

Diagnóstico laboratorial da anemia hemolítica auto-imune: características do teste manual direto do Polybrene®

G.W. BRAGA, J.O. BORDIN, G. MOREIRA JR., A. KURODA

Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP.

RESUMO — O teste manual direto do *Polybrene*® (TDP) e o teste de Coombs direto (TCD) foram utilizados para a detecção de IgG na superfície de hemácias de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de anemia hemolítica auto-imune (AHAI).

OBJETIVO. Comparar a sensibilidade e especificidade do TPD e do TCD no diagnóstico da AHAÍ.

MÉTODO. Foram estudados 18 pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial de AHAÍ. Como indivíduos controles, foram testados 20 doadores de sangue assintomáticos e 20 pacientes com anemia falciforme.

RESULTADOS. O TCD foi positivo em 14 pacientes e negativo em quatro indivíduos, enquanto o TDP foi positivo em 17 pacientes e negativo em um indivíduo que apresentava TCD positivo devido a

fixação de complemento (C3d) nas hemácias. Todos os eluatos positivos realizados com a técnica de diclorometano revelaram anticorpos quentes com especificidade “anti-Rh”. A sensibilidade do TDP (94%) para detectar fixação de IgG *in vivo* foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a do TCD (78%), enquanto os dois testes apresentaram a mesma especificidade (100%).

CONCLUSÃO. O presente estudo permite concluir que, além de apresentar maior sensibilidade que o TCD, o TDP é um método rápido e de baixo custo, sendo, dessa forma, um teste auxiliar útil no diagnóstico de AHAÍ, especialmente nos pacientes com TCD negativo.

UNITERMOS: Anemia hemolítica auto-imune. Teste de Coombs direto. Teste manual direto do *Polybrene*®.

INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica auto-imune (AHAI) é caracterizada pela destruição precoce das hemácias devido à fixação de imunoglobulinas e/ou complemento na superfície da membrana eritrocitária. O teste de Coombs direto (TCD), método habitualmente utilizado no diagnóstico da AHAÍ, apresenta sensibilidade limitada, desde que é positivo apenas quando o número de moléculas de IgG por glóbulo vermelho (IgG/GV) é superior a 200¹.

A detecção de auto-anticorpos eritrocitários pode ser determinada por técnicas mais sensíveis que o TCD. Pode-se utilizar teste relacionado ao consumo de anticorpo que fixa complemento², teste de formação de rosetas³, teste por radioimunoensaio⁴ e teste imunoenzimático⁵. Recentemente, a citometria de fluxo também tem sido empregada com essa finalidade⁶.

Devido a complexidade de realização e ao elevado custo dos testes mencionados, alternativamente, neste estudo avaliou-se o comportamento do método manual direto de brometo de hexadimetrina (*Polybrene*®) (TDP) em 18 pacientes com diagnóstico clínico de AHAÍ⁷.

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes

Foram estudados 18 pacientes com diagnóstico de AHAÍ acompanhados pela Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina. Todos os indivíduos estudados eram caucasóides, sendo quatro (22,2%) do sexo masculino e 14 (77,8%) do feminino, com idade variando de 15 a 70 anos (média de 40,3 anos). Foram realizados exames complementares para pesquisa de doença primária em todos os pacientes. Com isso, observaram 14 pacientes com AHAÍ primária e quatro indivíduos com AHAÍ secundária a outras doenças, sendo um com lúpus eritematoso sistêmico, um com síndrome de Sjögren, um com síndrome de Evans e um com linfoma não-Hodgkin.

Para controle negativo do método, o TDP também foi aplicado em 40 indivíduos sem evidência clínica de AHAÍ, sendo 20 doadores de sangue assintomáticos e 20 pacientes com anemia hemolítica hereditária (anemia falciforme, HbSS).

Testes

As amostras de sangue para estudo foram coleta-

Tabela 1 — Parâmetros clínicos e hematológicos de 18 pacientes com anemia hemolítica auto-imune

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico	HB g/dL	RET (%)	TCD IgG	TCD C3	TPD	Tratamento
AAO	15	F	AHAI	8,4	30,8	Neg	Neg	Pos	Prednisona
AGSV	27	F	AHAI	7,3	25,0	Neg	Neg	Pos	Esplenectomia
AMP	16	F	AHAI	7,7	12,5	Pos	Pos	Pos	Prednisona
AC	20	F	AHAI	7,9	12,6	Neg	Pos	Neg	Prednisona
BD	59	F	AHAI	3,8	11,0	Pos	Neg	Pos	Prednisona
CPR	70	F	AHAI	5,1	36,0	Pos	Neg	Pos	Prednisona + Esplenectomia
CQ	21	F	AHAI	7,4	22,5	Neg	Neg	Pos	Prednisona
EF	45	M	AHAI	10,1	3,5	Pos	Pos	Pos	Prednisona
JAO	70	M	AHAI	11,0	8,0	Pos	Neg	Pos	Prednisona
LBL	25	F	AHAI	9,0	7,2	Pos	Neg	Pos	Prednisona
MJS	58	F	AHAI	8,5	9,4	Pos	Neg	Pos	Prednisona
MGF	48	F	LES	6,4	34,0	Pos	Neg	Pos	Prednisona
MU	59	F	Sjögren	4,3	31,0	Pos	Pos	Pos	Prednisona
PJS	56	M	LNH	7,0	18,6	Neg	Neg	Pos	Prednisona + Clorambucil
RLSM	29	F	AHAI	7,5	18,0	Pos	Pos	Pos	Prednisona
SSP	47	F	AHAI	10,2	3,8	Pos	Neg	Pos	Prednisona
SRV	26	F	Evans	12,7	10,0	Pos	Pos	Pos	Prednisona
WMRF	35	M	AHAI	9,6	8,6	Pos	Pos	Pos	Prednisona

HB = hemoglobina; Ret = reticulócitos; TCD = teste de Coombs direto; TPD = teste manual direto do *Polybrene*®; LES = lúpus eritematoso sistêmico; Sjögren, = síndrome de Sjögren; Evans = síndrome de Evans; LNH = linfoma não-Hodgkin.

das em tubo contendo etilenodiaminotetraacetato de sódio (EDTA) sem anticoagulante. As suspensões de hemácias a 5%, preparadas com solução salina (NaCl a 0,9%), foram analisadas no dia da coleta, assim como as reações imuno-hematológicas utilizando soro. Antes dos testes, as hemácias foram lavadas seis vezes com solução salina.

Todos os pacientes foram tipados para o sistema sanguíneo ABO, para o antígeno D (Rh₀) do sistema Rh e, quando necessário, para outros antígenos eritrocitários.

O TCD foi realizado mediante técnica convencional, utilizando-se soro poliespecífico e soros mono-específicos anti-IgG e anti-C3b, 3d⁸. No estudo, o TCD foi titulado até que a reação se tornasse negativa microscopicamente e, a partir dos resultados da titulação, calculou-se o escore do TCD¹.

O eluato foi preparado pela técnica de diclorometano (DCM)⁹. Para isso, as hemácias foram lavadas, adicionadas a igual volume de salina, e a ambos foi adicionado igual volume de DCM. O tubo foi agitado, centrifugado e, após retirada do DCM, aquecido a 56°C por dez minutos. A seguir, centrifugou-se o tubo em caçapa aquecida e a camada superior (eluato) foi imediatamente transferida para um tubo limpo. Os eluatos foram testados contra um painel de hemácias do tipo O previamente fenotipadas para antígenos de outros sistemas sanguíneos, incluindo células do cordão umbilical.

Realizou-se o TDP, segundo a técnica descrita por Lalezari & Jiang¹⁰, em cinco fases: 1) as hemácias do paciente foram incubadas com soro autólogo em meio de baixa força iônica para facilitar a ligação

do anticorpo à superfície celular; 2) adicionou-se o *Polybrene*®, polication que promove agregação inespecífica das hemácias; 3) a seguir, foi adicionada solução de citrato de sódio, que dispersa a agregação inespecífica das hemácias não sensibilizadas, mas que não desfaz a aglutinação mediada por anticorpos que ocorreu durante a aproximação celular; 4) leitura macroscópica e microscópica da reação para pesquisa de aglutinados específicos secundários à reação antígeno-anticorpo; 5) nos casos de TDP microscopicamente negativos, complementou-se o teste com soro de Coombs anti-IgG¹⁰⁻¹².

Para as reações de aglutinação foram utilizados tubos de vidro de 120 x 75mm com uma proporção de dois volumes de soro ou eluato para um volume de suspensão de hemácias a 5%. Após a adição das células ao soro, a mistura foi centrifugada a 1.200 rotações por minuto (rpm), durante um minuto, e a leitura macroscópica feita por meio de delicada agitação do tubo. Os resultados negativos foram confirmados por leitura microscópica em aumento de 400 vezes. Para lavagem de células ou misturas células/soro, centrifugou-se o material a 2.400rpm durante dois minutos.

Todas as reações de aglutinação de hemácias realizadas nesse estudo, verificadas macroscopicamente e microscopicamente, foram quantificadas por meio de sistema numérico descrito por Marsh¹³.

RESULTADOS

Os resultados clínicos e hematológicos dos indivíduos estudados estão relacionados na tabela 1.

Tabela 2 — Resultados de testes imuno-hematológicos de 18 pacientes com anemia hemolítica auto-imune

Paciente	TCD IgG	TCD IgG Título	TCD C3d	TPD	DCM
AAO	Neg	0	Neg	Pos	Pos
AGSV	Neg	0	Neg	Pos	NR
AMP	Pos	1/32	Pos	Pos	NR
AC	Neg	0	Pos	Neg	Neg
BD	Pos	1/32	Neg	Pos	Pos
CPR	Pos	1/64	Neg	Pos	Pos
CQ	Neg	0	Neg	Pos	Pos
EF	Pos	1/64	Pos	Pos	Pos
JAO	Pos	1/32	Neg	Pos	Pos
LBL	Pos	1/32	Neg	Pos	Pos
MJS	Pos	1/64	Neg	Pos	Pos
MGF	Pos	1/32	Pos	Pos	Pos
MU	Pos	1/1	Pos	Pos	NR
PJS	Neg	0	Neg	Pos	Pos
RLSM	Pos	1/256	Pos	Pos	Pos
SSP	Pos	1/256	Pos	Pos	Pos
SRV	Pos	1/4	Pos	Pos	Pos
WMRF	Pos	1/1	Pos	Pos	Pos

TCDIgG = teste de Coombs direto com soro anti-IgG; TCD C3d = teste de Coombs direto com soro anti-C3b, C3d; TPD = teste manual direto do *Polybrene*[®]; DCM = eluato com diclorometano.

Tabela 3 — Resultados do teste de Coombs direto (TCD) e teste manual direto do *Polybrene*[®] (TDP) aplicados em pacientes com anemia hemolítica auto-imune (AHAI), anemia falciforme (HbSS), e doadores voluntários de sangue

Grupo (N)	TCD+	TCD-	TPD+	TPD-
AHAI (18)	14 (77,8%)	4 (22,2%)	17 (94,4%)	1 (5,6%)
HbSS (20)	0	20 (100%)	0	20 (100%)
Doadores de sangue (20)	0	20 (100%)	0	20 (100%)

Dos 18 pacientes avaliados, 14 (77,8%) apresentaram TCD positivo e quatro (22,2%), TCD negativo. Dos indivíduos com TCD positivo, em seis (42,9%) as hemácias foram aglutinadas com anti-IgG e anti-C3, em sete (50,0%) somente com anti-IgG, e em um (7,1%), apenas com anti-C3. Somente dois pacientes apresentaram reação de fraca intensidade com padrão microscópico, enquanto, em 12 indivíduos, as reações foram positivas macroscopicamente.

O eluato com DCM foi realizado em 15 pacientes, sendo positivo em 14 (93,3%), até mesmo naqueles com TCD negativo, e negativo com as hemácias do indivíduo que apresentava TCD positivo somente com anti-C3. Em todos os casos, a análise imuno-hematológica com os eluatos revelou anticorpos ativos a 37°C em fase de Coombs (anticorpos quentes) que reagiram com todas as células testadas do painel, com padrão de especificidade tipo “anti-

Rh”, isto é, anticorpos supostamente dirigidos contra o antígeno precursor do sistema Rh.

O TDP foi positivo em 17 (94,4%) indivíduos, incluindo os quatro pacientes com TCD negativo, porém foi negativo no paciente que apresentava TCD positivo somente com anti-C3. Mesmo nas reações de menor intensidade, o padrão de aglutinação do TDP foi sempre macroscópico, até mesmo nos indivíduos com TCD negativo ou positivo fraco. Os resultados imuno-hematológicos dos pacientes com AHAI estão resumidos na tabela 2.

A análise laboratorial dos doadores de sangue e pacientes com anemia falciforme, sem evidência clínica de AHAI, revelou TCD e TDP negativos em todos os casos. A tabela 3 resume os resultados do TCD e TDP aplicados em todos os indivíduos estudados.

A sensibilidade do TDP (94%) para o diagnóstico de AHAI, nos 18 pacientes estudados, foi significativamente ($p < 0,05$) maior que a do TCD (78%), enquanto os dois testes apresentaram a mesma especificidade (100%), não sendo observado nenhum resultado falso positivo com os eritrócitos dos indivíduos do grupo controle sem AHAI.

DISCUSSÃO

Todos os eritrócitos possuem certa quantidade de IgG ligada à sua superfície. Habitualmente, indivíduos normais possuem menos de 50 moléculas de IgG por glóbulo vermelho, enquanto, geralmente, as hemácias de pacientes com AHAI estão recobertas com grande quantidade de IgG¹⁴. Além disso, alguns autores postulam que, durante o processo de envelhecimento das hemácias, ocorre um aumento do número de moléculas de IgG/GV, o que favorece o reconhecimento e fagocitose celular pelos macrófagos¹⁵.

O teste de Coombs direto tem sido empregado para demonstrar a sensibilização de hemácias *in vivo* auxiliando o diagnóstico de AHAI, de doença hemolítica do recém-nascido (DHRN), e a investigação de reações transfusionais. O soro de Coombs poliespecífico contém, obrigatoriamente, anticorpos com atividade anti-IgG e anti-C3d, podendo conter, também, atividade anti-C4, anti-IgM e anti-IgA. Embora seja conveniente realizar, inicialmente, o TCD com soro poliespecífico, é necessário que, nos testes positivos, a investigação laboratorial prossiga com reagentes monoespecíficos¹.

A técnica manual do *Polybrene*[®] foi descrita, em 1980, por Lalezari & Jiang para detecção de aloanticorpos eritrocitários¹⁰. Diversos estudos confirmaram a utilidade do método como substituto do teste em salina e ao uso de enzimas em protocolos de investigação sorológica de aloanticorpos^{16,17}.

Além disso, proporciona melhores resultados que a prova cruzada rápida em indivíduos sensibilizados, detectando anticorpos não diagnosticados por outros métodos, especialmente quando relacionados ao sistema Rh¹⁸.

O *Polybrene*® é um polication que promove agregação lábil de hemácias, que, normalmente, é desfeita pela ação do citrato de sódio. O princípio do teste direto fundamenta-se na observação de que, quando existe sensibilização das hemácias por IgG, sua aproximação favorece a aglutinação, e o agregado não se desfaz após o tratamento com citrato de sódio. A leitura macroscópica da reação pode ser realizada poucos minutos após a incubação dos eritrócitos com o *Polybrene*®.

O teste manual direto foi utilizado na investigação de AHAI em poucos estudos. Em 1982, Garratty *et al.*¹⁹ encontraram TDP positivo em 46,7% dos 15 pacientes com AHAI estudados. Mais recentemente, Owen & Hows⁷ observaram que o TPD foi menos sensível que o TCD em 25% dos pacientes analisados e, em 9% dos casos, foi menos sensível que o eluato. A discrepância foi atribuída à presença de alguns casos de doença de hemaglutinina fria com TCD positivo apenas com C3d. No estudo aqui apresentado, a sensibilidade do TPD foi superior à do TCD (94% *versus* 78%, $p < 0,05$), sendo positivo em quatro pacientes com TCD negativo. Em concordância com o estudo acima citado, o TPD foi negativo no indivíduo com hemólise devido a complemento.

Durante muitos anos, acreditou-se que caso o TCD fosse negativo não haveria IgG na superfície da hemácia; entretanto, aproximadamente 5-10% dos pacientes com diagnóstico clínico de AHAI apresentaram TCD negativo, evidenciando que o TCD possui sensibilidade limitada¹⁹. As técnicas mais sensíveis que o TCD, empregadas para quantificar o número de moléculas de IgG ligadas à membrana eritrocitária, são de aplicação mais complexa e de custo mais elevado. Szymanski *et al.* descreveram um TCD automatizado capaz de detectar 100-150 moléculas de IgG/GV²⁰, Galili *et al.* utilizaram formação de rosetas de hemácias³, Jeje *et al.* usaram radioensaio⁴, enquanto outros autores têm quantificado o número de IgG/GV com o teste imunoenzimático^{21,22}. A citometria de fluxo também pode ser empregada na análise de anticorpos eritrocitários, permitindo a quantificação de IgG/GV por meio da medida de fluorescência/GV⁶.

Em geral, as técnicas desenvolvidas para avaliar pacientes com AHAI com TCD negativo apresentam resultados satisfatórios, e o tipo de teste é escolhido em função da melhor reprodutibilidade de resultados, facilidade de realização, menor toxicidade

do material utilizado, e menor custo. Recentemente, quantificamos com maior precisão o número de IgG/GV de pacientes com AHAI, utilizando um teste imunoenzimático (*enzyme-linked antigen test*, ELAT)²². Apesar de o ELAT possuir sensibilidade 9-10 vezes maior que a do TCD e não utilizar material radioativo, o teste é de realização complexa, demorada e, portanto, de difícil implantação na rotina imuno-hematológica.

Os resultados aqui apresentados evidenciam que o TPD é um teste auxiliar rápido (menos de dez minutos), de baixo custo e de sensibilidade superior ao TCD, especialmente útil no diagnóstico de AHAI causada por IgG em pacientes com TCD negativo. Porém, assim como o TCD, o TPD não permite a identificação da especificidade do auto-anticorpo ou a subclasse da IgG que sensibiliza as hemácias. Além disso, convém ressaltar que o TPD não detecta complemento na superfície das hemácias e pode apresentar baixa sensibilidade para detectar auto-anticorpos de determinadas especificidades, tais como o auto-anti-Kell⁷.

Embora as amostras de sangue para este estudo tenham sido coletadas em alguns pacientes na vigência de tratamento específico, o que poderia ter contribuído para a queda do título do auto-anticorpo, para um mesmo título de autoanticorpo em determinado paciente o TPD foi mais sensível que o TCD na detecção de sensibilização eritrocitária.

Deve-se enfatizar que o reconhecimento de hemácias pelos macrófagos não está relacionado apenas ao número de IgG/GV, mas, também, ao arranjo das moléculas ligadas aos polipeptídeos da membrana, à subclasse da IgG que está sensibilizando as células, à quantidade de IgG livre no soro e à capacidade fagocitária do sistema histiocítico-macrofágico do indivíduo. Assim, a importância clínica do anticorpo e, conseqüentemente, a gravidade do estado hemolítico não podem ser relacionadas apenas aos resultados observados na análise laboratorial^{23,24}.

CONCLUSÃO

O presente estudo permite concluir que, além de apresentar maior sensibilidade que o TCD, o TPD é um método rápido e de baixo custo, sendo, dessa forma, um teste auxiliar útil no diagnóstico de AHAI, especialmente nos pacientes com TCD negativo.

SUMMARY

Laboratory diagnosis of auto-immune hemolytic anemia: characteristics of the manual direct test of Polybrene™

The direct manual Polybrene™ test (DPT) and the direct antiglobulin tests (DAT) were employed to detect antibody sensitizing red blood cell (RCB) in patients with clinical and laboratorial findings of autoimmune hemolytic anemia (AIHA).

PURPOSE. To compare the sensitivity and specificity of DPT and DAT in the diagnosis of AIHA.

METHODS. Eighteen consecutive patients with diagnosis of AIHA were evaluated. The control group consisted of 20 normal volunteers blood donors and 20 patients with sickle cell anemia. All patients and controls were submitted to DPT and DAT. All DAT positive samples were further tested using monospecific reagents (anti-IgG heavy chain and anti-C3d). Positive samples for either DPT or DAT were evaluated by eluate technique using the dichloromethane (DCM).

RESULTS. The DAT was positive in 14 patients and negative in 4 subjects, while the DPT was positive in 17 patients and negative in 1 individual who had a positive DAT owing to complement (C3d). All positive eluates performed with DCM showed RBC autoantibodies with presumed "anti-Rh" specificity. The sensitivity rate of the DPT (94%) was significantly ($p < 0.05$) higher than the sensitivity rate of DAT (78%) to determine whether IgG was bound *in vivo*, but no difference was found regarding the specificity of the two tests.

CONCLUSION. 1) The DPT is more sensitive than the DAT in detecting IgG autoantibody on the RBCs of patients with AIHA; 2) because of its simplicity and rapidity, the DPT is a useful additional screening test for the investigation of Coombs-negative AIHA. [Rev Ass Med Brasil 1998; 44(1): 16-20.]

KEY WORDS: Autoimmune hemolytic anemia. Direct antiglobulin test. Direct manual Polybrene™ test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Petz LD, Garratty G. *Acquired Immune hemolytic anemias*. Churchill Livingstone Inc., New York, 1980.
- Gilliland BC, Baxter E, Evans R. Red-cell antibodies in acquired hemolytic anemia with negative antiglobulin serum tests. *N Engl J Med* 1971; 285: 252-6.
- Galili U, Manny N, Izak G. EA rosette formation: a simple mean to increase sensitivity of the antiglobulin test in patients with anti red cell antibodies. *Br J Haematol* 1981; 47: 227-33.
- Jeje MO, Blajchman MA, Steeves K, Horsewood P, Kelton JG. Quantitation of red cell-associated IgG using an immunoradiometric assay. *Transfusion* 1984; 24: 473-76.
- Leikola J, Perkins HA. Enzyme-linked antiglobulin test: an accurate and simple method to quantify red cell antibodies. *Transfusion* 1980; 20: 138-44.
- Garratty G, Nance SJ. Correlation between *in vivo* hemolysis and the amount of red cell-bound IgG measured by flow cytometry. *Transfusion* 1990; 30: 617-21.
- Owen I, Hows J. Evaluation of the manual hexadimethrine bromide (Polybrene®) technique in the investigation of autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* 1990; 30: 814-8.
- Walker RH. *The antiglobulin test. Technical manual*. American Association of Blood Banks. 10th ed. Arlington, VA, Karger, 1990; 147-57.
- Reid ME, Sipos M. Evaluation of dichloromethane elution of routine use in a transfusion service. *J Med Technol* 1984; 1: 772-5.
- Lalezari P, Jiang AF. The manual Polybrene® test: a simple and rapid procedure for detection of red cell antibodies. *Transfusion* 1980; 20: 206-11.
- Lalezari P. The manual hexadimethrine (Polybrene®) test: effects of serum proteins and practical applications. *Transfusion* 1987; 27: 295-301.
- Malde R, Kelsall G, Knight RC. The manual low-ionic strength polybrene technique for detection of red cell antibodies. *Med Lab Sci* 1986; 43: 360-3.
- Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion* 1972; 12: 352-3.
- Garratty G. Predicting the clinical significance of red cell antibodies with *in vitro* cellular assays. *Transfusion Med Rev* 1990; 4: 297-312.
- Kay MMB. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3.521-5.
- Fisher GA. Use of the manual Polybrene® test in the routine hospital laboratory. *Transfusion* 1983; 23:152-4.
- Steane EA, Steane SM, Montgomery SR, Pearson JR. A proposal for compatibility testing incorporating the manual hexadimethrine bromide (Polybrene®) test. *Transfusion* 1985; 25: 540-4.
- Lown JAG, Johnson W, Ivey JG. Eighteen months experience with a manual Polybrene® crossmatch in a large hospital transfusion laboratory. *Vox Sang* 1988; 55: 229-32.
- Garratty G, Postoway N, Nance S, Brunt D. The detection of IgG on the red cells of "Coombs negative" autoimmune hemolytic anemias. *Transfusion* 1982; 22: 430.
- Szymanski IO, Odgren PR, Fortier NL, Snyder LM. Red blood cell associated IgG in normal and pathologic states. *Blood* 1980; 55: 48-54.
- Bodensteiner D, Brown P, Skikne B, Plapp F. The enzyme-linked immunosorbent assay: accurate detection of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 182-5.
- Bordin JO, Souza-Pinto JC, Kerbauy J. Measurement of red blood cell antibodies in autoimmune hemolytic anemia. *Brazilian J Med Biol Res* 1991; 24: 895-9.
- Garratty G. The significance of IgG on the red cell surface. *Transfusion Med Rev* 1987; 1:47-57.
- Zupanska B, Brojer E, Thomson EE, Merry AH, Seyfried H. Monocyte-erythrocyte interaction in autoimmune haemolytic anaemia in relation to the number of erythrocyte-bound IgG molecules and subclass specificity of autoantibodies. *Vox Sang* 1987; 52: 212-8.