auto-antígenos ou por processos menos generalizados que envolvam antígenos estranhos homólogos a auto-antígenos (Gehrs and Friedberg, 2002). As AHAI são classificadas em dois grupos: primária e secundária. Na primária, a anemia hemolítica é o único achado clínico e não se identifica doença sistêmica de base. A secundária ocorre no contexto de uma doença sistêmica, sendo a AHAI somente uma manifestação dessa doença (Gehrs e Friedberg, 2002). Os anticorpos são, na maioria dos casos, do tipo IgG policlonais e, em raros casos, monoclonais. Em casos raros, os anticorpos quentes são do tipo IgM, (Sokol et al, 1998). Em pacientes com AHAI do tipo quente, auto-anticorpos do tipo IgM podem se ligar a imunoglobulinas do tipo IgG formando imuno-complexos. Esse mecanismo, ainda não elucidado seria responsável também por outras doenças auto-imunes causadas por anticorpos do tipo quente (Ehrenstein et al, 2000; Valent e Lechner, 2008). Quando há alguma suspeita, clínica ou laboratorial, de doença hemolítica, testes são realizados a fim de se identificar o tipo de anticorpo relacionado à doença e classificar a anemia hemolítica. A definição da causa auto-imune é imprescindível para o diagnóstico da AIHA, para isso são usados alguns testes laboratoriais baseados na detecção de auto-anticorpos e complemento contra antígenos eritrocitários, além de outros testes como, por exemplo, a contagem de reticulócitos, avaliação dos índices hematimétricos e dosagens bioquímicas. A detecção de auto-anticorpos eritrocitários pode ser determinada por diversas técnicas, como o teste de Coombs direto (TCD), além de outras técnicas mais sensíveis. Pode-se utilizar teste relacionado ao consumo de anticorpo que fixa complemento (Gilliland et al, 1971) teste de formação de rosetas (Galili et al, 1981), teste por radioimunoensaio (Jeje et al, 1984) e testes imunoenzimáticos (Leikola e Perkins, 1980). Recentemente, a citometria de fluxo (CF) também tem sido empregada com essa finalidade (Garratty e Nance, 1980). O método manual direto de brometo de hexadimetrina (Polybrene) mostrou-se também eficaz para o diagnóstico da AIHA (Braga et al, 1998). O diagnóstico conclusivo, no entanto, dessa desordem auto-imune compreende vários passos e apresenta, ainda hoje, limitações importantes, objeto de pesquisa e discussão deste trabalho.

2. Objetivos

Realizar uma revisão bibliográfica sobre os modelos atualmente propostos para o diagnóstico e acompanhamento da AHAI, comparando as diversas técnicas propostas a fim de se discutir vantagens e desvantagens das mesmas.

3. Desenvolvimento

Para o levantamento dos dados propostos neste trabalho foi realizado um estudo retrospectivo de revisão da literatura nas bases Scientific Electronic Library On-line (SciELO), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) e Biblioteca virtual em saúde (BVS). Além de artigos científicos, foram também utilizados livros textos.

4. Resultado e Discussão

Para o diagnóstico de AHAI vários testes laboratoriais são empregados. Os níveis de hematócrito(Ht) e hemoglobina(Hb), encontram-se, geralmente, normais em pacientes com processos compensatórios, porém, esses níveis podem estar diminuídos em hemólises severas. A Contagem de reticulócitos (CR) é um dos principais parâmetros analisados. Uma CR em níveis acima de 5% constitui forte evidência de anemia hemolítica, porém não é totalmente sensível para o diagnóstico da doença e cerca de 25% dos pacientes apresentam uma CR normal (Liesveld et al, 1987), tendo, no entanto, valor prognóstico, pois níveis de reticulócitos dentro do normal indicam anemia branda (Stein e Neff, 2001). Parâmetros bioquímicos podem caracterizar o processo hemolítico, como bilirrubina, lactato desidrogenase e haptoglobina sérica. Na AHAI, os níveis de bilirrubina frequentemente ultrapassam 15mg/dL, entretanto, em anemias hemolíticas crônicas, os níveis séricos de bilirrubina total raramente ultrapassam 6mg/dL (Stein e Neff, 2001). A haptoglobina sérica, quando diminuída indica aumento de destruição celular. A avaliação de hemoglobinúria deve ser cuidadosamente realizada. Quando a hemólise é intravascular e a quantidade de sangue destruído é grande, a urina pode conter hemoglobina livre e hemossiderina, devido a concentração plasmática de Hb acima 50 a 200mg/dL, que é a capacidade da haptoglobina em ligar-se a hemoglobina, levando a quadros de hemoblobinúria (Henry, 2008). Apesar de não específico, os níveis de LDH total e da fração LDH -1 são de grande valia para o diagnóstico da AIHA. LDH-1 está presente nos eritrócitos, no miocárdio e nas células do córtex renal. Apesar de sua maior utilidade comparada à dosagem de LDH total para confirmar hemólise, a análise das frações de LDH-1 raramente é usada (Stein e Neff, 2001). Para a conclusão da causa auto-imune são usados ensaios baseados na detecção de auto-anticorpos e complemento. Entre eles estão: o teste de Coombs direto, a citometria de fluxo, teste manual direto do Polybrene e o ELAT. O teste de anti-globulina, ou teste de Coombs direto (TCD), descrito pela primeira vez em 1945 por Coombs (Coombs et al, 1945 apud Zarandona e Yazer, 2006). Um resultado positivo do TCD é quase sempre associado com AHAI (Stroneck et al, 2003). O TCD pela técnica convencional em tubo (convencional tube technice- CTT) é mais usado e considerado o padrão ouro (Roback et al, 2003). Outra técnica, mais sensível é a do teste em gel (gel test- GT), que pode ser usada como alternativa em pacientes Coombs negativos (Chaudhary et al, 2006). No entanto, o TCD apresenta sensibilidade limitada, cerca de 1% -10% dos pacientes apresentam resultados falso-negativos (Valent e Lechner, 2008). Em 1980, Petz e Garratty estimaram que o teste é positivo apenas quando o número de moléculas de IgG por glóbulo vermelho(IgG/GV) é superior a 200 (Petz e Garratty, 1980), entretanto, foi demonstrado que pacientes que apresentavam número superior de moléculas de IgG associadas a seus RBCs, também tiveram resultados negativos no teste de Coombs (Gilliland, 1976; Kiruba e Han, 1988) o que sugere a existência de outras causas para os resultados falso-negativos. Entre estas causas, estariam a existência de anticorpos IgA e IgM que não são detectados por muitos reagentes usados nestes testes, presença de anticorpos de baixa afinidade que se desligam das hemácias durante etapas do teste, orientação das moléculas de IgG que as impedem de ligar-se aos eritrócitos adjacentes e um mecanismo de citotoxicidade mediada por células anticorpo-independentes (Petz LD e Garratty, 2004; Garratty, 2005). O teste de Coombs em gel (GT) não possui etapa de lavagem, o que aumenta sua capacidade de detecção de anticorpos de baixa afinidade. Vale ressaltar que um número pequeno de indivíduos tem um resultado positivo sem diminuição na sobrevivência dos eritrócitos. Resultado positivo sem evidência de hemólise foi reportado em 1-14.000 doadores de sangue saudáveis e 1-15% dos pacientes hospitalizados. (Brecher, 2002; Freedman, 1987). O uso da citometria de fluxo (CF) em imunohematologia vem crescendo devido a sua precisão, reprodutibilidade e compatibilidade com outros ensaios (Roback et al, 2003). A técnica é tida como a mais sensível para detecção de auto-anticorpos, com sensibilidade tão baixa quanto 30-40 moléculas por eritrócito sendo, portanto, uma alternativa a ser implementada no diagnóstico da AHAI, principalmente em pacientes que apresentam teste de Coombs negativo (Garratty e Arndt, 1999). Em estudo de 2009, Shi Lin e col. compararam resultados obtidos através da CF e do TCD pela técnica em tubo para detecção de auto-anticorpos e complemento contra RBC em pacientes com AHAI. Em 57 pacientes estudados, a sensibilidade do TCD em tubo para IgG (70,2%) foi similar a da CF para IgG (73,7%), porém, para pesquisa de C3d, a sensibilidade do TCD em tubo foi bem menor que a da CF, sendo a desta 73,4% e a daquele 36,8 %, portanto, a CF mostrou-se, significativamente, mais sensível na detecção de C3d ligado a RBC. Ainda no estudo de Shi Lin, quatro dos 40 pacientes positivos para IgG pela técnica do TCD em tubo tiveram resultados negativos na citometria de fluxo e 6 entre os 17 pacientes com resultados negativos de TCD em tubo apresentaram resultados positivos na CF. O que confirma a maior sensibilidade da CF quando comparada ao TCD em tubo. (Shi Lin et al, 2009). Conclusão semelhante havia sido relatada por estudo de 2006 que concluiu que a CF é, definitivamente, uma técnica mais sensível que o TCD e GT para detecção de anticorpos contra eritrócitos (Chaudhary et al, 2006). Uma alternativa mais sensível que o TCD, e de custos mais baixos que outros testes tradicionalmente empregados para avaliar a presença de auto-anticorpos é o método manual direto de brometo de hexadimetrina (PolybreneÒ) (TDP). Estudo brasileiro de 1998 avaliou o comportamento deste método manual direto (TDP) em 18 pacientes com

diagnóstico clínico de AIHA. O TCD foi positivo em 14 pacientes e negativo em 4 indivíduos, enquanto o TDP foi positivo em 17 pacientes e negativo em 1 indivíduo que apresentava TCD positivo devido à fixação de complemento (C3d) nas hemácias. A sensibilidade do TDP (94%) para detectar fixação de IgG in vivo foi, significativamente, maior que a do TCD (78%), com mesma especificidade em ambas (100%) (Braga et al, 1998). Porém, assim como o TCD, o TDP não permite a identificação do auto-anticorpo. Convém ressaltar que o TDP não detecta complemento na superfície das hemácias e pode apresentar baixa sensibilidade para detectar auto-anticorpos de determinadas especificidades (Owen e Hows, 1990). Parece existir uma provável relação entre o número de moléculas de IgG por eritrócito e a severidade da hemólise (Bodensteiner et al., 1983; Bordin et al., 1992). Apesar da grande eficácia na detecção de auto-anticorpos, o teste de Coombs direto não tem capacidade de quantificar estes auto-anticorpos, Já o teste Imunoenzimático (enzyme-linked antiglobulin test - ELAT) pode ser usado também para quantificação de auto anticorpos em pacientes com AHAI, sendo útil no prognóstico e acompanhamento da doença. Muitos fatores determinam a eficácia biológica dos anticorpos e sua habilidade em provocar hemólise in vivo, entre eles destacam-se quantidade, subclasse e título dos anticorpos, ativação do sistema complemento e habilidade funcional do sistema mononuclear fagocitário (Ravetch, 1991). A caracterização dos anticorpos permite determinar o tipo de hemólise presente e, portanto, define o tratamento mais adequado. Para tanto, alguns testes são realizados utilizando reagentes monoespecíficos, entre eles está o TCD, o GT e a CF. (Nathalang et al, 1997).

5. Considerações Finais

No último século, foram grandes os desafios e, por outro lado, os avanços no sentido de esclarecer a patogênese da AHAI e de desenvolver métodos diagnósticos cada vez mais sensíveis e específicos e que possam melhor contribuir para a precocidade do diagnóstico e a precisão na definição de AHAI e dos anticorpos e/ou proteínas o complemento envolvidos nesta doença. Outra questão ainda a ser solucionada diz respeito à quebra do mecanismo de tolerância aos antígenos próprios e à solução para conter essa quebra e defesa, na busca por esclarecer estes mecanismos. Atualmente, o teste de Coombs direto ainda é considerado o padrão ouro para a identificação do processo hemolítico auto-imune, porém, devido à necessidade de se atender a um número significativo de pacientes Coombs negativos e com AHAI presente, novas técnicas foram desenvolvidas e estão, cada dia mais, sendo usadas na rotina clínica laboratorial com relativo sucesso, como discutido neste trabalho. Entre elas, destaca-se o papel da Citometria de fluxo. Nesse contexto, ocupa lugar de destaque o profissional analista clínico, a quem cabe a devida execução dos testes, aprimoramento dos métodos diagnósticos e, principalmente, na melhor interpretação dos resultados obtidos pelas várias técnicas possíveis de serem empregadas, entendendo as limitação e variações das mesmas. A formação continuada e a atualização destes profissionais tornam-se, portanto, de extrema necessidade.

Referências Bibliográficas

- Braga G.W; Bordin J. O.; Moreira Jr G.; Kuroda A. Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene. *Rev Ass Med Brasil* 1998; 44(1): 16-20
- Bordin J.O.; Kerbauy J.; Souza-Pinto J.C.; Conti C.; Acceturi C.A.; Kishiwada M.A.M.; Novo N.F; Castello A. Quantitation of red blood cell-bound IgG by enzyme-linked antiglobulin test in human immunodeficiency virus infected patients. *Transfusion*, 1992; 32: 426-429.
- Bodensteiner D.; Brown P.; Skikne B.; Plapp F. The enzyme linked immunosorbent assay: accurate detection of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. *American Journal of Clinical Pathology*. 1983; 79: 182-185.
- Brecher M.E. editor. American Association of Blood Banks technical manual. 14th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks Press; 2002.
- Chaudhary R.; Das S.S.; Gupta R.; Khetan D. Application of flow cytometry in detection of red-cell-bound IgG in Coombs-negative AIHA. *Hematology*, 2006; 11(4): 295-300.
- Coombs, 1945 apud Zarandona J.M.; Yazer M.H. The role of the Coombs test in evaluating hemolysis in adults. *CMAJ*, 2006; 174(3) | 307.
- Freedman J. The significance of complement on the red cell surface. *Transfusion Medicine Reviews*, 1987; 1: 58-70.
- Garratty G.; Arndt P.A. Applications of flow cytometry to red blood cell immunology. *Cytometry*, 1999; 38: 259-267.
- Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Seminars in Hematology*, 2005; 42: 156-64.
- Gehrs B.C.; Friedberg R.C. Autoimmune hemolytic anemia. *American Journal of hematology*, 2002; 69: 258-271.
- Garratty G. Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology. *Seminars in Hematology*, 2005; 42: 156-64.
- Henry B. J. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 20ª Ed, São Paulo, Manole 2008.
- Kiruba R.; Han P. Quantitation of red cell-bound immunoglobulin and complement using enzyme-linked antiglobulin consumption assay. *Transfusion*, 1988; 28: 519-24.
- Liesveld J.L.; Rowe J.M.; Lichtman M.A. Variability of the erythropoietic response in autoimmune hemolytic anemia: analysis of 109 cases. *Blood*, 1987; 69: 820-826.
- Nathalang O.; Chuansunrit A.; Prayoonwivat W.; Siripoonya P.; Sriphaisal T. Comparison between conventional tube technique and gel technique in direct antiglobulin tests. *Vox Sanguinis*, 1997; 72: 169-171.

Owen I.; Hows J. Evaluation of the manual hexadimethrinebromide (Polybrene) technique in the investigation of autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion*, 1990; 30: 814-8.

Petz L.D.; Garratty G. *Immune hemolytic anemias*. 2nd ed. Philadelphia (PA): Churchill Livingstone; 2004.

Ravetch J.; Kinet J-P. Fc receptors. *Annual Review of Immunology*, 1991,9: 457-492.

Roback J.D.; Barclay S.; Hillyer C.D. An automatable format for accurate immunohematology testing by flow cytometry. *Transfusion*, 2003; 43:918-927.

Shi Lin J.; Chi Hao T.; Yi Lyou J.; Chen Y.; Liu H.; Tzeng C.; Chiou T. Clinical application of a flow cytometric direct antiglobulin test. *Transfusion*, 2009; v49.

Stein R.S.; Neff A.T. Immune hemolytic anemia. *Hematology*, 2001, Volume 1, Part 4.

Stroncek D.F.; Njoroge J.M.; Proctor J.L.; Childs R.W.; Miller J. A preliminary comparison of flow cytometry and tube agglutination assays in detecting red blood cell associated .*Transfus Med*, 2003 ;13(1): 35-41