



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Discente: Luciana Corrêa Carneiro

**“Avaliação do Impacto da Automação no Método de
Fenotipagem Eritrocitária em Amostras de Doadores de
Sangue da Fundação HEMOPA”**

BELÉM-PARÁ

2020

LUCIANA CORRÊA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA AUTOMATAÇÃO NO MÉTODO DE FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE DA FUNDAÇÃO HEMOPA

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação Mestrado em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissional sob a orientação do Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior

Belém – Pará
2020

LUCIANA CORRÊA CARNEIRO

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA AUTOMAÇÃO NO MÉTODO DE FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA EM AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE DA FUNDAÇÃO HEMOPA

Projeto de pesquisa apresentado ao Programa de Pós-graduação Mestrado em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas Profissional sob a orientação do Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
ICB-UFPA (Orientador)

Profa. Dra. Renata Bezerra Hermes de Castro
ICB-UFPA (Titular)

Profa. Dra. Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro
ICB-UFPA (Titular)

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello
ICB-UFPA (Titular)

Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira
ICB-UFPA (Suplente)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 HISTÓRIA DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA E DA IMUNOHEMATOLOGIA ERITROCITÁRIA.....	8
2.2 OS ANTÍGENOS E OS SISTEMAS ERITROCITÁRIOS.....	9
2.2.1 Sistema ABO	11
2.2.2 Sistema Rh	13
2.2.3 Outros sistemas de grupos sanguíneos.....	14
2.2.3.1 Sistema P	14
2.2.3.2 Sistema MNSs.....	14
2.2.3.3 Sistema Lutheran (Lu)	16
2.2.3.4 Sistema Kell (K).....	17
2.2.3.5 Sistema Lewis (Le)	18
2.2.3.6 Sistema Duffy (Fy).....	20
2.2.3.7 Sistema Kidd (Jk)	21
2.4 AS REAÇÕES TRANSFUSIONAIS	24
3 JUSTIFICATIVA	26
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5 METODOLOGIA	28
5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA	28
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	28
5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	28
5.4 ASPECTOS ÉTICOS	28
5.4.1 Riscos	29
5.4.2 Benefícios	29
5.5 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	29
5.6 FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA POR METODOLOGIA MANUAL	29
5.7 FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA POR METODOLOGIA AUTOMATIZADA....	31
5.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA	32
6 RESULTADOS	33
7 DISCUSSÃO	36
8 CONCLUSÃO	38
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

INTRODUÇÃO. A imunohematologia eritrocitária é considerada uma das áreas com maior potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias diagnósticas. Entretanto, ainda hoje, a principal preocupação com o uso dessas tecnológicas são os riscos de aloimunização decorrentes de possíveis falhas diagnósticas.

OBJETIVOS. Avaliar o impacto da automação na fenotipagem eritrocitária e o nível de concordância dessa com a metodologia manual em amostras de doadores de sangue atendidos no hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA no período de janeiro a dezembro de 2019.

MATERIAL E MÉTODOS. Foram analisadas 2.700 amostras tanto por metodologia manual quanto por metodologia automatizada, através do equipamento IH500 da BioRad®, para fenotipagem eritrocitária. Os resultados foram testados quanto ao nível de concordância através do teste de Coeficiente Kappa. **RESULTADOS.** Das amostras fenotipadas 98,6% (2.662/2.700) foram concordantes em ambas as metodologias e apenas 1,4% (38/2700) foram discordantes. Das 38 amostras discordantes, 31,6% referiram-se ao fenótipo Lu(b); 15,8% ao fenótipo Lu(a); 13,1% ao fenótipo Fy(b); 7,9% aos fenótipos Le(b), E, c; 5,3% aos fenótipos N, S, s, Kp(a), P1; e 2,6% aos fenótipos M, Jk(a), Jk(b), Fy(a).

CONCLUSÕES. O nível de concordância entre os conjuntos de dados obtidos através das técnicas de fenotipagem eritrocitária manual e automatizada foi de 98,6% e o impacto da implantação da metodologia automatizada gerou um aumento na capacidade de amostras analisadas em 27,9% em relação ao mesmo período do ano anterior.

PALAVRAS-CHAVE: Imunofenotipagem, Antígenos de Grupos Sanguíneos, Transfusão de Eritrócitos, Incompatibilidade de Grupos Sanguíneos, Reação Transfusional.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Erythrocyte immunohematology is considered one of the areas with the greatest potential for the development of new diagnostic technologies. However, even today, the main concern with the use of these technologies is the risks of alloimmunization resulting from possible diagnostic failures. **GOALS.** Evaluate the impact of automation on erythrocyte phenotyping and the level of agreement between it and the manual methodology in samples from blood donors treated at the blood center coordinating the Fundação HEMOPA from January to December 2019. **MATERIAL AND METHODS.** 2.700 samples were analyzed both by manual and automated methodology, using BioRad® IH500 equipment, for erythrocyte phenotyping. The results were tested for the level of agreement using the Kappa Coefficient test. **RESULTS.** Of the phenotyped samples, 98.6% (2.662 / 2,700) were in agreement in both methodologies and only 1,4% (38/2700) were in disagreement. Of the 38 discordant samples, 31,6% referred to the Lu (b) phenotype; 15,8% to the Lu (a) phenotype; 13,1% to the Fy phenotype (b); 7.9% to Le (b), E, c phenotypes; 5,3% to N, S, s, Kp (a), P1 phenotypes; and 2,6% for phenotypes M, Jk (a), Jk (b), Fy (a). **CONCLUSIONS.** The level of agreement between the data sets obtained through manual and automated erythrocyte phenotyping techniques was 98,6% and the impact of the implementation of the automated methodology generated an increase in the capacity of samples analyzed by 27,9% in relation to the same previous year.

KEYWORDS: Immunophenotyping, Blood Group Antigens, Erythrocyte Transfusion, Blood Group Incompatibility, Transfusion Reaction.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas muitos foram os avanços tecnológicos para o diagnóstico e tratamento de diversas doenças, contudo, mesmo hoje, para alguns casos, a transfusão de sangue ainda é a única alternativa terapêutica eficiente de tratamento (TOREZAN; SOUZA, 2010).

Neste sentido, para uma boa prática transfusional, a melhor alternativa é seguir critérios rigorosos de indicação e controle em todas as fases do ciclo do sangue. Ainda assim, estas não são suficientes para eliminar, na sua totalidade, os riscos de ocorrência de eventos adversos secundários a uma transfusão de sangue, sejam eles imediatos ou tardios (SAITO, 2010; SQUIRES, 2011).

Para tanto, o Ministério da Saúde do Brasil edita frequentemente manuais técnicos para a orientação do uso de hemocomponentes, além de portarias, como a Portaria Consolidada nº 5/2017 do Ministério da Saúde, que estabelecem diretrizes para as diferentes fases da cadeia do sangue, que vão desde a captação de doadores de sangue até o término propriamente dito da infusão do hemocomponente no receptor (SOUZA NETO; BARBOSA, 2012).

Dentre as várias fases que compõem o ciclo do sangue, podemos destacar a triagem imunohematológica para fins de segurança transfusional (PROIETTI; CIOFFI, 2008). Nesta fase, inicialmente são realizados os testes de fenotipagem eritrocitária e posteriormente a prova de compatibilidade entre a bolsa do doador e o sangue do paciente. Porém, este é um trabalho árduo, pois além do sistema ABO, existem também outros sistemas de grupos sanguíneos de importância transfusional. (BONIFÁCIO, 2009; BAPTISTA, 2011).

Já foram descritos, além do sistema ABO, cerca de outros 364 antígenos eritrocitários (ISBT, 2020), dos quais os antígenos de maior significado clínico, em função do seu potencial imunogênico, são os dos grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy e Kidd (HENRY, 2008; CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004; CASTILHO et al., 2015).

O potencial imunogênico destes antígenos, contudo, pode variar em diferentes grupos étnicos e em situações clínicas específicas. Desse modo, estudos voltados para a análise dos fenótipos eritrocitários de grupos sanguíneos em pacientes e doadores de sangue possibilita a redução do risco de aloimunização no receptor, além

de permitir estimar a disponibilidade de sangue compatível, principalmente em casos de reação transfusional hemolítica tardia (RTHT) (NOVARETTI et al., 2000).

A aloimunização é, portanto, uma complicação transfusional que está diretamente relacionada a um aumento do risco de reações transfusionais, e à redução da disponibilidade de sangue compatível para futuras transfusões. Assim, a fenotipagem dos glóbulos vermelhos na prática transfusional é essencial para confirmar a identidade de aloanticorpos suspeitos e para facilitar a identificação de anticorpos que possam ser formados futuramente, evitando-se assim os riscos de RTHT (CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA DA TRANSFUSÃO SANGUÍNEA E DA IMUNOHEMATOLOGIA ERITROCITÁRIA

A prática do uso de sangue para fins terapêuticos já data de muitos séculos, desde o seu início com os povos romanos e egípcios que se banhavam ou bebiam o sangue de animais ou pessoas com objetivo de curar doenças como elefantíase, epilepsia e escorbuto, até os relatos da primeira prática transfusional, mal sucedida, realizada com o Papa Inocêncio VIII em 1492, quando o mesmo veio a óbito em decorrência de complicação pelo uso “terapêutico” do sangue na época. Muitas outras tentativas, todas sem sucesso, também foram relatadas nos anos seguintes até 1818. (VERRASTRO et al., 2005; FIDLARCZYK; FERREIRA, 2008).

É somente a partir do ano de 1901, porém, com a descoberta do sistema ABO por Karl Landsteiner, que a hemoterapia realmente passou a ser considerada uma prática terapêutica “segura”. A primeira transfusão sanguínea bem-sucedida, e precedida da compatibilização ABO, foi realizada somente no ano de 1907 por Reuben Ottenberg, prática esta amplamente adotada posteriormente, durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918) (SARAIVA, 2005; HARMENING, 2015; GIRELLO; KÜH, 2011; GARRATTY et al., 2002).

Quarenta anos após a descoberta do sistema ABO, outro acontecimento também revolucionou a prática da medicina transfusional: a identificação do fator Rh por Landsteiner e Wiener. Este fato foi considerado de grande importância para a

imunohematologia, pois complementou o entendimento sobre a incompatibilidade entre os diversos tipos sanguíneos humanos (NARDOZZA et al., 2010).

Com o passar dos anos, outras pesquisas para a melhoria de boas práticas em hemoterapia, do emprego científico dos anticoagulantes, aperfeiçoamento dos equipamentos de coleta de sangue, e aprimoramento das técnicas de armazenamento e transfusão de sangue, além do conhecimento e reconhecimento mais adequado das indicações e contra-indicações do uso terapêutico do sangue, tornaram a prática transfusional uma alternativa terapêutica na rotina médica (BOLTON-MAGGS; COHEN, 2013).

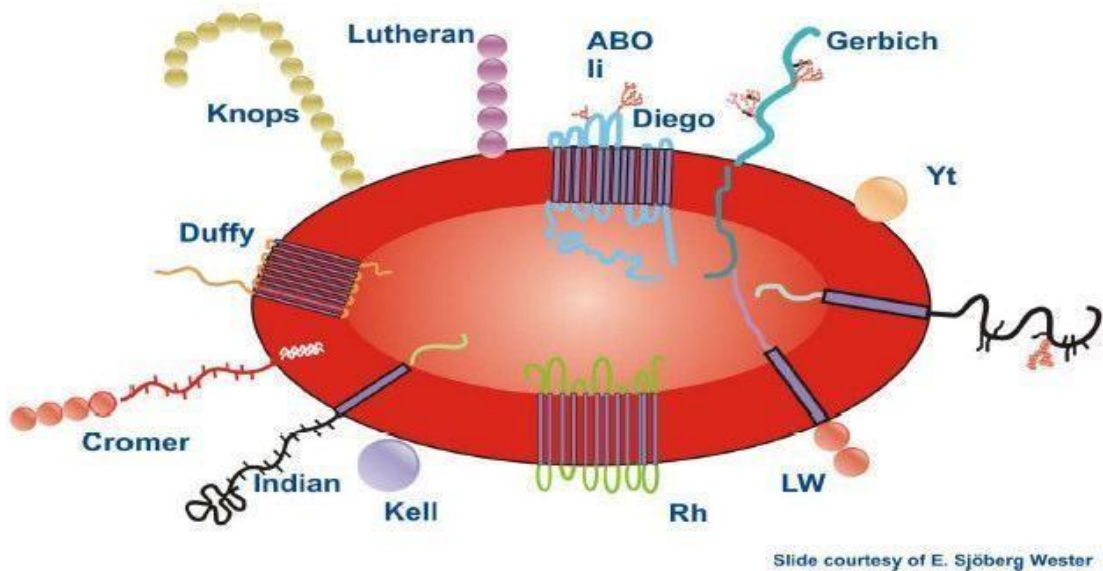
A imunohematologia eritrocitária neste contexto, porém, mesmo hoje, ainda é considerada uma área em constante crescimento mundial no que se refere à medicina transfusional, permanecendo em busca de novos antígenos e desenvolvimento de novas tecnologias.

2.2 OS ANTÍGENOS E OS SISTEMAS ERITROCITÁRIOS

Podemos definir como sistemas de grupos sanguíneos o conjunto de antígenos formados a partir da expressão de genes alelos de mesmo locus gênico, ou mesmo por um complexo de dois ou mais genes homólogos intimamente ligados. E, por conseguinte, definir antígenos eritrocitários como sendo estruturas proteicas, glicolipídicas ou glicoproteicas que encontram-se na superfície externa das hemácias (Figura 1) desempenhando funções fisiológicas, como transporte de substâncias ou quimiorreceptores, dotadas de imunogenicidade, ou seja, capazes de induzir a produção de anticorpos sempre que o sistema imune do indivíduo reconhecer essas estruturas como estranhas (HENRY, 2008; MACHADO, 2018; BONIFÁCIO, 2009).

Neste sentido, além do sistema ABO, amplamente conhecido, existem também outros sistemas de grupos sanguíneos de grande importância transfusional (Figura 1), cuja formação depende de aproximadamente 50 genes (BONIFÁCIO, 2009; BAPTISTA, 2011). Atualmente, já foram descobertos 364 antígenos eritrocitários, dos quais 326 estão contidos em 39 sistemas, segundo a classificação da Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT, 2020).

Figura 1 - Representação esquemática de alguns dos antígenos de grupos sanguíneos de maior importância clínica com expressão na membrana celular das hemácias



(Fonte: NYDEGGER; FLEGEL, 2004)

No que tange a importância transfusional dos antígenos eritrocitários, podemos destacar que, além do sistema ABO que tem os antígenos mais significativos clinicamente, os antígenos dos sistemas de grupo sanguíneo Rh, Kell, Duffy e Kidd, são também de extrema importância por sua alta imunogenicidade (CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004; CASTILHO et al., 2015).

Esta capacidade imunogênica e o significado clínico dos anticorpos eritrocitários têm relação direta com a frequência dos antígenos nos eritrócitos, que, por sua vez, têm características imunogênicas próprias. Estas características, contudo, podem variar em diferentes grupos étnicos, assim como na imunogenicidade e também em situações clínicas específicas, como na ocorrência de anticorpos irregulares principalmente em pacientes politransfundidos (HENRY, 2008).

Cada sistema antigênico é também específico, ou seja, os anticorpos correspondentes se fixam especificamente aos sítios antigênicos determinados por cada grupo correspondente (HENRY, 2008).

Na prática transfusional este risco de ocorrência de anticorpos irregulares, e conseqüentemente aloimunização, é maior em pacientes que necessitam de transfusões frequentes como: portadores de anemia falciforme, talassêmicos,

oncológicos, portadores de anemia hemolítica autoimune, entre outros. E está diretamente relacionada ao aumento do risco de reações transfusionais e com a redução da disponibilidade de sangue compatível para futuras transfusões no mesmo paciente, em função da necessidade de identificação de hemácias antígeno-negativas adequadas para as futuras transfusões (CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004)

A importância de se estudar os fenótipos eritrocitários dos grupos sanguíneos em pacientes e doadores de sangue, então, está relacionada à possibilidade de comparação da frequência dos genes mais imunogênicos de cada sistema, sendo a informação relevante para diminuir o risco de aloimunização, além de permitir se estimar a disponibilidade de sangue compatível, principalmente em casos de reação transfusional hemolítica tardia (RTHT) (NOVARETTI et al., 2000; CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004)

A consequência transfusional direta a uma transfusão mal compatibilizada em relação aos antígenos ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd e MNS é a geração de anticorpos, em sua maioria de classe IgG, de maior significado clínico associados a casos de Reação Hemolítica Tardia (RHT) pós-transfusional e Doença Hemolítica Peri Natal (DHPN), e cuja reação ocorre a 37°C, podendo ou não fixar complemento (BEIGUELMAN, 2003; HARMENING, 2015; CASTILHO; PELLEGRINO JÚNIOR, 2004).

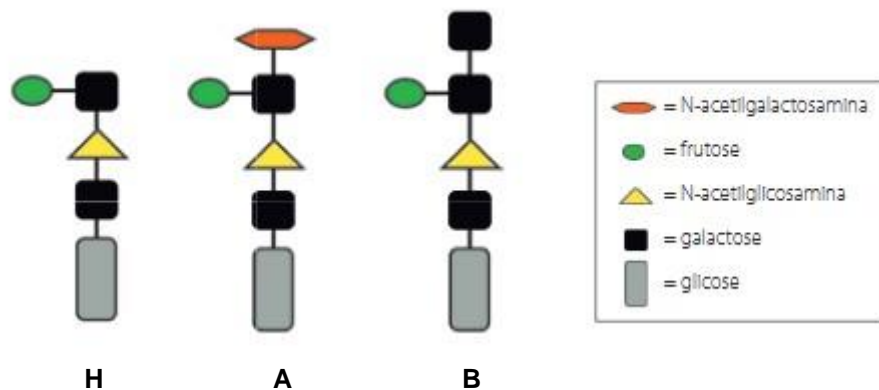
2.2.1 Sistema ABO

É o sistema de grupo sanguíneo mais importante e mais conhecido. Os genes ABO estão localizados no braço longo do cromossomo 9 (posição 9q34.1-q34.2), e dispõem de quatro genes: A1, A2, B e O (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; VIZZONI; COTIAS, 2013)

Os genes A e B determinam a produção de enzimas que são responsáveis pela produção dos respectivos antígenos, a partir de um antígeno precursor. As cadeias de carboidratos são sintetizadas pela ação de glicosiltransferases que catalisam a transferência de monossacarídeos específicos de um substrato doador para um acceptor. O substrato acceptor para as transferases A e B (produtos dos alelos A e B) é uma estrutura denominada antígeno H, que contém o monossacarídeo fucose como resíduo terminal. Isso significa que, sem o antígeno H, os antígenos A e B não são produzidos e conseqüentemente não se expressam na membrana da hemácia (BARJAS-CASTRO, 2013; DANIELS, 2005)

As glicosiltransferases adicionam carboidratos terminais à substância H, que serve como estrutura básica para esses dois antígenos (figura 2). O gene A é responsável pela adição de N-acetilgalactosamina, formando o antígeno A; o gene B adiciona uma galactose, formando o antígeno B (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Figura 2 - Representação esquemática dos antígenos A, B, H



(Fonte: VIZZONI; COTIAS, 2013)

Os antígenos do sistema ABO não estão restritos à membrana eritrocitária, podendo ser encontrados também na saliva e nos líquidos biológicos de indivíduos que apresentem o gene secretor. Estão expressos desde a 5^a ou 6^a semanas de vida intrauterina, porém é somente por volta de 2 a 4 anos de vida que o número de sítios antigênicos apresenta expressão plena (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os anticorpos anti-A e anti-B são detectados no soro de indivíduos que não possuem os antígenos correspondentes (Quadro 1). Esses anticorpos aparecem espontaneamente depois dos 3-6 meses de idade, com pico de produção dos 5 aos 10 anos de idade e com diminuição progressiva na velhice. São produzidos após estímulo antigênico desencadeado por substâncias quimicamente semelhantes aos antígenos A e B presentes no meio ambiente, como nas bactérias do trato digestivo, por isso são considerados anticorpos de ocorrência natural (BARJAS-CASTRO, 2013; VIZZONI; COTIAS, 2013).

Quadro 1 - Definição dos grupos sanguíneos ABO

Grupo Sanguíneo ABO	Antígenos (membrana da hemácia)	Anticorpos (soro ou plasma)
A	A	Anti-B
B	B	Anti-A
AB	A, B	Ausente
O	H	Anti-A e Anti-B

(Fonte: BARJAS-CASTRO, 2013)

A identificação dos fenótipos ABO está relacionada à presença ou à ausência dos antígenos A e/ou B na membrana das hemácias (prova direta) e à detecção ou à ausência de anticorpos contra os antígenos eritrocitários que não estão presentes na superfície das hemácias (prova reversa) (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Estes anticorpos são, geralmente, da classe IgM, com capacidade de ativar a via do complemento e causar hemólise. Dessa forma, são responsáveis por reações transfusionais graves em pacientes que recebem transfusões ABO incompatíveis. Anticorpos anti-A e anti-B da classe IgG possuem a capacidade de atravessar a placenta e se ligar às hemácias fetais. Em situações de incompatibilidade ABO entre mãe e feto, podem ocasionar doença hemolítica do recém-nascido (BARJASCASTRO, 2013; VIZZONI; COTIAS, 2013).

2.2.2 Sistema Rh

O sistema Rh é bastante amplo, já tendo sido descritos cerca de 50 antígenos. O locus Rh está localizado no braço curto do cromossomo 1 no qual somente dois genes foram identificados até o momento um gene RHD e outro RHCE, onde o antígeno Rh (D) já é produzido e expresso em hemácias fetais desde a sexta semana de gestação (NARDOZZA et al., 2010).

Destes, os cinco sorotipos que estão mais envolvidos clinicamente com formas significativas na medicina transfusional são: D, C, E, c, e. Sendo que o antígeno D é sabidamente o mais implicado em casos de aloimunização devido a sua maior antigenicidade dentre todos os tipos de antígenos eritrocitários. De modo que, a presença do antígeno D em hemácias está diretamente associada à positividade para o fator Rh (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009).

2.2.3 Outros sistemas de grupos sanguíneos

Alguns sistemas de grupos sanguíneos evidenciam maior importância na prática transfusional em relação a outros, o que torna fundamental o conhecimento de cada um deles com suas respectivas características (GIRELLO; KÜH, 2011).

2.2.3.1 Sistema P

Em 1927, Landsteiner e Levine descreveram o grupo sanguíneo P. Na procura de novos antígenos, fizeram um experimento injetando eritrócitos humanos em coelhos e produziram um anticorpo chamado anti-P, cuja expressão passou a dividir os eritrócitos humanos em dois grupos: P+ e P-. Sendo conhecido hoje que anti-P1 é um anticorpo da classe IgM comum, de ocorrência natural no soro dos indivíduos P2 e que não determina reação transfusional ou doença hemolítica perinatal. E ainda que raramente ocorre como sendo da classe IgG, porém, quando presente, este anticorpo se ativa a 37°C e ganha importância transfusional reagindo mediante a aglutinação de hemácias direta em baixas temperaturas com hemácias P1 positivas (VIZZONI; COTIAS, 2013).

2.2.3.2 Sistema MNSs

Foi também através dos experimentos de Landsteiner e Levine (1927) que se conseguiu detectar pela primeira vez a presença de anticorpos anti-M e anti-N. Anos depois, com a implantação da técnica da antiglobulina, em 1947, por Walsh e Montgomery foi descoberto o antígeno S que era o produto de um gene ligado ao par de alelos responsável pelo M e N. Seu alelo "s", contudo, só foi descoberto em 1951 por Levine et al. e desde então o sistema MN passou a ser conhecido como MNSs, um sistema de dois *loci* (apud VIZZONI; COTIAS, 2013).

Hoje sabe-se que os antígenos do grupo sanguíneo MNS são transportados em proteínas portadoras de açúcar chamadas glicoforinas, presentes na membrana dos eritrócitos. Estas glicoforinas contêm os açúcares que determinam o tipo de fenótipo MNS de uma pessoa (DEAN, 2005).

Os antígenos MN, em especial, podem ser detectados em hemácias fetais a partir da 9ª semana de gestação e ao nascimento já estão bem desenvolvidos, porém, estes antígenos podem ser facilmente destruídos por enzimas proteolíticas, por encontrarem-se na parte externa da Glicoproteína A. Em relação à sua produção, são dependentes de genes localizados no cromossomo 4 (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os antígenos SS, por sua vez, são muito parecidos com os antígenos MN, também estão localizados no cromossomo 4, sendo que estas glicoproteínas S e s diferem entre si pela simples substituição de aminoácidos na posição 29 (S: metionina/s: treonina), sendo, por sua vez, menores que as glicoproteínas dos antígenos MN, e denominadas de Ss-sialoglicoproteína (Ss-SGP) ou glicoforina B (GPB). Com relação à atividade desses antígenos, pode ser destruída por papaína ou bromelina, dependendo da concentração, duração e proporção da solução enzimática utilizada. Destaca-se o fato de que os antígenos Ss são restritos aos eritrócitos, não sendo encontrados em plaquetas, linfócitos, monócitos ou granulócitos (GIRELLO; KÜH, 2011; VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os anticorpos anti-M são de ocorrência natural, quase sempre pertencem à classe IgM (crioaglutininas) e normalmente não fixam complemento, reativos em salina e, em sua maioria, reagem melhor a 4°C, mas que podem reagir fracamente a 37°C. Devido ao efeito de dose, anticorpos anti-M podem reagir melhor com hemácias M+N- (genótipo MM) (GIRELLO; KÜH, 2011; VIZZONI; COTIAS, 2013).

Esses anticorpos foram frequentemente detectados em mães pré-natais. Em alguns relatos de casos na literatura, o anticorpo anti-M é descrito como o segundo anticorpo não Rh mais comum após o anti-Kell, porém apenas casos esporádicos de isoimunização anti-M foram relatados nas últimas décadas (ARORA et al., 2015; LI et al., 2019).

Os anticorpos anti-N, por sua vez, são aglutininas frias reativas na fase salina, podendo ser de classe IgG ou IgM, que não liga complemento e nem reage com hemácias tratadas previamente com enzimas. Apresentam efeito de dose, reagindo melhor com hemácias com fenótipo M-N+. Não tem significância clínica, a menos que reaja a 37°C. Sendo este anticorpo anti-N mais raro que o tipo anti-M (GIRELLO; KÜH, 2011; VIZZONI; COTIAS, 2013).

Em relação aos anticorpos anti-S e anti-s, a maioria é de classe IgG, sendo que o anti-S pode ser eventualmente de ocorrência natural de classe IgM. Estes anticorpos são reativos a 37°C, alguns deles podem expressar boa reatividade em temperaturas mais baixas (4°C) e podem ou não reagir com hemácias previamente tratadas. Embora detectados com menos frequência que o anti-M, verifica-se uma maior probabilidade dos anticorpos anti-S ou anti-s serem clinicamente significantes por estarem associados a ocorrência de reações transfusionais do tipo hemolíticas graves em função dos anticorpos anti-S e anti-s ativarem o sistema complemento, sendo os

anticorpos anti-s, contudo, os mais raros e de maior significância clínica, pois são ativados pelo antígeno “s” que é altamente imunogênico. Portanto, os concentrados de hemácias selecionados para transfusão em pacientes fenotipados que não possuem os antígenos S e s, devem do mesmo modo ser negativos para o antígeno correspondente a esses anticorpos e compatíveis nas provas de compatibilidade (GIRELLO; KÜH, 2011; VIZZONI; COTIAS, 2013).

2.2.3.3 Sistema Lutheran (Lu)

Esse sistema foi descrito por Callender et al. em 1945, após a descoberta do anticorpo anti-Lu(a), um anticorpo de baixa frequência e que estava presente no soro de um dos pacientes analisados após uma transfusão. Seu par antitético, um antígeno de alta frequência, também foi descoberto no mesmo ano, a partir da descoberta do anticorpo anti-Lu(b). O sistema de grupo sanguíneo parecia completo até o início da década de 1960 já com a identificação dos antígenos Lu(a) e Lu(b) e seus anticorpos correspondentes, foi quando Crawford et al. (1961) descreveram o primeiro fenótipo Lu(a-b-) (apud VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Lutheran estão expressos em duas proteínas eritrocitárias: Lu (Lutheran) e B-CAM (Moléculas de Adesão de Células Basal), que são produtos do gene *Lu* localizado no cromossomo 19 e que diferem entre si somente no tamanho do domínio citoplasmático A presença de antígenos Lutheran já foi detectada em células do cérebro, pulmão, pâncreas e placenta, porém, encontram-se ausentes em plaquetas, linfócitos e monócitos (EYLER; TELEN, 2006; DANIELS, 2009).

Em relação aos anticorpos anti-Lu(a), são de ocorrência natural e tendem a desaparecer alguns meses depois de terem sido detectados, sendo então de pouca importância clínica e transfusional. Porém estes anticorpos representam a maioria dos anticorpos luteranos, e reagem em salina com melhor afinidade em temperatura ambiente que a 37°C e frequentemente o anticorpo anti-Lu(a) passa despercebido nos testes de rotina de imunohematologia em função da maioria das células de triagem para anticorpos irregulares serem negativas para o antígeno Lu(a). Alguns exemplares, porém, destes anticorpos reagem tanto a 37°C como no teste de antiglobulina humana (AGH) (VIZZONI; COTIAS, 2013).

A maioria dos anticorpos anti-Lu(b), por sua vez, pertence à classe IgG com reatividade a 37°C e na fase de AGH, sendo produzidos frequentemente em resposta

à gravidez ou a transfusões (VIZZONI; COTIAS, 2013). Clinicamente, os anticorpos do sistema luterano são relativamente benignos, entretanto, apesar de alguns aloanticorpos anti-Lu(b) terem pouco ou nenhum significado clínico, o desenvolvimento desses aloanticorpos pode gerar complicações transfusionais, já que alguns indivíduos podem desenvolver reações hemolíticas transfusionais e quadros de icterícia pós-transfusional, limitando assim a disponibilidade de hemocomponentes compatíveis para as transfusões futuras (SINGER et al., 2000; DANIELS, 2009).

2.2.3.4 Sistema Kell (K)

O sistema do grupo sanguíneo Kell é um dos sistemas de grupos sanguíneos mais complexos, depois dos grupos sanguíneos ABO e Rh, e com maior quantidade de antígenos altamente imunogênicos (DEAN, 2005).

Foi descoberto em 1946 após a realização da técnica de Coombs no soro de uma paciente, a Sra Kelleher, a qual inspirou o nome deste sistema. Os anticorpos anti-Kell presentes nesta paciente resultaram em doença hemolítica em seu filho recém-nascido cujas hemácias expressavam o antígeno Kell. Desde então, um total de 25 antígenos Kell já foram descobertos e são expressos em diferentes frequências em diferentes populações (DEAN, 2005; VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Kell estão expressos na glicoproteína Kell, produto do gene *KEL* localizado no cromossomo 7. Contudo, a expressão desses antígenos também é controlada por um gene regulador XK, localizado no braço curto do cromossomo X (BONIFÁCIO, 2009).

Estes antígenos são extremamente imunogênicos, sendo o antígeno K (Kell) o segundo mais imunogênico de todos os antígenos de grupos sanguíneos, perdendo neste quesito de imunogenicidade apenas para o antígeno D. No entanto, o antígeno K é de baixa frequência, enquanto que o seu par antitético k (cellano) é de alta frequência e pode ser encontrado em aproximadamente 99,8% da população. Em relação à inativação, os antígenos Kell podem ser inativados por tripsina, quimiotripsina, soluções de ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol (2-ME), 2-aminoetilisotioúrio (AET) e ZZAP (que contém DTT e enzima proteolítica papaína ativada com cisteína). (GIRELLO; KÜH, 2011; VIZZONI; COTIAS, 2013).

Já os anticorpos anti-Kell são geralmente da classe de anticorpos IgG, e em menor frequência da classe IgM. Semelhante ao que é observado para os antígenos D e K, os anticorpos anti-D são os anticorpos irregulares mais frequentes, seguido dos

anticorpos anti-K, em detecções em serviços de Hemoterapia (DEAN, 2005; VIZZONI; COTIAS, 2013). Aproximadamente 20% dos anticorpos do sistema Kell ativam complemento até C3, e têm sido implicados em casos de DHRN e reações transfusionais hemolíticas graves imediatas ou tardias (SCHULTZ, 1990; GIRELLO; KÜH, 2011).

2.2.3.5 Sistema Lewis (Le)

O sistema de grupo sanguíneo Lewis caracteriza-se por não ser produzido pelos eritrócitos e não estar integrado à sua estrutura de membrana, o que o torna um sistema diferente dos demais. Os antígenos desse sistema são elaborados por células teciduais e secretados nos fluidos corporais, principalmente nas secreções e no plasma (HARMENING, 2015).

O gene *Lewis* encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 19 p13.3, estando ligado ao locus do complemento C3, que produz uma L-glicosiltransferase que acrescenta uma L-fucose a uma substância precursora básica para a produção dos antígenos deste grupo sanguíneo Le(a) e Le(b). Os indivíduos que não sintetizam esses antígenos têm o fenótipo Lewis negativo, devido à presença de alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), cuja distribuição é diferente em vários grupos étnicos (DANIELS, 2012; CORVELO et al., 2013).

Como já comentado anteriormente, os antígenos Lewis são provenientes do plasma e, como consequência, adsorvidos pela membrana dos eritrócitos, sendo expressos em muitos tecidos humanos, incluindo células da mucosa da superfície gástrica. (BONIFÁCIO, 2009).

Indivíduos com genes funcionais fucosiltransferase-2 (*FUT2*) e -3 (*FUT3*) expressam o antígeno Lewis-B ou Le(b), mas aqueles com *FUT2* não funcional expressam apenas Lewis-A ou Le(a). Além disso, indivíduos com um gene *FUT3* não funcional não expressam nem Le(a) nem Le(b) sendo então designados de Le(a-b-) (BUCARDO, 2018).

Este fenótipo Le(a-b-) não é decorrente da ausência do gene *FUT3*, mas de mutações específicas no gene *Le* que vão ocasionar uma transferase Lewis não funcional ou parcialmente ativa, gerando assim a expressão negativa nos eritrócitos, como é observado em pacientes portadores de alguns tipos de câncer, cirrose alcoólica, infecções virais e parasitárias, onde estes pacientes podem não expressar os antígenos Lewis nos eritrócitos, significando que esta modificação do fenótipo

positivo para fenótipo negativo seja decorrente de metabolismo lipídico anormal, por alterações de triglicerídeos e de proteínas de alta densidade e/ou outras alterações neoplásicas que podem ocorrer nestes pacientes (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os anticorpos do sistema do grupo sanguíneo Lewis são de ocorrência natural, sendo mais frequentemente pertencentes à fração de classe IgM e reagindo bem a temperaturas abaixo de 37°C. A maioria dos autores refere que esses anticorpos não são considerados clinicamente significativos visto que os eritrócitos reagentes à 37°C, independentemente do fenótipo de Lewis, tem sobrevivida *in vivo* normal, não sendo portanto, necessário transfundir eritrócitos negativos, para este antígeno, para pacientes com anticorpos contra antígenos de Lewis (MAKROO et al., 2014; NEEDS, 2019).

Os anticorpos Lewis são capazes de ativar o complemento, podendo provocar hemólise *in vitro* e *in vivo*. E ainda apresentam reatividade exacerbada quando as células são tratadas por enzimas proteolíticas como a papaína, bromelina, ficina e tripsina, cujas substâncias são potencializadores adicionados ao teste com o objetivo de facilitar a interação entre o antígeno e o anticorpo, aproximando as hemácias, e favorecendo dessa forma a aglutinação e encurtando o tempo de reação (VIZZONI; COTIAS, 2013; FERREIRA et al., 2014)

No sistema Lewis o anticorpo anti-Le(a) é o mais frequente, sendo produzido por aproximadamente 20% dos indivíduos que apresentam fenótipo Le(a-b-). Na maioria das vezes este anticorpo é da classe IgM, entretanto já existem relatos de casos de anticorpos de classe IgG presentes no soro de pacientes após transfusões maciças contendo o antígeno Le(a) (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Estes anticorpos anti-Le(a) demonstram melhor afinidade por células suspensas em salina em temperatura ambiente, embora algumas vezes reajam bem a 37°C e na fase da antiglobulina humana (AGH), podendo estar associado a reações transfusionais hemolíticas. Contudo, estes anticorpos podem ser facilmente neutralizados por plasma ou saliva que contenha a substância Le(a). Indivíduos portadores do fenótipo Le(a-b+) não produzem anti-Le(a) pelo fato de a estrutura do antígeno Le(a) estar contida dentro do epítipo de Le(b). Eles apenas são produzidos em indivíduos que não possuem o antígeno Le(a) nem o antígeno Le(b) (VIZZONI; COTIAS, 2013).

O anticorpo anti-Le(b) é produzido por indivíduos apresentando o fenótipo Le(a+b-) e ocasionalmente por indivíduos Le(a-b-), porém, não é comumente

encontrado nos testes pré-transfusionais. Sendo habitualmente uma imunoglobulina de classe IgM que não se fixa ao complemento com facilidade, quando comparado à mesma atividade exercida pelo anticorpo anti-Le(a) (VIZZONI; COTIAS, 2013).

2.2.3.6 Sistema Duffy (Fy)

O grupo sanguíneo Duffy foi identificado pela primeira vez em 1950 em um paciente hemofílico que fora submetido a múltiplas transfusões de sangue e foi o primeiro a ser identificado como produtor de anticorpos anti-Fy(a). No ano seguinte, Ikin et al. (1951) descreveram o anticorpo que definiu o seu par antitético, denominado anti-Fy(b), no soro de uma mulher múltipara. Ficando evidenciado que os principais antígenos do sistema Duffy na rotina imunohematológica eram o Fy(a) e o Fy(b) (apud DEAN, 2005).

Os antígenos Fy(a) e Fy(b) são produzidos a partir do gene que está localizado perto do centrômero, no braço longo do cromossomo 1 q22-23, de alelos codominantes que estão contidos em uma glicoproteína ácida (gp-Fy). Os alelos Fy(a) e Fy(b) diferem por uma simples substituição de base no nucleotídeo 125. No alelo Fy(a), nesta posição, a base nitrogenada é a guanina (G) e no alelo Fy(b) a base nitrogenada é a adenina (A). Isso produz um códon para glicina no aminoácido 42 no alelo Fy(a), e um códon para ácido aspártico no alelo Fy(b). Essa substituição de um aminoácido no domínio amino-terminal da proteína é suficiente para definir os dois antígenos antitéticos. Essa variação leva, então, à identificação dos fenótipos Fy(a+b), Fy(a-b) e Fy(a+b+) (JENS et al., 2005).

Esses antígenos têm como características a capacidade de serem facilmente destruídos por enzimas proteolíticas, como a papaína, bromelina, ficina e quimiotripsina, além do ZZAP, que tem a capacidade de clivar a IgG. E possuem a característica de serem desnaturados por formaldeído ou pelo aquecimento a 56°C durante 30 minutos (HARMENING, 2015).

Os anticorpos anti-Fy(a) e anti-Fy(b), por sua vez, são geralmente pertencentes à classe IgG e reagem melhor à fase da antiglobulina humana. Na presença de hemácias tratadas por enzimas como a bromelina e a papaína, a reação antígeno-anticorpo não ocorre, sendo essa uma característica útil na análise da identificação de múltiplos anticorpos no soro que contenha anti-Fy(a) ou anti-Fy(b), ou seja, na técnica laboratorial de identificação de anticorpos irregulares, os anticorpos anti-Duffy aparecem no painel de hemácias que não contenham enzimas, e desaparecem do

painel quando da presença das enzimas citadas. Desta forma, quando no soro do paciente são identificados a presença de anticorpos anti-Fy(a) ou anti-Fy(b), o mesmo deve obrigatoriamente receber sangue com ausência do antígeno correspondente para que não haja incompatibilidade na hemácia do doador com o soro do paciente (HARMENING, 2015).

Os anticorpos anti-Fy(a) e anti-Fy(b) têm grande significado clínico, já tendo sido associados a reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias, e ainda à doença hemolítica do recém-nascido (JENS et al., 2005). Estas reações, por sua vez, são mais comumente associadas ao anticorpo anti-Fy(a), que é um anticorpo encontrado com maior frequência que o anticorpo anti-Fy(b). Outrossim, as reações associadas ao anticorpo anti-Fy(b) geralmente ocorrem em associação com outros anticorpos (JENS et al., 2005; VIZZONI; COTIAS, 2013).

O anticorpo anti-Fy₃ é produzido por indivíduos com fenótipo Fy(a-b-), isto é, que não expressam nenhuma glicoproteína do grupo sanguíneo Duffy e, por conseguinte, que reagem com fenótipos Fy(a+b-) e Fy(a-b+). A gravidade da presença deste anticorpo para a prática da medicina transfusional se dá em função do mesmo não ser destruído por tratamento enzimático, mantendo a sua reatividade mesmo quando as células Fy₃ são tratadas por enzimas proteolíticas (JENS et al., 2005).

2.2.3.7 Sistema Kidd (Jk)

O sistema Kidd também foi descoberto em 1951 no soro de uma paciente cuja produção de anticorpos estava direcionada contra um antígeno eritrocitário que ocorreu durante a gravidez. Com o avanço dos estudos, se descobriu que o antígeno em questão estava presente nas hemácias do feto, e que os anticorpos maternos contra estes antígenos geravam uma doença hemolítica fatal ao seu filho recém-nascido (DEAN, 2005)

O primeiro antígeno no sistema de grupo sanguíneo Kidd a ser descoberto foi o Jk(a). Desde então, dois outros antígenos deste grupo sanguíneo já foram descritos, Jk(b) e Jk(3) (DEAN, 2005), os quais são protagonistas em várias reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias em função da forte resposta exibida por anticorpos dirigidos contra os antígenos do sistema Kidd (LAWICKI et al., 2017).

Em relação aos antígenos Jk(a) e Jk(b), estes são polimórficos na maioria das populações mundiais e encontram-se definidos por dois alelos co-dominantes autossômicos (HAMILTON, 2019).

Quanto à detecção destes antígenos, os antígenos Jk(a) já podem ser detectados em eritrócitos fetais a partir da 11ª semana de vida gestacional, e possuem maior expressão na membrana eritrocitária quando presentes em indivíduos homozigóticos Jk(a)Jk(a), em comparação a indivíduos que apresentam os antígenos em heterozigose Jk(a)Jk(b); enquanto que para o antígeno Jk(b) essa detecção já é possível a partir da 7ª semana de vida gestacional. Ambos os antígenos Jk(a) e Jk(b) já estão bem desenvolvidos ao nascimento e com capacidade imunogênica, caso não sofram alteração por enzimas proteolíticas, ZZAP, DTT, AET e difosfato de cloroquina (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Os anticorpos anti-Jk(a) e anti-Jk(b) pertencem à classe de IgG, mais especificamente das subclasses IgG1 e IgG3, com ampla capacidade de se ligar a proteínas do complemento e causar hemólise intra e extravascular, cujo efeito final são reações transfusionais hemolíticas agudas e tardias, assim como rejeição de órgãos em pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos (SANFORD et al., 2015)

A identificação desses anticorpos deve ser realizada em amostras recentes, pois os anticorpos Kidd geralmente causam reações transfusionais hemolíticas do tipo tardio, e seus títulos de anti-Jk(a) e anti-Jk(b) decaem rapidamente *in vivo*. Isso significa que um anticorpo identificado num primeiro momento pode não ser perceptível posteriormente o que torna a verificação dos registros dos pacientes com esses anticorpos previamente formados uma necessidade que não deve ser negligenciada. (VIZZONI; COTIAS, 2013).

Já os anticorpos do tipo anti-Jk3 são menos frequentes e também pertencem à classe IgG que reage com a AGH, porém, são observados em indivíduos portadores de fenótipo nulo Jk(a-b-) e reagem com os eritrócitos que expressam antígenos Jk(a)+ e Jk(b)+ (HAMILTON, 2019).

2.3 FENOTIPAGEM ERITROCITÁRIA DOS SISTEMAS SANGUÍNEOS

A fenotipagem sanguínea é a determinação da presença ou ausência de antígenos eritrocitários na membrana da hemácia. De modo geral, a hemoterapia atual tem se caracterizado pelo desenvolvimento de novas tecnologias que possam proporcionar avanços nas técnicas existente de fenotipagem eritrocitária (CASTILHO, 2008).

A imunohematologia baseia-se na pesquisa *in vitro* das possíveis interações existentes entre antígeno e anticorpo, tanto para pesquisa de antígenos na hemácia como para pesquisa de anticorpos (regulares ou irregulares) no soro dos indivíduos, por métodos de hemaglutinação, e que tem por princípio a formação de aglutinatos de hemácias após serem sensibilizadas por anticorpos. Porém, para uma interpretação precisa desta técnica é necessário conhecer bem as duas etapas da reação, isto é, conhecer bem a reação antígeno e anticorpo propriamente dita (etapa de sensibilização) e também o fenômeno de hemaglutinação (etapa da visualização), para que se possa compreender e aplicar seus fundamentos no dia-a-dia da rotina de um banco de sangue (GIRELLO; KÜH, 2011).

Hoje já existe uma grande variedade de testes para tipagem e fenotipagem dos grupos sanguíneos. Dentre esses, podemos destacar: o método de aglutinação em microplacas, que usa hemácias magnetizadas; o método de gel centrifugação e de fenotipagem em tubos, que se baseiam na presença de antissoros que contêm anticorpos previamente conhecidos; e o método de biologia molecular para a identificação dos genótipos eritrocitários. Sendo que, no caso desse último, o conhecimento das bases genéticas dos polimorfismos dos grupos sanguíneos, adquirido nos últimos anos, permitiu a aplicação da genotipagem na prática transfusional, principalmente em casos inconclusivos (DANIELS et al., 2005; WESTHOFF, 2006, MARTINS et al., 2009, GIRELLO; KÜH, 2011).

Em relação aos métodos sorológicos utilizados na fenotipagem eritrocitária, a genotipagem também tornou-se vantajosa para: a identificação do risco de doença hemolítica do recém-nascido; a determinação dos grupos sanguíneos quando os reagentes contendo anticorpos não estão disponíveis; a identificação de variantes raras; o auxílio da identificação de anticorpos irregulares; e, principalmente, a conclusão do grupo sanguíneo em pacientes que receberam transfusão recente ou

apresentam resultado positivo no teste de antiglobulina direta (TAD) (CASTILHO et al., 2002).

A determinação correta dos sistemas de grupo sanguíneo na prática transfusional, assim, mostra-se importante não apenas para prevenir problemas relacionados às incompatibilidades transfusionais, mas também para permitir o melhor uso de unidades de hemocomponentes com fenótipos menos frequentes (MARTINS et al., 2009).

2.4 AS REAÇÕES TRANSFUSIONAIS

Como já descrito anteriormente, embora a prática da transfusão de sangue seja uma tecnologia relevante na terapêutica médica capaz de salvar vidas e/ou melhorar a saúde dos pacientes, esta não é livre de riscos potenciais ao receptor, com complicações agudas ou tardias, de maior ou menor gravidade, que são chamadas de reações transfusionais (CLIMENT-PERIS; VÉLEZ-ROSARIO, 2001).

Segundo Bolton-Maggs e Cohen (2013), entende-se por reação transfusional todo e qualquer evento adverso resultante de uma transfusão sanguínea de curso durante ou após a infusão do hemocomponente. Assim, o tempo decorrido entre o ato transfusional e a reação propriamente dita permite que esta reação seja classificada como: imediata ou tardia.

São consideradas, assim, reações transfusionais imediatas aquelas que ocorrem durante a transfusão ou até 24 horas após o ato transfusional. Nesta categoria estão incluídas as seguintes reações: alterações metabólicas, reação hemolítica imune aguda, reação febril não hemolítica, reações alérgicas, sobrecarga volêmica, reação por contaminação bacteriana da bolsa, edema pulmonar não cardiogênico (TRALI - Transfusion Related Acute Lung Injury), reação hipotensiva e hemólise não imune (CALLERA et al., 2004).

Já os incidentes transfusionais que ocorrem após 24 horas do ato transfusional são chamados de reações transfusionais tardias, as quais são classificadas como: reação hemolítica imune tardia, síndromes hiperemolíticas, púrpura pós-transfusional, doença do enxerto versus hospedeiro relacionada à transfusão, aloimunização, sobrecarga de ferro e doenças infectocontagiosas, como hepatites B e C, HIV, Doença de Chagas e sífilis (BIHL et al., 2007).

Dentre estas reações transfusionais, as que são de relevância para este estudo são as reações hemolíticas imunes agudas, nas quais ocorre hemólise intravascular das hemácias transfundidas em virtude da incompatibilidade destas com o sistema imunológico do receptor, com a produção de anticorpos pré-formados na circulação do receptor. Os principais sinais e sintomas do paciente durante estas reações são: dor torácica, abdominal e no sítio da infusão, febre, hipotensão grave, calafrios, sensação de morte iminente, hemoglobinúria, insuficiência renal aguda e coagulação intravascular disseminada (SOUSA NETO; BARBOSA, 2012).

As reações hemolíticas imunes tardias podem gerar a chamada aloimunização eritrocitária, uma resposta imunológica contra antígenos eritrocitários estranhos, que ocorre geralmente devido à sensibilização do paciente após uma transfusão de sangue ou gestações. Contudo, muitos destes aloanticorpos podem não ser descobertos depois de algum tempo da sensibilização, porque a tendência é que os títulos destes anticorpos decaiam, atingindo níveis não detectáveis. Entretanto, caso este paciente precise no futuro de outra transfusão e receba antígenos estranhos para os quais já tenha sido sensibilizado, devido à memória imunológica, o mesmo desenvolverá uma resposta imune secundária bem mais rápida que a anterior que pode resultar em reação transfusional hemolítica imune tardia grave (MACHADO et al., 2018).

3 JUSTIFICATIVA

A Portaria de Consolidação Nº5, de 28 de setembro de 2017, recomenda: "... a realização da fenotipagem para os antígenos eritrocitários no sangue do receptor, dos sistemas Rh (E, e, C, c), Kell (K), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb) e MNS (S, s), para pacientes aloimunizados contra antígenos eritrocitários ou que estão ou poderão entrar em esquema de transfusão crônica, com o objetivo de auxiliar a identificação de possíveis anticorpos antieritrocitários irregulares", assim, as bolsas de sangue a serem transfundidas para estes pacientes devem ser fenótipo-compatíveis, sempre que possível. Desta forma, quanto maior o número de doadores fenotipados corretamente, menor o risco de reações transfusionais imediatas ou tardias.

Atualmente, principalmente nos Serviços de Hematologia e Hemoterapia da rede pública brasileira, um número considerável de doadores está sendo fenotipado para os grupos sanguíneos de maior importância transfusional, porém esses dados ainda têm sido pouco divulgados na literatura (MACHADO et al., 2018).

Em especial, em relação à Gerência de Imunohematologia Eritrocitária (GEMER) da Fundação Hemopa, esta prática segue o previsto na legislação vigente, contudo, com duas metodologias, uma automatizada empregada para a realização de fenotipagem eritrocitária de doadores, através do uso do equipamento IH500 da (BioRad®); e outra metodologia manual, realizada por técnicos capacitados, para a fenotipagem eritrocitária de pacientes. Porém, esta metodologia automatizada para a fenotipagem de amostras de doadores, que anteriormente era realizada manualmente e somente uma única vez, só começou a ser utilizada na fundação a partir de 2017, com a aquisição do equipamento supracitado, e após uma determinação da AABB (Associação Americana de Banco de Sangue), para que todo doador que tivesse sua fenotipagem realizada uma vez, deveria também ter sua fenotipagem retestada e confirmada em uma próxima doação. Assim, muitos doadores que foram fenotipados primeiramente pela técnica manual, estão sendo retestados atualmente pela técnica automatizada.

Desta forma, visando diminuir o tempo e os riscos de erros operacionais que envolvem a técnica manual de fenotipagem eritrocitária em amostras de doadores de sangue, é que este estudo se propôs a avaliar o impacto da automação no método de fenotipagem eritrocitária nas amostras destes doadores.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da implantação da automação no método de fenotipagem eritrocitária, através do uso do equipamento IH500 (BioRad®), para amostras de doadores de sangue atendidos na Gerência de Imunohematologia Eritrocitária da unidade coordenadora da Fundação HEMOPA.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o nível de concordância entre os conjuntos de dados obtidos através das técnicas de fenotipagem eritrocitária: manual e automatizada;
- Avaliar o número de casos discordantes de fenotipagens eritrocitárias testados entre as técnicas manual e automatizada;
- Comparar o quantitativo de resultados de fenotipagem eritrocitária liberados anualmente após a implantação da metodologia automatizada.

5 METODOLOGIA

5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Estudo de caráter transversal e analítico realizado com 2.700 amostras de doadores da rotina da Gerência de Imunohematologia Eritrocitária do Hemocentro Coordenador da Fundação HEMOPA, que procuraram a referida fundação para realizar doação de sangue voluntária, no período de janeiro a dezembro de 2019.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo doadores de sangue com idade igual ou superior a 16 anos, de ambos os gêneros, que: possuíam residência fixa na área metropolitana de Belém e Ananindeua; preferencialmente doadores de repetição, tendo realizado no mínimo duas doações no Hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA; já apresentassem resultado negativo para sorologia e para pesquisa de doença hematológica; e que realizaram os testes de rotina de fenotipagem eritrocitária com as amostras estando armazenadas por no máximo 72 horas.

5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os doadores de sangue cujas amostras estiveram coaguladas.

5.4 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido a um comitê de ética para aprovação segundo a Resolução CNS N.º 466, de 12 de dezembro de 2012. Contudo, por tratar-se de um estudo sem envolvimento direto dos pesquisadores com os participantes da pesquisa, os pesquisadores assinaram um termo de responsabilidade e confidencialidade e uso de dados e solicitaram a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os documentos foram apresentados junto com o projeto ao CEP para aprovação e ainda aguardam a resposta.

5.4.1 Riscos

Pelo presente projeto não houve nenhum risco grave para a participação dos sujeitos da pesquisa neste estudo. Um possível risco seria a perda de sigilo dos dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, o qual foi amenizado pela utilização de numeração própria da Fundação HEMOPA que permitiu a identificação dos sujeitos da pesquisa durante todo o estudo, ficando os dados pessoais dos mesmos sob guarda restrita dos pesquisadores do estudo.

5.4.2 Benefícios

Os dados obtidos neste estudo são de grande utilidade, pois permitem a verificação do impacto do equipamento de automação em imunohematologia IH500 (BioRad®), utilizado na rotina de fenotipagem eritrocitária de doadores de sangue da Fundação HEMOPA, para os antígenos Rh (E, e, C, c), Kell (K), k, Kp (Kpa, Kpb), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb), MNS (S, s), Lewis (Lea, Leb), P1 e Lutheran (Lua, Lub).

5.5 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram utilizadas amostras de sangue venoso, anti-coagulado com EDTA, de doadores de sangue que procuraram o hemocentro coordenador da Fundação HEMOPA, no período de janeiro a dezembro de 2019 e que atenderam aos critérios de inclusão.

5.6 FENOTIPAGEM ERITROCIÁRIA POR METODOLOGIA MANUAL

Todas as amostras de doadores de sangue selecionadas, conforme os critérios de inclusão, foram submetidas à fenotipagem eritrocitária para os antígenos Rh (E, e, C, c), Kell (K), k, Kp (Kpa, Kpb), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb), MNS (S, s), Lewis (Lea, Leb), P1 e Lutheran (Lua, Lub) por metodologia manual e, posteriormente, por metodologia automatizada através do equipamento IH500 (BioRad®).

A técnica de fenotipagem eritrocitária manual foi realizada para a análise de antígenos presentes na membrana das hemácias do doador, utilizando antissoros específicos para cada antígeno, presentes nos cartões de microtubos da BioRad® (fabricante: DiaMed) suspensos em gel Sephadex.

Para a fenotipagem dos sistemas Rh (C, c, E, e) e Kell foram preparadas suspensões de hemácias na proporção 1:20, isto é, 0,5 ml do diluente-2 (Liss) e 25 µl do concentrado de hemácias, com posterior dispensação de 12,5 µl desta solução em cada microtubo do cartão que contém anticorpos anti-C, anti-c, anti-E, anti-e e anti-K de origem humana, suspensos em gel.

Para a fenotipagem dos sistemas MNS (S e s) e Duffy (Fya, Fyb), por sua vez, foram preparadas suspensões de hemácias na proporção 1:100, isto é, 1.000 µl do diluente-2 (Liss) e 10 ou 12,5 µl do concentrado de hemácias, com posterior dispensação de 50 µl desta solução em cada microtubo do cartão que contém 2 microtubos com gel neutro e 4 microtubos com antiglobulina humana poliespecífica (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal) suspensos em gel. Posteriormente, foram adicionados, em cada microtubo, os respectivos anti-soros anti-M, anti-N, anti-S, anti-Fya e anti-Fyb, com incubação por 10 minutos em temperatura ambiente (18 a 25°C).

Já para a fenotipagem dos sistemas P1, Lewis (Lea, Leb) e Lutheran (Lua, Lub) foram preparadas suspensões de hemácias a 5% com diluente-1 (Bromelina) na proporção 1:20, isto é, 0,5 ml do diluente-1 e 25 µl do concentrado de hemácias, com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, e posterior dispensação de 10 µl desta solução em cada microtubo do cartão que contém anticorpos monoclonais anti-P1, anti-Lea, anti-Leb, e policlonais anti-Lua, anti-Lub de origem humana suspensos em gel.

E por fim, a fenotipagem dos sistemas k, Kp (Kpa, Kpb) e Kidd (JKa, JKb) que foi realizada através da preparação de suspensões de hemácias também a 5% com diluente-1 (Bromelina) e na proporção 1:20, isto é, 0,5 ml do diluente-1 e 25 µl do concentrado de hemácias com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, e posterior dispensação de 10 µl em cada microtubo do cartão que contém anticorpos policlonais anti-k humano, anti-Kpa humano, anti-Kpb humano, anti-Jka monoclonal e anti-Jkb monoclonal suspensos em gel.

Os cartões foram, então, centrifugados a 910 rpm por 10 minutos e, posteriormente, foi realizada a leitura das reações conforme os padrões da aglutinação em gel teste apresentados na Figura 3.

Figura 3: Padrões de aglutinação em microtubos suspensos em gel



(Fonte: SCCHÖRNER, 2017)

5.7 FENOTIPAGEM ERITROCIÁRIA POR METODOLOGIA AUTOMATIZADA

Em seguida à fenotipagem eritrocitária manual de amostras de doadores de sangue da unidade coordenadora da Fundação Hemopa, foi realizada fenotipagem automatizada das mesmas através do equipamento IH500 (BioRad®), para os fenótipos Rh (E, e, C, c), Kell (K), k, Kp (Kpa, Kpb), Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb), MNS (S, s), Lewis (Lea, Leb), P1 e Lutheran (Lua, Lub).

O equipamento IH500 (BioRad®) utiliza como metodologia de análise a técnica de Gel-centrifugação, uma microtécnica baseada no uso de cartões contendo microtubos com Gel Sephadex ou Poliacrilamida, que são analisados quanto às reações de aglutinação entre o complexo antígeno-anticorpo (positivo para o antígeno pesquisado) ou hemácias sem reatividade (negativo para o antígeno pesquisado) através do software de gerenciamento de dados e interpretação de resultados - IHCom (BioRad®).

5.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Como métodos a serem adotados para a avaliação entre as duas metodologias, manual e automatizada, foram realizados métodos de estatística descritiva das variáveis qualitativas para determinação das frequências absolutas e percentuais, sendo estimado para margem de erro esperada que não ocorram resultados discordantes em mais de 5% do total de amostras analisadas.

Os dados discordantes entre as duas técnicas foram avaliados por análise comparativa através da aplicação do Teste Coeficiente Kappa, para descrever a intensidade de concordância entre os dois métodos.

O coeficiente Kappa é calculado pela fórmula:

$$Kappa = \frac{P(O) - P(E)}{1 - P(E)}$$

onde P(O) é a proporção observada de concordâncias (soma das respostas concordantes dividida pelo total) e P(E) a proporção esperada de concordâncias (soma dos valores esperados das respostas concordantes dividida pelo total).

Este teste permite avaliar tanto se a concordância está além do esperado tão somente pelo acaso, quanto o grau dessa concordância. A interpretação dos valores obtidos está representada de acordo com o Quadro 1, segundo a classificação de Landis e Koch, 1977 (apud PAES, 2012).

Quadro 1: Diferentes níveis de concordância de acordo com Landis e Koch, 1977

Valor do coeficiente Kappa	Interpretação
<0	Sem concordância
0-0.19	Concordância pobre
0.20-0.39	Concordância fraca
0.40-0.59	Concordância moderada
0.60-0.79	Concordância substancial
0.80-1.00	Concordância quase perfeita

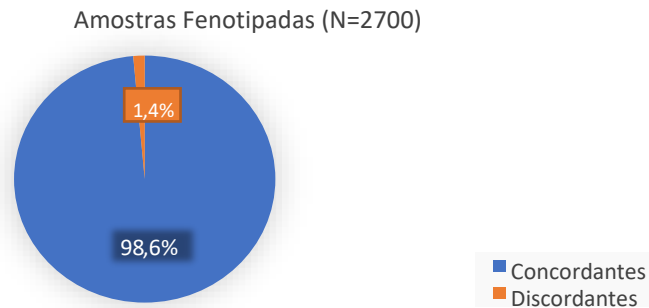
(Fonte: PAES, 2012)

6 RESULTADOS

O método de automação para a fenotipagem eritrocitária em amostras de doadores de sangue da unidade coordenadora da Fundação HEMOPA só foi implantado no ano de 2018. Contudo, foi somente no ano seguinte (2019) que todas as amostras de doadores de sangue dessa fundação passaram a ser, efetivamente, fenotipadas e confirmadas pela metodologia automatizada. Assim, nesse ano foi realizado um total de 7.542 fenotipagens de amostras de doadores de sangue por essa metodologia, dentre as quais abrangem: fenotipagens realizadas apenas uma vez, pois o doador ainda não realizou nova doação para efetiva confirmação de resultado; fenotipagens incompletas, realizadas em determinados sistemas de grupos sanguíneos; fenotipagens realizadas em duas doações diferentes pela metodologia automatizada; e, finalmente, as que foram contempladas neste estudo, fenotipagens realizadas pela automação cujos doadores continham resultado pela metodologia manual. Esta quantidade de amostras de doadores fenotipados no ano de 2019 demonstra um aumento de 1.649 (27,9%) fenotipagens realizadas a mais quando comparadas ao período do ano anterior, quando as fenotipagens eritrocitárias foram realizadas exclusivamente pela metodologia manual.

Desse total, 2.700/7.542 (35,8%) amostras fenotipadas foram incluídas neste estudo após fenotipagem eritrocitária manual e automatizada, no período de janeiro a dezembro de 2019, para a efetiva análise comparativa dos resultados, onde observou-se que 2.662/2.700 (98,6%) amostras fenotipadas foram concordantes para todos os fenótipos pesquisados através das duas metodologias (Gráfico 1).

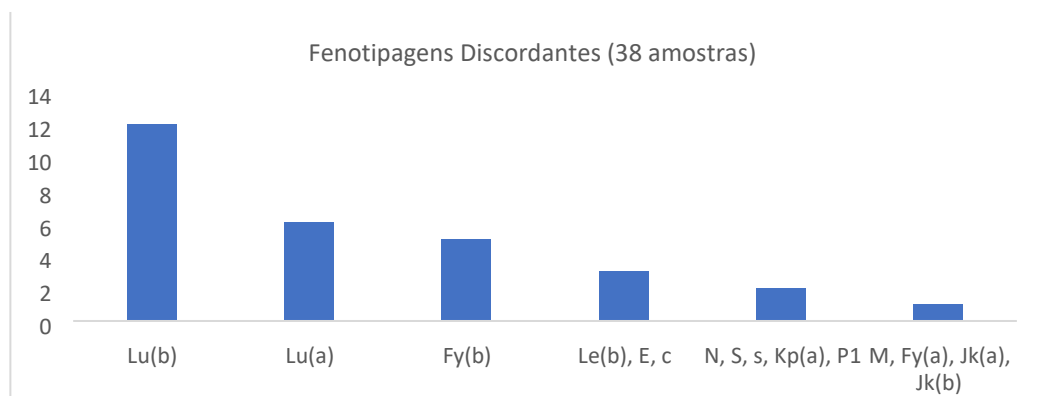
Gráfico 1 - Percentual de amostras de doadores de sangue, da unidade coordenadora da Fundação HEMOPA, que foram concordantes ou discordantes após fenotipagem eritrocitária por metodologias manual e automatizada no período de janeiro a dezembro de 2019



(Fonte: Dados obtidos junto à Gerência de Imunohematologia da Fundação HEMOPA, 2019)

Do total de amostras fenotipadas e incluídas nesse estudo, 38/2.700 (1,4%) foram discordantes entre as duas metodologias. Dessas, 02/38 (5,3%) foram discrepantes para dois fenótipos na mesma amostra; 01/38 (2,6%) foi discrepante para cinco fenótipos na mesma amostra, e 12/38 (31,6%) amostras tiveram o fenótipo eritrocitário **Lu(b)** como o principal fenótipo causador de discrepância entre as técnicas, seguido do fenótipo **Lu(a)** associado a casos de fenotipagem eritrocitária discordantes para 6/38 (15,8%) das amostras (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Frequência de fenótipos eritrocitários em amostras de doadores de sangue, da unidade coordenadora da fundação HEMOPA, que foram discordantes quando testadas pelas metodologias manual e automatizada no período de janeiro a dezembro de 2019



(Fonte: Dados obtidos junto à Gerência de Imunohematologia da Fundação HEMOPA, 2019)

Ainda em relação aos fenótipos de grupos sanguíneos discordantes, porém, que tiveram menor frequência, podemos destacar o fenótipo **Fy(b)** detectado como discordante em 5/38 (13,1%) das amostras testadas; os fenótipos **Le(b)**, **E**, **c** envolvidos em 3/38 (7,9%) dos casos discordantes; os fenótipos **N**, **S**, **s**, **Kp(a)**, **P1** encontrados em 2/38 (5,3%) das amostras discordantes; e os fenótipos **M**, **Jk(a)**, **Jk(b)**, **Fy(a)** que foram observados discordantes em apenas 1/38 (2,6%) das amostras testadas.

Para essas amostras discordantes foi realizada análise estatística através do teste de coeficiente Kappa, que permite avaliar tanto se a concordância está além do esperado tão somente pelo acaso, quanto o grau dessa concordância entre as amostras. Assim, nossos resultados evidenciaram que existe uma excelente replicabilidade para todos os fenótipos envolvidos e testados entre as metodologias manual e automatizada. Quanto mais o valor de Kappa se aproxima de 1, maior é considerada a concordância entre os dados, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Teste de coeficiente Kappa nas amostras de fenotipagens discordantes entre as duas metodologias: manual e automatizada

Fenótipo	Concordância Observada	Kappa	p (unilateral)	Conclusão de Replicabilidade
Lu(b) (12/38)	0.9956	0.8615	<0,0001	Excelente
Lu(a) (06/38)	0.9978	0.9257	<0,0001	Excelente
Fy(b) (05/38)	0.9982	0.9374	<0,0001	Excelente
Le(b),E,c (03/38)	0.9989	0.9615	<0,0001	Excelente
N,S,s,Kp(a),P1 (02/38)	0.9993	0.9740	<0,0001	Excelente
M,Jk(a),Jk(b),Fy(a) (01/38)	0.9996	0.9868	<0,0001	Excelente

(Fonte: Adaptado de AYRES, 2007)

7 DISCUSSÃO

Os avanços científicos e tecnológicos recentes têm favorecido a implementação da automação nos vários ramos da medicina laboratorial por gerar benefícios importantes ao paciente como: menor tempo no processamento e análise das amostras, menor tempo na liberação dos resultados, além de maior precisão e segurança no diagnóstico (CAMPANA; OFLUSTIL, 2011).

O emprego da automação na prática laboratorial, de um modo geral, tem também muitas outras vantagens para a instituição e seus colaboradores como: aumento da produtividade, redução da exposição dos colaboradores a riscos biológicos e ergonômicos, e principalmente, maior nível de segurança em todas as fases do processamento das amostras com a obtenção de resultados precisos (CAMPANA; OFLUSTIL, 2011).

Especificamente em bancos de sangue, muitos benefícios têm sido observados a partir da implementação de metodologias automatizadas, como por exemplo, o aumento da segurança transfusional através da minimização dos erros de processamento manual de amostras, melhor otimização do uso de insumos e liberação mais rápida dos resultados (GUPTA, 2015).

Neste sentido, o presente estudo mostrou resultados semelhantes aos observados por outros autores (Schoenfeld et al, 2010; Bhagwat et al, 2015; Park et al, 2019) que compararam a fenotipagem de grupos sanguíneos também por técnicas manuais e automatizadas, e ainda o impacto da automação em laboratórios de imunohematologia de bancos de sangue.

Na Índia, Bhagwat et al (2015) em seus estudos observaram uma concordância de 95,1% entre a tipagem ABO/Rh de 1.000 amostras testadas através das técnicas manuais e automatizadas. Schoenfeld et al (2010), por sua vez, analisaram a fenotipagem eritrocitária de 304 amostras para os grupos sanguíneos ABO/Rh e Rh+Kell realizadas por técnicas manuais e automatizadas e obtiveram concordância de 100% entre essas metodologias.

Park et al (2019), utilizando equipamento de automação para fenotipagem eritrocitária semelhante ao utilizado em nosso estudo (IH500 - BioRad®), observaram 100% de concordância entre as técnicas manual e automatizada após testagem de 200 amostras de sangue para os grupos sanguíneos ABO/Rh. Porém, não foi

encontrado na literatura nenhum relato que tenha realizado estudo comparativo de fenotipagem eritrocitária estendida utilizando as técnicas manual e automatizada.

Quanto ao impacto da implantação da metodologia de automação para fenotipagem eritrocitária de amostras de doadores de sangue, através da utilização do equipamento IH500 (BioRad®), na Gerência de Imunohematologia da Fundação HEMOPA, nossos dados mostraram 98,6% de concordância com os resultados obtidos a partir da técnica manual, contudo, o maior impacto observado foi o aumento de 27,9% amostras de doadores fenotipadas com painel expandido em relação ao mesmo período do ano anterior, quando a metodologia utilizada na época era exclusivamente manual.

Esse número demonstra, portanto, que o aumento da capacidade de processamento e análise de amostras de sangue de doadores para o painel expandido de fenotipagem eritrocitária, através da metodologia de automação, amplia em muito a possibilidade de detecção de doadores com fenótipos raros na população e ainda a de transfusões de bolsas de concentrados de hemácias fenótipo-compatível.

Nosso estudo abriu ainda uma série de possibilidades futuras, pois sendo o Estado do Pará uma unidade da federação brasileira de grandes extensões territoriais e muita dificuldade de logística de transporte, parece-nos razoável pensar que se cada unidade de hemocentros regionais da Hemorrede Estadual pudesse ter seu próprio banco de dados com doadores de sangue fenotipados, isso diminuiria as dificuldades de logística de transporte e de tempo de envio de bolsa de concentrados de hemácias fenotipadas para fenótipos raros para pacientes atendidos nessas localidades e adjacências. Portanto, a sugestão deste estudo é para que se estenda a pesquisa de fenotipagem eritrocitária em amostras de doadores de sangue da Hemorrede.

8 CONCLUSÃO

O nível de concordância entre os conjuntos de dados obtidos através das técnicas de fenotipagem eritrocitária manual e automatizada foi de 98,6%, enquanto que o número de casos discordantes detectados foi de apenas 1,4%. Por sua vez, a implantação da metodologia de fenotipagem eritrocitária automatizada aumentou a capacidade de análise do setor de imunohematologia da Fundação HEMOPA em 27,9% amostras de doadores fenotipadas a mais que o total analisado para o mesmo período do ano anterior, quando a metodologia utilizada na época era exclusivamente manual.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARORA, S.; DODA, V.; MARIA, A.; KOTWAL, U.; GOYAL, S. Maternal anti-M induced hemolytic disease of newborn followed by prolonged anemia in newborn twins. **Asian J Transfus Sci.** v.9, n.1, p 98-101, **2015**.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. 2007. **Bioestat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, **2007**. 324 p.

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L.M.M. Aloimunização. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** Rio de Janeiro, v.31, n.6, p.311-319, **2009**.

BAPTISTA, M.W.; NARDIN, J.M.; STINNGHEN, S.T. Aloimunização eritrocitária em pacientes de um hospital infantil atendido pelo Instituto Paranaense de Hemoterapia e Hematologia, de 2007 a 2010. **Cad Esc Saúde.** Curitiba, v.2, n.6, p.131-142, **2011**.

BARJAS-CASTRO, M.L. **Imunohematologia do doador e do receptor**. In: BRASIL. Ministério da Saúde. **Técnico em Hemoterapia**. Secretaria de Gestão do Trabalho e Educação na Saúde. Departamento de Gestão do Trabalho na Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, **2013**. 294 p.

BATISSOCO, A.C.; NOVARETTI, M.C.Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto, v. 25, n. 1, p.47-58, **2003**.

BEIGUELMAN, B. **Os Sistemas Sanguíneos Eritrocitários**. 3. ed. São Paulo: Funpec, **2003**. 235 p.

BIHL, F.; CASTELLI, D.; MARINCOLA, F.; DODD, R.Y.; BRANDER, C. Transfusiontransmitted infections. **Journal of Translational Medicine**, v.5, n.25, p.1-11, **2007**.

BOLTON-MAGGS, P.H.B.; COHEN, H. Serious Hazards of Transfusion (SHOT) haemovigilance and progress is improving transfusion safety. **British Journal of Haematology**, v.163, n.3, p.303–314, **2013**.

BONIFÁCIO, S.L.; NOVARETTI, M.C.Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São Paulo, v. 31, n. 2, p.104-111, **2009**.

BHAGWAT, S.N.; SHARMA J.H.; JOSE J.; MALI C.J. Comparison and automated techniques for blood grouping and crossmatching: experience from tertiary care centre. **J. Lab. Physicians.** v.7, n.2, p.96-102, **2015**.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Técnico em Hemoterapia**. Secretaria de Gestão do Trabalho e Educação na Saúde. Departamento de Gestão do Trabalho na Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, **2013**. 294 p.

BUCARDO, F.; NORDGREN, J.; REYES, Y.; GONZALEZ, F.; SHARMA, S.; SYENSSON, L. The Lewis A phenotype is a restriction factor for Rotateq and Rotarix vaccine-take in Nicaraguan children. **Scientific Reports** v.8, n.1502, p.1-8, **2018**.

CALLERA, F.; SILVA, A.C.O.; MOURA, A.F.; MELO, D.B.; MELO, C.M.T.P. Descriptions of acute transfusion reactions in a Brazilian Transfusion Service. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto, v.26, n.2, p.78-83, **2004**.

CAMPANA, G.A.; OFLUSTIL, C.P.; Conceitos de automação na medicina laboratorial: revisão de literatura. **J Bras Patol Med Lab.** v.47, n.2, p.119-127, **2011**.

CASTILHO, L.; PELLEGRINO JÚNIOR, J. Blood Group Genotyping. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** São José do Rio Preto, v. 26, n. 2, p.135-140, **2004**.

CASTILHO, L.; PELLEGRINO JÚNIOR, J.; REID, M.E. **Fundamentos de Imunohematologia**. São Paulo: Atheneu, **2015**. 230p.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; BIANCO, C.; PELLEGRINO JR., J; ALBERTO, F.L.; SAAD, S.T. DNA-based typing of blood groups for the management of multiplytransfused sickle cell disease patients. **Transfusion**. v.42, n.2, p.232-238, **2002**.

CLIMENT-PERIS, C.; VÉLEZ-ROSARIO, R. Immediate transfusion reactions. **P R Health Sci J**. Porto Rico, v.20, n.3, p.229-235, **2001**.

CORVELO, T.C.O.; LOIOLA, R.S.P.; AGUIAR, D.C.F.; MATOS, G.C.B.; BRITO, D.C. The Lewis Histo-Blood Group System: Molecular Analysis of the 59T>G, 508G>A, and 1067T>A Polymorphisms in an Amazonian Population. **PLoS One**, v.8, n.7, **2013**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3726698/>
Acesso em: junho de 2019.

DANIELS, G. ABO, Hh, and Lewis systems. In: _____ (Org) **Human Blood Groups**. 2. ed. Nova Jersey: Blackwell Science, **2012**. p.7-67.

_____ Lutheran. **Imunohematology**. v.25, n.4, p.152-159, **2009**.

DANIELS, G; VAN DER SCHOOT, CE; OLSSON, ML. Report of the First International Workshop on molecular blood group genotyping. **Vox Sang**. v.88, n.2, p. 136-142, **2005**.

DEAN, L. **Blood Groups and Red Cell Antigens**. National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD (US), 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2270/?report=reader>. Acesso em: julho de 2019.

EYLER, C.E.; TELEN, M.J. The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor. **Transfusion**. v.46, n.4, p.668-677, **2006**.

FERREIRA, A.M.; CASTRO, M.D.L.R.B.; MURADOR, P.; RAMOS, R.S.; CASTILHO, S.L. **Imunohematologia Laboratorial**. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência – Brasília: Ministério da Saúde, **2014**. 60p.

FIDLARCZYK, D.; FERREIRA, S.S. **Enfermagem em hemoterapia**. Rio de Janeiro: MedBook, **2008**. 206 p.

GARRATTY, G.; TELEN, M.J.; PETZ, L.D. Red cell antigens as functional molecules and obstacles to transfusion. **American Society of Hematology**, Washington, v.1, p.445-462, **2002**.

GIRELLO, A.L.; KÜH, T.I.B.B. **Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária**. 3. ed. São Paulo: Senac, **2011**. 303 p.

GUPTE, S.C. Automation in Blood Centre: Its impact on Blood Safety. **Asian J Transfus Sci**. v.9, n.1, p. S6–S10, **2015**.

HAMILTON, J.K. Kidd Blood Group System: outwardly simple with hidden complexity. **ISBT Science Series**. Toronto, v.14, n.1, p. 3-8, **2019**.

HARMENING, M.D. **Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão**. 6. ed. Rio de Janeiro: Revinter, **2015**. 684 p.

HEMOPA, 2019. **GEMER-POP-010- Fenotipagem Eritrocitária**. Rev. 9

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20. ed. São Paulo: Manole, **2008**. 304p.

ISBT – Disponível em: <http://isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogeneticsand-blood-group-terminology/>. Acesso em: agosto de **2020**.

JENS, E.; PAGLIARINI, T.; NOVARETTI, M.C.Z. Sistema de Grupo Sanguíneo Duffy: Biologia e Prática Transfusional. **Rev Bras Hematol Hemoter**. São José do Rio Preto, v. 27, n.2, p.110-119, **2005**.

LAWICKI, S.; COVIN, R.B.; POWERS, A.A. The Kidd (Jk) Blood Group System. **Transfusion Medicine Reviews**. v.31, n.3, p.165-172, **2017**.

LI, S.; MO, C.; HUANG, L.; SHI, X.; LUO, G.; JI, Y.; FRANG, Q. Hemolytic disease of the fetus and newborn due to alloanti-M: three chinese case reports and a review of the literature. *Transfusion*. v.59, n.1, p. 385-395, **2019**.

MACHADO, A.C; SELL, A.M.; MACEDO, L.C.; REIS, P.G.; VISENTAINE, J.E.L. Frequências fenotípicas dos grupos sanguíneos Kell, Duffy e Kidd em doadores de sangue do Hemonúcleo de Apucarana, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.50, n.2, **2018**. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/frequencias-fenotipicas-dos-grupos-sanguineos-kellduffy-e-kidd-em-doadores-de-sangue-do-hemonucleo-de-apucarana-sul-do-brasil/>.

Acesso em: março de 2019.

MARTINS, M.L.; CRUZ, K.V.D.; SILVA, M.C.F.; VIEIRA, Z.M. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, vol.31, n.4, p.252-259, **2009**.

MAKROO, R.N.; ARORA, B.; BHATIA, A.; CHOWDHRY, M.; LUKA, R.N. Clinical Significance of Antibody Specificities to M, N and Lewis Blood Group System. **Asian Journal of Transfusion Science**. v.8, n.2, p.96-99. **2014**.

NARDOZZA, L.M.M; SZULMAN, A.; BARRETO, J.A.; JUNIOR, E.A.; MORON, A.F. The molecular basis of RH system and its applications in obstetrics and transfusion medicine. **Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo, v.56, n.6, p.724-728, **2010**.

NEEDS, M. The Lewis Blood Group System and Secretor Status. **The Biomedical Scientist**, p.26-29, **2019**. Disponível em : <https://thebiomedicalscientist.net/science/lewis-blood-group-system-and-secretorstatus>. Acesso em: março de 2019.

NOVARETTI, M.C.Z.; DORLHIAC-LLACER, P.E.; CHAMONE, D.A.F. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. **Rev Bras Hematol Hemoter**. São José do Rio Preto, v.22, n.1, p.23-32, **2000**.

NYDEGGER, U.E.; FLEGEL, W.A. Histo-blood group antigens as allo – and/or autoantigens. **4th International Congress Autoimmunity**. Budapest, **2004**.

Disponível em: <https://slideplayer.com/slide/2299645/>

Acesso em: novembro de 2019

PAES, A.T. Por dentro da Estatística. **Educ Contin Saúde Einstein**. São Paulo, v.10, n.4, p.165-166, **2012**.

PARK, S.H.; KIM, J.; LIM, J.H.; JEONG, J.; LEE, S.H. Performance evaluation of automated immunohematology analyzer IH 500 for blood bank testing. **Indian J Hematol Blood Transfus**. v.35, n.4, p. 731-735, **2019**.

PROIETTI, A.B.F.C.; CIOFFI, J.G.M. Hemovigilância: verificação final da qualidade da transfusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. São José do Rio Preto, v.30 n.3, **2008**.

SAITO, M. **Hemovigilância: eventos transfusionais adversos antes e após implantação de um Comitê Transfusional Hospitalar**. 2010. 77p. Dissertação: (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, **2010**.
Disponível em : <<http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000160230>>
Acesso em: março de 2019.

SANFORD, K.W.; BOURIKIAN, S.; McCLAIN, A.; CURTIS, K. Development and detection of Kidd Antibodies. **Lab Med Summer**. v.46, n.3, p.235-240, **2015**.

SARAIVA, J.C.P. A história da Hemoterapia no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. São José do Rio Preto, v.27, n.3, p.153-158, **2005**.

SCHÖRNER, E.J. **Curso de boas práticas no ciclo do sangue**. Triagem laboratorial-Imuno-hematologia do doador. **2017**. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/4048533/5007342/Imunohematologia_doador+Curso+RS+09.08.17.pdf/e23b7080-d39b-4493-b038-4bd52b0a76c7 Acesso em: outubro de 2019.

SCHOENFELD, H.; PRETZER, K.J.; HEYMANN, C.V.; NEUNER, B.; KALUS, U.; KIESEWETTER, H.; PRUSS, A. Validation of a hospital-laboratory workstation for immunohematological methods. **Transfusion**. v.50, n.1, p.26-31, **2010**.

SINGER, S.T.; WU, V.; MIGNACCA, R.; KUYPERS, F.A.; MOREL, P.; VICHINSKY, E.P. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly asian descent. **Blood**. Washington, v. 96, n. 10, p.3369-3373, **2000**.

SOUSA NETO, A.L.; BARBOSA, M.H. Incidentes transfusionais imediatos: revisão integrativa da literatura. **Acta Paul Enferm**. São Paulo, v.25, n.1, p.146-150, **2012**.

SQUIRES, J.E., Risks of transfusion. **South Med J**. v.104, n.11, p.762-769. **2011**.

TOREZAN, G.; SOUZA, E.N. Transfusion of blood products: are the nurses prepared to care for peritransfusion? **Revista de Enfermagem da UFPE**. v.4, n. 2, p.658-665, **2010**.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo: Atheneu, **2005**. 303 p.

VIZZONI, A.G.; COTIAS, P.M.T. **Imuno-hematologia eritrocitária**. In: OLIVEIRA, M.B.S.C de; RIBEIRO, F. C.; VIZZONI, A. G. (Org). **Conceitos Básicos e Aplicados em Imuno-hematologia**. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio – Biblioteca Emília Bustamante - Rio de Janeiro: EPSJV, **2013**. p. 65-97.

WESTHOFF, CM. Molecular testing for transfusion medicine. **Curr Opin Hematol.** v.13, n.6, p.471-475, **2006.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

TERMO DE COMPROMISSO DE USO E GUARDA DE DADOS (TCUGD)

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo intitulado: “Avaliação do Impacto da Automação no Método de Fenotipagem Eritrocitária em Amostras de Doadores de Sangue da Fundação HEMOPA”, e abaixo assinados, se comprometem em fazer uso dos dados obtidos neste estudo apenas para fins científicos e restritos ao projeto em questão, resguardo a identidade de todos os envolvidos e mantendo a confidencialidade de seus dados. Sob pena de quebra de sigilo prevista na resolução 466/2012 da CONEP e penalidades jurídicas previstas no código civil brasileiro vigente.

Belém, 29 de novembro de 2019.

Nome: Prof Dr Lacy Cardoso de Brito Junior RG:
1600092

Nome: Luciana Corrêa Carneiro
RG: 2933404



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO-TCLE**

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo intitulado: “Avaliação do Impacto da Automação no Método de Fenotipagem Eritrocitária em Amostras de Doadores de Sangue da Fundação HEMOPA”, abaixo assinados, solicitam perante este Comitê de Ética em Pesquisa, a dispensa da utilização do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE para a coleta de dados, tendo em vista que somente serão utilizados os dados obtidos a partir do estudo de material já coletado, através da identificação das amostras apenas pelo número da amostra gerado no momento do cadastro da doação de sangue, sem acesso a nenhuma informação pessoal dos doadores.

Nestes termos, os pesquisadores se comprometem a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução CNS nº 466/12 e suas complementares.

Belém, 29 de novembro de 2019.

Nome: Prof Dr Lacy Cardoso de Brito Junior RG:
1600092

Nome: Luciana Corrêa Carneiro RG:
2933404

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

- C289a Carneiro, Luciana Correa.
Avaliação do impacto da automação no método de
fenotipagem eritrocitária em amostras de doadores de
sangue da fundação Hemopa / Luciana Correa Carneiro. —
2020.
48 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior
Coorientador(a): Prof. Dr. Carlos Eduardo de Melo
Amaral
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Análises Clínicas, Belém, 2020.
1. Imuno-hematologia. 2. Grupos Sanguíneos. I.
Título.

CDD 612.11
