

**PEDRO
HENRIQUE
CANEZIN**

CRIMINALÍSTICA

PARA CONCURSOS

4ª edição

Revista, ampliada e
atualizada

2025

 **EDITORA**
*Jus*PODIVM
www.editorajuspodivm.com.br

direcionamento do sangue é impulsionado em volumes bastante relevantes em direção ao chão, o nome “queda livre” indica a saída de sangue de vasos calibrosos ao encontro do solo. É o caso, por exemplo, do acerto de uma artéria, a qual jorra sangue sobre o chão.

▪ **Manchas Alteradas**

Manchas alteradas são aquelas que sofreram uma ação secundária, modificando a configuração inicial do vestígio. Assim, as manchas alteradas por limpeza são resultado do deslizamento entre duas superfícies, provocando expansões significativas de sangue.

No caso das silhuetas, essas manchas ocorrem de acordo com o secar do sangue. Uma gota que vai secando aos poucos começa a sua secagem na porção cortical, o que estende para a porção mediana após alguns minutos. Essa região cortical permanece mais aderida que a porção central, de forma que a mancha forme uma silhueta caso haja um arrastamento posteriormente, com sobreposição de regiões.

▪ **Ausência de manchas**

Tão importante quanto interpretar manchas de sangue é conhecer sinais de que esse vestígio esteve no local, mas se modificou ou foi limpo. Diante disso, a doutrina aponta a **ÁREA DE SOMBRA**, que consiste em uma região localizada na circunvizinhança da mancha principal, onde deveria haver sangue. Ocorre, por exemplo, quando um objeto depositado no local é movido, deixando uma “sombra”.

De outro lado, há também situações de **SANGUE LATENTE**, isto é, invisível a olho nu, mas que pode ser detectado por metodologias mais sensíveis, como é o caso do luminol ou de testes imunocromatográficos.

HEMATOLOGIA FORENSE IDENTIFICADORA

▪ **Introdução**

Hoje, diversos autores sugerem métodos diferenciados na análise do sangue, talvez por existirem diferentes metodologias. No entanto, é certo que nos principais laboratórios forenses já existe uma padronização dos métodos de análise de sangue.

Para se realizar análise forense identificadora por meio de sangue, os métodos podem ser divididos da seguinte forma:



TESTES PRESUNTIVOS (OU IDENTIFICAÇÃO GENÉRICA)

▪ Teste de Luzes

Em se tratando do uso de luzes forenses para identificação de sangue, foi visto que a luz branca, quando em contraste com uma superfície clara, diferencia o sangue de modo satisfatório, a ponto de ser identificado a olho nu. De outro modo, um dos grandes problemas é a identificação de sangue quando ocorre em cenas de crime com manchas latentes ou em superfícies escuras. Dessa forma, desponta uma série de literaturas, dentre elas, o qual sugere a utilização das seguintes luzes forenses como método de triagem:

- Luz branca:** é utilizada sobre superfícies claras, em que há contraste entre a mancha de sangue (vermelha) e a superfície;
- Luz azul (455 nm):** a doutrina aponta a utilização da luz azul sobre superfícies claras, na expectativa de gerar um contraste opaco, enegrecido na mancha de sangue;
- Radiação infravermelha:** é utilizada sobre superfícies escuras, em que a tonalidade da mancha (formada por componentes orgânicos) fica mais escura do que o próprio tecido.

▪ Reveladores Cromogênicos

Exames presuntivos de sangue são geralmente catalíticos, envolvem o uso de agente oxidante, como o peróxido de hidrogênio $H_2O_{2(aq)}$ e um indicador que muda de cor (ou algum indicador luminescente) e que sinaliza a oxidação catalisada pela hemoglobina como se fosse uma enzima peroxidase. Esse comportamento de peroxidase da hemoglobina foi descoberto em 1863 pelo cientista alemão Schönbein. De lá para cá, inúmeros testes de presunção foram elaborados.

Do total de reagentes que existem, apenas um pequeno número tem interesse prático no campo da ciência forense. Os reagentes aqui discutidos serão:

reagente de Kastle-Meyer, reagente de Benzidina e tintura de guáiaço (reação de Van Deen).

O reagente de **Kastle-Meyer** é constituído por uma mistura de substâncias. Um exemplo de proporção seria 0,1 g de **fenolftaleína**, 2,0 g de hidróxido de sódio (sob a forma de pellet), 2,0 g de pó de zinco metálico e 10mL de água destilada.

Para realizar o procedimento de detecção, macera-se a mancha ou a crosta com 1 mL de água destilada ou hidróxido de sódio concentrado. Em seguida, seleciona-se duas gotas do macerado e, após colocá-las em um tubo de ensaio, misturam-se duas gotas do reagente. Por fim, adicionam-se à solução duas gotas de peróxido de hidrogênio a 5%. Se a amostra for de sangue, esta terá, necessariamente, hemoglobina, a qual possui a característica de decompor o peróxido de hidrogênio (comportamento de peroxidase) em água e oxigênio nascente. Então, este oxigênio promoverá a oxidação de Fenolftalina em Fenolftaleína (um indicador ácido-base), evidenciando ao perito que a amostra pode ser sangue. O teste pode ser feito também com *swab*.

O reagente de **Benzidina**, também conhecido como **Adler-Ascarelli**, é também uma mistura de substâncias. Uma proporção possível seria 0,16 g de benzidina cristalizada, 4 mL de ácido acético glacial e 4 mL de peróxido de hidrogênio de 3 a 5%. O procedimento consiste em macerar a mancha de sangue em 1mL de água destilada ou em ácido acético glacial. Após, separa-se duas gotas do macerado e adicionam-se, em um tubo de ensaio, duas gotas do reagente recentemente preparado.

Da mesma forma que o reagente de Kastle-Meyer, o reagente de benzidina se baseia na catálise da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e radical oxigênio pela hemoglobina presente no sangue. O oxigênio formado irá oxidar a benzidina, alterando sua estrutura, fenômeno que é perceptível, sob o ponto de vista experimental, com o aparecimento da coloração azul da solução.

⚡ ATENÇÃO!

Os laboratórios forenses atualmente têm uma predileção pelo teste de Kastle-Meyer, visto que a benzidina é tóxica!

A **REAÇÃO DE VAN DEEN** é um teste inespecífico para sangue, resultando positivo para líquidos orgânicos contendo metais como ferro, níquel ou cobre. Em um tubo de ensaio contendo sangue coloca-se uma gota de tintura de guáiaço a 10% e água oxigenada. O teste se positiva com a coloração azul.

▪ Reveladores Luminescentes

O Luminol é clássico nos seriados de investigação científica e também na vida real. O 5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinadiona, mais conhecido por luminol, é um composto que, sob determinadas condições, promove uma reação do tipo **QUIMIOLUMINESCENTE**.

Na cena de crime, nem sempre há evidências visíveis de sangue. Alguém poderia, por exemplo, limpar o local, a fim de encobrir o acontecido. No entanto, o luminol pode reagir com quantidades diminutas de sangue. Sua sensibilidade pode atingir a casa de milhões (1/1.000.000), a depender das circunstâncias do meio, mesmo em locais com azulejos, pisos cerâmicos ou de madeira, os quais tenham sido lavados.

A eficácia do produto é tão grande que é possível a detecção de sangue, mesmo que já tenham se passado anos da ocorrência do crime, de acordo com a literatura atual. As fórmulas utilizadas hoje não afetam potencialmente a cadeia de DNA, permitindo o reconhecimento dos criminosos ou das vítimas. No entanto, existem relatos de alterações de reações bioquímicas, principalmente enzimáticas e imunológicas que são influenciadas pela solução de luminol, notadamente os agentes oxidantes e o pH básico.

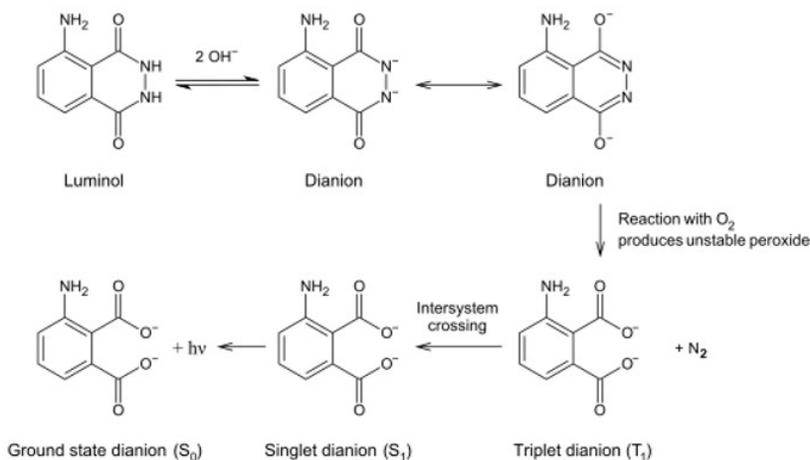
É importante citar que, quando presente no local de crime, as hemácias sanguíneas sofrem hemólise, o que acaba por liberar a hemoglobina, expondo-a ao oxigênio atmosférico. Diante disso, o Fe^{2+} se oxida a Fe^{3+} por ação do oxigênio atmosférico. Esse estado férrico é o que de fato executa a ação peroxilítica do peróxido de hidrogênio (ou de outro agente oxidante), transformando-o em oxigênio molecular e água.

Na reação do luminol, é comum o uso de bases fracas, na expectativa de se produzir um composto oxidado de ferro chamado de hematina. A hidroxila liberada por bases em tantos testes de identificação de sangue forma um complexo de hematina (hidróxido de protoporfirina férrica), o qual apresenta uma intensa atividade peroxilítica.

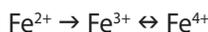
Quando da aplicação de luminol sobre supostas manchas de sangue em local de crime, são utilizados como reagentes um componente básico (funcionando como doador de elétrons), o peróxido de hidrogênio (ou outro agente oxidante, como perborato) e o luminol.

A reação de luminol com peróxido de hidrogênio necessita de um catalisador redox. Uma grande variedade de metais de transição pode ser usada para este fim. No caso do teste para a presença de sangue, este catalisador é o íon do elemento ferro oxidado que está presente nos grupos heme da hemoglobina. Quando em contato com o peróxido, o ferro catalisa o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Este oxigênio liberado oxida a molécula de luminol, resultando

em um peróxido orgânico tão instável, que rapidamente se decompõe em um ácido dicarboxílico aromático em um estado excitado. Ao regressar ao estado fundamental, este ácido libera um fóton cujo comprimento de onda é de aproximadamente 432 nm, o que é tipicamente reconhecido na reação do luminol.



Representação da reação de luminol, demonstrando a formação do diânion em meio básico, seguido para os estados excitados, com liberação de luz.



Existem várias formulações de luminol citadas pela doutrina, diferenciando-se basicamente os reagentes utilizados:

Fórmula de Grodsky (1951)	Fórmula de Weber
<ul style="list-style-type: none"> • Água destilada • Perborato de sódio • Carbonato de sódio • Luminol 	<ul style="list-style-type: none"> • Hidróxido de sódio (Solução A) • Peróxido de hidrogênio (Solução B) • Luminol (Solução C) • Água destilada

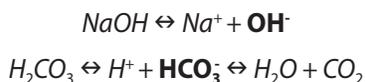
⚡ ATENÇÃO!

Luminol é uma substância irritante, não carcinogênica e que não afeta a análise molecular por PCR da amostra! Hoje o sistema BlueStar é utilizado no lugar do luminol por ser menos tóxico e mais sensível.

Na prática, a formulação mais comum hoje é a Grodsky, mas muitos centros criminalísticos trabalham com adaptações de formulação tendo em vista a expertise do perito. De acordo com a fórmula do autor, o carbonato de sódio serve como agente transformador do meio básico, a partir da seguinte reação:

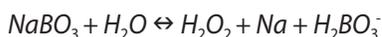


Note que a hidrólise do carbonato de sódio, um sal, forma-se um par ácido-base, neste caso, a base forte NaOH (hidróxido de sódio) e o ácido fraco H_2CO_3 (ácido carbônico). Em meio aquoso, há tendência de ocorrência das seguintes dissociações:



A partir do exposto, nota-se que a solução de carbonato de sódio apresenta íons OH^- e HCO_3^- , o que proporciona um meio básico. Para além disso, a literatura mais recente indica o envolvimento da hidroxila na reação de ativação do luminol, o que explica a sensibilidade da reação pelo pH.

Além do carbonato, outro agente envolvido na reação do luminol é o perborato de sódio (NaBO_3), o qual funciona como um agente oxidante. Veja a reação de hidrólise:



Veja que, além do íon borato formado, há também formação de peróxido de hidrogênio, o qual, em meio aquoso básico, forma radical oxigênio. Nesse caso, tanto o oxigênio quanto o íon borato liberados podem oxidar a molécula do luminol, causando a luminescência.

⚠ ATENÇÃO!

O perborato é um agente tóxico, com atividade irritante e que pode degradar o DNA quando em grandes quantidades.

TESTES CONFIRMATÓRIOS

Os testes confirmatórios são testes que confirmam a presença de sangue pela formação de cristais derivados do grupo heme ou de reações imunológicas com a hemoglobina. Exemplos desses testes são: microscopia, espectroscopia, teste de Teichmann e teste de Takayama.

▪ Microscopia

Quando uma mancha de sangue chega ao laboratório forense, ela é sujeita a testes muito sensíveis, porém pouco específicos, a fim de determinar se ela é de sangue ou não. A esse tipo de análise se dá o nome de teste de presunção.

Basicamente, a microscopia de um vestígio em que se suspeite ser sangue é realizada por meio de microscopia óptica (ou de luz), em que uma pequena porção de sangue (aproximadamente 50 μL) é depositada sobre a lâmina, com sobreposição de lamínula. Em seguida, observa-se:

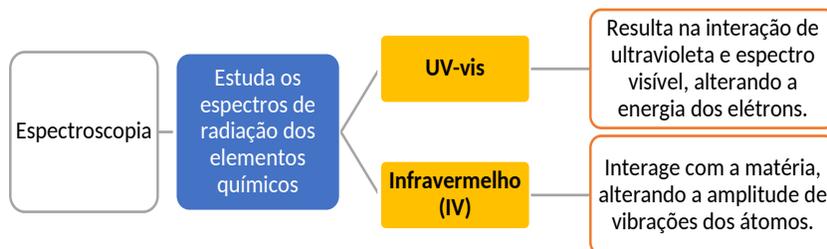
- Células anucleadas, com formato de disco bicôncavo ao centro, identificadas como hemácias;
- Células nucleadas, com núcleos de diversas morfologias (polimorfonucleados);
- Pequenos grânulos celulares de formato arredondado e anucleado (plaquetas).

Note que a observação de sangue por microscopia não garante que tal sangue é necessariamente de alguém, ou sequer que se trata de sangue humano. Por isso, a microscopia é apenas uma técnica sugestiva.

▪ Espectroscopia

As espectroscopias consistem em um conjunto de técnicas utilizadas para análise de substâncias, baseada na produção e interpretação de seus espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas. Como a radiação é classificada com base no espectro eletromagnético em que se situa, também são várias as técnicas espectroscópicas.

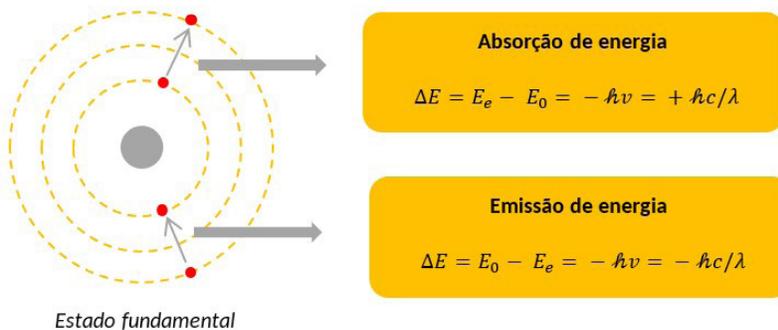
Assim, enquanto a espectroscopia de absorção UV-Vis usa a radiação na faixa do visível e ultravioleta do espectro como fundamento da técnica (que é capaz de interagir com os elétrons presentes nas camadas atômicas), a espectroscopia de infravermelho parte da prerrogativa da interação entre essa radiação e a vibração das ligações entre os átomos. Como consectário lógico, o uso de radiação UV-vis altera a energia dos elétrons, enquanto o IV altera a amplitude de vibrações.



As técnicas de espectroscopia vibracional vêm ganhando destaque nas investigações forenses, visto que fornecem informações mais detalhadas dos analitos, permitindo a sua identificação de forma inequívoca. De fato, as formas que os átomos vibram depende da sua massa, ligação e interações químicas, sendo elas influenciadas pelo meio em que se encontram. Dessa forma, o espectro vibracional de uma espécie química incorpora todos esses fatores, constituindo-se uma verdadeira impressão digital. Não é diferente do que acontece com o sangue. No âmbito da hematologia forense, a espectrofotometria e a espectroscopias de IV com Transformada de Fourier (FTIR) são as principais espectroscopias utilizadas.

Na espectrofotometria, a técnica se baseia na atenuação da radiação eletromagnética proveniente de uma fonte de luz pela absorção realizada por moléculas presentes em uma solução. Pela lei de Lambert-Beer (veremos adiante), essa atenuação é correlacionada à concentração da espécie química.

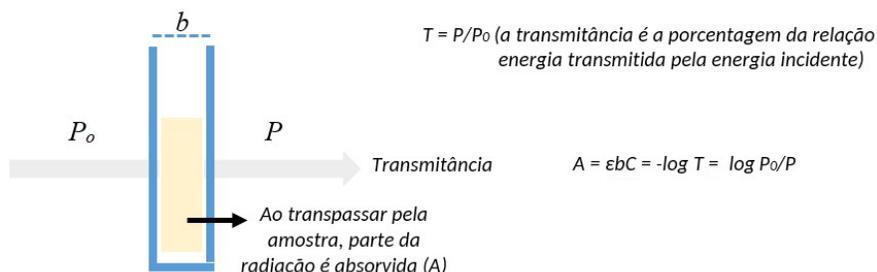
Previamente à aplicação de determinado tipo de estímulo, notadamente na região UV-Vis, o analito está estável, ou seja, no estado fundamental ou ainda em um estado de menor energia. Sendo assim, o estímulo faz com que ocorra uma transição para um estado de maior energia, chamado de estado excitado.



Havendo estimulação da amostra oriunda de uma fonte de radiação eletromagnética, pode-se observar vários fenômenos, como a reflexão ou o espalhamento da radiação. Parte dessa radiação, é importante frisar, pode ser absorvida, causando um estado excitado no analito. Sendo assim, na espectroscopia de absorção, o que se mede é a quantidade de fótons (ou luz) absorvida em função do comprimento de onda, o que deságua em informações relevantes no que diz respeito à amostra.

A lei de absorção, também conhecida como lei de Lambert-Beer ou somente como lei de Beer, afirma quantitativamente como a grandeza da atenuação depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho

sobre o qual ocorre a absorção. Conforme a luz atravessa uma solução contendo determinado analito (o qual absorve parte da radiação), há decréscimo entre a radiação emitida e a radiação transmitida, proporcionalmente à qualidade ou quantidade do analito. Em uma solução com quantidade certa de analito, quanto maior for a distância percorrida pela radiação dentro da solução com o analito, maior será a atenuação e maior a absorbância (A) da amostra. A figura a seguir esquematiza o princípio da absorção.



A partir da expressão da concentração (em mol/L) da solução e do tamanho do “caminho” transcorrido pela luz, há estabelecimento de uma constante de proporcionalidade chamada de “absortividade molar”, o qual tem como símbolo ϵ e costuma ser particular de cada solução. Assim, a absorbância, que é uma medida adimensional, pode ser representada pela multiplicação da absortividade molar, comprimento da cubeta (em centímetros) e concentração (em mol/L).

$$A = \epsilon b c$$

em que ϵ possui as unidades de $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Se de um lado, a espectroscopia de absorção utiliza como fonte de radiação a luz na faixa UV-Vis, na espectroscopia de IV, são utilizadas fontes de energia na região do infravermelho, as quais não são capazes de excitar elétrons em nível de camadas eletrônicas mais afastadas do núcleo, mas podem induzir uma vibração em átomos ligados covalentemente. As ligações covalentes nas moléculas não são rígidas, e possuem uma larga variedade de movimentos vibracionais, além dos movimentos rotacionais. Todas as moléculas orgânicas absorverão a radiação infravermelha, que corresponde em energia a estas vibrações.

A espectroscopia de IV é um recurso bastante importante na identificação de substâncias, visto que as vibrações entre os átomos ligantes acontecem de acordo com valores específicos de frequência características de grupamentos funcionais. Logo, grupamentos contendo $-CH_3$, $=CH_2$ (correspondentes respectivamente a aproximadamente 2.960 cm^{-1}), $=C=O$ (correspondentes a aproximadamente 1630 a 1820 cm^{-1}) entre outros grupos, apresentam vibrações em regiões características, o que possibilita a criação de um espectro de acordo com cada

estrutura dos analitos. A depender do tipo de molécula e do tipo de vibração que ela apresenta, é possível determinar tipos específicos de interação, tal qual será caracterizada em um espectrograma, como será mostrado adiante.

▪ **Teste de Teichmann**

O método de Teichmann permite confirmar a presença de sangue por meio da formação de cristais de **HEMINA** após uma reação de oxidação do Ferro presente na hemoglobina a partir do ácido acético e um sal (proveniente de um halogênio como cloreto de potássio).

O procedimento consiste em aplicar a solução de Bertrand na suposta mancha de sangue e aquecer até borbulhar a amostra. Logo após, observa-se a lâmina em microscópio para detecção dos cristais romboédricos (cloreto de ferriprotoporfirina) de hemina, o qual se apresentam na cor marrom.



Representação de cristais de Teichmann.

O teste de cristais de Teichmann é recomendado no caso de a amostra ser proveniente de um extrato concentrado da mancha ou crosta em análise.

▪ **Teste de Takayama**

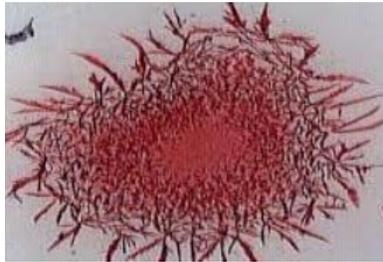
O método de Takayama permite confirmar a presença de sangue pela observação de cristais formados derivados do grupo heme. O teste de Takayama pode ser aplicado em fibras do tecido manchado ou em raspados de crosta.

O método usado para obter tais cristais consiste na preparação de uma solução saturada de **glicose e outra de hidróxido de sódio 10%**. Feita as duas soluções, o preparo da solução de trabalho deve ser feito no momento da análise, em que será usado 0,5ml da solução saturada de Glicose-D, 0,5ml de hidróxido de sódio a 10%, 0,5ml de **piridina** e 1ml de água destilada.

Com a solução de trabalho pronta, em uma lâmina é colocada uma pequena porção da fibra ou crosta suspeita de ser sangue e cobre-se com uma lamínula. Após colocar a solução de trabalho, o reagente deve emergir por capilaridade,

evitando assim o excesso e o aparecimento de bolhas, o que pode dificultar a visualização dos cristais de **HEMOCROMOGÊNIO**.

Com a lâmina pronta, leva-se ao aquecimento entre 70°C a 80°C por aproximadamente 30 segundos. Normalmente a reação provoca uma coloração rósea avermelhada. Nisso, avalia-se os cristais em microscópio. Os cristais apresentarão uma coloração rósea avermelhada, em formato de bastão de várias larguras ou em formato de pena, e agrupam-se em feixes. Ainda podem aparecer em forma de agulhas quando o teste é realizado em sangue decomposto.



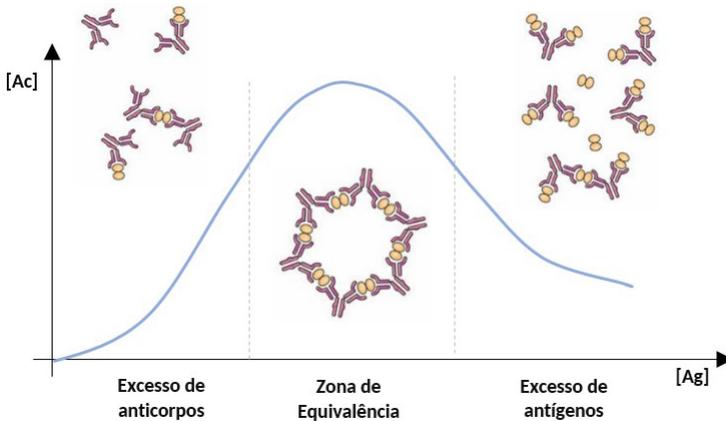
Representação de cristais de Takayama.

O teste de cristais de Takayama é recomendado no caso de a amostra ser proveniente de fibras de tecido ou raspado de crosta. Esse teste é muito sensível e pode ser feito inclusive em sangue envelhecido.

TESTES DE CONFIRMAÇÃO DE SANGUE DE ORIGEM HUMANA

Os testes de confirmação de sangue humano são testes que demandam alta especificidade e sensibilidade. Diante disso, os testes dessa natureza utilizam como princípio a reação imunológica antígeno-anticorpo. Na imunologia, é amplamente estudada a especificidade do sítio de ligação do anticorpo, mais precisamente a extremidade da fração anticorpo (F_{ab}), com a região epitópica do antígeno. Em linhas gerais, a região de interação entre o antígeno e o anticorpo apresenta conformação favorável, o que contribui com as interações intermoleculares entre essas regiões.

Para que ocorra a reação antígeno-anticorpo, com formação de complexos, o curso de interação exige uma concentração equivalente entre antígeno e anticorpo, o que viabiliza que a reação entre anticorpos específicos para sangue humano interaja com regiões específicas da hemoglobina humana, predispondo a formação do complexo. É importante frisar que, havendo excesso de antígenos na reação, não haverá a formação do imunocomplexo, efeito este conhecido como “gancho” ou “hook”. Por isso, em exames imunocromatográficos de sangue o que se recomenda é uma diluição entre 1:100 e 1:1000 para evitar um falso negativo.



Representação do gráfico de aumento de concentração de antígenos e anticorpos.

⚡ ATENÇÃO!

O efeito gancho (hook) acontece quando amostras com alta concentração de antígenos (como a hemoglobina) dão resultados falsos negativos. Isso pode ser resolvido por meio da diluição da amostra (1:100 a 1:1000).

▪ Teste de Coombs ou Antiglobulina Humana

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. 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 envolvidos na doença hemolítica do recém-nascido e do feto e na anemia hemolítica autoimune.

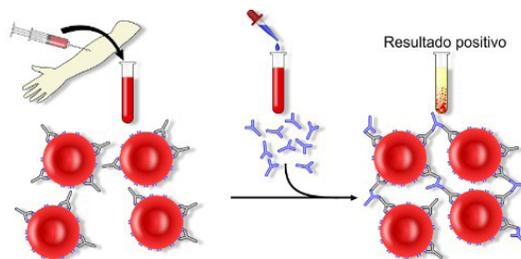
A IgM e a IgG são os anticorpos de maior importância clínica relacionados aos grupos sanguíneos. Anticorpos da classe IgM têm uma estrutura pentamérica e são capazes de aglutinar diretamente as hemácias em meio salino. Anticorpos da classe IgG sensibilizam as hemácias **SEM CAUSAR AGLUTINAÇÃO** eritrocitária, por isso anticorpos IgG são considerados "incompletos". 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.

O teste de antiglobulina, ao utilizar a anti-IgG, humana permite reconhecer a fração F_c do anticorpo fixado na membrana das hemácias sensibilizadas. Dessa forma, as duas porções F_{ab} dos heteroanticorpos contidos no soro AGH formam uma ligação entre os anticorpos humanos, resultando no fenômeno da aglutinação.

▪ Teste de Coombs Direto

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.

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.



Representação do Teste de Coombs direto
(Fonte: adaptado de Vizzon & Silva, 2015).

O teste da antiglobulina direto pode ser utilizado para detecção:

- **Doença hemolítica do recém-nascido e do feto:** Detecta hemácias fetais ou do recém-nascido sensibilizadas *in vivo* por anticorpos IgG provenientes da mãe.
- **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.
- **Anemia hemolítica autoimune (AHAI) e induzida por drogas:** Pacientes com anemia hemolítica autoimune por anticorpos quentes podem apresentar hemácias sensibilizadas por IgG e/ou componentes do complemento. É sabido ainda que certos fármacos como a metildopa podem desencadear reações positivas nos testes de TAD.

✦ ATENÇÃO!

Comumente anticorpos quentes são da classe IgG enquanto anticorpos frios são da classe IgM.

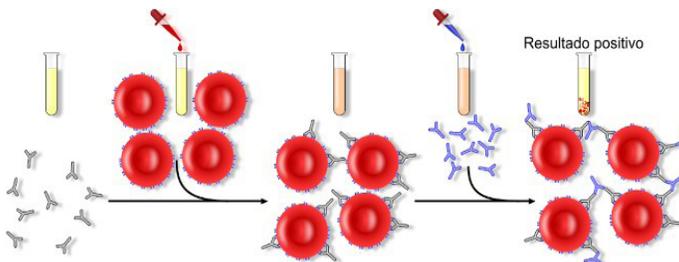
▪ Teste de Coombs Indireto

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 Rh 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. 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.

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:

- a) Temperatura ambiente (fase salina);
- b) Incubação a 37°C (fase térmica);
- c) 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.



Representação do Teste de Coombs indireto
(Fonte: adaptado de Vizzon & Silva, 2015).

O teste da antiglobulina indireto é frequentemente utilizado para:

- **Fenotipagem eritrocitária:** Para detectar antígenos eritrocitários em testes que interagem com anticorpos conhecidos do soro reagente,

por exemplo, anti-D para determinar D fraco, anti-Kell para determinar antígeno Kell, entre outros. Na fenotipagem de alguns antígenos eritrocitários, como 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.

- **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 negativo por apresentar grande possibilidade de desenvolver aloanticorpos.
- **Prova de compatibilidade ou prova cruzada:** Para detectar anticorpos presentes no soro ou plasma do receptor contra antígenos presentes nas hemácias do doador.
- **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. Esse teste é extremamente útil em gestantes e pacientes candidatos a transfusão de sangue com pesquisa de anticorpos positiva.

✦ ATENÇÃO!

No teste da antiglobulina humana, após a adição do soro antiglobulina humana, o tempo de incubação deve ser diferente, comparando-se amostras provenientes de manchas e macerados.

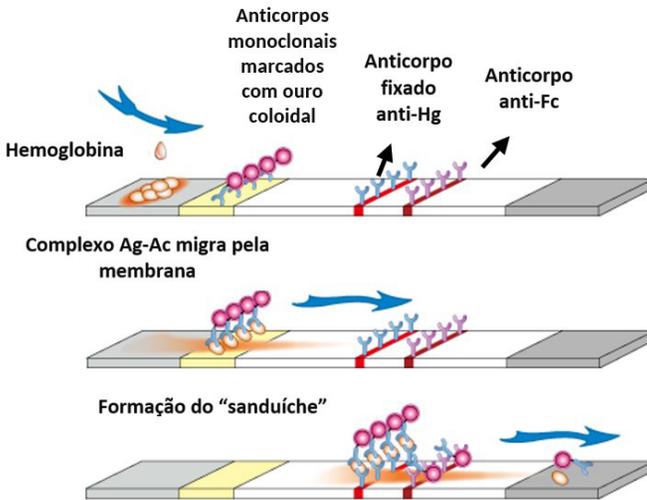
▪ **Imunocromatografia de hemoglobina humana**

A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeiro criada para o estudo das proteínas séricas. Atualmente pode ser utilizada para a detecção de doenças e de diversos compostos. A detecção de sangue humano também pode ser feita por essa técnica, de forma que se detecte especificamente regiões da hemoglobina humana.

Esse teste utiliza anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana conjugados com partículas de corante. O imunocomplexo formado (após a colocação da amostra no local adequado) migra através da membrana até a zona de reação, onde será capturado por um segundo anticorpo direcionado contra hemoglobina humana. A formação do "sanduíche" anticorpo-antígeno-anticorpo concentra as partículas de corante, formando uma linha azul, que indica a presença de hemoglobina humana na amostra.

Anticorpos anti-hemoglobina humana monoclonais móveis que não estiverem ligados ao antígeno migram pela membrana até a zona controle, onde serão imobilizados por anticorpos anti-IgG presentes, formando uma linha azul correspondente ao controle. Assim, se o resultado for positivo, aparecerão duas linhas; e, se for negativo, uma linha deve se formar na região correspondente ao controle. Um exemplo de uso hoje é o *HEXAGON OBTI human blood*. Sua execução é muito mais rápida e prática que o teste de inibição da antiglobulina humana. Além disso, não requer a manipulação dos reagentes, evitando contaminação da amostra.

Sendo assim, percebe-se que essa é uma técnica qualitativa de triagem, que apenas informa se o sangue é humano ou não. Na perícia, isso é importante para avaliação de locais de crime. Algumas vantagens são a economia, fácil interpretação e visualização a olho nu.



Teste imunocromatográfico com anticorpo monoclonal anti-hemoglobina humana (teste positivo).

⚡ ATENÇÃO!

Testes imunocromatográficos são mais sensíveis que o Teste de Coombs!

▪ Inibição da antiglobulina humana (Teste de Vacher-Sutton)

Para amplificar a sensibilidade do método de aglutinação na detecção de antígenos, a variante inibição da aglutinação indireta insere uma segunda etapa no ensaio. Dos exames sorológicos utilizados para verificação da presença de sangue humano, o mais utilizado e menos oneroso é o teste de inibição da