

## PROVA CRUZADA – *CROSSMATCHING*

Sempre que se pretende realizar uma transfusão de sangue deve proceder-se no mínimo à tipificação do sangue do dador e receptor. Em cães previamente sensibilizados (gestações ou transfusões há mais de 4 dias), cães que sofreram uma reacção transfusional ou com história anterior desconhecida, deve realizar-se também o *crossmatching*, de forma a diminuir o risco de reacções. Nos restantes cães o *crossmatching* maior e menor é desnecessário, visto não existirem Ac's pré-formados, originando com certeza uma ausência de reacção Ac-Ag (aglutinação dos GV's). Contudo, sabe-se que uma transfusão de sangue incompatível diminui bastante o tempo de vida dos eritrócitos (de 21 dias para 4-6 dias), sendo, por isso, aconselhável a tipificação sanguínea do dador e receptor, mesmo na primeira transfusão. Os gatos apresentam sempre Ac's naturais, sendo imperativa a realização da prova cruzada em todos os casos. O *crossmatching* simula a resposta do receptor ao plasma e eritrócitos do dador. Caso não seja possível a sua realização, deve usar-se sangue de um dador universal. Nos gatos não existem dadores universais, podendo avaliar-se a probabilidade de ser A ou B através da raça.

O *crossmatching* é um teste importante na avaliação da incompatibilidade sanguínea; no entanto, apenas evidencia essa incompatibilidade no caso de já haver Ac's do receptor contra os Ag's presentes nos eritrócitos do dador, o que, em cães, apenas acontece após sensibilização prévia (Ac's do colostro ou transfusões anteriores). Desta forma, não substitui de forma alguma a tipificação sanguínea.

Na prova cruzada os componentes dos sangues do dador e receptor são misturados, de modo a verificar a ocorrência de aglutinação dos eritrócitos (formação de "grumos"), indicativa de incompatibilidade. A prova cruzada completa é realizada em duas etapas:

***Crossmatching* maior:** o receptor tem Ac's já formados contra os GV's?

Consiste em misturar uma pequena quantidade de sangue total ou suspensão de eritrócitos do sangue dador com uma pequena quantidade de soro do receptor. O resultado positivo é dado a partir da observação directa de grumos macroscópicos e/ou a aglutinação microscópica dos eritrócitos. Esta etapa é considerada a mais importante e deve ser realizada em transfusões com receptores previamente sensibilizados (gestações ou transfusões há mais de 4 dias), que sofreram uma reacção transfusional ou com história anterior

desconhecida; em gatos deve ser sempre realizada antes de qualquer transfusão.

**Crossmatching menor:** o dador tem Ac's já formados contra os GV's?

Consiste em misturar uma pequena quantidade de sangue total ou uma suspensão de eritrócitos do sangue do receptor com o soro do dador e, do mesmo modo, pesquisar a formação de "grumos" e/ou aglutinação dos eritrócitos.

É sempre necessário realizar esta prova em gatos (visto poder haver Ac's naturais), em transfusões com sangue de cães dadores que tenham Ac's pré-formados (transfusões ou gestações prévias) e sempre que é necessário transfundir grande quantidade de plasma.

Ao realizar a prova, deve evitar-se a hemólise durante a colheita e o anticoagulante (EDTA) deve estar em volume adequado para não diluir a amostra. Os laboratórios de referência realizam o teste completo em tubos à temperatura ambiente, a 37 °C e a 4 °C. Desta forma aconselhamos o mesmo procedimento sempre que possível. O sangue deve ser compatível a 37 °C (máxima actividade dos anticorpos anti-DEA 1.1. e anti-DEA 1.2).

De seguida, são apresentados 3 protocolos de realização do *crossmatching*.

## MÉTODO RÁPIDO

Se o tempo escaceia misture numa lâmina 1 gota de sangue do dador (em EDTA ou CPDA-1), 1 gota de soro do receptor e 2 gotas de soro fisiológico.

## TÉCNICA RÁPIDA EM TUBO DE ENSAIO

- 1) Coloque num tubo de ensaio 2 gotas de sangue do dador (em EDTA ou CPDA-1) e misture com 1 ml de soro fisiológico.
- 2) Adicione 2 gotas de soro do receptor e centrifugue o tubo a 750 rpm durante 15-30 segundos.
- 3) Agite levemente o tubo e coloque uma gota numa lâmina de microscopia.

## TÉCNICA EM LÂMINA DE MICROSCOPIA (método de eleição)

- 1) Coloque 0,5-1 ml de sangue do dador e do receptor em 2 tubos separados de EDTA e 1-2 ml de sangue do dador e do receptor em 2 tubos de vidro. Identifique os 4 tubos.

- 2) Centrifugue todos os tubos a 1000 rpm durante 5-10 minutos de modo a separar os eritrócitos do plasma ou soro; se não dispõe de centrífuga mantenha os tubos à temperatura ambiente durante 1- 6 h, separando os componentes por sedimentação. Aspire o soro dos tubos de vidro com pipetas (ou seringa e agulha de 18 G) e coloque-os em tubos separados. Elimine o plasma dos tubos de EDTA, ficando apenas com o concentrado de eritrócitos. Identifique os tubos.
- 3) Prepare uma suspensão de GV's do dador e do receptor, de modo a diminuir a formação de *rouleaux*: coloque num tubo de vidro 0,2 ml de concentrado de eritrócitos do dador e 4,8 ml de soro fisiológico; repita para o receptor. Este passo diminui também a aglutinação macroscópica, sendo opcional a sua realização.
- 4) Identifique 4 lâminas de microscopia:

**Controlo dador:** 1 gota de soro do dador e 1 gota da suspensão de GV's (SGV) do dador.

**Crossmatching maior:** 1 gota de soro do receptor e 1 gota SGV do dador.

**Crossmatching menor:** 1 gota de soro do dador e 1 gota de SGV do receptor

**Controlo receptor:** 1 gota de soro do receptor e 1 gota de SGV do receptor.

Se usarmos directamente o concentrado de eritrócitos sem realizar a suspensão, deveremos colocar 2 gotas soro em vez de 1 gota.

### **Interpretação dos resultados das três técnicas:**

Misture bem as gotas rodando gentilmente as lâminas: observe a formação de microagregados após 2 minutos; coloque uma lamela e, após 5 minutos, observe ao microscópio (objectivas de 40x a 100x):

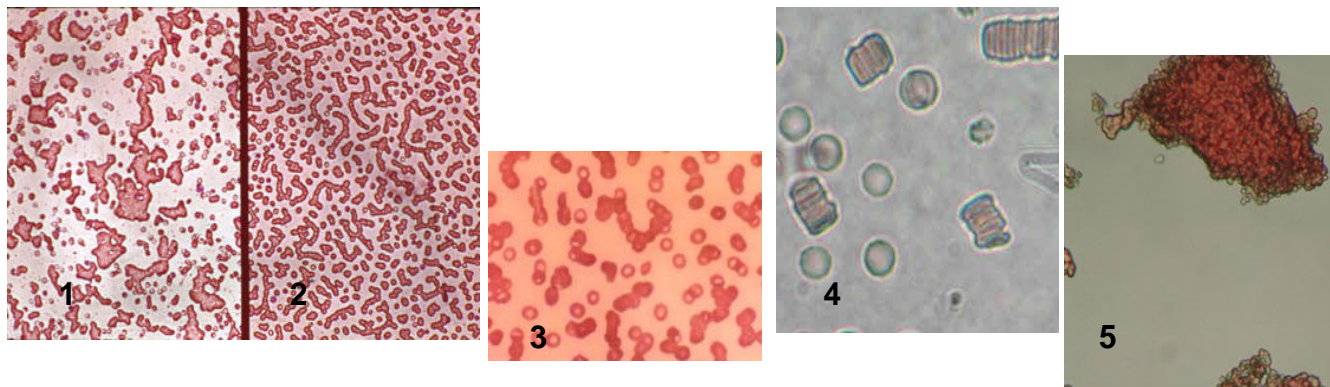
- **Aglutinação vs Rouleaux:**

É impossível a distinção macroscópica. Microscopicamente a aglutinação surge como agregados de células (em bago de uva), orientadas indistintamente e sobrepostas de uma forma desordenada. Os *rouleaux* surgem geralmente em pilhas de eritrócitos; os de maior tamanho mais dificilmente se distinguem da aglutinação. Nestes casos, deveremos estar atentos aos bordos destes agregados, tentando identificar imagens sugestivas de pilhas de eritrócitos.

Após 1-2 minutos em gatos e 2-3 minutos nos cães, à medida que a solução vai secando, começam a formar-se os *rouleaux* (maior intensidade nos bordos da lamela). Estes são meros artefactos,

enquanto que sinais de aglutinação indicam incompatibilidade sanguínea.

- Animais com **anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM)** originam um *cross-matching* maior e um controlo do receptor positivo. Nestes casos, o ideal é usar sangue de um “dador universal” – DEA 1.1 negativo.



Figuras 1 e 5: Aglutinação - reacção positiva.

Figuras 2, 3 e 4: Rouleaux - reacção negativa.