

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.035 – Página 1/6	
Título do Documento	IMUNOLOGIA: COOMBS DIRETO E INDIRETO	Emissão: 09/10/2023	Próxima revisão: 09/10/2025
		Versão: 02	

1. OBJETIVO

- Descrever a técnica empregada na UACAP para a realização de coombs direto (CD) e indireto (CI).

2. MATERIAIS

- Amostra de sangue em tubo EDTA e soro;
- Centrífuga para amostras;
- Centrífuga para cartões (DG Spin);
- Incubadora de cartões (DG Therm);
- Leitora de cartões (DG Reader);
- Pipetas automáticas de 10µl, 25 µl, 50µl e 1ml;
- Ponteiras;
- Tubos de acrílico para suspensões;
- Cartão DG Gel Coombs;
- Solução de baixa força iônica (DG Gel Sol);
- Hemácias para investigação/identificação de anticorpos irregulares (Serascan Diana 1 e 2 e Serascan Diana Di^a).

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Os exames de CD e CI são realizados diariamente em duas rotinas, no período matutino após as 11:00 (todas as amostras que entraram após as 18:00 do dia anterior) e no período vespertino entre 16:00 e 17:00.

3.1. Coleta e processamento da amostra

1º Coletar a amostra de sangue em tubos com anticoagulante EDTA (tampa roxa), conforme protocolo de coleta de amostras (PRT.UACAP.002). O exame de coombs indireto pode ser realizado em amostra de soro (tampa amarela);

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.035 – Página 2/6	
Título do Documento	IMUNOLOGIA: COOMBS DIRETO E INDIRETO	Emissão: 09/10/2023	Próxima revisão: 09/10/2025
		Versão: 02	

2º Cadastrar o exame no sistema laboratorial e etiquetar a amostra (POP.UACAP.057-Cadastro de amostras);

3º Centrifugar o tubo de sangue com EDTA durante 5 minutos a 3400 rpm. Não devem ser utilizadas amostras hemolisadas, turvas ou com presença de coágulos. O tubo de soro deve ser centrifugado por 10 minutos;

4º Encaminhar a amostra junto da lista de pendência dos exames ao setor de imunologia (POP.UACAP.059 – Emissão de lista de pendência).

Observações:

- Quando o CD e CI são realizados na mesma amostra de hemograma é necessário confirmar no setor da hematologia se a amostra já foi processada e se tem resultado liberado antes de centrifugá-la.
- Amostras guardadas sob refrigeração (2-8 °C) podem ser utilizadas para o exame até 48 horas após a coleta.

3.2. Procedimento dos testes

3.2.1. Coombs direto

- 1º Deixar as amostras e os reagentes atingirem temperatura ambiente (18-25 °C);
- 2º Inspeccionar o estado dos cartões (não utilizar Cartões DG Gel Coombs que estejam com o lacre de alumínio danificado, que tenham sinais de ressecamento, bolhas de ar no gel, gotas de gel ou sobrenadante na parte superior do microtubo) e centrifugá-los por 9 minutos;
- 3º Identificar tubos de acrílico e os cartões a serem utilizados com o número do paciente;
- 4º Preparar a suspensão de hemácias a 1% (pipetar 1 ml de DG Gel Sol e 10 µl de concentrado de hemácias no tubo de suspensão) e homogeneizar;
- 5º Retirar com cuidado o lacre de alumínio do microtubo a ser utilizado, mantendo o cartão na posição vertical;
- 6º Pipetar 50 µl da suspensão de hemácias a 1% nos microtubos identificados;
- 7º Centrifugar o cartão DG gel Coombs por 9 minutos na centrífuga DG Spin;
- 8º Realizar a leitura.

3.2.1. Coombs Indireto

- 1º Deixar as amostras e os reagentes atingirem temperatura ambiente (18-25 °C);

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.035 – Página 3/6	
Título do Documento	IMUNOLOGIA: COOMBS DIRETO E INDIRETO	Emissão: 09/10/2023	Próxima revisão: 09/10/2025
		Versão: 02	

2º Inspeccionar o estado dos cartões (não utilizar Cartões DG Gel Coombs que estejam com o lacre de alumínio danificado, que tenham sinais de ressecamento, bolhas de ar no gel, gotas de gel ou sobrenadante na parte superior do microtubo) e centrifugá-los por 9 minutos;

3º Identificar três microtubos da placa DG Gel Coombs como 1, 2 e Di^a para cada paciente;

4º Homogeneizar os frascos de hemácias Serascan Diana 1, 2 e Di^a e dispensar nos microtubos identificados 50 µl (1 gota);

5º **OBS:** É importante SEMPRE pipetar as hemácias antes do soro ou plasma.

6º Adicionar 25 µl de soro ou plasma do paciente em cada microtubo;

7º Incubar a 37°C por 15 minutos;

8º Centrifugar durante 9 minutos na centrífuga DG Spin;

9º Realizar a leitura.

3.2.2.1. Titulação de Coombs Indireto

A titulação de anticorpos tem por finalidade a determinação do título de anticorpo em um determinado soro ou plasma e consiste em uma serie de diluições duplas colocadas em contato com hemácias portadoras do antígeno correspondente.

O título do paciente é representado pela maior diluição onde se obteve a reação de aglutinação 1+.

1º Deixar as amostras e os reagentes atingirem temperatura ambiente (18-25 °C);

2º Inspeccionar o estado dos cartões (não utilizar Cartões DG Gel Coombs que estejam com o lacre de alumínio danificado, que tenham sinais de ressecamento, bolhas de ar no gel, gotas de gel ou sobrenadante na parte superior do microtubo) e centrifugá-los por 9 minutos.

3º Realizar as diluições do soro ou plasma do paciente utilizando DG gel sol (100 µl de DG gel sol e 100 µl de soro/plasma ou amostra de diluição anterior): 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 e 1:2048;

4º Identificar um microtubos do cartão DG Gel Coombs para cada diluição (realizar o teste com as hemácias que deram positivas no teste Coombs Indireto);

5º Homogeneizar os frascos de hemácias Serascan Diana 1, 2 e Di^a e dispensar nos microtubos identificados 50 µl (1 gota);

6º Adicionar 25 µl de soro ou plasma correspondente a cada diluição, trocando a ponteira de um microtubo para o outro;


Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.035 – Página 4/6	
Título do Documento	IMUNOLOGIA: COOMBS DIRETO E INDIRETO	Emissão: 09/10/2023	Próxima revisão: 09/10/2025
		Versão: 02	

7º Incubar à 37°C por 15 minutos;

8º Centrifugar durante 9 minutos na centrífuga DG Spin;

9º Realizar a leitura manualmente ou por equipamento de leitura automatizada (DG Reader).

3.3. Leitura dos resultados automatizada (DG Reader)

1º. Clique no botão Criação Manual de Série  da janela Diana R, para selecionar um teste a ser lido. Os testes disponíveis serão exibidos na janela “Grelhas Definidas”.

2º. Selecionar o teste a ser lido (Coombs direto.pln ou Coombs Indireto.pln) e clicar no botão OK. Uma janela “Modificação de resultados” exibirá o cartão DG gel Coombs a ser lido;

3º. Encaixar o cartão no suporte de cartões com o código de barras virado para trás e a identificação do paciente para frente;

4º. Fechar o suporte de cartões deslizando-o para a esquerda;

5º. Na janela “Introduzir identificação da amostra”, que abrirá automaticamente após o fechamento do suporte de cartões, realizar a leitura do código de barras do paciente e clicar em OK.

3.4. Envio de Resultados da leitora automatizada (DG Reader)

1º. No software Diana O. Clicar no ícone de relatório “Resultados por amostra” .

2º. Selecionar o número de cadastro da amostra inicial e o da amostra final que você deseja enviar para o sistema (SIL);

3º. Selecionar o tipo de análise em “Grelha a utilizar” e clicar em OK;

4º. Abrirá uma janela com as fotos e leituras dos pacientes selecionados. Clicar em

“Enviar a Host”  e em seguida clicar em “Enviar a host”.

5º. Os resultados serão enviados para o sistema SIL.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.035 – Página 5/6	
Título do Documento	IMUNOLOGIA: COOMBS DIRETO E INDIRETO	Emissão: 09/10/2023	Próxima revisão: 09/10/2025
		Versão: 02	

3.5. Leitura manual dos resultados

Resultados são considerados positivos quando as células aglutinam formando uma linha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel e negativos quando formam um botão compacto de células no fundo do microtubo, de acordo com o Quadro 1.

Recomenda-se a leitura imediata dos resultados após a centrifugação dos cartões, se necessário a leitura pode ser realizada até 24 horas após o processamento, porém os cartões devem ser mantidos na posição vertical, refrigerados (2-8 °C) e vedados.

Quadro 1 – Interpretação de Resultados.

Negativo	-	Faixa de glóbulos vermelhos no fundo e na parte restante da coluna sem aglutinações visíveis.
Positivo	+/-	Escassas aglutinações de tamanho pequeno na metade inferior da coluna.
	1+	Algumas aglutinações de tamanho pequeno na coluna.
	2+	Aglutinações de tamanho pequeno ou mediano na extensão da coluna.
	3+	Faixa superior de aglutinações de tamanho médio na metade superior da coluna.
	4+	Faixa de glóbulos vermelhos aglutinados na parte superior da coluna.
DP (Dupla população)		Faixa dupla de glóbulos vermelhos, no fundo e na parte superior da coluna.

Fonte: GRIFOLS. Bula.

3.4. Limitações

- A presença de alguns medicamentos, soluções de dextrans, restos de gel de silicone do tubo de extração da amostra, podem induzir um resultado positivo no Coombs direto.
- Ao utilizar o plasma, não é possível detectar as reações hemolíticas dependentes do complemento.
- Restos de fibrina podem reter os glóbulos vermelhos não aglutinados, aparecendo uma capa rosada no alto do gel.
- A presença de elevadas concentrações de imunoglobulinas ou outras proteínas séricas na amostra pode neutralizar a antiglobulina humana polivalente inclusive após



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.035 – Página 6/6	
Título do Documento	IMUNOLOGIA: COOMBS DIRETO E INDIRETO	Emissão: 09/10/2023	Próxima revisão: 09/10/2025
		Versão: 02	

múltiplas lavagens.

3.5. Liberação dos resultados

Os resultados são inseridos no sistema de interfaceamento laboratorial e deverão ser liberados após conferência por profissional de nível superior habilitado.

4. REFERÊNCIAS

GRIFOLS. **Bula - Bula DG Gel Coombs**. Diagnostic Grifols S.A: Espanha.

GRIFOLS. **Guia rápido para utilização de DG gel® card**. Diagnostic Grifols S.A: Espanha.

GRIFOLS. **Guia rápido DG reader**. Diagnostic Grifols S.A: Espanha

5. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
01	01/07/2021	Elaboração do POP
02	28/09/2023	Revisão do POP

Elaboração Andressa Leite Ferraz de Melo Janaina Narcizo Rodrigues	Data: 01/07/2021
Revisão 2ª versão: Janaina Narcizo Rodrigues e Letícia Ayran Medina Yabunaka	Data:28/09/2023
Análise Viviane Regina Noro – Chefe da UACAP	Data: 28/09/2023
Validação Graciela Mendonça dos Santos Bet – Chefe do STGQ em exercício	Data: 05/10/2023
Aprovação: Tiago Amador Correia – Gerente de Atenção à Saúde	Data: 09/10/2023

Assinado eletronicamente no processo Sei nº 23529.014068/2023-17.

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que indicada a fonte.