

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Versão impressa ISSN 1516-8484

Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v.24 n.04 São José do Rio Preto out./dez. 2002

doi: 10.1590/S1516-84842002000400005

Controle de qualidade interno de reagentes em imunohematologia - Aspectos práticos

Internal quality control of immunohematological reagents - Practical aspects

Marcia C. Z. Novaretti (I); Valdecir J. Bueno (II); Pedro E. Dorlhiac-Llacer (III); Dalton A. F. Chamone (IV).

I - Chefe da Divisão de Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo; Doutora em hematologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Professora colaboradora da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

II - Farmacêutico-Bioquímico, responsável pelo Controle de Qualidade Interno em Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo

III - Prof. Livre-Docente da disciplina de hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Diretor Técnico Científico da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo

IV - Professor Titular de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Presidente da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo

RESUMO

A hemoterapia tem buscado incessantemente o aumento da segurança transfusional. Para tanto tem envolvido, dentre outros, a padronização de testes que comprovem a qualidade dos reagentes utilizados nos serviços hemoterápicos, as análises, o uso e a manutenção de equipamentos apropriados e treinamento de funcionários. O controle de qualidade é essencial e indispensável para a obtenção de resultados confiáveis nos ensaios para os quais se destinam. Até o momento, não há descrição pré-estabelecida dos requisitos mínimos para os reagentes utilizados nos testes imuno-hematológicos pelo Ministério da Saúde. Este trabalho tem por objetivo apresentar os aspectos práticos que envolvem o controle de qualidade em imuno-hematologia, além de informações básicas sobre os principais reagentes imuno-hematológicos disponíveis no mercado brasileiro.

Palavras-chave: Controle de qualidade, anticorpos monoclonais, diagnóstico, reagentes de grupos sanguíneos

ABSTRACT

One of the main objectives of transfusion medicine is to promote safe transfusion. Continuous improvement involves the standardization of techniques used for quality control of reagents, adequate equipment evaluation and its maintenance and staff training. Quality control of reagents is critical for achieving reliable results in immunohematological testing. In Brazil, as far as we know, there are no minimum requirements for immunohematological reagent guidelines. This paper has the purpose of describing practical aspects of quality control in immunohematology, as well as providing information on the most common immunohematological reagents available on the Brazilian market.

Keywords: Quality control, monoclonal antibodies, diagnosis, blood group reagents.

Introdução: A Medicina Transfusional tem como objetivo a transfusão segura. O Brasil tem se destacado na América Latina pelo posicionamento de vanguarda quanto à legislação referente ao sangue e aos hemoderivados (1,2,3,4). Paralelamente, o Ministério da Saúde, no âmbito da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem desenvolvido estratégias para avaliação da qualidade dos serviços hemoterápicos, e do cumprimento da legislação pertinente (5,6). Para tanto, investir em controle de qualidade é essencial e indispensável para a obtenção de resultados confiáveis nos ensaios para os quais se destinam.

Há cerca de 20 anos, um estudo conduzido no Reino Unido avaliando os serviços hemoterápicos quanto aos testes imuno-hematológicos, já apontava a importância da padronização de técnicas e reagentes (7). Grande relevância tem a questão, que uma das metas mobilizadoras nacionais intitulada "Sangue com garantia de qualidade em todos o seu processo até 2003", contempla a implementação de um sistema de controle da qualidade externo em imuno-hematologia e sorologia em unidades hemoterápicas (8,9). Obviamente, a busca pelo aprimoramento envolve a padronização de pesquisa constante e aplicada de testes que comprovem a qualidade dos reagentes utilizados nos laboratórios onde se realizam as análises, uso e manutenção de equipamentos apropriados e treinamento de funcionários (10,11). Até o momento, não há parâmetros padronizados e pré-estabelecidos no Brasil que discriminem detalhadamente os requisitos mínimos desejáveis para os reagentes utilizados nos testes imuno-hematológicos.

Acreditando ser de grande importância basearmos nossos ensaios de controle de qualidade acordados à nossa realidade, vimos apresentar a experiência do Departamento de Controle de Qualidade em Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo, laboratório com certificação de qualidade ISO 9002 pela British Standards desde 1998, pretendendo contribuir para a excelência dos testes imuno-hematológicos, para facilitar a implementação de outros laboratórios de controle de qualidade congêneres e para ampliar a conscientização de profissionais brasileiros e latino-americanos que atuem no setor (12).

Objetivamente, o controle de qualidade em imuno-hematologia pode ser realizado rotineiramente, tanto por ocasião da aquisição de insumos como quando da observação, pelos usuários de resultados laboratoriais que levem à suspeita de alteração da qualidade desses reagentes. Isso porque como os reagentes empregados nos testes imuno-hematológicos são produtos biológicos, mesmo após análise e liberação do reagente pela empresa que o produziu, vários outros fatores como transporte, armazenamento e temperatura, dentre outros, podem alterar a qualidade desses produtos (13).

Precedendo a implantação de testes de controle de qualidade em imuno-hematologia, é crucial a elaboração de descrição (quadro 1) detalhada e concisa dos insumos empregados. A descrição aqui apresentada foi baseada nas legislações do Conselho Europeu (14), do Canadá (15), da Alemanha (16) e dos Estados Unidos (17,18), tendo sido feitas, em circunstâncias excepcionais, adaptações frente às necessidades locais. Por exemplo, na descrição de painel de hemácias para identificação de anticorpos irregulares deve haver, pelo menos, uma hemácia com antígeno Di(a+); isto porque já foi anteriormente descrito que, na população brasileira, é freqüente o encontro de anticorpo anti-Di^a (19).

Quadro 1. Exemplo de descrição de reagente imuno-hematológico

Material	Reagente de glóbulos vermelhos contendo, no mínimo, 11 frascos de suspensões de hemácias para identificação de anticorpos irregulares
Descrição	Estojo constituído por, no mínimo, 11 frascos com suspensões de hemácias de 3 a 5% de origem humana de, pelo menos, 11 indivíduos do grupo O, com perfis antigênicos conhecidos para a identificação de anticorpos irregulares. Deve permitir a identificação dos anticorpos anti-eritrocitários clinicamente significantes mais freqüentemente encontrados e apresentar, pelo menos, uma suspensão de hemácias antígeno Di(a+). Deve ser acompanhado de diagrama demonstrando a fenotipagem dos antígenos estudados. A fenotipagem deverá ser compatível com o diagrama enviado pelo fabricante. As hemácias deverão apresentar teste de antiglobulina direto negativo. Deve vir acompanhado de certificado de Qualidade que comprove confirmação completa de cada frasco/hemácia.
Inspeção visual	Os reagentes não deverão apresentar hemólise, precipitados, partículas em suspensão ou formação de gel.
Bula e rótulos	<p>As bulas e os rótulos das embalagens interna e externa deverão estar em língua portuguesa, conter as especificações exigidas pela legislação vigente - Código de Defesa do Consumidor e pela Anvisa.</p> <p>A bula deverá ser compatível com o produto apresentado e conter as seguintes informações técnicas: nome comercial e marca do produto, finalidade do uso e origem do produto, explicações claras da metodologia, da coleta e do preparo da amostra, dos procedimentos, das limitações e da interpretação de resultados positivos e negativos dos testes, preservante utilizado, concentração protéica e reagentes necessários para o teste. Quando indicado, deve incluir as instruções adequadas para a reconstituição, mistura ou diluição, bem como o diluente a ser empregado.</p>
Apresentação	O reagente deverá ser apresentado em sua embalagem original, composto por estojo com, no mínimo, 11 frascos de vidro, contendo de 3,0 a 5,0 mL por frasco, com contagotas em vidro transparente, dispensando aproximadamente, 50,0 microlitros e ser acompanhado pela respectiva bula e embalagem conforme citado acima.
Validade	Validade mínima de 21 dias, à partir da data da entrega, ou de acordo com a programação do fabricante. Deve-se ainda adequar a validade à quantidade de estojos necessários, conforme previsão mensal. A empresa deve, obrigatoriamente, entregar a nova remessa até o dia anterior ao vencimento do lote em uso, sob pena de quebra do contrato.
Amostra	Deverá ser entregue conforme especificado em apresentação.
Parecer técnico	Sim
Registro no Ministério da Saúde	Sim

A avaliação da qualidade tem início com o teste de Inspeção visual no recebimento- que tem por propósito fundamental, analisar algumas características visuais e condições do reagente no momento do seu recebimento. Observamos aspectos como presença ou ausência de turvação, de hemólise, de partículas estranhas em suspensão, a temperatura de transporte e condições gerais básicas da amostra como rótulo legível, vazamentos e acondicionamento do frasco.

Numa segunda etapa, verificamos quais informações contidas no rótulo das embalagens interna (aquela que acondiciona o produto) e externas do mesmo (aquelas utilizadas para o acondicionamento da embalagem interna), analisando se as orientações requeridas na descrição do produto e no disposto pela ANVISA e no Código do Consumidor (1,2,3,4,5,6,20) estão presentes e de forma adequadamente expostas.

Em uma terceira etapa, verificamos qual o tipo de material transparente usado na confecção da embalagem interna, tipo de conta-gotas e volume médio dispensado gota a gota; matéria-prima do qual é feito o conta-gotas e a pera de aspiração e dispersão volumétrica.

Segundo regulamentação do FDA (Food and Drug Administration) (18) em parte dos rótulos afixados aos frascos de alguns reagentes imuno-hematológicos podem ser coloridos (tabela 1). No Brasil não há legislação a respeito até o momento. O objetivo de colorir parte do rótulo visa reduzir o risco de erro ao utilizar esses reagentes com conseqüentes falhas na interpretação de resultados.

Tabela 1. Reagentes imunohematológicos e coloração dos rótulos

Reagente imunohematológico	Coloração do rótulo
Anti-A	Azul
Anti-B	Amarelo
Reagentes para teste rápido em tubo	
Anti-C	Rosa
Anti-D	Cinza
Anti-E	Marron
Anti-CDE	Laranja
Anti-c	Lavanda
Anti-e	Verde

Na quarta etapa, analisamos o conteúdo informativo da bula, também observando se as orientações requeridas estão presentes e em língua portuguesa. Damos ênfase as seguintes características: nome do reagente, empresa que o produziu, temperatura de armazenamento, cuidados básicos para garantia da qualidade do produto descritas pela empresa que o produziu, uso específico do reagente (em tubo, em gel, em microplaca), natureza do reagente (monoclonal, policlonal, mistura de ambos, albuminoso, salino), metodologia do teste (volume de amostra e reagente, tempo e temperatura de incubação, força de centrifugação, reagentes adicionais necessários, análise dos resultados obtidos, causas de resultados falsos), concentração protéica do produto, tipo de conservante (para o caso de ser azida sódica, também se exige a indicação e os cuidados com o manuseio e desprezo do mesmo), se a frase informativa obrigatória para qualquer produto que não tenha finalidade de uso direto em humanos – *uso exclusivo "in vitro"* - está presente, temperatura e forma de armazenamento e data de fabricação. No caso de reagentes liofilizados, deve informar qual o volume e o diluente necessários para sua correta resuspensão e tempo de validade após reconstituição.

Na quinta etapa, são feitos testes de qualidade dos reagentes propriamente dito. Esses produtos devem ser testados nas técnicas para as quais foram aprovados para uso (tubo, gel, microplacas, lâminas e/ou sistemas automáticos) (21), demonstrando assim, que os resultados devem ser aqueles que possibilitem a clara identificação, tanto com soro não diluído, quanto com soro diluído; ao mesmo tempo que não haja testes falso-negativos e/ou falso-positivos (18).

Didaticamente, dividiremos os insumos utilizados em imuno-hematologia em três grupos, descritos a seguir:

1. Reagentes Imuno-hematológicos / soros identificadores de antígenos eritrocitários

Os soros identificadores de antígenos eritrocitários podem ser de natureza policlonal, monoclonal (MoAb) ou ainda, lectinas (22). Até algumas décadas atrás, os soros utilizados em imuno-hematologia eram basicamente de natureza policlonal. Entretanto, a partir da descrição da produção de anticorpos monoclonais em quantidade ilimitada por Kohler et al (23), os soros de origem MoAb tornaram-se cada vez mais facilmente disponíveis e, atualmente, os policlonais são raridade (24). Primeiramente, porque o uso *in vitro* de material MoAb evita, o então reduzido risco de transmissão de agentes infectantes. Posteriormente, porque a produção de reagentes policlonais muitas vezes implica na hiperimunização de indivíduos para a produção de anticorpos dirigidos contra antígenos eritrocitários (25). Outras vantagens já apontadas para os reagentes MoAb são: permite que raros anticorpos possam ser produzidos, utilizando-se células B imortais (26), quantidades ilimitadas de anticorpos podem ser produzidas; os reagentes, uma vez padronizados, não variam lote a lote quanto à reatividade e conteúdo de anticorpos (27); reações positivas indesejáveis decorrentes da presença de anticorpos contaminantes como anti-T, anti-Tn e outros, não ocorrem; e a contribuição ímpar para um maior conhecimento dos epítomos (a porção de um antígeno com a qual uma população única e específica de moléculas de anticorpos combina) dos antígenos eritrocitários (28,29,30,31).

Dentre as desvantagens dos reagentes MoAb, temos reações cruzadas, causadas pela especificidade do anticorpo dirigida contra epítomos presentes em diferentes antígenos eritrocitários (32,33), alguns MoAb são temperatura, pH e tempo de incubação dependentes e certos MoAb não podem ser empregados em testes de adsorção e eluição (34).

Quanto aos soros policlonais, deve-se lembrar que esses reagentes são produzidos a partir de um único indivíduo ou a partir de um *pool*, mas nem sempre essa informação acompanha o produto. Outro aspecto a ser considerado é que vários fabricantes podem produzir soro a partir de um mesmo indivíduo, aumentando o risco de uma interpretação errônea de um resultado (por exs.: confirmação de fenotipagem com soros de diferentes procedências pode, na realidade, ser o mesmo reagente).

A produção de reagentes MoAb anti-A, anti-B e anti-AB (35,36,37) foi conseguida logo após a publicação dos trabalhos de Kohler et al (23). Os reagentes para tipagem ABO assim produzidos tem as mesmas vantagens já apontadas (38); Lubenko e Redman em 1989 (39) já relatavam que certos soros anti-B monoclonais não aglutinavam hemácias A_1B_{fraco} e B_{fraco} podendo, nestes casos, levar a erro na classificação ABO, isto é, essas amostras poderiam ser incorretamente classificadas como A e O, respectivamente. Consente-se então, a extrema importância da informação na bula quanto ao clone (ou clones) utilizada para a produção desses reagentes (40). Os MoAb contra antígenos A e B tem outras desvantagens, como alguns MoAb anti-B que detectam antígenos B adquiridos detectáveis por outros soros monoclonais anti-B ou por reagentes anti-B policlonais. Neste caso, sugeriria-se, incorretamente, um fenótipo AB, com conseqüentes repercussões clínicas (reação hemolítica aguda) (41,42,43). Casos de fenótipo A(B) também já foram reportados (44).

Um dos problemas mais freqüentemente encontrados com o uso de soro anti-D monoclonal é a não aglutinação de amostras D-fraco (45). Recentemente, foi descrito que soros anti-D Moab podem ter sua afinidade aumentada com o uso de uma IgG anti-D, obtida a partir de um clone humano (43F10), produzido pela técnica de arrastamento de cadeias leves de IgG, seguida pela seleção por tecnologia

de apresentação do fago. Esta técnica permite o isolamento de variantes de grande afinidade pelo antígeno D, aumentando a potência de reagentes anti-D (46).

Atualmente são inúmeros os reagentes monoclonais disponíveis para uso em imuno-hematologia: anti-A, anti-B, anti-D, anti-Le^a, anti-Le^b, anti-M, anti-N, anti-C, anti-c, anti-E, anti-e, anti-Cw, anti-K, anti-k, anti-Kp^a, anti-Js^b, anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-S, anti-P₁ e anti-H, dentre outros (47, 48,49,50,51,52,53,54,55).

É imprescindível que os soros produzidos comercialmente sejam utilizados exatamente como o especificado pelo fabricante. Um reagente licenciado para uso pela técnica em tubo pode ser inadequado para uso em microplaca. Por exemplo, se não houver detalhamento quanto ao método para o qual o reagente foi licenciado, pode-se consultar a empresa fabricante, devendo a resposta ser formalizada por escrito e mantida no laboratório para controle documental.

Os reagentes para teste rápido em lâmina e em tubo geralmente são anticorpos incompletos potentes, ressuspensos em meio protéico, usados para potencializar a reação antígeno anticorpo. Alguns desses reagentes contêm albumina, devendo ser mantidos entre 2 e 8°C, mas nunca congelados. Falsos resultados podem ser observados em pacientes com teste de antiglobulina direto positivo (56). Daí o interesse da indústria em modificar quimicamente reagentes para aumentar a sensibilidade dos mesmos.

Os soros de classe IgG quimicamente modificados são produzidos através de redução por compostos sulfidrilas e estabilização por agentes alquilantes (p.ex.: iodoacetamida), permitindo a aglutinação de hemácias resuspensas em meio salino, não necessitando de substâncias potencializadoras. Isso, evita as reações falso-positivas nas amostras com teste de antiglobulina direto (TAD) positivo (57,58). Esses reagentes têm as mesmas indicações que os para teste rápido em lâmina ou em tubo. São mais caros que os reagentes para teste rápido em lâmina ou em tubo, mas podem ser usados em amostras TAD positivas. Existem relatos de que estes reagentes tem menor afinidade que os para teste rápido (34).

Existem ainda soros de classe IgG produzidos após purificação em colunas específicas para determinado anticorpo, que adsorvem e depois eluem o anticorpo. Torna-se vantajoso o uso desses reagentes, pois não há a necessidade de lavagem das hemácias após a etapa de incubação, uma vez que esse soro é virtualmente, livre de outras moléculas de IgG e de outras proteínas (34).

Os reagentes antiglobulina são utilizados em grande parte dos testes imuno-hematológicos podendo ser de origem policlonal e/ou monoclonal (59). Os reagentes poliespecíficos podem ter coloração esverdeada para facilitar a sua identificação. Ao realizar o controle de qualidade dos reagentes anti-IgG, a avaliação da sua potência é crítica (60), devendo-se ter o cuidado de selecionar amostras conhecidas com anticorpos anti-Duffy e anti-Kidd em diluições seriadas (34). Já para os reagentes anticomplementares, a avaliação da qualidade é mais complexa. Para avaliar atividade anti-C3, é recomendável o uso do teste em dois estágios com EDTA escolhendo-se amostras com anticorpos anti-Lewis, por serem na sua maioria, IgM e ligarem-se ao complemento (57).

As lectinas não são anticorpos, são extratos obtidos principalmente, a partir de sementes de plantas, que têm a capacidade de reagir com glóbulos vermelhos e por isso são aqui considerados (61). São proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que ligam-se a açúcares, podendo aglutinar e/ou precipitar glicoconjugados (62). Várias lectinas têm especificidade para antígenos eritrocitários conhecidos, outras aglutinam todos os glóbulos vermelhos (*Dolichos biflorus* - Anti A₁, -Tn e Cad; *Ulex europeus* - Anti-H e *Vicia graminea* - anti-N). Deve-se considerar que as lectinas reagem com açúcares simples, e dependem de sua configuração anomérica, da natureza e da posição do açúcar na porção terminal, dentre outros. Não são raras as reações cruzadas (%), entre lectinas e cada açúcar pode ser relacionado a várias lectinas (57). Essas peculiaridades devem ser levadas em consideração quando da avaliação desses reagentes.

Nos testes de controle de qualidade para avaliação da especificidade, reatividade e título dos soros identificadores de antígenos eritrocitários, soros antiglobulina humana e reagente para controle de Rh,

são utilizadas suspensões de hemácias com tipagem ABO/Rh conhecidas (tabela 2). Poderão ser utilizadas também, suspensões de hemácias comerciais, alíquotas de hemácias descongeladas.

O primeiro ensaio realizado é o que verifica a especificidade do anticorpo que constitui o produto. É feito adicionando-se ao tubo de ensaio devidamente identificado, partes iguais do soro e de uma suspensão de hemácias a % em solução salina (NaCl 0,9%), cujo fenótipo é negativo para o antígeno contra o qual se destina o reagente (p. ex.: suspensão de hemácias do grupo sanguíneo O rr para avaliação de soro anti-D). Outro ensaio feito é o da reatividade, no qual se observa qual a intensidade de reação ocorrida quando colocamos partes iguais de reagente e de suspensão de hemácias a 5,0% antígeno positivo em relação ao reagente testado em solução salina (NaCl 0,9%). A única exceção com relação à suspensão de hemácias a ser utilizada nos testes anteriormente descritos é na análise do soro anti-H lectina, onde a suspensão recomendada é de 10,0%.

O teste de titulação nos dá informações sobre a potência do produto. É expresso como a mais alta diluição recíproca de um anticorpo que resulta em aglutinação de intensidade 1+ (34). Este ensaio é realizado preparando-se uma bateria de 12 (doze) tubos de ensaio, previamente identificados. Nos tubos 1:2 a 1:2048 é colocado 100,0 µL de solução albuminosa a 6,0%. Posteriormente, nos tubos 1:1 e 1:2, adiciona-se 100,0 µL do reagente a ser testado. Após homogeneização cuidadosa realizada no tubo 1:2, aspira-se 100,0 µL desta mistura e transfere-se para o tubo seguinte (tubo 1:4). Faz-se nova homogeneização e repete-se o processo até o último tubo (1:2048). Deste último tubo, aspira-se 100,0 µL do homogeneizado e despreza-se, para manter a igualdade volumétrica entre todos os tubos do teste. A seguir, serão dispensados 50,0 µL de uma suspensão de hemácia a 5,0% (exceção para o soro anti-H Lectina, onde usa-se suspensão de hemácias em salina a 10,0%) para que se continue a pesquisa, de acordo com as referências de realização da técnica contidas na bula do produto. A leitura deve ser feita da mais alta diluição (1:2048) para a menor (1:1). O resultado deve ser expresso em números inteiros. Por exemplo: se um soro que apresenta titulação 1+ na diluição 1:32 e inferior a 1+ na titulação 1:64 o título desse soro é 32 e não 1:32 que é uma razão.

Pode ser atribuído aos testes de diluição, um escore que em cada intensidade de aglutinação expressa em cruces, corresponde a valor numérico (64). A leitura dos resultados de titulação expressos em escore permite também avaliar a avidéz de um reagente. É importante frisar que quando a pesquisa do título é feita com reagentes chamados "albuminosos", a suspensão de hemácias utilizada para a realização dos ensaios é feita em albumina bovina 22% com o intuito de não gerar modificações na concentração protéica do sistema (34). Durante a execução dos ensaios referidos, é ainda observada a aderência e a forma de desprendimento do "botão de hemácias" do fundo do tubo e a viscosidade do reagente. Caso nesta fase algo ocorra que inpeça a perfeita visualização do resultado, o reagente será aprovado. Na tabela 3 são apresentados os requisitos mínimos para a aprovação de reagentes imuno-hematológicos quanto à reatividade, título e escore (quando aplicável) para todos os reagentes testados.

Tabela 2. Hemácias utilizadas nos testes de Inspeção de Qualidade de soros identificadores de antígenos eritrocitários, soro antiglobulina humana e reagente controle de Rh. (Depto. De controle de Qualidade em Imunohematologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo)

Soros/ testes	Especificidade	Reatividade	Título
Anti-A monoclonal e policlonal	05 amostras O 05 amostras B	01 amostra A ₁ 01 amostra A ₂ 01 amostra A ₁ B 01 amostra A ₂ B	01 amostra A ₁ 01 amostra A ₂ 01 amostra A ₁ B 01 amostra A ₂ B
Anti-B monoclonal e policlonal	05 amostras O 05 amostras A	01 amostra B 01 amostra A ₁ B	01 amostra B 01 amostra A ₁ B
Anti-AB monoclonal e policlonal	10 amostras O	01 amostra A ₁ 01 amostra A ₂ 01 amostra A ₁ B 01 amostra B	01 amostra A ₁ 01 amostra A ₂ 01 amostra A ₁ B 01 amostra B
Anti-A ₁	01 amostra O 01 amostra A ₂	01 amostra A ₁	01 amostra A ₁
Anti-H	03 amostras A ₁ 03 amostras A ₂	03 amostras O	----
Anti-D monoclonal, anti-D policlonal, anti-D monoclonal + policlonal, de alta ou baixa concentração protéica	01 amostra O rr 01 amostra O r'r 01 amostra O r''r	01 amostra O R ₀ r 01 amostra O R ₁ r 01 amostra O R ₂ r	01 amostra O R ₀ r 01 amostra O R ₁ r 01 amostra O R ₂ r
Controle de Rh	01 amostra O R ₀ r 01 amostra O R ₁ r 01 amostra O R ₂ r	----	----
Anti-CDE	03 amostras rr	01 amostra O R ₁ r 01 amostra O R ₂ r 01 amostra O r'r 01 amostra O r''r	01 amostra O R ₁ r 01 amostra O R ₂ r 01 amostra O r'r 01 amostra O r''r
Anti-C monoclonal	01 amostra O rr 01 amostra O R ₂ r	01 amostra O R ₁ R ₁ 01 amostra O r'r	01 amostra O R ₁ R ₁ 01 amostra O r'r
Anti-c monoclonal	02 amostras O R ₁ R ₁	01 amostra O R ₁ r 01 amostra O rr	01 amostra O R ₁ r 01 amostra O rr
Anti-E monoclonal	01 amostra O rr 01 amostra O R ₁ r	01 amostra O R ₂ R ₂ 01 amostra O r''r	01 amostra R ₂ R ₂ 01 amostra r''r
Anti-e monoclonal	02 amostras O R ₂ R ₂	01 amostra O R ₂ r 01 amostra O rr	01 amostra O R ₂ r 01 amostra O rr

Soros/ testes	Especificidade	Reatividade	Título
Anti- C ^w	02 amostras C ^w -	01 amostra C ^w +	01 amostra C ^w +
Anti-Kell	01 amostra K-k+	01 amostra K+k+	01 amostra K+k+
Anti-k (cellano)	01 amostra K+k-	01 amostra K+k+	01 amostra K+k+
Anti-Kp ^a	01 amostra Kp (a-b+)	01 amostra Kp (a+b+)	---
Anti-Kp ^b	01 amostra Kp (a+b-)	01 amostra Kp (a+b+)	---
Anti-Js ^a	01 amostra Js (a-b+)	01 amostra Js (a+b+)	---
Anti-Js ^b	01 amostra Js (a+b-)	01 amostra Js (a+b+)	---
Anti-Fy ^a	01 amostra Fy (a-b+)	01 amostra Fy (a+b+)	01 amostra Fy(a+b+)
Anti-Fy ^b	01 amostra Fy (a+b-)	01 amostra Fy (a+b+)	---
Anti-Jk ^a	01 amostra Jk (a-b+)	01 amostra Jk (a+b+)	01 amostra Jk(a+b+)
Anti-JK ^b	01 amostra Jk (a+b-)	01 amostra Jk (a+b+)	---
Anti-Lu ^a	01 amostra Lu (a-b+)	01 amostra Lu (a+b+)	---
Anti-Lu ^b	01 amostra Lu (a+b-)	01 amostra Lu (a+b+)	---
Anti-Di ^a	01 amostra Di (a-b+)	01 amostra Di (a+b+)	---
Anti-Di ^b	01 amostra Di (a+b-)	01 amostra Di (a+b+)	---
Anti-Le ^a	01 amostra Le ^a -	01 amostra Le ^a +	---
Anti-Le ^b	01 amostra Le ^b -	01 amostra Le ^b +	---
Anti-M	01 amostra M-N+	01 amostra M+N+	01 amostra M+N+
Anti-N	01 amostra M+N-	01 amostra M+N+	---
Anti- S	01 amostra S-s+	01 amostra S+s+	01 amostra S+s+
Anti- s	01 amostra S+s-	01 amostra S+s+	01 amostra S+s+
Anti- P ₁	01 amostra P ₁ -	01 amostra P ₁ +	01 amostra P ₁ +
Anti-Tj ^a	01 amostra P ₁ -	01 amostra P ₁ +	01 amostra P ₁ +
Anti-I	01 amostra I-	01 amostra I+	01 amostra I+
Antiglobulina humana poli e mono específica	05 amostras com TAD negativo	01 amostra O (Dccee) sensibilizada por anti-D	01 amostra O (Dccee) sensibilizada por anti-D

Tabela 3. Requisitos mínimos esperados na inspeção de Qualidade dos soros identificadores de antígenos eritrocitários e soros antiglobulina humana (Depto. De controle de Qualidade em Imunohematologia da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo)

Soros/testes	Hemácias	Reatividade	Título	Escore
Anti-A monoclonal e policlonal	A ₁	3+	256	72
	A ₂	2+	128	60
	A ₁ B	3+	128	60
	A ₂ B	2+	64	52
Anti-B monoclonal e policlonal	B e A ₁ B	3+	256	72
Anti-AB monoclonal e policlonal	A ₁ , B, A ₁ B	3+	128	60
	A ₂	2+	128	128
Anti-A ₁ lectina	A ₁	3+	4	----
Anti-H lectina	O, A ₂	2+	----	----
	A ₁	neg. ou < 2+	----	----
Anti-D monoclonal, anti-D policlonal, anti-D monoclonal + policlonal, de alta ou baixa concentração protéica	R ₀ r, R ₁ r e R ₂ r	3+	32	----
Controle de Rh	R ₀ r, R ₁ r, R ₂ r e rr	Negativo	----	----
Anti-CDE	R ₁ r e R ₂ r	3+	32	----
	r'r	2+	16	----
	r''r	1+	8	----
Anti C monoclonal	R ₁ R ₁ e r'r	3+	16	----
Anti-c monoclonal	R ₁ r e rr	1+	4	----
Anti-E monoclonal	R ₂ R ₂ e r''r	3+	16	----
Anti-e monoclonal	R ₂ r e rr	1+	4	----
Anti- C ^w	C ^w -	1+	8	----
Anti-Kell	K+k+	1+	8	----
Anti-k (cellano)	K+k+	1+	8	----
Anti-Kp ^a	Kp(a+b+)	1+	1	----
Anti-Kp ^b	Kp(a+b+)	1+	1	----
Anti-Js ^a	Js(a+b+)	1+	1	----
Anti-Js ^b	Js(a+b+)	1+	1	----
Anti-Fy ^a	Fy(a+b+)	1+	8	----
Anti-Fy ^b	Fy(a+b+)	2+	1	----
Anti-Jk ^a	Jk(a+b+)	1+	8	----
Anti-JK ^b	Jk(a+b+)	1+	1	----
Anti-Lu ^a	Lu(a+b+)	1+	1	----
Anti-Lu ^b	Lu(a+b+)	1+	1	----
Anti-Di ^a	Di(a+b+)	1+	1	----
Anti-Di ^b	Di(a+b+)	1+	1	----
Anti-Le ^a	Le ^a +	2+	1	----
Anti-Le ^b	Le ^b +	2+	1	----
Anti- M	M+N+	1+	4	----
Anti-N	M+N+	2+	1	----
Anti- S	S+s+	1+	4	----
Anti- s	S+s+	1+	4	----
Anti- P ₁	P ₁ +	1+	4	----
Anti-Tj ^a	P ₁ +	1+	4	----
Anti-I	I+	1+	4	----
Antiglobulina humana monoesp. e poliespecífico	Dccee sensibilizadas por Anti-D	3+	128	----

2. Reagentes de glóbulos vermelhos

Os reagentes de glóbulos vermelhos utilizados em imuno-hematologia são aqueles indicados para a tipagem reversa ABO, para a pesquisa de anticorpos irregulares, para a identificação de anticorpos irregulares e hemácias sensibilizadas com IgG. Geralmente, os reagentes de glóbulos vermelhos são obtidos a partir de sangue total coletado em CPD ou ACD. Posteriormente, é lavado para remover anticorpos e outras proteínas plasmáticas e ressuspenso em uma solução de Alsever modificada - preservante, contendo aminoácidos, para preservar a integridade dos antígenos eritrocitários - inosina e ou adenina. Antibióticos, como cloranfenicol e/ou neomicina, podem ser usados para prevenir a contaminação bacteriana. Alguns fabricantes adicionam EDTA (ácido dietilenoaminoacético) à solução de Alsever, como anticoagulante. Entretanto, o EDTA tem atividade anti-complementar, devendo a suspensão de glóbulos vermelhos ser lavada com solução de cloreto de sódio a 0,9%, quando da realização da pesquisa e/ou titulação de hemolisinas. A validade de reagentes de glóbulos varia de 21 a 35 dias, devendo-se respeitar estritamente as recomendações do fabricante (65).

Para a tipagem ABO reversa, existem várias opções de reagentes de glóbulos vermelhos no mercado brasileiro: um conjunto de dois frascos, cada um contendo uma suspensão de hemácias humanas (A₁ e B) e um conjunto de três frascos, cada um contendo uma suspensão de glóbulos vermelhos A₂ presente neste conjunto, auxilia na detecção de subgrupos de A, apesar de não ser obrigatória (66). Recentemente foi publicado um artigo sobre o impacto da remoção de glóbulos vermelhos A₂ na interpretação da classificação ABO (67).

Existe ainda, a opção de se utilizar um kit com quatro suspensões de hemácias para tipagem ABO reversa (A₁, B, A₂ e O). A suspensão de hemácias de grupo sanguíneo O serve como controle para a tipagem reversa facilitando o reconhecimento de outros anticorpos que não o anti-A e o anti-B, além de fatores de agregação de hemácias que não dependentes de reação imunológica.

Para a pesquisa de anticorpos irregulares são empregados conjuntos que podem ser constituídos por dois, três ou quatro frascos de suspensões de glóbulos vermelhos humanos de grupo O, extensivamente fenotipados para antígenos de diferentes sistemas de grupos sanguíneos. O uso desse reagente tem por objetivo, detectar anticorpos produzidos contra antígenos eritrocitários que não anti-A e anti-B potencial e clinicamente significantes. No Brasil, devido à frequência de anti-Di^a é recomendável que pelo menos, uma suspensão de glóbulos seja Di(a+). Os conjuntos com três ou quatro suspensões de hemácias possuem certos antígenos com expressão homocigótica, permitindo a detecção de anticorpos fracos (ex.: anti-Jk^a, anti-Jk^b, anti-Fy^a, anti-Fy^b, etc.).

A identificação de anticorpos irregulares é obrigatória em pacientes receptores de sangue com resultado de pesquisa para anticorpos irregulares positiva (1). É realizada utilizando-se um painel de suspensão de glóbulos vermelhos de grupo sanguíneo O, fenotipados para os antígenos eritrocitários de diferentes sistemas de grupos sanguíneos e, pelo menos, uma suspensão Di(a+). É constituído por um número variável de frascos (de 11 a 20), podendo ainda ser previamente tratado com enzimas proteolíticas (papaína ou ficina) para agilizar a identificação de determinados anticorpos contra antígenos eritrocitários. As enzimas potencializam as reações para a identificação de anticorpos Rh, Kidd, Lewis, P e Vel e de crioglutininas de especificidade anti-I, anti-i e anti-HI. As hemácias tratadas com ficina ou papaína não reagem com a maioria das amostras de anti-Fy^a, anti-M, anti-N e anti-Pr positivas (68).

Com o objetivo de validação dos testes de Coombs direto e indireto, cujos resultados foram negativos, é utilizado outro reagente de glóbulos vermelhos, constituído por um frasco contendo suspensão de hemácias sensibilizadas por anticorpos IgG. A obtenção de uma reação positiva após a adição deste reagente, assegura que o procedimento foi adequadamente realizado, que o reagente de Coombs foi adicionado e que sua atividade anti-IgG está preservada.

A inspeção dos reagentes de glóbulos vermelhos é feita após repouso de, aproximadamente, 24 horas em refrigerador ou câmara fria com temperatura controlada, de acordo com as especificações do fabricante. Esse descanso permite que ocorra a precipitação e acomodação das hemácias apenas por

influência da força da gravidade, impedindo que, por meio de aceleração centrífuga, ocorram interferências que possam levar ao aumento da lise de células, alterando assim, o grau de hemólise observado. Também observamos se ocorreu o depósito de partículas estranhas sobre as hemácias precipitadas e a presença ou não dessas partículas em suspensão na fase superior do sistema heterogêneo. Considerando-se os levantamentos feitos em nossos arquivos por mais de cinco anos, que demonstraram não haver erro na identificação dos fenótipos (69), passamos a exigir laudos e/ou certificados de que esses testes de confirmação fenotípica foram realizados nos laboratórios de controle de qualidade dos produtores e que o diagrama que acompanha o produto passou por triagem, com conseqüente confirmação dos fenótipos nele indicados.

Outros reagentes correlatos

Fazem parte desse grupo, reagentes e correlatos rotineiramente utilizados em imuno-hematologia como a albumina bovina, a solução de baixa força iônica, o polietilenoglicol, os estojos para eluato, dentre outros.

A albumina bovina é o mais antigo reagente utilizado para a potencialização de reação antígeno-anticorpo (34). Para a análise desse reagente, são feitos testes com hemácias não sensibilizadas (teste de antiglobulina direto negativo), para verificar se o reagente promove hemaglutinação sem a presença de anticorpos específicos e conhecidos para as amostras escolhidas. O reagente não pode formar grumos, empilhamento de hemácias (hemácias em "rouleaux") ou promover hemólise. Existem inúmeros relatos de autoanticorpos que reagem somente na presença de albumina bovina (70), sendo necessário na análise de qualidade dessa substância potencializadora, cuidado especial para avaliar estas situações, que não são incomuns. Para tanto, albumina bovina a 22% é adicionada a cinco amostras de suspensão de hemácias não sensibilizadas.

O reagente de polietilenoglicol ou P.E.G. foi descrito por Nance e Garraty como potencializador de reações antígeno-anticorpo (71), sendo superior à albumina na identificação de anticorpos irregulares (72). A análise de qualidade das formulações com P.E.G. envolvem testes de reatividade e especificidade, sendo utilizadas seis diferentes suspensões de hemácias com os seguintes fenótipos utilizados para os ensaios de reatividade (E+e+), Fy(a+b+) e Le(a+b+) e especificidade (E-e+), Fy(a-b+) e Le(a-b+). Amostras selecionadas que contenham anticorpos anti-E, anti-Fy^a e anti-Le^b com título = 1 são testadas para verificar a intensidade de aglutinação das reações antígeno-anticorpo. Realizamos duas baterias de teste em paralelo. Em uma delas, adicionamos o P.E.G. e incubamos em temperatura e tempo recomendados pelo fabricante – geralmente, 15 minutos a 37,0°C. Na outra, repetimos todos os passos, mas sem acrescentar P.E.G.. Neste caso, a bateria será incubada a 37°C por 60 minutos. Os resultados esperados para sua aprovação resumem-se na não ocorrência de resultado falso positivo, falso negativo, formação de grumos, empilhamento de hemácias ("rouleaux") ou hemólise. Já no teste de reatividade, os resultados obtidos na bateria onde foi adicionado o P.E.G., devem obrigatoriamente, apresentar reações mais intensas do que as observadas na bateria onde não foi adicionado o P.E.G..

Os testes de eluato são indicados em várias situações como: na identificação soro com anticorpos de várias especificidades, na confirmação da presença de antígenos eritrocitários fracos, na confirmação da presença de antígenos eritrocitários fracos, na identificação de anticorpos envolvidos em doença hemolítica do recém-nascido, em reações hemolíticas transfusionais e na investigação de anticorpos em anemia hemolítica auto-imune. Os estojos para eluato comerciais devem permitir que as moléculas de anticorpos sejam dissociadas das hemácias e, ao mesmo tempo, preservar os antígenos eritrocitários (34). Para confirmação da atividade do estojo, usamos uma suspensão de hemácias conhecida com teste de antiglobulina direto positivo, devidamente preparada, de acordo com orientações contidas na bula e realizamos a técnica descrita pelo fabricante para técnica de eluição ácida. Se, com o uso do produto, for possível realizar a eluição, conservando as características do anticorpo e permitindo sua identificação, o produto é liberado para uso.

O difosfato de cloroquina também pode ser empregado nos testes de eluato. As análises feitas para aprovação da cloroquina são semelhantes às feitas para eluato por eluição ácida.

Para finalizar, pretendemos com esse artigo, apresentar a relevância do controle de qualidade em imuno-hematologia de forma clara e concisa, além de informações básicas sobre os reagentes mais frequentemente utilizados, esperando com isso, contribuir pra a melhoria da qualidade dos serviços hemoterápicos Brasileiros. Também é nosso desígnio, abrir a discussão sobre a necessidade de adequação e padronização de índices técnicos e ensaios mínimos para a realidade Brasileira, baseando-se na gritante diversidade racial e genética da população Brasileira.

Referências Bibliográficas

1. Brasil. Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993. www.anvisa.gov.br/sangue/legis/portarias.htm
2. Brasil. Portaria no. 2135 de 22 de dezembro de 1994. www.anvisa.gov.br/sangue/legis/portarias.htm
3. Brasil. Lei 10.205 de 21 de março de 2001. www.anvisa.gov.br/sangue/legis/leis.htm
4. Brasil. Portaria nº 262 de 5 de fevereiro de 2002. www.anvisa.gov.br/sangue/legis/portarias.htm
5. Brasil. Portaria 121, 24 de novembro de 1994. www.anvisa.gov.br/sangue/legis/portarias.htm
6. Brasil. Portaria 127, 08 de dezembro de 1995. www.anvisa.gov.br/sangue/legis/portarias.htm
7. Holburn AM, England, JM. The U.K. national external quality assessment scheme in blood group serology. Compatibility testing 1979-1980: trends and performance in relation to practice in antiglobulin testing. *Clin Lab Haematol.* 1982. 4(2):155-67.
8. Brasil. Sangue e Hemoderivados Meta Mobilizadora Nacional. www.anvisa.gov.br/sangue/meta/index.htm
9. Brasil. Sangue e Hemoderivados Meta Mobilizadora Nacional. www.anvisa.gov.br/sangue/meta/meta5.htm.
10. Koepke JA Thakur, K. Laboratory proficiency in blood banking: the variability of blood bank reagents for blood typing. *Vox Sang.* 1972. 22(3):222-8.
11. Grindon AJ, Eska PL. Error rate, precision, and accuracy in immunohematology. *Transfusion.* 1977. 17(50):425-30.
12. Morganti L, Bellis T, Andreoli MA, Zago-Novaretti, MCZ, Dorlhiac-Llacer, PE, Chamone, DAF. Quality control in blood group reagents: a Brazilian experience. *Vox Sang.* 1998, 74(s1):1634.
13. Novaretti MCZ, Morganti IL, Bellis TI, Andreoli, MA, , Dorlhiac-Llacer, PE, Chamone, DAF. Análise do controle de qualidade em reagentes imuno-hematológicos. *Rev. Bras. Hemat. Hemoter.* 1996. 18:390.
14. Novaretti MCZ, Morganti L, Bellis TI, Andreoli, MA, , Dorlhiac-Llacer, PE, Chamone, DAF. Análise do controle de qualidade em reagentes imuno-hematológicos. *Rev. Bras. Hemat. Hemoter.* 1996. 18:390.
15. Canada. Canadian General Standards Board. CGSB106.4-M86. 1976. 1-38p.
16. Frey-Wettstein M, Barandun S, Bucher U, Butler R, Metaxas M. *Diebluttransfusion ein Vademecum.* Karger, Munchen. 1986. 236pp.
17. Code of Federal Regulations. Food and Drugs Administration. Parts 600 to 799. US Government Printing Office. Washington, 1997. 101-111.
18. Code of Federal regulations. Additional Standards for diagnostic substances for laboratory. Food and Drugs Administration. Parts 600 to 799. US Government Printing Office. Washington. 2001. p.110-121.
19. Novaretti MCZ, Soares MAC, Silveira EJ, Dorlhiac-Llacer, PE, Chamone, DAF. Anti-Diego A in multiple transfused patients. *Rev. Paul. Med.* 1992.27(1):31.
20. Grinover AP. Código de Defesa do Consumidor 7ª edição. Forense Univ. 1062pp.
21. Morley G. Quality control with automated blood grouping equipment. *Med Lab Sci.* 1983.40(3):243-53.

22. Andreoli MA, Bellis T, Morganti L, Zago-Novaretti, MCZ, Dorlhiac-Llacer, PE, Chamone, DAF. Importância do controle de qualidade dos reagentes imuno-hematológicos anti-A, Anti-A e Anti-H na determinação dos subgrupos de A. *Boletim de Hematologia*, 1997, 249.
23. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975. 256(5517):495-7.
24. Beardsley T. Blood-typing reagents. Monoclonal product on UK market. *Nature*. 1983. 301(5897):187.
25. Siegel DL. Recombinant Monoclonal antibody technology. *Transf Clin Biol*. 2002. 9(1):15-22.
26. Voak D. Monoclonal Antibodies as blood grouping reagents. *Baillieres Clin Haematol* 1990. 3(2):219-42.
27. Voak D, Sacks S, Alderson T, Takei F, Lennox E, Jarvis J, Milstein C, Darnborough J. Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluation as a grouping reagent. *Vox Sang* 1980. 39(3):134-40.
28. Lomas C, Tippet P, Thompson KM, Melamed MD, Hughes-Jones N. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*. 1989. 57(4):261-4.
29. Lomas C, Grassman W, Ford D, Watt J, Gooch A, Jones J, Beolet Stern D, Wallace M, Tippet P. FPTT is a low incidence Rh antigen associated with a few partial Rh D phenotype, DFR. *Transfusion*. 1994. 34(7):612-6.
30. Lomas C, Mc Coll K, Tippet P. Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D. *Transfus Med*. 1993. 39(1):67-9.
31. Tipper P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang*. 1996. 70(3):123-31.
32. Steiner LA, Eisen HN. The relative affinity of antibodies synthesized in the second response. *J Exp Med*. 1967. 126(6):1185-205.
33. Fraser RH, Inglis G, Allan JC, Murphy MT, Ilan EK, Mackie A, Mitchell R. Murine monoclonal antibody with anti-e-like specificity: suitable for screening for e-negative cells. *Transfusion*. 1990. 30(3):226-9.
34. Issitt PD, Anstee DJ. *Applied blood group serology*. 4th ed. Montgomery Scientific Publications, Durham. USA. 1998. 1208pp.
35. Munro AC, Inglis G, Blue A, Sheridan R, Mitchell R. Mouse monoclonal anti-A and anti-B as routine blood grouping reagents: an evaluation. *Med Lab Sci*. 1982. 39(2):123-7.
36. Branstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Willian AF, Ziegler A. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocyte HLA and other human cells surface antigens-new tool for genetic analysis. *Cell*. 1978. 14(1):9-20.
37. Voak D, Lennox E, Sacks S, Milstein C, Darnborough J. Monoclonal anti-A and anti-B: development as cost-effective reagents. *Med Lab Sci*. 1982. 39(2):109-122.
38. Lubenko A. *Monoclonal Antibodies against Human Red Blood Cells and Related antigens*. Paris: Librairie Arnette, 1987, p.161.
39. Lubenko A, Redman M. Weak B antigens and heterogeneity of monoclonal anti-B reagents. *Vox Sang*. 1989.57(4):275.
40. Lubenko A, Redman M, Contreras M. ISBT Workshop on RBC monoclonal antibodies: report on g2 (anti-B, -AB) antibodies. *Rev. Franc. Transf. Immunohematol*. 1987. 30(5):303-13.

41. Beck ML, Kirkegaard J, Korth J, Judd WJ. Monoclonal anti-B reagents and the acquired B phenotype. *Transfusion*. 1993. 33(7):964.
42. Garraty G, Arndt P, Co A, Rodberg, K, Furmanski M. Fatal hemolytic reaction resulting from ABO mistyping of a patient with acquired B antigen detectable only by some monoclonal anti-B reagents. *Transfusion*. 1996. 36(4):351-7.
43. Epstein JS. Detection of acquired B antigen by monoclonal anti-B blood group reagents. *Transfusion*. 1997. 37(1):103-5.
44. Beck ML, Korth J, Kirkegaard J, Pierce S. Anomalous results of ABO blood grouping with monoclonal reagents. *Transfusion*. 1993. 33(7):624.
45. Lubenko A, Johnson A. Flow cytometric analysis of 68 monoclonal anti-D. *Transfus Clin Biol*. 1996. 3(6):415-7.
46. Proulx C, Boyer L, ST, Armour I, Bazin R, Lemieux R. Higher affinity human D moAb prepared by light-chain shuffling and selected by fage display. *Transfusion*. 2002. 42:59-65.
47. Scott ML, Voak D. Monoclonal antibodies to Rh D-development and uses. *Vox Sang*. 2000. 78 (supp 2):79-82.
48. Thompson K, Barden G, Sutherland J, Beldon I, Melamed M. Human monoclonal antibodies to C, c, E and G antigens of Rh system. *Immunology*. 1990. 71(3):323-7.
49. Rouger P, Noizat-Pirenne F, Le Penneç, PY. Avances dans l'utilisation des anticorps monoclonaux pour le test de groupe sanguin. *Transfus. Clin. Biol*. 1997. 4(4):345-9.
50. Messeter L, Brodin T, Chester MA, Karlsson KA, Zopf D, Lundblad A. Immunochemical characterization of monoclonal anti-Leb blood group reagent. *Vox Sang*. 1984. 46(2):66-74.
51. Sonneborn HH, Uthemann H, Munro AC, Bruce M, Fraser RH, Inglis G. Reactivity of monoclonal antibodies directed against blood group antigens M and N. *Dev. Biol. Stand*. 1984. 57:61-8.
52. Strobel E. Comparison of monoclonal and polyclonal anti-P1 reagents. *Clin Lab*. 2001. 47(5-6):249-55.
53. Nakajima T, Yazawa S, Miyzaki S, Furukawa K. Immunochemical characterization of anti-H monoclonal antibodies obtained from a mouse immunized with human saliva. *J. Immunol. Methods*. 1993. 159(1-2):261-7.
54. Rouger P, Tsikas G, Gane P, Oriol R, Salmon C. Immunological approach of anti-H (9), anti-Lewis (6), anti-P (3) and anti-Pr (1) monoclonal antibodies. *Rev. Transfus. Immunohematol*. 1987. 30(5):663-9.
55. Halverson GR, Chaudhuri A, Huang T, Yazdanbakhsh K, Reid MF. Immunisation of transgenic mice for production of MoAbs directed at polymorphic blood group antigens. *Transfusion*. 2001. 41(11):1393-6.
56. White WD, Issitt, CH, McGuire D. Evaluation of the use of albumin controls in Rh phenotyping. *Transfusion*. 1974. 14(1):67-71.
57. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Practice*. 10th ed. Blackwell Science. London. 1997. 754pp.
58. Romans P, Tilley CA, Crookston MC, Falk RE, Dorrington KJ. Conversion of incomplete antibodies to direct agglutination of by reduction; evidence for segmental flexibility within the Fc fragment of immunoglobulin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977. 74 (6):2531-5.
59. Food and Drug Administration. Revision to requirements for licensed Anti-globulin and Blood grouping reagents. HHS. Direct final Rule. *Fed Regist*. 2000. 12,65:77497-9.

60. Gardner B, Ghosh S, Brazier DM, Holburn AM. Quantitative quality control of antiglobulin reagents. *Clin. Lab. Haematol.* 1983. 5(2):215-9.
61. Bird GWG. Lectins in immunohematology. *Transfus. Med. Rev.* 1989. 3(1):55-62.
62. Blanchard D. Biochemical approaches to the detection and characterization of membrane proteins carrying blood group determinants. *Transfus. Clin. Biol.* 1995. 2(4):217-22.
63. Judd WJ. The role of lectins in blood group serology. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1980. 12(3):171-214.
64. Roy TCF, Nicholson GS, Ala FA. Blood grouping reagents. Preparation and application methods. WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean series. 1993. 5.p.87.
65. Zago MC, Prado SS, Oliveira VCP, Soares MAC, Dorlhiac-Llacer PE, DAF. Significado clínico de anti-A1 em soro de indivíduos A2;, A2B, A3e A3B. *Linha Direta.* 1991.(2):27.
66. Chiaroni J, Andreu G, Aznar R, Béolet M, Cherby C, Cornillot C. Impact de la suppression de hématies-test A² et du serum-test anti-A, -B on l'interprétation du groupage sanguine ABO. *Transfus. Clin. Biol.* 2001. 8(4):381-9.
67. Novaretti MCZ, Sayed MEA, Jens E, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Estudo comparativo de quatro diferentes métodos na identificação de anticorpos irregulares. *Rev. Bras. Hemat. Hemoter.* 1994. 16(165):304.
68. Novaretti MCZ, Morganti L, Andreoli MA, Bellis T, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Controle de qualidade de reagentes de glóbulos vermelhos para detecção e identificação de anticorpos irregulares: experiência da Fundação Poró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. *Boletim de hematologia.* 1997. 251.
69. Hossaini AA, Burkhart CR, Hooper GS. A further example of the non-immune auto-agglutinating property of serum. *Transfusion.* 1965. 5(5):461-4.
70. Nance S, Garraty G. A new potentiator of red blood cell antigen-antibody reactions. *Am. J. Clin. Pathol.* 1987. 87(5):633-5.
71. Novaretti MCZ, Jens E, Filho EC, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DAF. Comparison of tube and gel techniques for antibody identification. *Immunohematology.* 2000. 16(4):138-141.