

TESTE DA ANTIGLOBULINA HUMANA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Alexandre Gomes Vizzoni* e Flavia Regina Medeiros da Silva

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz)

*E-mail: alexandre.vizzoni@gmail.com

Submetido em: 20/01/2015

Aceito em: 14/07/2015

Publicado em: 30/09/2015

Resumo

O teste de antiglobulina pode ser utilizado na detecção de hemácias sensibilizadas por aloanticorpos, autoanticorpos e/ou componentes do complemento. A sensibilização pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*. A detecção da sensibilização das hemácias *in vivo* é determinada pelo teste de antiglobulina direta ou Coombs direto, enquanto que a sensibilização *in vitro* é determinada pela técnica de antiglobulina indireta ou coombs indireto, podendo ser aplicada para os testes de compatibilidade, triagem de anticorpos irregulares, identificação de anticorpos irregulares, fenotipagem eritrocitária e estudos de titulação de anticorpos. A interpretação de um teste de antiglobulina positivo exige o conhecimento do diagnóstico do paciente, avaliação das medicações em uso, gravidez e história transfusional, assim como a informação de presença de anemia hemolítica autoimune. O fenótipo eritrocitário do paciente deve ser avaliado com cautela quando o teste de antiglobulina direto é positivo, uma vez que com as hemácias recobertas por anticorpos podem ocorrer resultados falso-positivos. As hemácias teste para a realização da técnica de antiglobulina indireta devem ter fenótipo previamente conhecido (hemácias R₁R₁ e R₂R₂) com a finalidade de possibilitar a identificação de anticorpos que apresentem efeito de dose. Somente o resultado sorológico do teste não é diagnóstico, devendo ser avaliado em conjunto com os dados clínicos e demais dados laboratoriais, tais como: hematócrito, bilirrubina, haptoglobina e contagem de reticulócitos.

Palavras-chave: Teste de Coombs, Técnicas Imunológicas, Reações Antígeno-Anticorpo.

Human Antiglobulin Test: a Literature Review

Abstract

The antiglobulin test can be used for detection of sensitized erythrocytes by alloantibodies, autoantibodies and/or complement components. Sensitization can occur *in vivo* or *in vitro*. The detection of *in vivo* sensitized erythrocytes is determined by direct antiglobulin test or direct Coombs, whereas the *in vitro* sensitization is determined by the indirect antiglobulin technique or indirect Coombs. It can be applied for compatibility testing, screening of irregular antibodies, identification of irregular antibodies, erythrocyte phenotyping, and antibody titration studies. The interpretation of a positive antiglobulin test requires knowledge of the patient's diagnosis, evaluation of medications, pregnancy and transfusion history, as well as information of the presence of autoimmune hemolytic anemia. The patient's erythrocyte phenotype should be evaluated with caution when direct antiglobulin test is positive since red blood cells coated with antibody can cause false-positive results. The red blood cells test for carrying out the indirect antiglobulin technique must have previously known phenotype (R₁R₁ RBC and R₂R₂) in order to allow the detection of antibodies that show dosage effect. The result of serological test alone is not a diagnostic and should, therefore, be evaluated in conjunction with other clinical and laboratory data, such as hematocrit, bilirubin, haptoglobin, and reticulocyte count.

Keywords: Coombs' Test, Immunological Techniques, Antigen-Antibody Reactions.

La Prueba de Antiglobulina Humana: Una Revisión de la Literatura

Resumen

La prueba de antiglobulina se puede utilizar para detectar hematíes sensibilizados por aloanticuerpos, autoanticuerpos y/o componentes del complemento. La sensibilización puede ocurrir *in vivo* o *in vitro*. La detección de la sensibilización de las hematíes *in vivo* es determinada por la prueba de antiglobulina directa o Coombs directa, mientras que la sensibilización *in vitro* es determinada por la técnica de antiglobulina indirecta o Coombs indirecta, pudiendo ser aplicada para las pruebas de compatibilidad, la selección de anticuerpos irregulares, identificación de anticuerpos irregulares, fenotipificación de eritrocitos y estudios de titulación de anticuerpos. La interpretación de una prueba de antiglobulina positiva requiere el conocimiento de diagnóstico del paciente, la evaluación de medicamentos en uso, el embarazo y la historia de la transfusión, así como la información de la presencia de anemia hemolítica autoinmune. El fenotipo de los eritrocitos del paciente debe ser evaluado con precaución cuando la prueba de antiglobulina directa es positiva, ya que las hemtaíes recubiertas con anticuerpos pueden ocurrir resultados falsos-positivos. La prueba de las hematíes para la realización de la técnica de antiglobulina indirecta deben tener fenotipo previamente conocido (hematíes R₁R₁ y R₂R₂) a fin de posibilitar la identificación de anticuerpos que presenten efecto de dosis. Solo el resultado serológico de la prueba no es diagnóstico, debiendo ser evaluado en conjunto con los datos clínicos y demás datos laboratoriales, tales como: hematocrito, la bilirrubina, haptoglobina y recuento de reticulocitos.

Palabras clave: Prueba de Coombs, Técnicas Inmunológicas, Reacciones Antígeno-Anticuerpo.

1. INTRODUÇÃO

Em 1945, Coombs, Mourant e Race produziram o soro de antiglobulina humana a partir da injeção de soro humano ou seus componentes purificados em coelhos. Embora tenham sido fundamentais em introduzir o teste de antiglobulina à sorologia de grupos sanguíneos, o princípio do teste já tinha sido descrito por Moreschi, em 1908, não sendo divulgado na época⁽¹⁻²⁾. A descoberta foi de grande importância para a medicina transfusional, pois a partir daí foi possível a detecção de vários anticorpos incompletos que não causavam aglutinação das hemácias em meio salino, como os anticorpos do sistema Rh (D) envolvidos na doença hemolítica do recém-nascido e do feto e na anemia hemolítica autoimune⁽³⁻⁴⁾.

A IgM e a IgG são os anticorpos de maior importância clínica relacionados aos grupos sanguíneos. Anticorpos da classe IgM, têm uma estrutura pentamérica, e são capazes de aglutinar diretamente as hemácias em meio salino. Anticorpos da classe IgG sensibilizam as hemácias sem causar aglutinação eritrocitária, e são considerados "incompletos"⁽⁴⁾. A detecção de hemácias sensibilizadas por IgG é realizada pela adição de antiglobulina humana (AGH) ou anti-IgG, que causa a aglutinação eritrocitária. A utilização da AGH pode ser considerada a maior descoberta da medicina transfusional depois do sistema ABO^(1,4).

O teste de antiglobulina ao utilizar a anti-IgG humana permite reconhecer a fração Fc do anticorpo fixado na membrana das hemácias sensibilizadas, dessa forma, as duas porções Fab dos heteroanticorpos contidos no soro AGH, formam uma ligação entre os anticorpos humanos, resultando no fenômeno da aglutinação^(1,3,5).

2. TIPOS DE REAGENTES DE ANTIGLOBULINA HUMANA

Os soros de antiglobulinas humanas podem ser:

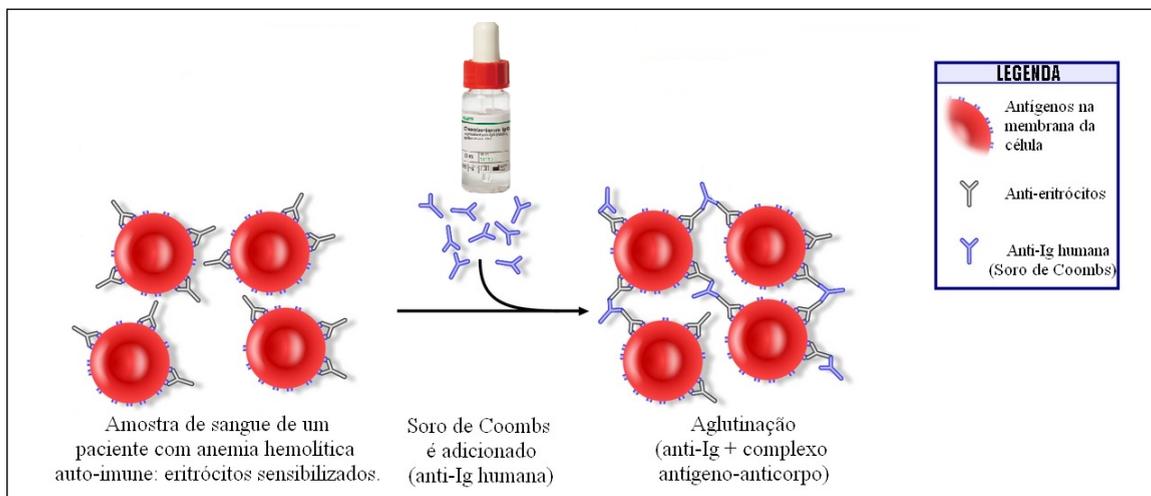
- Poliespecíficos:** Podem ser policlonais, monoclonais ou mistos. Contêm anticorpos contra IgG humana e contra frações do complemento C3 (C3b, C3c e/ou C3d)^(1,3).
- Monoespecíficos:** Podem ser policlonais ou monoclonais. Contém apenas uma especificidade de anticorpos, anticorpos anti-IgG, anti-IgM, anti-IgA ou anticorpos para componentes específicos do complemento como C3b, C3c ou C3d^(1,3).
- Anti-IgG:** Não contém atividade anticomplemento. Contêm anticorpos específicos para o fragmento Fc da cadeia pesada gama da molécula de IgG. Está presente nos soros monoespecíficos^(1,3).
- Anticomplemento:** São reativos apenas contra componentes do complemento, não tendo atividade contra imunoglobulinas humanas. Está presente nos soros poliespecíficos^(1,3).

2.1 Aplicação do teste de antiglobulina humana

a) Teste da antiglobulina direto (alguns autores: teste direto da antiglobulina)

Também conhecido como Teste da Antiglobulina Direto (TAD) ou Coombs Direto (CD), é considerado um método simples para detectar a sensibilização *in vivo* de hemácias com IgG e/ou componentes do complemento, de acordo com o soro de antiglobulina humana utilizado (figura 1). Pode ser realizado pela técnica em tubo ou gel-teste⁽⁶⁾. O método em tubo é realizado após a adição de hemácias a serem testadas, previamente lavadas com solução fisiológica por 3 vezes a 0,9%, e a adição do reagente de antiglobulina humana. A lavagem das hemácias é uma etapa fundamental, pois tem a finalidade principal de remoção de globulinas humanas e evitar a neutralização do soro de Coombs.

Figura 1: Representação esquemática do teste de Coombs direto.

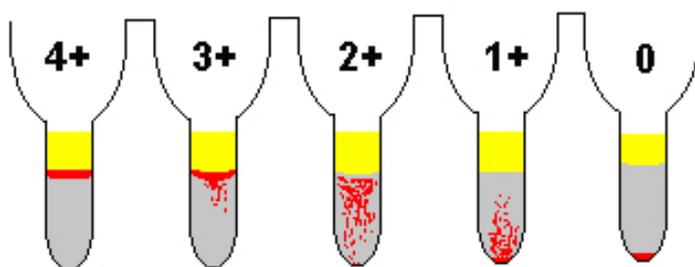


Fonte: Adaptado de: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php

O método de gel-teste é realizado com a adição de hemácias comerciais diluídas aproximadamente a 0,8% ao cartão gel contendo o soro de AGH e, geralmente não há necessidade de lavagem prévia das hemácias teste^(3,5,7). Entretanto, resultados falso-positivos por este método podem ser elucidados se o teste for repetido com a utilização de cartão monoclonal ou células previamente lavadas com salina ou ID-Diluyente 2 pré-aquecidos a 40°C⁽⁸⁾.

A aglutinação ocorre nos microtubos durante o estágio de centrifugação. As hemácias, que são mais densas que o gel, tendem a passar através dele. Quando as hemácias não são aglutinadas por anticorpos, sedimentam-se no fundo da coluna. Quando formam aglutinados, pela ação dos anticorpos, as hemácias são retidas pelo gel durante a centrifugação, podendo apresentar padrões de intensidade de 1 a 4 cruzes quando positivas (figura 2).

Figura 2: padrão de intensidade de reação em gel teste.



Condições clínicas para um TAD positivo⁽⁹⁻¹⁰⁾:

1. Doença hemolítica do recém-nascido e do feto: Detecta hemácias fetais ou do recém-nascido sensibilizadas *in vivo* por anticorpos IgG provenientes da mãe.
2. Reação transfusional hemolítica: Geralmente demonstra a presença de IgG ou C3d, ou ambos, dependendo da natureza e especificidade do anticorpo do receptor, principalmente após pacientes terem sido submetidos a transfusão de sangue com fenótipo incompatível.
3. Anemia hemolítica autoimune (AHA) e induzida por drogas: Pacientes com anemia hemolítica autoimune por anticorpos quentes podem apresentar hemácias sensibilizadas por IgG e/ou componentes do complemento⁽¹¹⁻¹²⁾. É sabido ainda que certos fármacos como a metildopa podem desencadear reações positivas nos testes de TAD.

Um teste de antiglobulina direto com resultado positivo pode ser encontrado em 1 em 1.000 a 1:14.000 doadores de sangue saudáveis⁽¹³⁾, sem aparente hemólise. A importância deste achado não é clara, mas alguns indivíduos podem desenvolver anemia hemolítica autoimune (AHA) ou câncer⁽¹⁴⁾. O TAD é positivo em 7 a 15 % das amostras de pacientes hospitalizados. Dessa forma, ressalta-se a importância da realização do TAD e a devida correlação clínica do paciente.

b) Teste da antiglobulina indireto (alguns autores: teste indireto da antiglobulina)

O teste da antiglobulina indireto (TAI) ou Coombs Indireto detecta a presença de anticorpos não-ABO livres no soro/plasma. O TAI utiliza pelo menos duas hemácias reagentes do grupo O RhD positivo com fenótipo conhecido, contendo a maioria dos antígenos clinicamente importantes para os sistemas Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Lewis, P, Lutheran e mais recentemente, a inclusão do antígeno Dia⁽¹⁵⁾. O painel de triagem de anticorpos é representado por um diagrama, onde estão relacionados à constituição antigênica de cada célula de avaliação, sendo fornecido a cada lote pelo fabricante (figura 3).

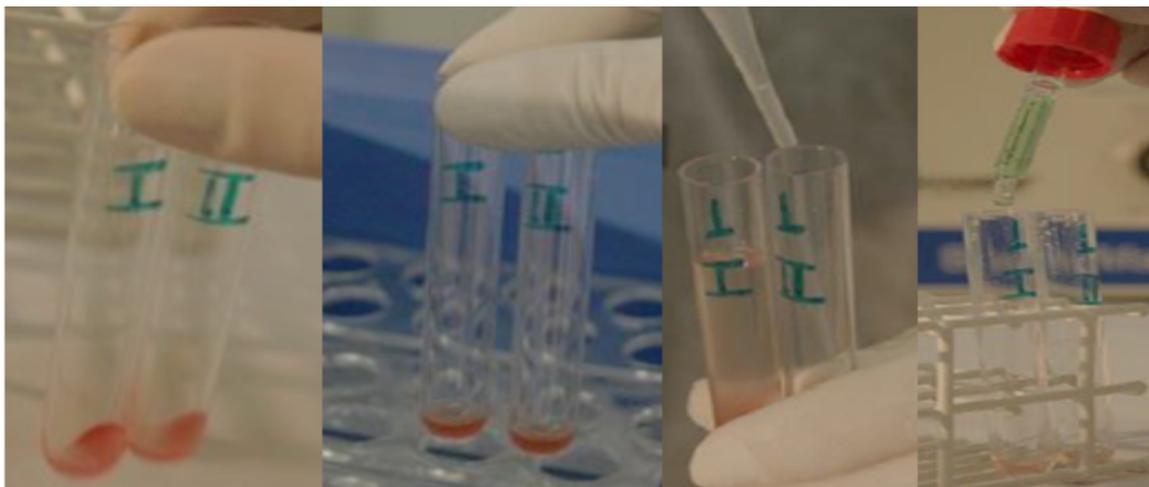
Figura 3: Diagrama para triagem de anticorpos irregulares.

DIAGRAMA PARA TRIAGEM DE ANTICORPOS																					
Sistema	Rh					Kell		MNS				Kidd		Duffy		Lewis		P	Lutheran		
Células	D	C	E	c	e	K	k	M	N	S	s	J	Jk	Fy ^a	Fy ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	Lu ^a	Lu ^b	
I	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	+
II	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+

O TAI tem como princípio colocar as hemácias fenotipadas em contato com soro ou plasma do indivíduo, buscando evidenciar a presença de anticorpos na amostra analisada. No método em tubo, a técnica deve incluir pelo menos três fases (figura 4):

- Temperatura ambiente (fase salina)
- Incubação 37° (fase térmica)
- Antiglobulina humana (fase de AGH)

Entre a fase térmica e a fase de antiglobulina humana, deve-se proceder a lavagem das hemácias com solução fisiológica, compreendendo uma etapa crucial do teste⁽¹⁶⁾.

Figura 4: Método em tubo do teste de antiglobulina indireto. Estão representadas as fases de temperatura ambiente, incubação a 37°C, lavagem das hemácias e antiglobulina humana.

Pequenas variações da técnica em tubo podem ocorrer dependendo do emprego de substâncias potencializadoras⁽¹⁷⁻¹⁸⁾, como a adição de albumina, polietilenoglicol (PEG) ou enzimas proteolíticas. No método em gel-teste a leitura é realizada diretamente na fase antiglobulina humana. A presença de aglutinação, em qualquer uma das fases pelo método em tubo ou na fase de antiglobulina pelo método de gel-centrifugação, revela a presença de anticorpos irregulares. Uma vez detectada a presença de anticorpos irregulares, o mesmo deverá ser identificado⁽¹⁸⁻¹⁹⁾.

O teste de antiglobulina indireto é frequentemente utilizado para^(3,4,9):

- 1. Fenotipagem eritrocitária:** Para detectar antígenos eritrocitários em testes que interagem com anticorpos conhecidos do soro reagente, como por exemplo, anti-D para determinar D fraco, anti-Kell para determinar antígeno Kell, entre outros. Na fenotipagem de alguns antígenos eritrocitários, como por exemplo, o antígeno M e o antígeno N, utiliza-se antissoros monoclonais que aglutinam as hemácias sem a necessidade do soro de Coombs. Isso se deve pelo fato desses anticorpos serem compostos de anticorpos de classe IgM.
- 2. Pesquisa de anticorpos irregulares:** Para detectar anticorpos irregulares na amostra de soro ou plasma em teste contra antígenos presentes nas hemácias de triagem. É um teste muito utilizado para monitorar mulheres no período gestacional, principalmente as Rh (D) negativo por apresentar grande possibilidade de desenvolver aloanticorpos.
- 3. Prova de compatibilidade ou prova cruzada:** Para detectar anticorpos presentes no soro ou plasma do receptor contra antígenos presentes nas hemácias do doador.
- 4. Identificação de anticorpos irregulares:** Após uma triagem inicial que indica a presença de anticorpo irregular na amostra analisada, procede-se uma identificação do mesmo, com o objetivo de determinar a sua especificidade. Este teste é extremamente útil em gestantes e pacientes candidatos a transfusão de sangue com pesquisa de anticorpos positiva.

3. IMPORTÂNCIA DO USO DAS HEMÁCIAS FENOTIPADAS NA TÉCNICA DA ANTIGLOBULINA HUMANA

O teste de antiglobulina humana indireto baseia-se na reação de aglutinação das hemácias de triagem antígeno correspondente ao anticorpo presente no soro ou plasma estudado. Como mencionado anteriormente, hemácias de triagem são no mínimo duas hemácias do grupo O, em suspensão de 0,8 a 3 % dependendo do fabricante e método utilizado. Essas hemácias devem cumprir com as recomendações e orientações para os procedimentos de compatibilidade em laboratórios de transfusão de sangue e, os seguintes antígenos eritrocitários devem estar expressos nestas células de triagem: D, C, E, c, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Le^a, M, N, S, s^(2,4,20).

Recomenda-se que uma das células de triagem deva ser R₁R₁ e a outra R₂R₂, onde os antígenos Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b estejam presentes. Os antígenos S e s devem ser representados nas células de triagem com expressão homocigótica, ou seja, elas visam evitar o efeito de dose (anticorpos reagem mais fracamente ou podem não reagir com hemácias em que os antígenos estão expressos em heterocigose, por exemplo, Jk^a/Jk^b). As hemácias de triagem não devem ser reunidas em pool⁽²⁰⁾.

De acordo com o trabalho realizado pelo Hemocentro Regional de Guarapuava/PR, geralmente, grande parte dos laboratórios de análises clínicas realiza os testes de antiglobulina indireto utilizando hemácias do grupo O, Rh(D) positivo, não fenotipadas para os demais antígenos dos outros sistemas clinicamente importantes. Desta forma, os antígenos que deveriam estar presentes na membrana das hemácias tipo O, podem estar ausentes, o que ocasionaria um resultado falso-negativo, causado pelas hemácias normalmente adquiridas aleatoriamente pelos laboratórios em geral, dentre um pool de clientes previamente classificados como O Rh (D) positivo, do próprio laboratório⁽²¹⁾.

O conhecimento do fenótipo das hemácias de triagem e da identificação de anticorpos é extremamente importante e necessário, evitando que resultados falso-negativos ocorram pelo emprego inadequado das hemácias selecionadas para o teste⁽²²⁾.

Num estudo realizado por Furlan e Merisio (2011) no Hemonúcleo de Francisco Beltrão/PR, foram pesquisados 172 pacientes, e constatou-se que alguns antígenos eritrocitários não estavam presentes nas membranas das hemácias dos pacientes: C=35%, c=16%, E=72%, e=05%, K=97%, k=0,1%, Kp^a= 94%, Kp^b=0,1%, Jk^a=19%, Jk^b= 30%, Le^a=87%, Le^b=33%, Fy^a=28%, Fy^b=17%. Observou-se que 41% dos pacientes pesquisados eram do tipo O⁽⁷⁾. Dessa forma, um paciente que apresente um anticorpo anti-Kell, ao se realizar aleatoriamente a compatibilidade entre o soro deste paciente e as hemácias de doadores de grupo O positivo não fenotipadas previamente, a probabilidade dessas hemácias conterem o antígeno Kell e detectar o anticorpo é de 39,7% (P= 0,41 x 0,97).

Dessa forma, fica evidente que utilizar hemácias selecionadas aleatoriamente, sem o conhecimento prévio dos fenótipos, pode ocasionar grave erro na execução do teste. Anticorpos clinicamente significativos podem não ser evidenciados, resultando num teste falso-negativo. A não detecção de um anticorpo clinicamente significante (anti-K, anti-c, entre outros) pode ocasionar a destruição dos eritrócitos^(23, 24), causando anemia e consequente liberação de hemoglobina (hemólise), que será metabolizada até bilirrubina indireta. O neonato é incapaz de conjugar com eficiência a bilirrubina indireta, provocando hiperbilirrubinemia, em seu grau mais avançado o Kernicterus (que é uma síndrome neurológica devido à bilirrubina indireta (não conjugada ou lipossolúvel), que atravessa a barreira hematoencefálica e se deposita nos núcleos cerebelares e na base do cérebro, sendo considerada uma lesão cerebral irreversível), hidropsia e muito frequentemente o óbito⁽²⁵⁻²⁶⁾.

4. IMPORTÂNCIA DAS HEMÁCIAS CONTROLE (HEMÁCIAS SENSIBILIZADAS POR IGG) NO TESTE DE ANTIGLOBULINA

O resultado negativo de um teste de antiglobulina precisa ser validado com o uso das hemácias controle de AGH ou controle de Coombs. As hemácias controle são previamente sensibilizadas por anticorpos IgG e, quando adicionadas em tubo com teste de antiglobulina negativo, devem aglutinar-se pela presença do soro AGH. A aglutinação das hemácias controla e comprova a eficácia do soro AGH e também que as lavagens prévias foram realizadas corretamente^(3,4,10).

5. CONCLUSÃO

O teste da antiglobulina (também chamado teste de Coombs) baseia-se no princípio de que, globulinas anti-humanas (AGH) obtidas a partir de espécies não humanas imunizadas, se ligam a globulinas humanas, tais como: IgG ou complemento, seja livre no soro ou ligado a antígenos nas hemácias.

Existem dois tipos principais de anticorpos de grupo sanguíneo, IgM e IgG. Devido à sua grande estrutura de pentâmero, os anticorpos IgM ligam-se aos antígenos correspondentes suspensos em soro fisiológico e os aglutinam diretamente. Os anticorpos IgG são denominados não aglutinantes, porque a sua estrutura é pequena (monômero) e dessa forma não possui a capacidade de aglutinar diretamente as hemácias sensibilizadas. A adição de AHG contendo anti-IgG permite a aglutinação das células sensibilizadas.

O teste de antiglobulina contribui diretamente para o diagnóstico da anemia autoimune, pois sua positividade confirma que o anticorpo foi fixado *in vivo* à hemácia do paciente, auxiliando dessa forma o diagnóstico diferencial com outras anemias hemolíticas, como as causadas por alterações da hemoglobina ou da estrutura da hemácia. É importante também no diagnóstico das anemias hemolíticas do recém-nascido e das anemias induzidas por drogas.

Embora o teste de Coombs seja extremamente sensível, um resultado negativo não exclui a presença de anticorpos ligados às hemácias. Neste caso, testes complementares como a eluição de anticorpos podem ser necessários para a confirmação de sua positividade.

Anticorpos clinicamente significantes são aqueles capazes de se ligar à membrana eritrocitária na temperatura corpórea, reduzirem a sobrevivência das hemácias circulantes e atravessarem a barreira placentária. Estes anticorpos reagem após incubação a 37°C e são detectados pelo teste indireto da antiglobulina.

Os reagentes utilizados na pesquisa de anticorpos antieritrocitários são compostos, no mínimo, de hemácias de dois fenótipos distintos. Estas hemácias devem ser fenotipadas para os principais antígenos eritrocitários, cujos anticorpos apresentam importância clínica: D, C, c, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, Le^a, Le^b, M, N, S, s e P₁. Alguns antígenos devem estar em homozigose em pelo menos um dos reagentes (C, c, E, e, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s). Denomina-se homozigose ou antígenos em dose dupla quando a herança de alelos idênticos determina uma maior expressão do antígeno na membrana da hemácia.

O teste de antiglobulina direto está indicado somente em pacientes com suspeita de hemólise imune, ou com fins de diagnóstico ou de monitorização terapêutica (ex.: evento adverso à transfusão). Nestas situações este teste tem um bom valor preditivo.

Podem ocorrer discrepâncias entre os resultados de uma mesma amostra em decorrência da sensibilidade do método utilizado. Na metodologia em gel-teste é possível detectar uma quantidade menor de moléculas de anticorpos ligados aos eritrócitos quando comparado pelo método em tubo.

6. REFERÊNCIAS

1. Simpson PP, Hall P. Teste de Antiglobulina. In: Harmening DM. *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*. 4ª Ed. Filadélfia: Ed. Revinter; 2006. p. 71-87.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. *Imunohematologia: Testes pré transfusionais*. Série TELELAB; 2001. p. 37-44.
3. Girello AL, Kühn TIBB. *Fundamentos da Imuno-Hematologia Eritrocitária*. 3ª ed. São Paulo: editora Senac; 2011. Cap.3, p.91-100.
4. Machado SL, Vizzoni AG. Introdução à Imuno-Hematologia. In: Paulo CJLS (coord.), Silva AM, Neto LMR (org.). *Hematologia: métodos e interpretação*. São Paulo: Roca; 2013. p.389-421.
5. Nance S. Red Cell antibody detection and identification. In: *Imunohematology: principles and practice*. Quinley ED. Third edition: Lippicott Williams & Wilkin; 2001. P.75-94.
6. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S et al.. *The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions*. Transfusion. 1990;30(2):109-13. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2305438>
7. Furlan F, Merisio PR. *Perfil de fenótipos dos principais grupos sanguíneos de pacientes do Hemonúcleo regional de Francisco Beltrão*. NewsLab. 2011;108:98-108. Disponível em: http://www.newslab.com.br/newslab/revista_digital/108/revista.pdf
8. Diamed Latino América-Brasil. *Guia de Resolução de Problemas – Gel teste*. Disponível em: <http://www.diamed.com.br/Cmi/Pagina.aspx?82>. Acesso em: 15/05/2015.
9. Barjas-Castro ML. Aplicações do teste de antiglobulina direta. In: *Hemoterapia: fundamentos e prática*. Editora Atheneu.2007;(19):p.177-183.

10. Feitosa BAM, Vizzoni AG. *Significado Clínico do Teste de Coombs direto na rotina pré-transfusional*. Infarma. 2009;21(11-12):37-46. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v21.e11/12.a2009.pp37-46>
11. Garraty G. *Immune hemolytic anemia associated with negative routine serology*. Semin Hematol. 2005;42(3):156-164. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminhematol.2005.04.005>
12. Segel GB, Lichtman. *Direct antiglobulina ("Coombs") test-negative autoimmune hemolytic anemia: a review*. Blood Cells Mol Dis, 2014 apr;52(4):152-60. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979613002702>
13. Zantek ND, Koepsell SA, Tharp DR Jr, Cohn CS. *The direct antiglobulina test: a critical step in the evaluation of hemolysis*. AM J Hematol. 2012;87(7):707-9. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.23218/epdf>
14. Rottenberg Y, Yahalom V, Shinar E, Barchana M, Adler B, Paltiel O. *Blood donors with positive direct antiglobulin tests are at increased risk for cancer*. Transfusion. 2009; 49:838-42. Disponível em: <http://www.docstoc.com/docs/124237998/Blood-donors-with-positive-direct-antiglobulin-tests-are-at>
15. Garratt, G. *How concerned should we be about missing antibodies to low frequency antigens?* Transfusion, 2003;43 844-47.
16. Hopkins C, Walters TK. *Thermal amplitude test*. Immunohematology. 2013;29(2):49-51. Disponível em: http://www.redcross.org/images/MEDIA_CustomProductCatalog/m38440119_29_2_05.pdf
17. Weldy L. *Polyethylene glycol antiglobulina test (PEG-AGT)*. Immunohematology. 2014;30(4):158-60.
18. Lisboa SM, Vizzoni AG. *Introdução à imuno-hematologia*. In: Silva AM, Neto LMR (Orgs). *Hematologia: métodos e interpretação*. São Paulo: Roca, 2013; Cap.15, p. 389-422.
19. Haywood JR, Moulds MKG, Bryant BJ. *Determination of optimal method for antibody identification in a reference laboratory*. Immunohematology. 2011;27(4): 146-50. Disponível em: http://www.redcross.org/images/MEDIA_CustomProductCatalog/m16141467_27_4_11.pdf
20. Gooch A , Parker J , Wray J , Qureshi H. *Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy*. British Committee for Standards in Haematology. 2008. 22p.
21. Reda SY, Oliveira DO. *Coombs indireto sem o uso de hemácias fenotipadas na gestante Rh(D) negativo: tranquilidade ou problema?* NewsLab. 2012;113:128-136. Disponível em: http://www.newslab.com.br/newslab/revista_digital/113/revista.pdf
22. Haywood Jr, Moulds MKG, Bryant BJ. *Determination of optimal method for antibody identification in a reference laboratory*. Immunohematology. 2011;27(4):146-50. Disponível em: http://www.redcross.org/images/MEDIA_CustomProductCatalog/m16141467_27_4_11.pdf
23. Cianciarullo MA, Ceccon MEJ, Vaz AC. *Prevalência de marcadores imuno-hematológicos em recém-nascidos ao nascimento e em suas respectivas mães e incidência de doença hemolítica numa maternidade de São Paulo*. Rev Assoc Med Bras. 2003; 49(1): 45-53. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0104-42302003000100033&script=sci_arttext
24. Baiocchi C, Nardoza LMM. *Aloimunização*. Rev Bras Ginecol Obstet. 2009;31(6):311-19. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032009000600008

25. Bhutani, VK, Wong RJ. *Bilirubin Neurotoxicity in Preterm Infants: Risk and Prevention*. J Clin Neonatol. 2013;2(2):61-9. Disponível em: http://www.jcnonweb.com/temp/JClinNeonatology2261-4529291_123452.pdf
 26. Kaplan M, Bromiker R, Hammerman C. *Severe Neonatal Hyperbilirubinemia and Kernicterus: Are These Still Problems in the Third Millennium?* Neonatology.2011;100:354–62. Disponível em: <http://www.karger.com/Article/Pdf/330055>
-