



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Aline Trombini Rodrigues

**Aloimunização dos doadores de sangue como fonte de
anti-soros e hemácias raras**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Valéria Nogueira Dias Paes Secco

**Botucatu
2016**

Aline Trombini Rodrigues

Aloimunização dos doadores de sangue como fonte
de anti-soros e hemácias raras

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre(a) em Pesquisa e
Desenvolvimento: Biotecnologia
Médica

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Valéria Nogueira Dias Paes Secco

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nogueira Dias Paes Secco, Valéria.

Aloimunização dos doadores de sangue como fonte de
anti-soros e hemácias raras / Valéria Nogueira Dias Paes
Secco. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Valéria Nogueira Dias Paes Secco
Capes: 21100004

1. Doadores de sangue. 2. Formação de anticorpos.
3. Eritrócitos. 4. Anticorpos. 5. Antígenos.

Palavras-chave: Aloimunização; Anticorpos
antieritrocitários; Antígenos de grupos sanguíneos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar capacidade, paciência, perseverança e fé para chegar até aqui.

Aos meus pais e irmão, Carlos, Claudete e Pedro, pelo amor, força, paciência e incentivo.

À Prof^a Dr^a Valéria por todo o apoio, incentivo, carinho, atenção, dedicação, confiança em mim depositada. Por todas as vezes que se mostrou muito mais que uma profissional, serei eternamente grata.

À Prof^a Dr^a Patrícia, por sempre me incentivar, acreditar em mim, buscando sempre o meu melhor. Por toda dedicação e apoio desde a faculdade. Obrigada pelo zelo e carinho.

Ao Hélio pela análise estatística, pela maneira prestativa e humilde que me recebeu.

Ao meu amigo Fernando, a quem sou muito grata por todos os ensinamentos, toda dedicação, todo carinho, todo apoio que me deu durante esses anos.

Às minhas amigas Denise e Adaíze por todos os ensinamentos, pela amizade, experiências profissionais e de vida compartilhadas. Por todo apoio que sempre me deram!

À Ms^a Inês, por toda a aprendizagem e carinho.

À minha amiga Caroline, que sempre me ajudou em tudo o que precisei. Sempre muito disposta, atenciosa, amiga, companheira.

Aos funcionários da transfusão e hemocomponentes pela aprendizagem, apoio e amizade que me proporcionaram.

Aos doadores de sangue por toda a ajuda necessária, contribuindo para a realização deste trabalho.

Direção e funcionários do Hemocentro de Botucatu, que de alguma maneira contribuíram com este trabalho.

Resumo

Rodrigues, AT, Secco, VNDP. Aloimunização dos doadores de sangue como fonte de anti-soros e hemácias raras.

O conhecimento dos fenótipos eritrocitários de doadores de sangue é um procedimento essencial na prática transfusional, o qual aumenta a eficácia e a segurança do ato transfusional, além de prevenir a aloimunização. Os antígenos eritrocitários são clinicamente significantes na medicina transfusional, por serem altamente imunogênicos e pela possibilidade de causarem reações transfusionais, aloimunizações, anemias hemolíticas autoimunes e doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN). A incidência de aloimunização à antígenos eritrocitários é alta em pacientes politransfundidos, principalmente nos portadores de hemoglobinopatias e em pacientes submetidos a transplantes. O objetivo deste trabalho foi elaborar um banco de doadores de hemácias com diferentes fenótipos e painéis contendo soros e plasmas com anticorpos de importância clínica para atender e agilizar a transfusão de receptores de sangue alossensibilizados. Foi realizado um levantamento dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu fenotipados utilizando registros de livros de bancada do ano de 2001 a 2007 e do sistema informatizado (Sistema de Banco de Sangue – SBS), através do qual encontramos um total de 6.039 doadores fenotipados, sendo que 2.700 tinham apenas registro nos livros de bancada. Das 31.942 amostras de doadores de sangue em que foram realizadas a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) no período do nosso estudo, 77 apresentaram a PAI positiva na rotina laboratorial. Para a elaboração do Banco de Doadores Fenotipados, foram cadastrados e validados (duas ou mais fenotipagens realizadas) no sistema informatizado SBS, 7.074 antígenos de todos os sistemas de grupos sanguíneos. Desses, 4.748 (67,1%) antígenos pertenciam ao sistema Rh e 2.326 (32,9%) pertenciam a outros sistemas de grupos sanguíneos. Dos antígenos cadastrados (7.074), 2.396 (89%) antígenos não tinham nenhum histórico de fenotipagens anteriores e 304 (11%) já possuíam histórico e foram validados. De um total de 31.942 doadores de sangue, 77 apresentaram a PAI positiva. Para elaboração da soroteca/plasmateca constituída por painéis de soros/plasmas raros, realizamos novamente a PAI dessas amostras, seguida da Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI), do tratamento com Dithiothreitol (DTT), se necessário, e da titulação de anticorpos. Destas 77 amostras de PAI positiva, 21 constituíram a soroteca/plasmateca, pois consideramos como critérios de inclusão: a importância clínica, a especificidade e o título dos anticorpos (reatividade com diluição maior que 1/2). Do total de anticorpos identificados (77), os de maior prevalência foram: anti-D, anti-E, anti-Dia, anti-M, anti-D+C e anti-Le^a. Assim sendo, concluímos que é de suma importância a

elaboração de um Banco de Doadores de Sangue com fenótipos menos frequentes, para que os pacientes em esquema de transfusão de concentrado de hemácias possam ser transfundidos de modo mais compatível possível, prevenindo deste assim a aloimunização a antígenos eritrocitários e otimizando a prática transfusional. É essencial também a elaboração de uma soroteca/plasmateca constituída de painéis de soros/plasma com anticorpos de importância clínica e, com isso, proporcionar além de uma maior agilidade na triagem da bolsa de concentrado de hemácias compatível, uma maior segurança para o paciente transfundido.

Palavras-chave: Aloimunização, Antígenos de grupos sanguíneos, Anticorpos antieritrocitários.

Abstract

Rodrigues, AT, Secco, VNDP. Alloimmunization of blood donors as a source of antisera and rare red cells.

The knowledge of the erythrocyte phenotypes of blood donors is an essential procedure in transfusion practice, which increases the effectiveness and safety of transfusion Act, besides preventing the aloimunização. Erythrocyte antigens are clinically significant in transfusion medicine, because they are highly imunogênicos and the possibility of causing transfusional reactions, autoimmune hemolytic anemia, aloimunizações and hemolytic disease of the fetus and newborn (DHFRN). The incidence of alloimmunization to the erythrocyte antigens is high into politransfundidos patients, especially in patients with hemoglobinopathies and in patients undergoing organ transplants. The aim of this work was to develop a bank of red blood donors with different phenotypes and panels containing serums and plasmas with antibodies of clinical importance to attend and simplify the transfusion of blood alossensibilizados receivers. We manage a survey of blood donors from the Blood of Botucatu, using bench books records of the year 2001 to 2007 and computerised system (blood bank system SBS), through which we found a total of 6039 donors in conclusion, which only 2700 had records on the books. A total of samples (31942) of blood donors that were collected from the research of irregular antibodies (RAI) during the period of our study, 77 presented the RAI in laboratory routine. For the preparation of the donor bank in conclusion have been registered and validated (two or more fenotipagens made) in the computerised system SBS, 7074 antigens in every system of blood groups. Of these, 4748 (67.1) antigens belonged to the Rh system and 2326 (32.9) belonged to other blood group systems. Of registered antigens (7,074), 2396 (89) antigens had no history of previous fenotipagens and 304 (11) already had a history and have been validated. A total of 77 31942, blood donors showed the positive RAI. For the preparation of sorotecaplasmateca consisting of sorosplasmas rare panels carry out again the RAI of those samples, followed by the identification of irregular antibodies (IAI), treatment with Dithiothreitol (DTT) if necessary and titration of antibodies. Of these 77 samples were positive RAI, 21 formed the sorotecaplasmateca, because we believe as inclusion criteria: the clinical importance, the specificity and the title of antibodies (reactivity with dilution greater than 1/2). A total of identified antibodies (77), the most prevalent were: anti-D, anti-E, anti-Dia, anti-M, anti-D+C e anti-Le^a. Therefore, we conclude that it is of the utmost importance to develop a Bank of blood donors with less frequent phenotypes, so that patients in transfusion of packed red blood cells, can be transfused as compatible as possible, preventing the alloimmunization to erythrocyte antigens and optimizing transfusion practice. It

is essential also to draw up a sorotecaplasmateca consisting of sorosplasma panels with antibodies of clinical importance, for in this way we provide in addition to greater agility in the scholarship screening of packed cells compatible, greater safety for the patient transfused.

Keywords: Alloimmunization, blood group antigens, antibodies antieritrocitários

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Os componentes da membrana das hemácias que expressam os antígenos.....	3
Figura 2 – Planilha de cadastro dos doadores fenotipados.....	17
Figura 3 – PAI em tubo - meio Salino.....	18
Figura 4 – PAI na técnica em cartão - gel LISS/Coombs e Enzimático.....	20
Figura 5 – Painel de Hemácias – Fresenius Kabi utilizado na realização da IAI em meio salino.....	21
Figura 6 – Técnica de IAI em tubo – meio salino.....	21
Figura 7 – IAI na técnica em gel - centrifugação em LISS/Coombs.....	22
Figura 8 – Diagrama do painel de hemácias Bio-Rad - ID-DiaPanel.....	23
Figura 9 – IAI na técnica em gel – centrifugação em meio Enzimático.....	24
Figura 10 – Diagrama do painel de hemácias Bio-Rad - ID-DiaPanel – P.....	24
Figura 11 – Titulação em tubo/AGH.....	26
Figura 12 – Técnica de titulação em gel – centrifugação - LISS/Coombs.....	27
Figura 13 – Caixas da Soroteca/plasmateca.....	29
Figura 14 – Caixa da soroteca/plasmateca após 6 meses de monitoramento.....	29
Figura 15 – Planilha com informações dos doadores que constituem a soroteca/plasmateca.....	30

Figura 16 - Total de antígenos cadastrados do sistema Rh e de outros sistemas de grupos sanguíneos no sistema SBS.....	31
Figura 17 – Total de antígenos/fenótipos cadastrados (≤ 1) e total de antígenos/fenótipos validados (≥ 2) no sistema SBS.....	32
Figura 18 – Comparação entre o total de antígenos cadastrados do sistema Rh em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	33
Figura 19 – Total de antígenos do sistema Rh e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	33
Figura 20 – Total do antígeno C+ e antígeno C- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	34
Figura 21 – Total do antígeno c+ e antígeno c- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	35
Figura 22 – Total do antígeno E+ e antígeno E- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	35
Figura 23 – Total do antígeno e+ e antígeno e- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	35
Figura 24 – Total do antígeno Cw+ e antígeno Cw- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	36
Figura 25 – Comparação entre o total de antígenos K+, K-, k+ cadastrados em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	37
Figura 26 – Total dos antígenos K+, K-, k+ e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	37
Figura 27 – Total do antígeno K+ e antígeno K- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	38

Figura 28 – Total do antígeno k+ e antígeno k- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	38
Figura 29 – Comparação entre o total de antígeno Kp (a-) e antígeno Kp (b+) cadastrados em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	39
Figura 30 – Total do antígeno Kp (a-) e antígeno Kp (b-) e de outros antígenos sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	39
Figura 31 – Total do antígeno Kp (a-) e antígeno Kp (b+) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	40
Figura 32 – Comparação entre o total de antígenos do sistema Duffy em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	41
Figura 33 – Total dos antígenos do sistema Duffy e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	41
Figura 34 – Total do antígeno Fy (a+) e antígeno Fy (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	42
Figura 35 – Total do antígeno Fy (b+) e antígeno Fy (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	42
Figura 36 – Comparação entre o total de antígenos do sistema Lutheran em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	43
Figura 37 – Total dos antígenos do sistema Lutheran e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	43
Figura 38 – Total do antígeno Lu (a+) e antígeno Lu (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	44

Figura 39 – Total do antígeno Lu (b+) e antígeno Lu (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	44
Figura 40 – Comparação entre o total de antígenos P1 em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	45
Figura 41 – Total do antígeno P1 e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	45
Figura 42 – Total do antígeno P1+ e antígeno P1- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	46
Figura 43 – Comparação entre o total de antígenos do sistema Lewis em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	47
Figura 44 – Total dos antígenos do sistema Lewis e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	47
Figura 45 – Total do antígeno Le (a+) e antígeno Le (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	48
Figura 46 – Total do antígeno Le (b+) e antígeno Le (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	48
Figura 47 – Comparação entre total de antígenos do sistema MNS em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	49
Figura 48 – Total dos antígenos do sistema MNS e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	49
Figura 49 – Total do antígeno M+ e antígeno M- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	50
Figura 50 – Total do antígeno N+ e antígeno N- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	50

Figura 51 – Total do antígeno S+ e antígeno S- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	51
Figura 52 – Comparação entre total de antígenos do sistema Kidd em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados.....	51
Figura 53 – Total dos antígenos do sistema Kidd e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados.....	52
Figura 54 – Total do antígeno Jk (a+) e antígeno Jk (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	52
Figura 55 – Total do antígeno Jk (b+) e antígeno Jk (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	53
Figura 56 – Total de anticorpos identificados nas 77 amostras de soro dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	54
Figura 57 – Total de anticorpos que constituíram a soroteca/plasmateca dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	55
Figura 58 – Título dos anticorpos da soroteca/plasmateca no dia do armazenamento e no dia do monitoramento (6 meses depois).....	56
Figura 59 – Idade média dos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliqotadas na soroteca/plasmateca.....	60
Figura 60 – Sexo em relação aos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliqotadas na soroteca/plasmateca.....	61
Figura 61 – Etnia em relação aos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliqotadas na soroteca/plasmateca.....	61
Figura 62 – Grupo sanguíneo em relação ao total de doadores de sangue com PAI positivo.....	62

Figura 63 – Grupo sanguíneo em relação aos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliquoteadas na soroteca/plasmateca.....62

Lista de Quadros

Quadro 1 – Imunogenicidade dos antígenos eritrocitários.....	4
Quadro 2 – Frequência dos fenótipos do sistema MNS em brancos e negros...	6
Quadro 3 – Fenótipos do sistema P em brancos e negros.....	7
Quadro 4 – Frequência dos fenótipos Kell em brancos e negros.....	8
Quadro 5 – Frequência dos fenótipos Duffy em brancos, negros americanos e chineses.....	9
Quadro 6 – Fenótipos do sistema Kidd em brancos, negros e asiáticos.....	9
Quadro 7 – Fenótipos do sistema Lutheran em brancos e negros.....	10
Quadro 8 – Frequência dos fenótipos Lewis em brancos e negros.....	11
Quadro 9 – Título dos anticorpos da confecção da soroteca/plasmateca e do monitoramento.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
JUSTIFICATIVA	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVOS GERAIS	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÃO.....	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento dos fenótipos eritrocitários de doadores de sangue é um procedimento essencial na prática transfusional, o qual aumenta a eficácia e a segurança do ato transfusional, além de prevenir a aloimunização (formação de anticorpos quando há exposição de antígenos não próprios)¹.

Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e se apresentam como macromoléculas localizadas na membrana dos eritrócitos. Esses antígenos podem ser proteínas (como substâncias dos grupos sanguíneos Rh e MN) ou glicolípídeos (como substâncias dos grupos sanguíneos ABO, H, Lewis, Ii e P)^{2,3,4}. A Figura 1 ilustra a membrana eritrocitária com os respectivos antígenos citados acima.

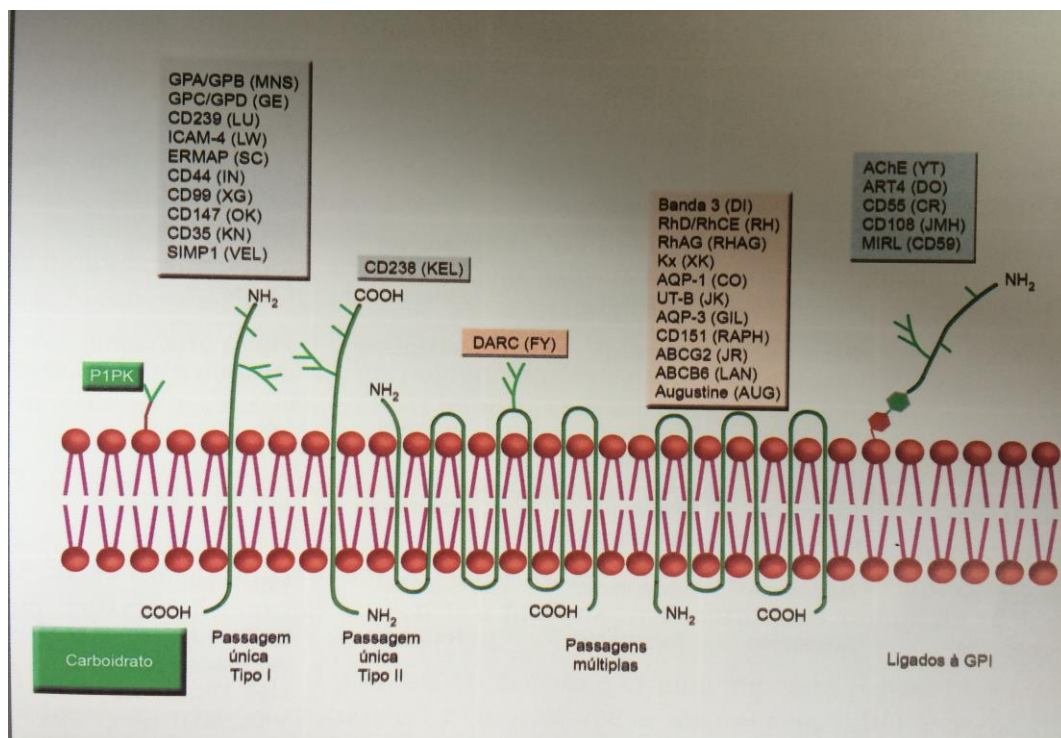


Figura 1 - Os componentes da membrana das hemácias que expressam os antígenos.

Castilho, L, Junior, JP, Reid, ME, 2015.

Os antígenos eritrocitários são clinicamente significantes na medicina transfusional, por serem altamente imunogênicos e pela possibilidade de causarem reações transfusionais, aloimunizações, anemias hemolíticas autoimunes, doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN)^{1,2}. Após a

descoberta do sistema ABO, mais de 308 antígenos foram descritos de acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT)². Depois do sistema ABO, o sistema Rh é considerado o mais importante na prática transfusional, sendo considerado o mais imunogênico. A imunização por RhD é muito mais frequente quando comparada à de outros antígenos de grupos sanguíneos que ocasionalmente produzem anticorpos irregulares, o que torna o sistema RhD de grande importância clínica². O quadro 1 mostra a imunogenicidade dos antígenos eritrocitários clinicamente significativos após os antígenos do sistema ABO.

Quadro 1 - Imunogenicidade dos antígenos eritrocitários

Antígeno de Grupo Sanguíneo	Sistema de Grupo Sanguíneo	Imunogenicidade (%)
D	Rh	50
K	Kell	5
c	Rh	2,05
E	Rh	1,69
k	Kell	1,50
e	Rh	0,56
Fy ^a	Duffy	0,23
C	Rh	0,11
Jk ^a	Kidd	0,07
S	MNS	0,04
Jk ^b	Kidd	0,03
s	MNS	0,03

Fonte: Adaptado de Williams, WJ, et al. (eds): Hematology. McGraw-Hill, New York, 1983, p.1491

Anticorpos formados contra antígenos de hemácias considerados de ocorrência natural, são encontrados no soro de indivíduos que nunca foram expostos a antígenos de hemácias por transfusão, vacina ou gestação. Esses anticorpos são aglutininas frias da classe IgM, reagem melhor à temperatura ambiente ou abaixo dela, não atravessam a barreira placentária, são capazes de ativar o sistema complemento, e quando ativas à 37°C podem ser hemolíticas. Podemos citar como exemplo de anticorpos naturais, os anticorpos dos sistemas: ABO, Hh, Ii, Lewis, MN e P^{2,5,6,7,8}.

Os anticorpos considerados imunes são aqueles encontrados no soro de indivíduos que já foram expostos a antígenos de hemácias, seja por transfusão, vacina ou gestação. Esses anticorpos são da classe IgG, reagem melhor a 37°C, necessitam de globulina anti-humana para a sua detecção e são capazes de atravessar a barreira placentária. Como os da classe IgM, podem provocar hemólise intravascular em casos de transfusões sanguíneas incompatíveis, através da ativação do sistema complemento, podendo as mesmas serem fatais^{2,5,6,8}.

Os anticorpos podem ainda serem classificados de acordo com o estímulo antigênico em: anticorpos regulares e irregulares. Os anticorpos regulares têm sua ocorrência esperada, como no caso dos anticorpos do sistema ABO. Já os anticorpos irregulares não têm sua ocorrência esperada, sendo formados apenas por aloimunização por transfusão incompatível ou gestação e são dirigidos contra qualquer epítipo dos 308 antígenos expressos na membrana dos eritrócitos^{2,6,9}.

Além dos antígenos e anticorpos do sistema ABO e Rh existem outros considerados de importância clínica na prática hemoterápica, como os descritos no quadro 1^{2,5}.

Logo após a descoberta do sistema ABO, Landsteiner e Levine descobriram o sistema MNS. Atualmente 48 antígenos já foram descritos nesse sistema, sendo que em termos de dimensões e complexidade, o antígeno é parecido com o do sistema Rh. Os anticorpos anti-M e anti-N não são clinicamente significantes, a menos que reajam à 37°C. São da classe IgM e de

ocorrência natural. Já os anticorpos anti-S e anti-s são considerados clinicamente significantes, sendo da classe IgG (reativos a 37°C) e imunes. Abaixo podemos observar o quadro 2 com as frequências dos antígenos M, N, S e s em brancos e negros⁶.

Quadro 2 – Frequência dos fenótipos do sistema MNS em brancos e negros

Fenótipo	Brancos (%)	Negros (%)
M+N-	28	26
M+N+	50	44
M-N+	22	30
S+s-	11	3
S+s+	44	28
S-s+	45	69
S-s-U-	0	<1

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

No mesmo ano da descoberta do sistema MNS (1927), o grupo sanguíneo P foi também introduzido por Landsteiner e Levine, que descreveram os antígenos P, P₁, P₂, p e Tj^a (atualmente conhecido como anti-PP₁pk). Este sistema se tornou mais complexo quando **Matson et al.** descreveram o fenótipo Pk. O anticorpo anti-P₁ é da classe IgM, de ocorrência natural, não sendo portanto, clinicamente significante e pode estar presente no soro de indivíduos Pk positivo. O anticorpo anti-PP₁pk é normalmente da classe IgM (raramente IgG) sendo encontrado em todos os indivíduos no início da vida. Está relacionado como causa de abortos espontâneos no início da gestação. O anti-P é frequentemente encontrado como auto-anticorpo, sendo hemolítico e podendo estar presente no soro de indivíduos Pk. No quadro 3 podemos observar os fenótipos do sistema P^{6,7}.

Quadro 3 – Fenótipos do sistema P em brancos e negros

Fenótipo	Brancos (%)	Negros (%)
P1	79	94
P2	21	6
P	Raro	Raro
P1k	Muito raro	Muito raro
P2k	Extremamente raro	Extremamente raro

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

Em 1946, foi descrito o primeiro antígeno do sistema Kell, o antígeno K, sendo este bem desenvolvido ao nascimento. Alguns anos depois, Levine et al  relataram a descoberta de outro antígeno desse sistema, o antígeno cellano (k), que é antitético ao K. Esses dois antígenos (K e k) são altamente imunogênicos, principalmente o K. O sistema de grupo sanguíneo Kell permaneceu assim até a descoberta de mais dois antígenos antitéticos, o antígeno Kp^a (baixa frequência) e o antígeno Kp^b (alta frequência). Depois dos anticorpos ABO e Rh, o anti-K é um dos anticorpos mais frequentemente encontrados nos serviços de Hemoterapia, sendo considerados clinicamente significantes pois podem causar grave DHFRN. Normalmente são da classe IgG, imunes e raramente IgM. Outros anticorpos desse sistema como o anti-k, anti-Kp^a e anti-Kp^b são em sua maioria imunes, da classe IgG, portanto tem significado clínico. No quadro 4 podemos observar a frequência dos fenótipos Kell^{6,7}.

Quadro 4 – Frequência dos fenótipos Kell em brancos e negros

Fenótipo	Brancos (%)	Negros (%)
K-k+	91	96,5
K+k+	8,8	3,5
K+k-	0,2	<0,1
Kp(a+b-)	<0,1	0
Kp(a+b+)	2,3	Raro
Kp(a-b+)	97,7	100

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

Em 1950, foi descrito o grupo sanguíneo Duffy (Fy), sendo o antígeno Fy^a o primeiro a ser descoberto. Um ano depois, foi relatado o par antitético do antígeno Fy^a, chamado antígeno Fy^b. Esses dois antígenos estão bem desenvolvidos ao nascimento, podendo ser detectados com 6 semanas de gestação. Os anticorpos anti-Fy^a e anti-Fy^b são clinicamente significativos, da classe IgG, considerados moderadamente imunogênicos (ocorrem três vezes menos que anti-K), sendo anti-Fy^a mais comum que Fy^b. O fenótipo Fy(a-b-) está relacionado com a resistência a infecção à malária^{6,7}.

Segue quadro abaixo com a frequência desses antígenos na população branca, negra e chinesa.

Quadro 5 – Frequência dos fenótipos Duffy em brancos, negros americanos e chineses

Fenótipo	Brancos (%)	Negros Americanos (%)	Chineses (%)
Fy(a+b-)	17	9	90,8
Fy(a+b+)	49	1	8,9
Fy(a-b+)	34	22	0,3
Fy(a-b-)	Muito raro	68	0

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

Um ano depois, 1951, foi descrito o sistema Kidd (Jk) com dois antígenos antitéticos, Jk^a e Jk^b. Esses antígenos são bem desenvolvidos ao nascimento e possuem moderada imunogenicidade. Quanto aos anticorpos desse sistema, o anti-Jk^a (mais frequente) e anti-Jk^b são da classe IgG, mas já foram descritos como IgM. São clinicamente significantes, associados com reações hemolíticas. No quadro 6 abaixo, encontramos a frequência dos fenótipos Kidd^{6,7}.

Quadro 6 – Fenótipos do sistema Kidd em brancos, negros e asiáticos

Fenótipo	Brancos (%)	Negros (%)	Asiáticos (%)
Jk(a+b-)	28	57	23
Jk(a+b+)	49	34	50
Jk(a-b+)	23	9	27
Jk(a-b-)	Extremamente raro	Extremamente raro	0,9 -<0,1

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

Os antígenos do sistema Lutheran (Lu) foram identificados desde 1945, quando o primeiro exemplar de anti-Lu^a foi descoberto, mas somente em 1961 o sistema foi descrito com dois antígenos principais, Lu^a e Lu^b. Esses antígenos

são pouco expressivos no nascimento. Seus anticorpos têm seus significados clínicos questionáveis, pois podem ser da classe IgA, IgM e IgG. Anti-Lu^a é de ocorrência natural, normalmente IgM. Anti-Lu^b é em sua maioria IgG, mas já foram detectados como IgA e IgM. No quadro 7, podemos observar os fenótipos do sistema Lutheran^{6,7}.

Quadro 7 – Fenótipos do sistema Lutheran em brancos e negros

Fenótipo	Branco (%)	Negro (%)
Lu(a+b-)	0,15	0,1
Lu(a+b+)	7,5	5,2
Lu(a-b+)	92,35	94,7
Lu(a-b-)	Muito raro	Muito raro

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

O sistema de grupo sanguíneo Lewis possui genes semelhantes aos genes ABO, porém são geneticamente independentes. Todos os antígenos Lewis, encontrados nos eritrócitos, foram absorvidos pelo plasma. Os antígenos desse sistema são denominados Le^a e Le^b, são formados nas secreções e secundariamente absorvidos às hemácias. Os indivíduos com o fenótipo Lewis (a+b-) são denominados não secretores e indivíduos com o fenótipo Lewis(a-b+) são denominados secretores. Os anticorpos Lewis (anti-Le^a e anti-Le^b) são produzidos geralmente por indivíduos Lewis(a-b-). Esses anticorpos são considerados de ocorrência natural, da classe IgM, embora possamos encontrar anti-Le^a como IgG. Segue abaixo, o quadro 8 com a frequência dos fenótipos Lewis^{6,7}.

Quadro 8 – Frequência dos fenótipos Lewis em brancos e negros

Fenótipo	Brancos (%)	Negros (%)
Le(a+b-)	22	23
Le(a-b+)	72	55
Le(a-b-)	6	22

Fonte: Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006

Em 1955, foi descoberto o sistema Diego, constituído por dois antígenos antitéticos, Di^a e Di^b. O antígeno Di^a é raramente encontrado na população branca, sendo frequente em asiáticos. Já o antígeno Di^b é normalmente encontrado na população branca e negra. Os anticorpos anti-Di^a e anti-Di^b são da classe IgG e podem estar associados a reações hemolíticas^{7,10}.

A transfusão de sangue é um procedimento no qual um hemocomponente é transfundido em um receptor. As transfusões são realizadas com o objetivo de aumentar a capacidade do sangue de transportar oxigênio, para restaurar o volume sanguíneo do organismo ou corrigir distúrbios da coagulação, trazendo um grande benefício para o receptor desde que indicada corretamente^{2,11}. Existem vários testes que são realizados para verificar se a bolsa de concentrado de hemácias é compatível com o receptor antes da mesma, ser transfundida. Dentre os testes obrigatórios pela legislação (Portaria nº 2.712 de 12 de novembro de 2013) estão a fenotipagem ABO/Rh, Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) e a Prova de Cruzada.

A fenotipagem ABO/Rh é utilizada para determinação do grupo sanguíneo, através da tipagem direta, a qual pesquisa os antígenos ABO nas hemácias, e a tipagem reversa, a qual pesquisa o anticorpo correspondente presente no soro. A PAI é utilizada para identificação de anticorpos irregulares, através da utilização de hemácias comerciais testadas com o soro/plasma do indivíduo. Tais anticorpos podem estar presentes no soro devido a gestação incompatível ou transfusão de hemácias com fenótipo incompatível. A Prova

Cruzada (PC), tem como princípio a pesquisa do anticorpo existente no soro do paciente (receptor) em relação a presença ou não do antígeno na hemácia do doador (bolsa). É utilizada para verificar a compatibilidade entre doador e receptor^{2,11}.

Em hemoterapia, a administração de concentrado de hemácias ou algum outro hemocomponente que possua quantidades consideráveis de hemácias, pode ser responsável pela aloimunização contra antígenos eritrocitários após uma transfusão. A aloimunização é a formação de anticorpos quando ocorre a exposição à antígenos não próprios, sendo estes considerados anticorpos irregulares. Esses anticorpos ocorrem em aproximadamente 0,3% a 2,0% da população em geral. O risco de aloimunização é de aproximadamente 1% por unidade transfundida, sendo mais frequente em pacientes politransfundidos (9%), doença falciforme (36%) e talassêmicos (10%)¹².

Alguns pacientes necessitam de transfusões frequentemente, e caso não seja transfundido um concentrado de hemácias com o fenótipo o mais compatível possível, estes podem se alosensibilizar (produzir anticorpos) ou apresentarem Reação Transfusional Hemolítica (RTH)^{11,13,14}.

As RTH podem ser classificadas em agudas, sendo aquelas que ocorrem até 24 horas após o início da transfusão, ou tardias, que ocorrem 24 horas após a transfusão de hemocomponentes. As RTHs são causadas pela destruição imune das hemácias transfundidas. Podem resultar em hemólise +- intravascular ou extravascular. Na RTH intravascular há destruição intravascular de eritrócitos caracterizada pela ruptura dos mesmos dentro da corrente sanguínea liberando hemoglobina no plasma; já RTH extravascular é caracterizada pela fagocitose dos eritrócitos e macrófagos do sistema macrofágico com liberação de bilirrubina no plasma^{15,16}. Alguns outros exemplos de reações transfusionais são: reação transfusional febril não hemolítica, reação transfusional aguda, reação alérgica, sobrecarga circulatória, TRALI (Lesão Pulmonar Aguda Associado à Transfusão), Púrpura Pós-Transfusional (PPT) e doença enxerto versus hospedeiro^{15,16,17}.

1.1 JUSTIFICATIVA

A incidência de aloimunização a antígenos eritrocitários é alta em pacientes politransfundidos, principalmente nos portadores de hemoglobinopatias e em pacientes submetidos a transplantes.

Com base nesses dados, torna-se importante a elaboração de um Banco de Doadores de Sangue com fenótipos menos frequentes, para que os pacientes em esquema de transfusão de concentrado de hemácias, possam ser transfundidos o mais compatível possível, prevenindo deste modo a aloimunização a antígenos eritrocitários e otimizando a prática transfusional.

Torna-se necessário também a utilização de uma estratégia mais efetiva para seleção de bolsa de concentrado de hemácias com fenótipo doador/receptor compatível, devido não somente ao grau de dificuldade que se apresente no momento da seleção da bolsa a ser transfundida, mas também devido a dificuldade de aquisição e ao alto custo dos anti-soros dirigidos contra antígenos considerados de alta incidência. Deste modo, é essencial a elaboração de uma soroteca/plasmateca constituída de painéis de soros/plasma com anticorpos de importância clínica, para deste modo, proporcionar além de **uma** maior agilidade na triagem da bolsa de concentrado de hemácias compatível, **uma** maior segurança para o paciente transfundido.

Esses painéis de soros/plasmas serão preparados com o principal objetivo de auxiliar na resolução de casos imuno-hematológicos complexos, viabilizando a resolução destes problemas e gerando um menor custo para o serviço.

Posteriormente **após** a utilização desses painéis na realização de uma triagem prévia da bolsa, serão utilizados, os anti-soros comerciais para confirmação do resultado da fenotipagem das bolsas de concentrado de hemácias que apresentarem o resultado inicial negativo 

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Elaborar um Banco de Doadores de hemácias com diferentes fenótipos e painéis contendo soros e plasmas com anticorpos de importância clínica para atender e agilizar a transfusão de receptores de sangue alossensibilizados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Rastrear através dos registros em livros e do sistema informatizado (SBS), os resultados das fenotipagens dos doadores de sangue realizadas na rotina imuno-hematológica.
- ✓ Elaborar uma planilha contendo as seguintes informações: número da bolsa do doador, cadastro de pessoa física (PF), fenótipos Rh, Kell e de outros sistemas de grupos sanguíneos e número de fenotipagens realizadas.
- ✓ Selecionar e cadastrar os doadores sem fenotipagens cadastradas no Sistema Informatizado de Banco de Sangue do Hemocentro de Botucatu (SBS) e validar os doadores com fenotipagens cadastradas anteriormente.
- ✓ Elaborar o Banco de Doadores de Sangue com Fenótipos Raros através de relatórios gerados pelo SBS.
- ✓ Rastrear através dos registros em livros de bancada e do Sistema Informatizado de Banco de Sangue do Hemocentro de Botucatu (SBS), o perfil e o título dos anticorpos identificados nos doadores de sangue em que a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) apresentou positividade na rotina laboratorial.

- ✓ Realizar a PAI e a Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI) nos meios Salino, Liss (BFI) e Enzimático das amostras de doadores de sangue que apresentaram a PAI positiva na triagem da rotina laboratorial.
- ✓ Realizar a titulação dos anticorpos identificados na IAI das amostras de doadores de sangue que apresentaram a PAI positiva na triagem da rotina laboratorial.
- ✓ Selecionar as amostras de soros e plasmas que contenham anticorpos de significado clínico para constituírem o painel de soros/plasmas raros.
- ✓ Monitorar semestralmente o título dos anticorpos aliquotados na soroteca/plasmateca durante o período de um ano.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEP), parecer nº 551.281.

3.2 AMOSTRAGEM INICIAL

Foi realizado um levantamento dos doadores de sangue fenotipados utilizando registros de livros de bancada do ano de 2001 a 2007 onde encontramos um total de 6039 doadores fenotipados. Também foram selecionadas 77 amostras esporádicas dos doadores de sangue que apresentaram a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) positiva.

3.3 CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo doadores de sangue fenotipados e amostras de doadores de sangue que apresentaram a PAI positiva.

Não foram incluídos em nosso estudo doadores de sangue sem fenotipagem e amostras que apresentaram a PAI negativa.

3.4 BANCO DE DOADORES FENOTIPADOS

Foi realizado um levantamento de doadores fenotipados utilizando como ferramenta o sistema informatizado (Sistema de Banco de Sangue – SBS) do Hemocentro de Botucatu e os registros de livros de bancada, sendo posteriormente, os dados coletados transferidos para planilhas específicas constituindo assim, o Banco de Doadores Fenotipados. Para elaboração desse Banco, foi montada uma planilha contendo registros dos doadores fenotipados, resgatados dos livros de bancada do ano de 2001 a 2007, sendo que do ano de 2008 a 2015 os mesmos já estavam cadastrados no sistema. Dados como o

número da bolsa do doadores, cadastro de pessoa física (PF), fenotipagem Rh e Kell e outros sistemas de grupos sanguíneos e o número de doações de todos os doadores com fenótipo validado (fenotipados no mínimo duas vezes) e não validados, foram inseridos na planilha de modo que esses fenótipos fossem cadastrados no sistema (Figura 2).

	A	B	C	D	E
1	Nº BOLSA	PF	Fenótipo Rh e Kell	Nº FENOTIPAGENS	Fenótipo outros sistemas
2	0000104380-3	43181	-----	3	Cw-, Fy (a+), S-
3	0000103447-2	133174	-----	0	Fy (a-)
4	0000092225-0	161777	-----	0	Fy (a-)
5	0000059286-2	57803	-----	0	Fy (a-)
6	0000059300-1	144313	-----	0	Fy (a-)
7	0000075551-6	130090	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
8	0000075914-7	12652	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
9	0000075105-7	115805	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
10	0000075110-3	132832	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
11	0000075503-6	63075	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
12	0000076665-8	155812	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
13	0000076093-5	103162	-----	0	Fy (a-), Jk (b+)
14	0000104358-7	137724	-----	0	Fy (a-), S-
15	0000104568-7	166641	-----	0	Fy (a+)
16	0000101983-0	165668	-----	0	Fy (a+)

Figura 2 – Planilha de cadastro dos doadores fenotipados



Posteriormente elaboramos o Banco de Doadores de Sangue com Fenótipos Raros, através de relatórios e planilhas geradas pelo sistema informatizado (Sistema de Banco de Sangue – SBS), o qual teve como requisitos para seleção dos doadores, os que apresentaram os antígenos de menores frequências e o número de vezes que o doador foi fenotipado (mínimo de duas vezes). Este Banco foi constituído por todos os antígenos fenotipados desses doadores, como também pelos seguintes dados: nome, RG, sexo, etnia, idade, endereço, telefone e tipagem sanguínea.

3.5 SOROTECA/PLASMATECA

3.5.1 Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI)

3.5.2 PAI - Técnica em tubo - meio Salino

- Foram identificados respectivamente 2 tubos (I e II) e adicionado a cada um deles, 1 gota das hemácias de triagem I e II (Bio-Rad) correspondentes com 100 µl do soro do doador
- Os tubos foram centrifugados a 3400 rpm por 15 segundos e realizada a leitura, considerando-se a intensidade de aglutinação (resultado positivo: 1+, 2+, 3+ ou 4+) ou a não aglutinação (resultado negativo)
- Se o resultado foi negativo, os tubos foram então incubados em temperatura ambiente (TA) por 30 minutos
- Posteriormente foi realizada a segunda leitura (Figura 3)

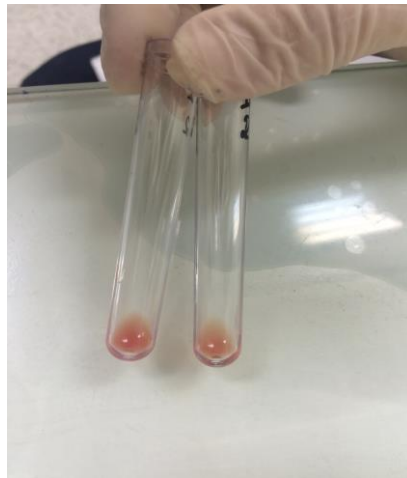


Figura 3 – PAI em tubo - meio Salino

3.5.3 PAI - Técnica de gel - centrifugação em LISS/Coombs

- O cartão gel LISS/Coombs foi identificado com o número do doador e cada microtubo com o número das hemácias de triagem I e II (Bio-Rad), e adicionadas 1 gota das hemácias de triagem correspondentes e 25 µl do soro do doador em cada microtubo

- O cartão foi incubado a 37°C por 15 minutos e centrifugados a 3400 rpm por 10 minutos
- Em seguida foi realizada a leitura de acordo com a intensidade de aglutinação (resultado positivo: w, 1+, 2+, 3+ ou 4+) ou não aglutinação (resultado negativo) (Figura 4)

3.5.4 PAI - Técnica de gel - centrifugação em meio Enzimático

- O cartão gel NaCl foi identificado com o número do doador e cada microtubo com o número das hemácias de triagem I e II (Bio-Rad), adicionadas 1 gota das hemácias de triagem correspondentes, 25 µl do soro do doador em cada microtubo e 1 gota de papaína (Bio-Rad)
- O cartão foi incubado a 37°C por 15 minutos e centrifugados a 3400 rpm por 10 minutos
- Em seguida foi realizada a leitura de acordo com a intensidade de aglutinação (resultado positivo: w - weak, 1+, 2+, 3+ ou 4+) ou não aglutinação (resultado negativo) (Figura 4)

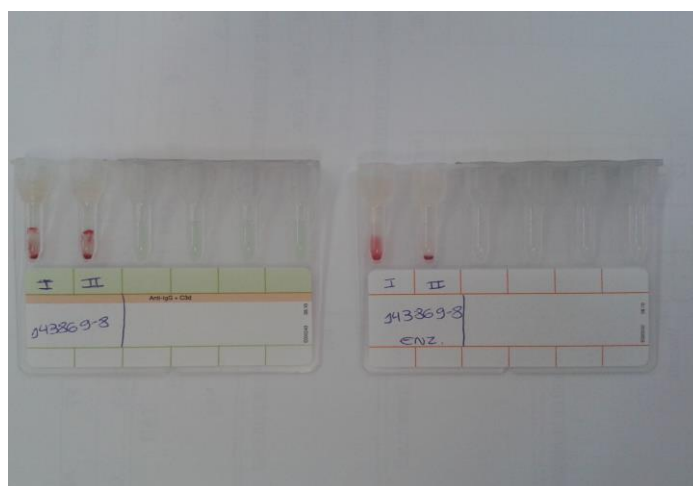


Figura 4 – PAI na técnica em cartão - gel LISS/Coombs e Enzimático

3.5.5 Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI) na técnica em tubo – Meio Salino

- Foram separadas as amostras que apresentaram positividade na triagem laboratorial da PAI técnica em tubo
- Foram identificados tubos de 1 a 16 e o auto controle (AC)
- Em cada tubo (1-16), foi adicionado 1 gota das hemácias do painel (Fresenius Kabi) e 100 µl do soro do doador a ser testado (Figura 5)
- No tubo do AC, foi realizada uma diluição a 5% de hemácias do doador previamente lavadas (50 µl de hemácia e 900 µl de solução fisiológica) e em seguida foram adicionados 100 µl do soro do doador
- Em seguida, foi realizada a centrifugação dos tubos a 3400 rpm por 15 segundos e posteriormente efetuou-se a leitura
- Os resultados foram interpretados de acordo com a intensidade de aglutinação (resultado positivo: w - weak, 1+, 2+, 3+ e 4+) ou não (resultado negativo)
- Posteriormente, os tubos foram incubados a 18°C por uma hora
- Após, foram centrifugados novamente a 3400 rpm por 15 segundos e realizada a leitura (Figura 6)



Figura 5 – Painel de Hemácias – Fresenius Kabi utilizado na realização da IAI em meio salino

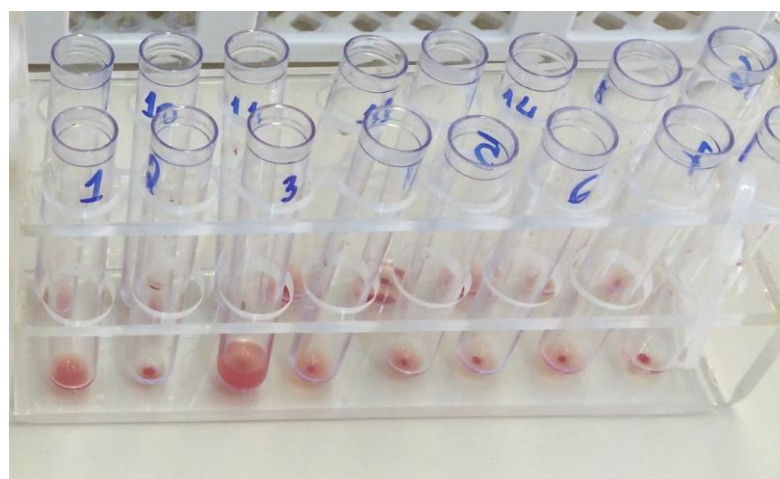


Figura 6 – Técnica de IAI em tubo – meio salino

3.5.6 Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI) na técnica em de gel – centrifugação em LISS/Coombs

- Foram identificados os microtubos do cartão ID – LISS/Coombs com o número do doador e com a identificação das respectivas hemácias (1 a 11) do painel (ID-DiaPanel – Bio-Rad) e o auto controle (AC)

- Foram adicionados em cada um dos microtubos (1 a 11) 50 µl da hemácia teste diluída em LISS e 25 µl do soro do doador
- No microtubo do AC, foi realizada uma diluição a 1% de hemácias do doador previamente lavadas (10 µl de hemácia e 900 µl de Diluente 2 - LISS) e em seguida foi então adicionado 25 µl do soro do doador
- Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 15 minutos e posteriormente foram centrifugados a 3400 rpm por 10 minutos e por último foi realizada a leitura (Figura 7 e 8)



Figura 7 – IAI na técnica em gel - centrifugação em LISS/Coombs

[illegible]

Figura 8 – Diagrama do painel de hemácias Bio-Rad - ID-DiaPanel

3.5.7 Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI) na técnica em gel – centrifugação em meio Enzimático

- Foram identificados os microtubos do cartão ID – NaCl com o número do doador e com a identificação das respectivas hemácias (1 a 11) do painel (ID-DiaPanel - P – Bio-Rad) e o auto controle (AC)
- Foram adicionados em cada um dos microtubos (1 a 11) 50 µl da hemácia teste tratadas com papaína e 25 µl do soro do doador
- No microtubo do AC, foi realizada uma diluição a 1% de hemácias do doador previamente lavadas (10 µl de hemácia e 900 µl de Diluente 2 - LISS), e então foram adicionados 25 µl do soro do doador e por último, 50 µl gota da enzima papaína (Bio-Rad)

3.5.8 Titulação de anticorpos na técnica em tubo/AGH

- Foi identificada uma série de tubos de hemólise com o número correspondente da amostra do doador e com as diluições 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256
- Foram adicionadas nos tubos de hemólise (1 a 10) 100µl do soro a ser testado, apenas nos tubos 1/1 e 1/2
- Em seguida, foram adicionadas 100µl de solução fisiológica a partir do tubo com a diluição de 1/2 até 1/256
- O tubo com a diluição 1/2 foi homogeneizado e foi transferido 100µl desta diluição para o tubo seguinte (1/4), e assim sucessivamente, até chegar no tubo 1/256
- Foram adicionados 50µl de suspensão a 5% de hemácias em todos os tubos da série, antígeno específico para o anticorpo em estudo e posteriormente foram homogeneizados
- Em seguida, foram incubados os tubos em banho maria a 37°C por 15 minutos
- Posteriormente, foram realizadas três lavagens  dos tubos com solução fisiológica
- Foram então adicionados 50µl de antiglobulina humana poliespecífica – IgG (Bio-Rad) em cada tubo, os quais foram centrifugados a 3400 rpm por 15 segundos e por último foi realizada a leitura de acordo com a intensidade de aglutinação
- Consideramos como título, a maior diluição que apresentou aglutinação (Figuras 11)

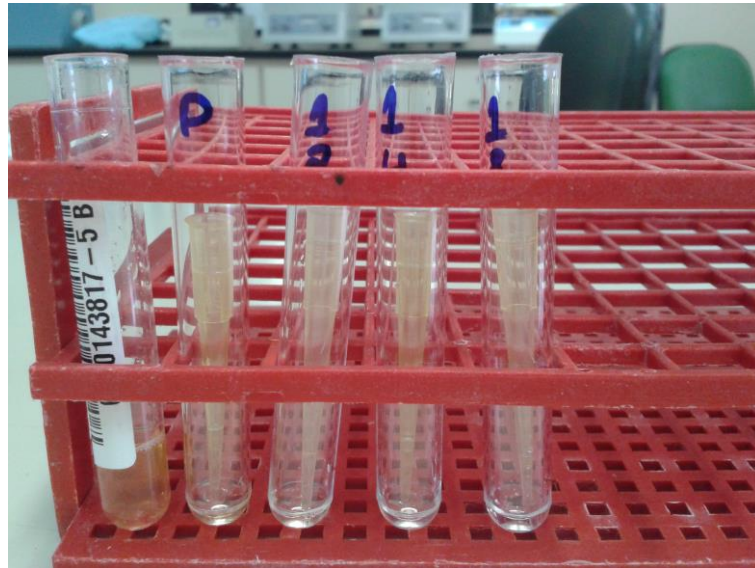


Figura 11 – Titulação em tubo/AGH

3.5.9 Titulação de anticorpos na técnica em gel – centrifugação em LISS/Coombs

- Foi identificada uma série de tubos de hemólise com o número correspondente da amostra do doador e com as diluições 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256
- Foram adicionadas nos tubos de hemólise (1 a 10) 100µl do soro a ser testado, apenas nos tubos 1/1 e 1/2
- Em seguida, foram adicionadas 100µl de solução fisiológica a partir do tubo com a diluição de 1/2 até 1/256
- O tubo com a diluição 1/2 foi homogeneizado e foi transferido 100µl desta diluição para o tubo seguinte (1/4), e assim sucessivamente, até chegar no tubo 1/256

- Posteriormente, foram identificados os microtubos do cartão gel – LISS/Coombs com o número da amostra do doador e com as respectivas diluições: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256
- Em seguida, foi adicionado 50 µl das hemácias antígeno específico para o anticorpo em estudo em todos os microtubos do cartão
- Os cartões foram então incubados a 37°C por 15 minutos e centrifugados a 3400 rpm por 10 minutos e posteriormente foi realizada a leitura (Figuras 12)

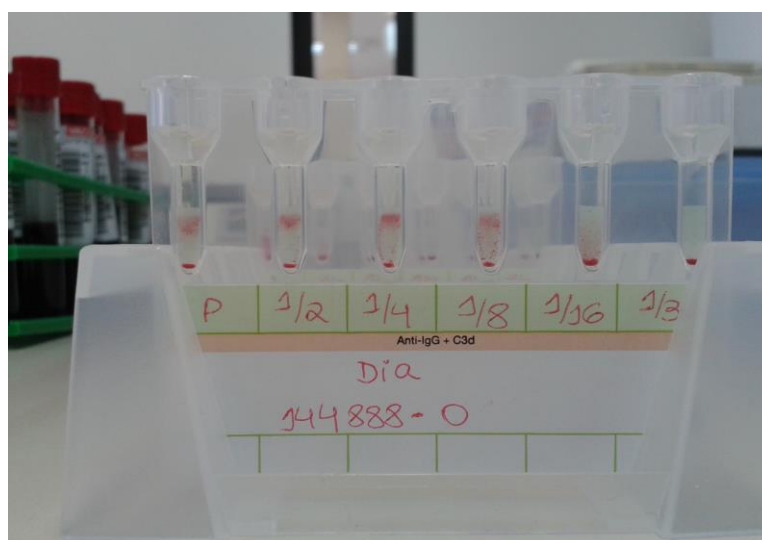


Figura 12 – Técnica de titulação em gel – centrifugação - LISS/Coombs

3.5.9.1 Tratamento do soro com Dithiothreitol (DTT)

- Foram identificados 2 tubos com o número da amostra do doador, sendo 1 com a identificação “DTT” e outro “Salina”
- Em seguida, em um tubo adicionamos 100 µl do soro a ser testado com 100 µl de DTT e no outro, 100 µl do soro a ser testado com 100 µl de solução fisiológica

- Os tubos foram então incubados em temperatura ambiente (TA) por 30 minutos e posteriormente foram homogeneizados
- Em seguida, foi realizada a PAI nas técnicas LISS/Coombs e Enzimático descritas anteriormente, porém, utilizando o soro tratado com DTT
- Posteriormente, foi realizada a leitura de acordo com a intensidade de aglutinação (resultado positivo: w – weak, 1+, 2+, 3+ e 4+) ou não aglutinação (resultado negativo)

3.6 Montagem da Soroteca/Plasmateca

- Foram separadas as amostras de soro e as bolsas de plasmas que apresentaram o perfil do anticorpo identificado, classe do anticorpo e cujo título apresentasse o mínimo de reatividade na diluição 1/2 na técnica em tubo ou as amostras que não apresentaram reatividade no tubo foram tituladas em cartão gel
- Posteriormente foi aliquoteado um volume de aproximadamente 0,5 ml nos microtubos previamente identificados para utilização em tubo ou gel, os quais foram então colocados em caixas apropriadas contendo 100 microtubos com a mesma amostra (1 caixa para cada doador e anticorpo) (Figura 13), sendo armazenadas em freezer -18°C a -22°C
- Após seis meses da data da montagem da soroteca/plasmateca foi realizado o monitoramento através da titulação dos anticorpos para verificar a perda ou não do título (Figura 14)
- Posteriormente foi montada uma planilha contendo o nome do doador, sexo, idade, etnia, tipagem sanguínea, número do registro do hospital, data da doação, anticorpo identificado no soro, título do anticorpo na data da montagem e no monitoramento (após seis

meses) da soroteca/plasmateca, assim como o número e a data da montagem (Figura 15)



Figura 13 – Caixas da Soroteca/plasmateca

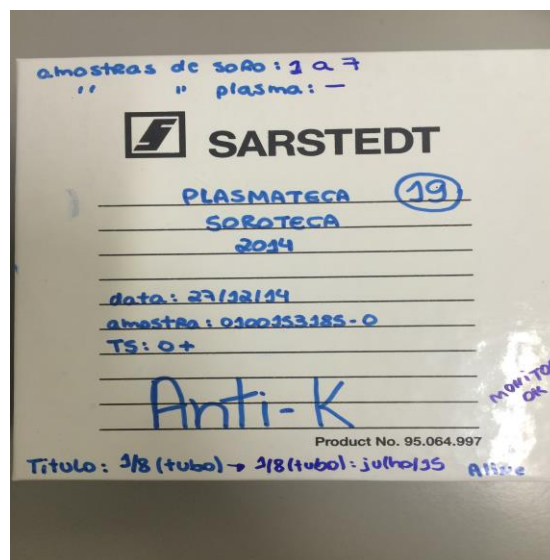


Figura 14 – Caixa da soroteca/plasmateca após 6 meses de monitoramento

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
Nº	NOME	SEXO	IDADE	ETNIA	TS	PF	DATA DOAÇÃO	Nº SOROT	ANTICORPO	TÍTULO	MONITORAMENTO	TELEFONE	ESCOLARIDADE
1	Marcos Alberto Rosa	M	36	B	A+	53679	03/05/2013	1	anti-Lea	1/64	SET = 1/16 (1 ANO E 4 MESES)	(14) 99111-8530	1º grau
2	Eliane de Cássia Crespim Rodrigues	F	34	B	O+	139285	26/04/2013	2	anti-M	1/4	SET = 1/2 (1 ANO E 4 MESES)	(14) 99771-3750	1º grau
3	Joceli Garcia Faria	F	54	B	B-	225005	18/05/2013	3	anti-D	1/256	1/64 (1 ANO E 4 MESES)	(14) 99709-1734	1º grau
4	Jose Benedito Quirino de Paula	M	50	B	O+	39603	19/08/2013	4	anti-Dia	1/2 (gel)	1/2 (1 ANO)	(14) 3841-2111/99789-2083	2º grau
5	Jose Benedito Quirino de Paula	M	50	B	O+	39603	10/03/2014	5	anti-Dia	1/8 (gel)	1/4 (6 MESES)	(14) 3841-2111/99789-2083	2º grau
6	Vinicius Aparecido Porfirio	M	26	B	O+	241583	25/02/2014	6	anti-E e prov. form anti-K	1/4 (gel)	1/4 (6 MESES)	(14) 99693-2129	2º grau
7	Jose Benedito Quirino de Paula	M	50	B	O+	39603	24/04/2014	7	anti-Dia	1/16 (gel)	1/4 (6 MESES)	(14) 3841-2111/99789-2083	2º grau
8	Eloy Rodrigues Torres	F	47	B	O+	30504	02/06/2014	8	anti-c	1/2	1/1 tubo (6 MESES)	(14) 3882-1256/99791-3838	2º grau
9	Valdinei Aparecido Gois de Oliveira	M	31	B	O+	129372	26/06/2014	9	anti-E	1/4 (gel)	1/4 gel (6 MESES)	(14) 99117-3925	1º grau
10	Olinda Rosa de Paula	F	50	B	O+	241333	28/06/2014	10	anti-E	1/4 (gel)	1/4 gel (6 MESES)	(14) 3888-1355	2º grau
11	Sirineu Pereira Caldas	M	30	B	O+	257427	06/08/2014	11	anti-Dia	1/32 (gel)	1/32 gel (6 MESES)	3726-1274	2º grau
12	Antonio Angelo Catarin	M	48	B	A+	157926	16/08/2014	12	anti-E	1/1 (tubo)	neg (tubo) e 1/4 (gel) (6 MESES)	98226-3611	1º grau
13	Leoni Trindade Bueno Silveria	F	54	B	O+	170987	16/08/2014	13	anti-K e anti-Dia	1/1024 (gel) e 1/8 (tubo)	1/1024 (gel); 1/2 tubo e 1/8 gel (6 MESES)	99686-2868	2º grau
14	Angela Maria de Moraes	F	43	B	A+	257885	22/08/2014	14	anti-Leb	1/4 (tubo)	1/4 tubo (6 MESES)	99766-8573	3º grau
15	Eliane Ferraz Pereira	F	37	B	B+	109216	30/08/2014	15	anti-M	1/4 (tubo)	1/1 tubo (6 MESES)	99766-1827	2º grau
16	Adelson Dias	M	35	B	A+	103518	14/10/2014	16	anti-K	1/1 (gel)	neg gel (6 MESES)	98200-5938	2º grau
17	Fernanda Maria Rizzo	F	32	N	A-	114940	22/10/2014	17	anti-M	1/8 (tubo)	1/2 tubo (6 MESES)	99684-2989	3º grau
18	Luciana Delazari Straut Brosco	F	44	B	O+	45975	06/11/2014	18	anti-Jka	1/2 (gel)	1/1 (gel) (6 MESES)	3291-1007/99691-8336	3º grau
19	Sidnei Vieira Miranda	M	41	B	O+	209214	22/12/2014	19	anti-K	1/8 (tubo)	1/8 (tubo) (6 MESES)	3845-1569	2º grau
20	Renata Campos Capela	F	42	B	A+	105800	19/12/2014	20	anti-M	1/2 (tubo)	neg (tubo) e 1/2 (gel) (6 MESES)	3813-4323/99127-1428	3º grau
21	Eliane Fernandes Santos	F	38	B	O-	214659	25/02/2015	21	anti-D+C	1/4 (tubo) e 1/2 (gel)	1/2 (tubo) e 1/1 (gel)	3815-6038	3º grau

Figura 15 – Planilha com informações dos doadores que constituem a soroteca/plasmateca

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a elaboração do Banco de Doadores Fenotipados foram cadastrados e validados (duas ou mais fenotipagens realizadas) no sistema informatizado (Sistema de Banco de Sangue – SBS) 7.074 antígenos de todos os sistemas de grupos sanguíneos. Desses, 4.748 antígenos pertenciam ao sistema Rh e 2.326 pertenciam a outros sistemas de grupos sanguíneos. Dos antígenos cadastrados (7.074), 2.396 antígenos não tinham nenhum histórico de fenotipagens anteriores e 304 já possuíam histórico e foram validados. Esses resultados encontram-se ilustrados nas figuras 16 e 17 abaixo.

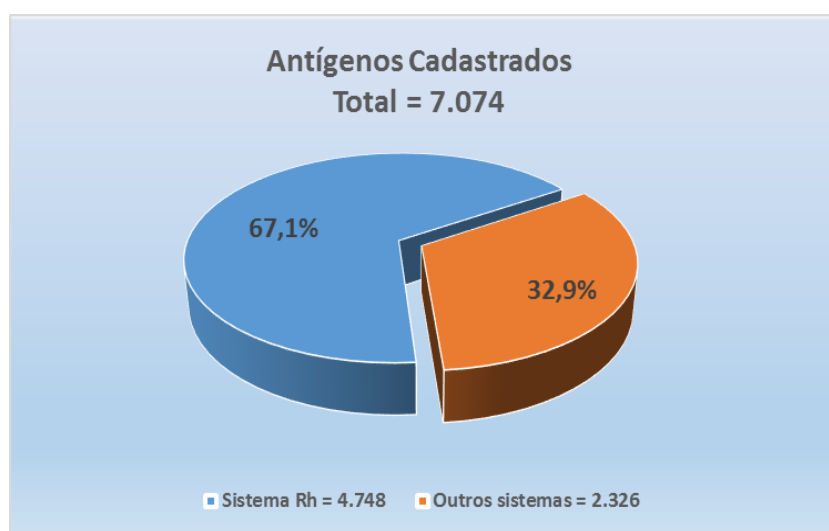


Figura 16 - Total de antígenos cadastrados do sistema Rh e de outros sistemas de grupos sanguíneos no sistema SBS

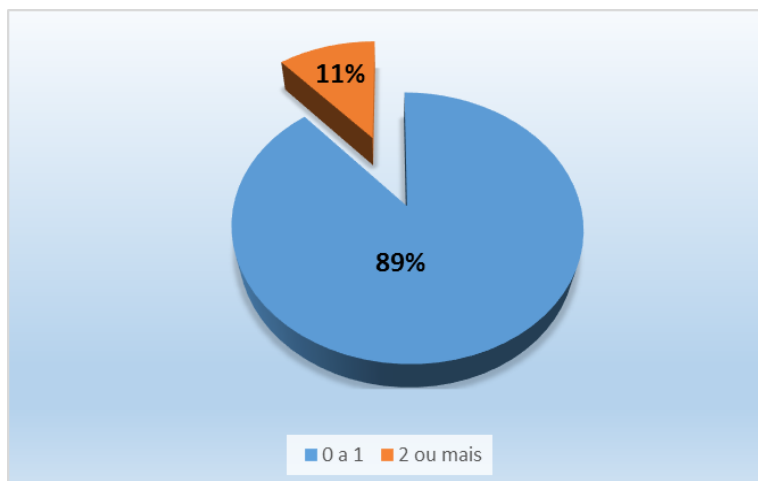


Figura 17 – Total de antígenos/fenótipos cadastrados (≤ 1) e total de antígenos/fenótipos validados (≥ 2) no sistema SBS



Após a seleção desses antígenos por sistemas de grupos sanguíneos, obtivemos as respectivas frequências em relação ao total cadastrado, ao total por sistema e aos antígenos positivos e negativos do sistema.

Depois do sistema ABO, os antígenos do sistema Rh são os mais importantes pois estão envolvidos na maioria das respostas imunes. A ordem crescente de imunogenicidade dos antígenos mais comuns do sistema Rh é: $D > c > E > C > e$ ^{7,18,20}.

De acordo com os nossos resultados o sistema Rh, apresentou a maior parte de antígenos cadastrados (67,1%) como demonstrado no gráfico 2, uma vez que uma alta porcentagem (460 doadores/mês) dos doadores de sangue são fenotipados para esse sistema como recomendado na portaria nº 2712 de 12 de novembro de 2013 (Figura 18).

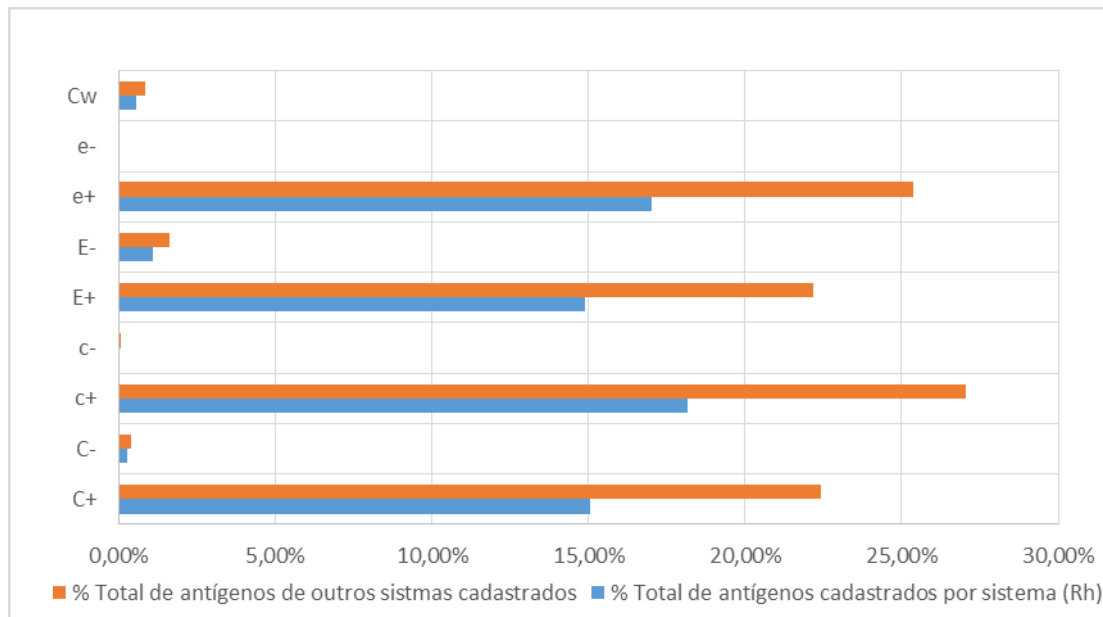


Figura 18 – Comparação entre o total de antígenos cadastrados do sistema Rh em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

Já na figura 19 abaixo, podemos observar a quantidade de antígenos do sistema Rh que foram cadastrados no sistema SBS.

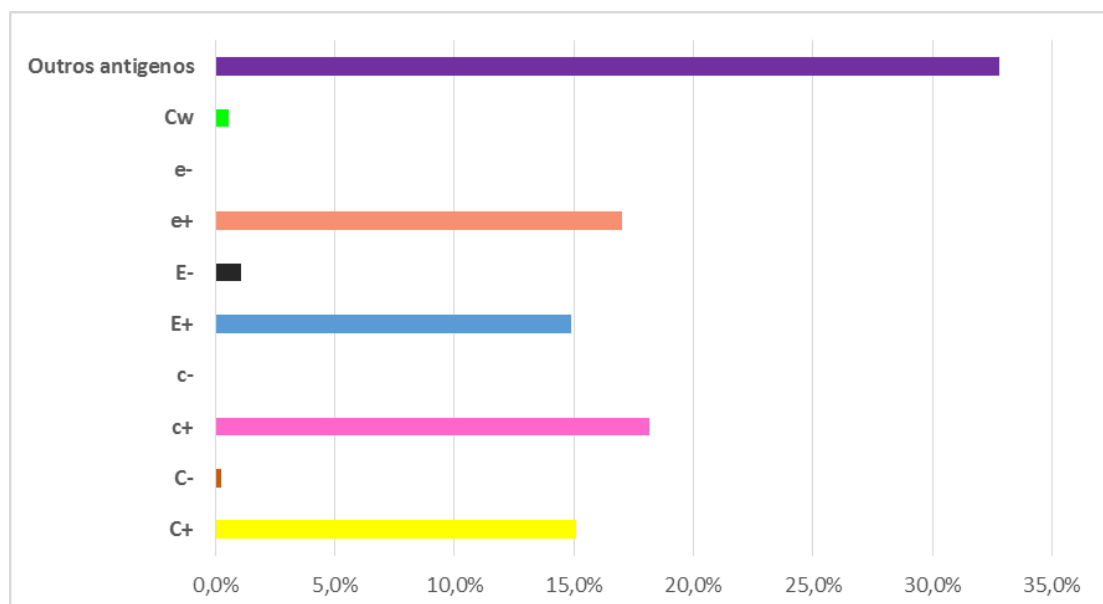


Figura 19 – Total de antígenos do sistema Rh e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados





Segundo Belguiman, 2003, a maior parte da população apresenta os antígenos C, c, E, e (70% C, 30% E, 80% c e 98% e), assemelhando-se com os resultados encontrados nesse estudo⁶.

O antígeno encontrado com maior frequência em nosso estudo foi o antígeno c, com 18,2% quando comparado com o total de antígenos cadastrados e 27,0% quando comparado com os outros antígenos do sistema Rh (Figura 19). Os antígenos negativos são menos frequentes, uma vez que a maior parte da população possui esses antígenos na membrana eritrocitária, com exceção do antígeno Cw, que não é encontrado frequentemente na população^{7,18,19}. Nas figuras 20, 21, 22 e 23 podemos observar as frequências dos antígenos positivos e negativos do sistema Rh na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

Segundo Beiguelman (2003), o aparecimento do antígeno Cw ocorre com uma frequência que varia de 1 a 2% nas populações caucasoides. Em nosso estudo, encontramos uma frequência de 100% do antígeno Cw negativo na população estudada (Figura 24).

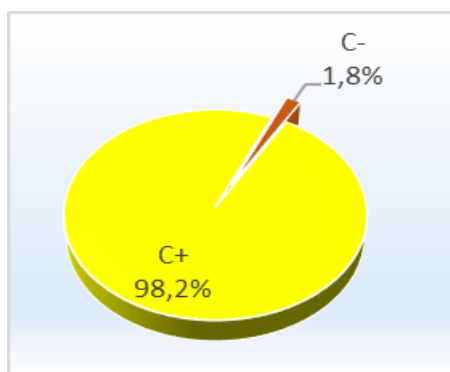


Figura 20 – Total do antígeno C+ e antígeno C- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

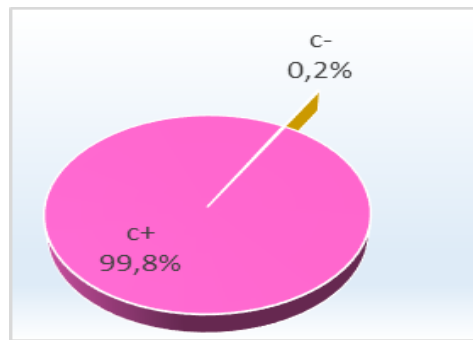


Figura 21 – Total do antígeno c+ e antígeno c- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

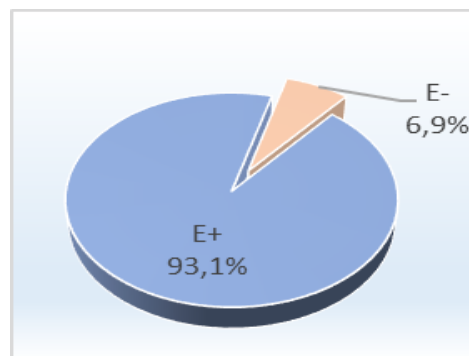


Figura 22 – Total do antígeno E+ e antígeno E- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

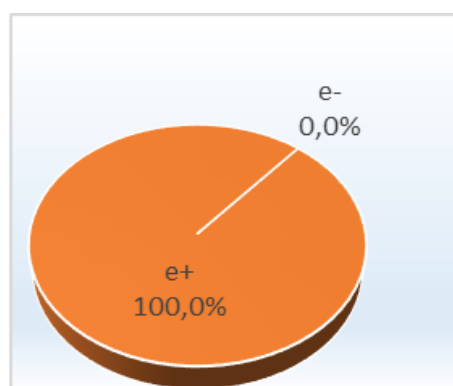


Figura 23 – Total do antígeno e+ e antígeno e- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

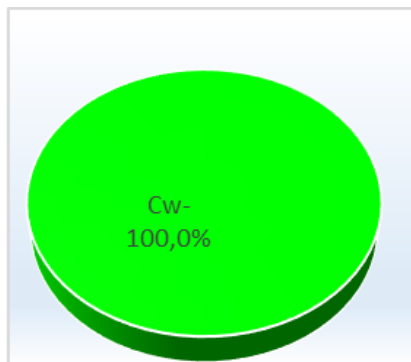


Figura 24 – Total do antígeno Cw+ e antígeno Cw- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

O antígeno K (sistema Kell) é considerado o antígeno mais imunogênico, depois do antígeno D (Sistema Rh), porém o mesmo não foi encontrado com frequência na população estudada (Figuras 25, 26, 27).

De acordo com Reid, et al (2013), o antígeno K possui baixa incidência nas populações (9% caucasianos, 2% negros, raro asiáticos). Beiguelman (2003) afirma que a importância do antígeno K é muito grande porque somente os antígenos do sistema ABO e o antígeno D do sistema Rh são mais imunogênicos que ele, além do mesmo estar entre as causas da doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN)^{7,18}. Quanto ao antígeno k, sua incidência é grande na maior parte das populações caucasianas e negras (Figura 28)¹⁸.

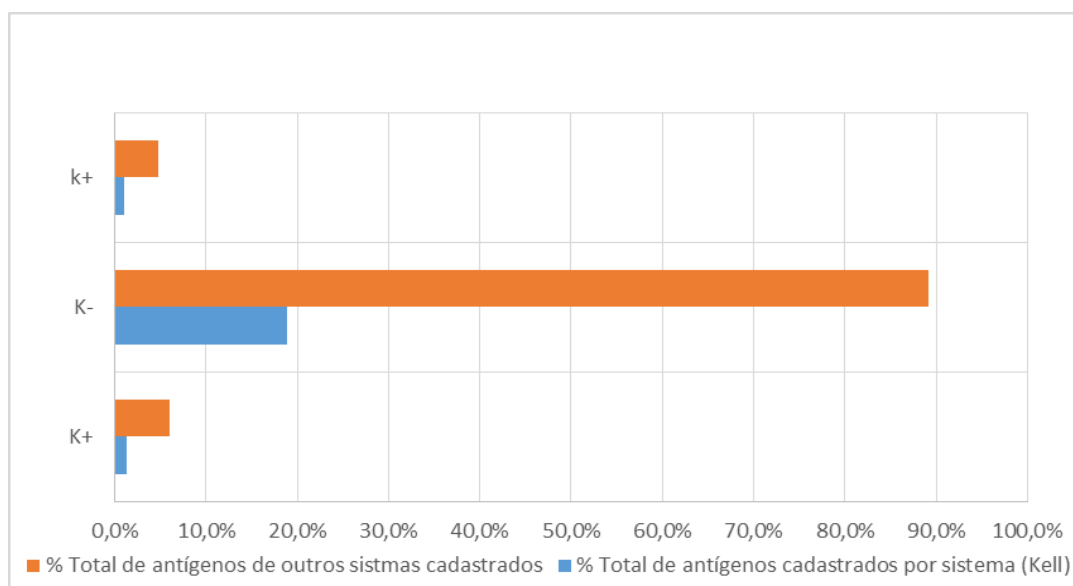


Figura 25 – Comparação entre o total de antígenos K+, K-, k+ cadastrados em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

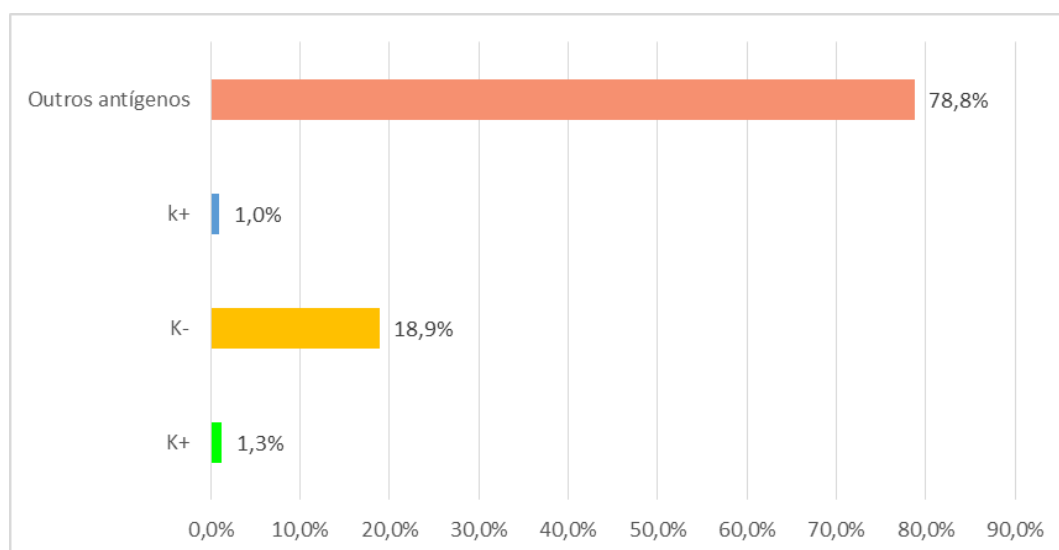


Figura 26 – Total dos antígenos K+, K-, k+ e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

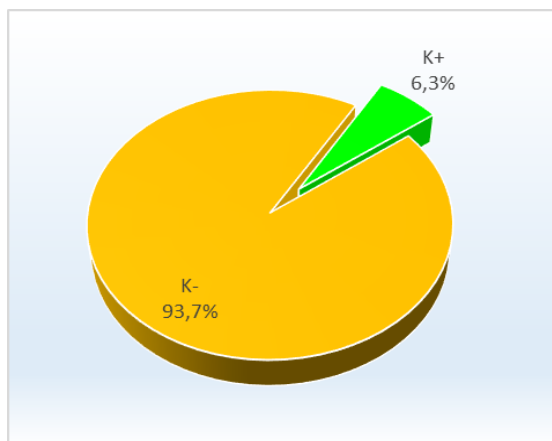


Figura 27 – Total do antígeno K+ e antígeno K- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

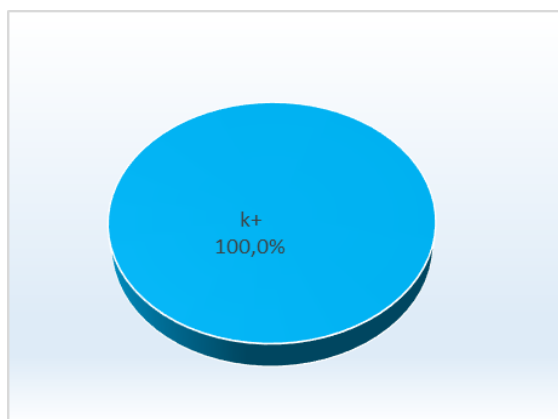


Figura 28 – Total do antígeno k+ e antígeno k- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

De acordo com Reid, et. al (2012), o antígeno Kp^a (Sistema Kell) possui uma frequência muito baixa em caucasianos (2%) e negros (menor que 0,01%), enquanto que o antígeno K^b é de alta frequência, dados estes que vem de encontro com os obtidos no nosso estudo (Figuras 29, 30 e 31).

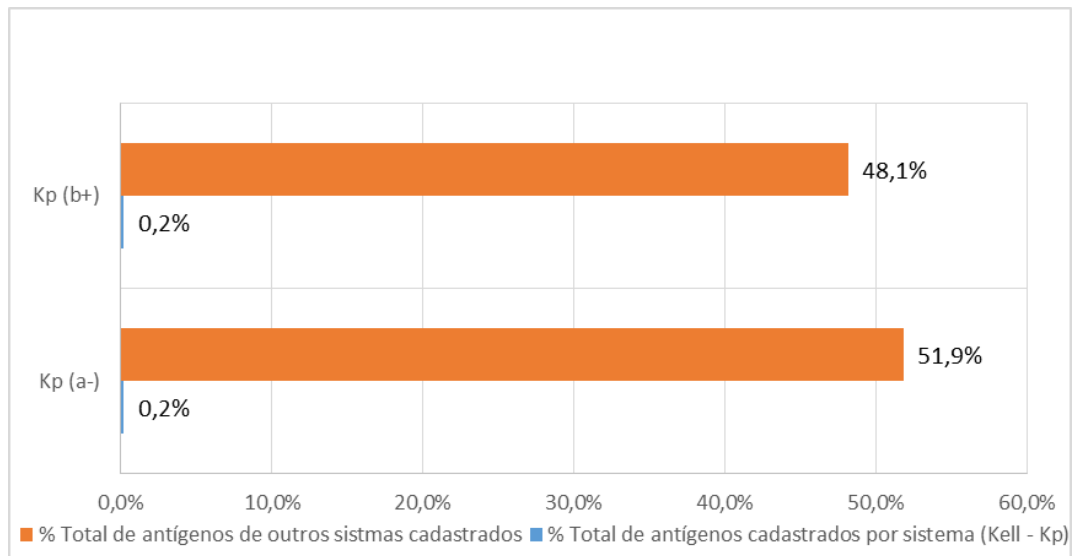


Figura 29 – Comparação entre o total de antígeno Kp (a-) e antígeno Kp (b+) cadastrados em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

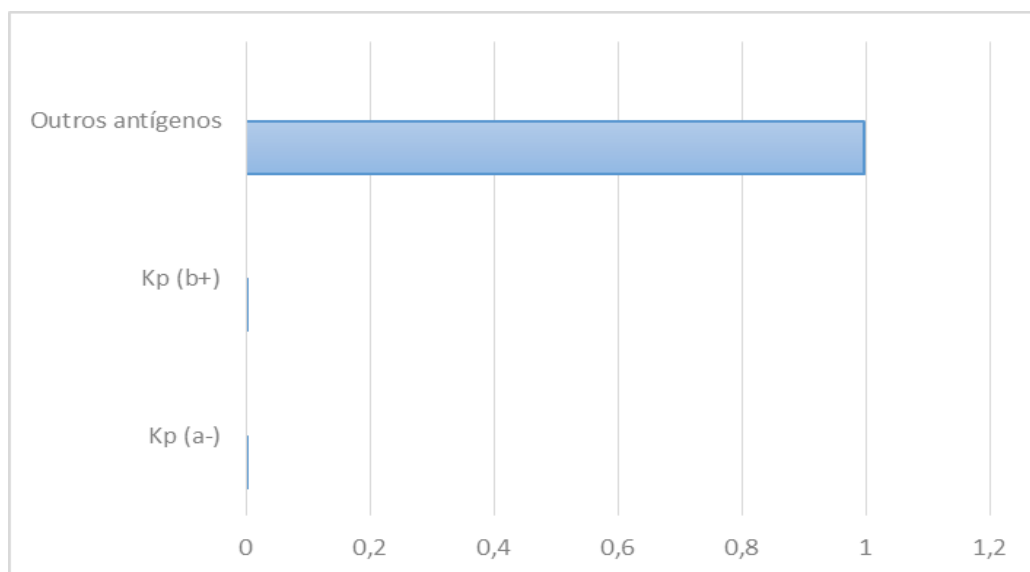


Figura 30 – Total do antígeno Kp (a-) e antígeno Kp (b-) e de outros antígenos sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

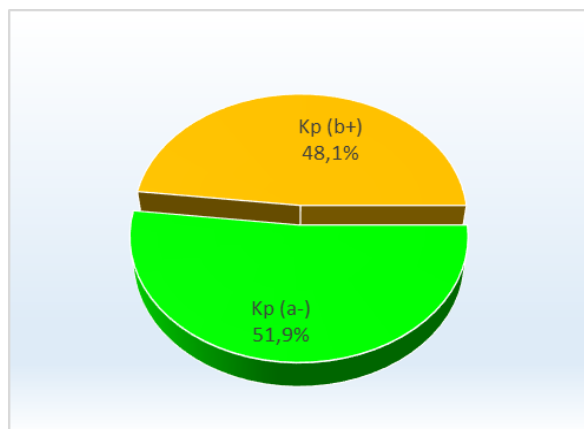


Figura 31 – Total do antígeno Kp (a-) e antígeno Kp (b+) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Depois do sistema ABO, Rh e Kell, o Sistema Duffy está entre os sistemas de grupos sanguíneos que possuem seus antígenos classificados como imunogênicos⁶. Em relação ao sistema Duffy, podemos dizer que a maior parte da população apresenta os antígenos Fy^a e Fy^b , com exceção da população negra, que em sua grande maioria não apresenta esses antígenos^{7,20}. A maioria dos negros africanos apresentam resistência a malária, sendo a glicoproteína Duffy receptora para o *plasmodium vivax*. Tendo em vista que o fenótipo $Fy(a-b-)$ é muito frequente (quase 100%) em negros, as pesquisas genéticas em relação a esta resistência é de grande importância, uma vez que o sistema Duffy está relacionado com a resistência a malária^{7,20,21}. Segundo Quinley (2011), a ocorrência dos antígenos do sistema Duffy, Fy^a e Fy^b se aproxima em 100% dos caucasianos e asiáticos mas é encontrado em somente 32% dos negros.

Os dados relatados acima não condizem com os nossos achados e podem ser justificado pelo fato de que os dados presentes representam apenas uma parte da população de Botucatu e região. Além deste fato, antígenos de outros sistemas de grupos sanguíneos foram cadastrados com maior frequência que os antígenos Fy^a e Fy^b em nosso sistema, o que pode ter gerado essa diferença de frequência em relação a literatura (Figuras 32, 33, 34 e 35).

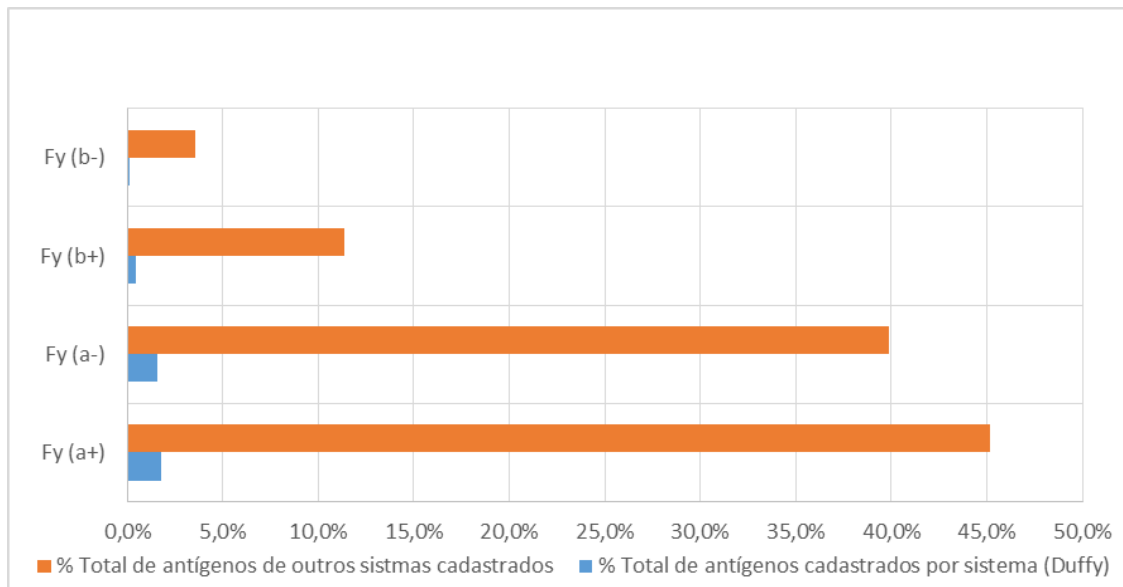


Figura 32 – Comparação entre o total de antígenos do sistema Duffy em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

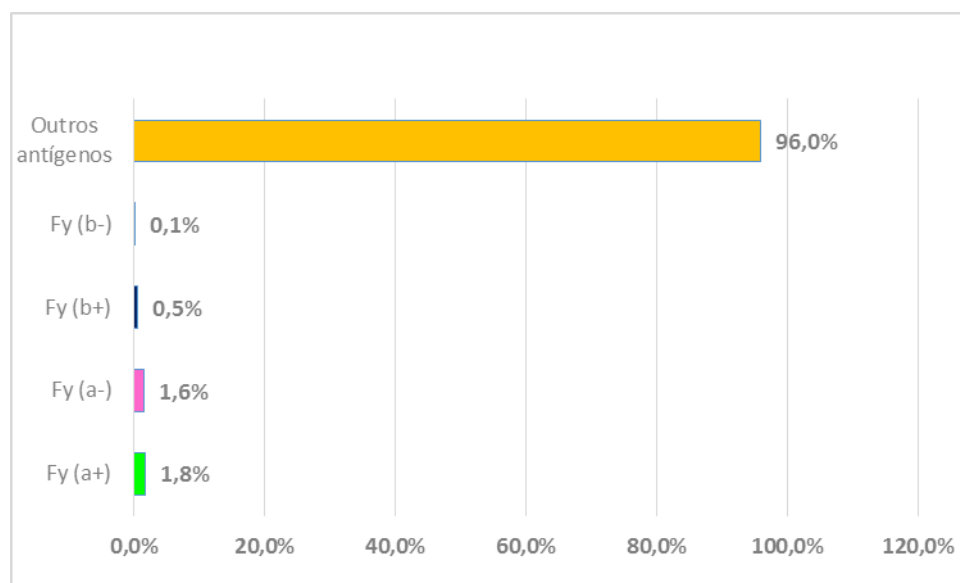


Figura 33 – Total dos antígenos do sistema Duffy e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

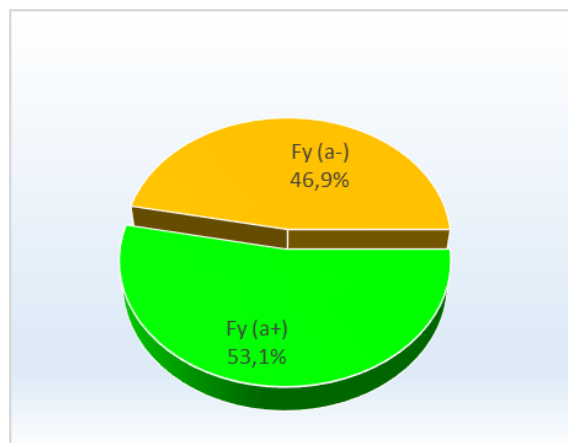


Figura 34 – Total do antígeno Fy (a+) e antígeno Fy (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

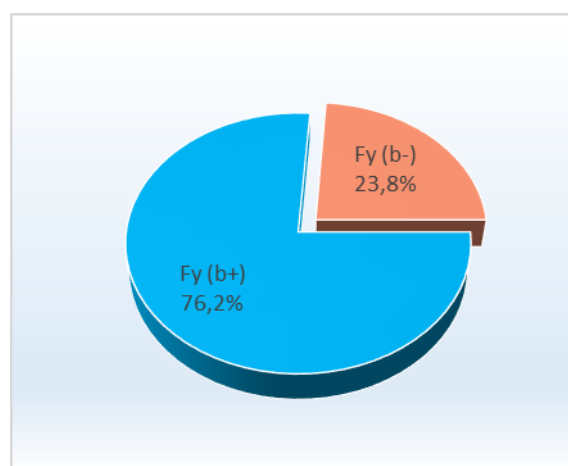


Figura 35 – Total do antígeno Fy (b+) e antígeno Fy (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Reid et al (2012) relatam em relação as frequências dos antígenos do sistema Lutheran, que o antígeno Lu^a não está presente na maior parte da população, e o antígeno Lu^b tem alta frequência em todas as populações, dado este que vem de encontro com as frequências encontradas nesse estudo. Diante da população estudada, não encontramos muitos doadores fenotipados para esse sistema em comparação aos demais sistemas de grupos sanguíneos (Figuras 36, 37, 38 e 39).

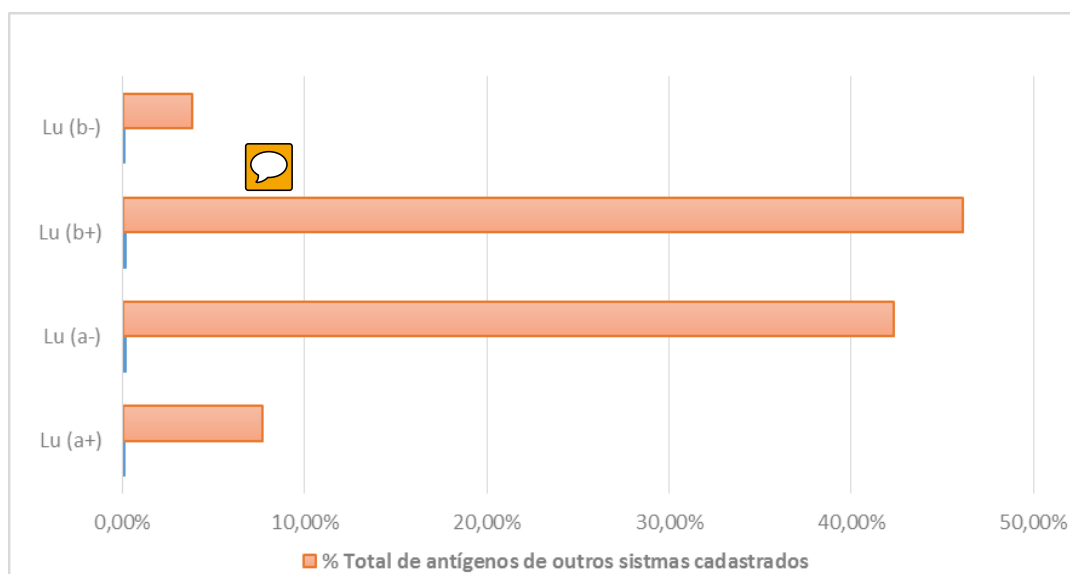


Figura 36 – Comparação entre o total de antígenos do sistema Lutheran em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

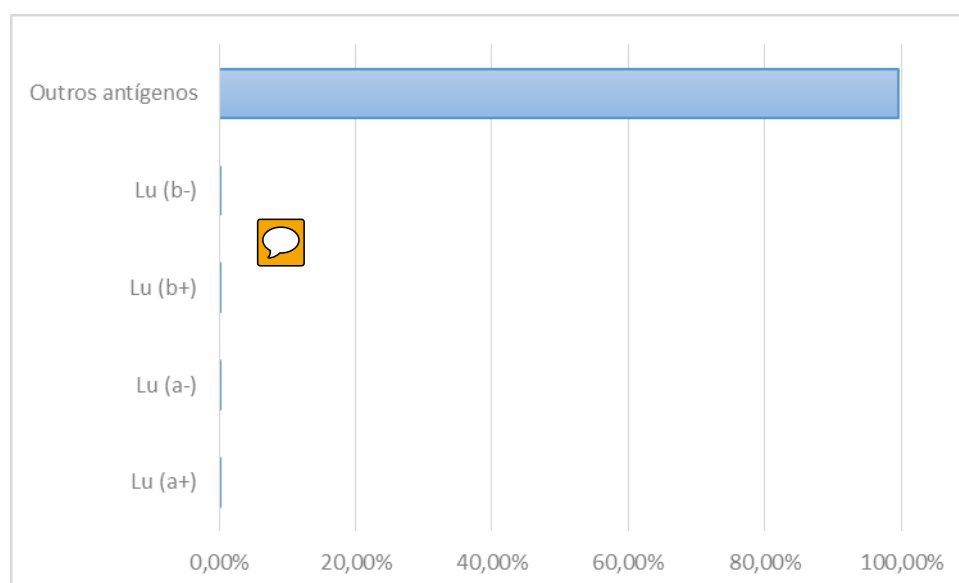


Figura 37– Total dos antígenos do sistema Lutheran e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

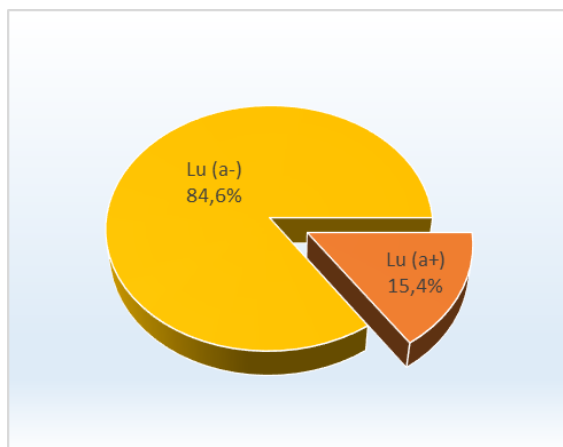


Figura 38 – Total do antígeno Lu (a+) e antígeno Lu (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

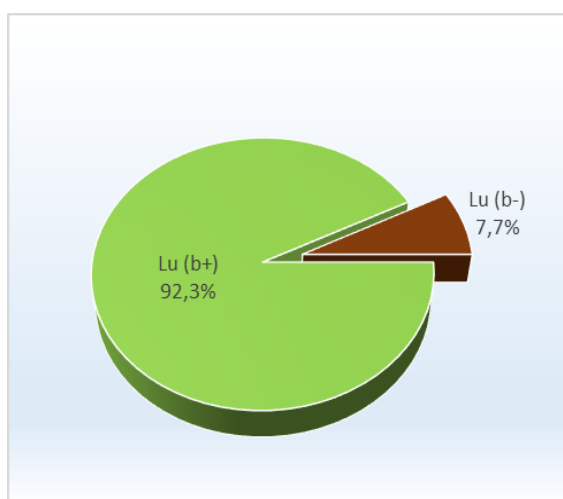


Figura 39 – Total do antígeno Lu (b+) e antígeno Lu (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Dos antígenos que constituem o sistema de grupo sanguíneo P, o antígeno P1 é o que apresenta alta frequência nas populações, afirma Quinley (2011), dados os quais assemelham-se com os encontrados nesse estudo (Figuras 40, 41 e 42)²⁰.

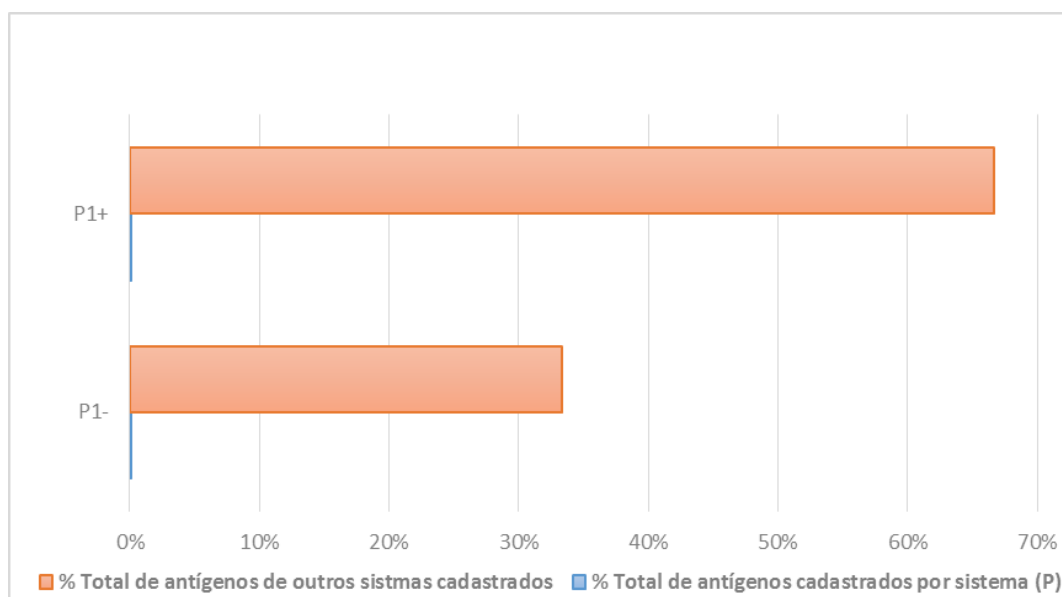


Figura 40 – Comparação entre o total de antígenos P1 em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

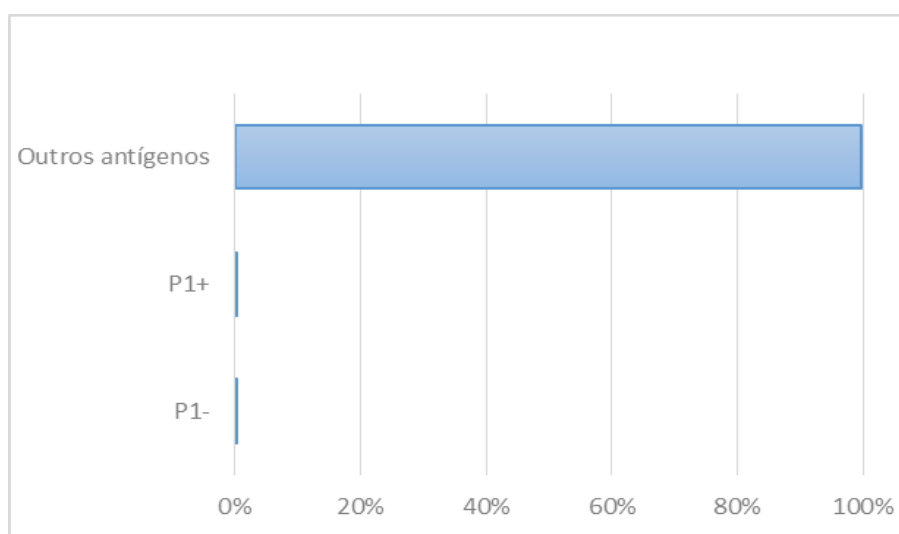


Figura 41 – Total do antígeno P1 e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

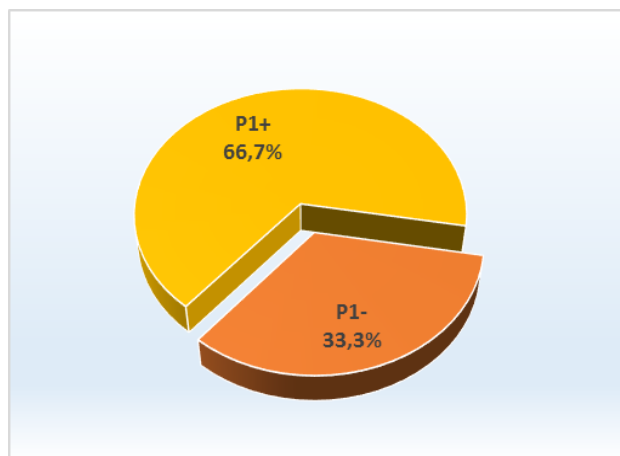


Figura 42 – Total do antígeno P1+ e antígeno P1- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Os antígenos do sistema Lewis, Le^a e Le^b, são glicoproteínas solúveis na saliva e fluidos corporais (exceto LCR), além de estarem presentes na membrana eritrocitária. O antígeno Le^b especificamente na mucosa gástrica é receptor para a bactérias *Helicobacter pylori*, sendo assim, torna-se importante o conhecimento dos antígenos **dess** sistema¹². Relativamente a maior parte da população não apresenta o antígeno Le^a e apresenta o antígeno Le^b, o que vem de encontro com nossos achados^{12,18}. Em nosso estudo, não foram encontrados um número significativo de doadores fenotipados para o sistema Lewis quando comparados as fenotipagens de antígenos de outros grupos sanguíneos (Figura 43, 44, 45 e 46).

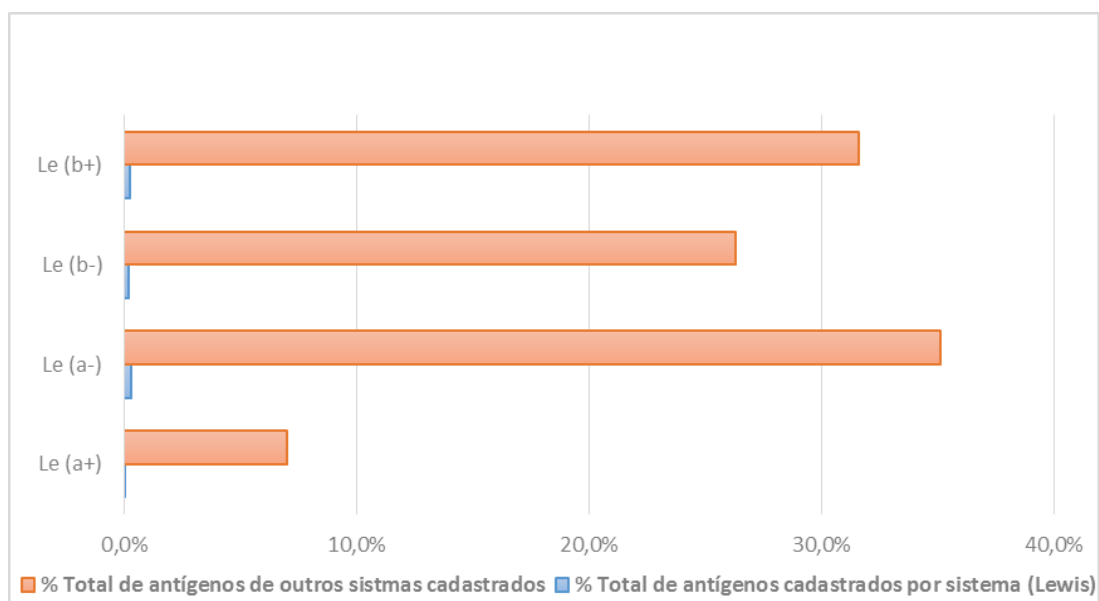


Figura 43 – Comparação entre o total de antígenos do sistema Lewis em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

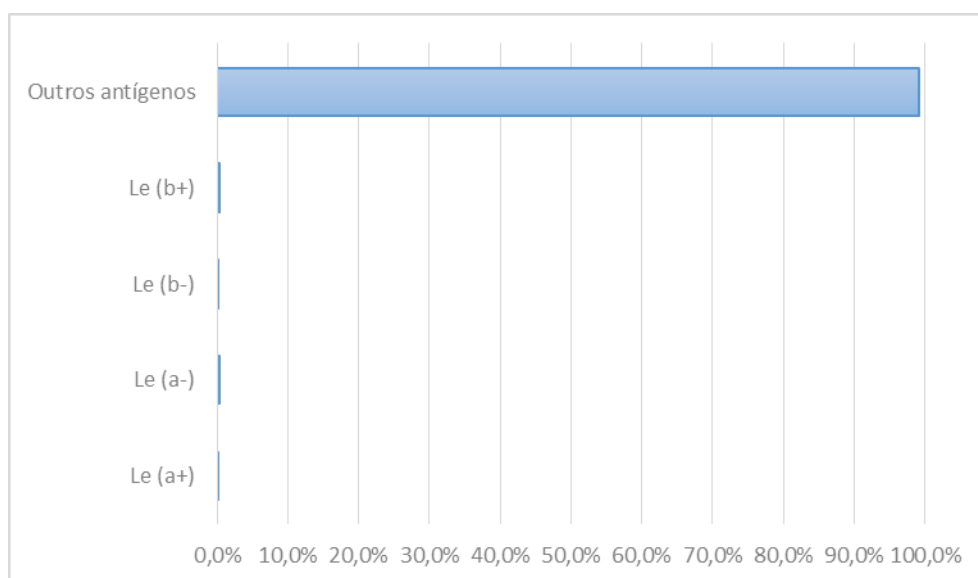


Figura 44 – Total dos antígenos do sistema Lewis e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

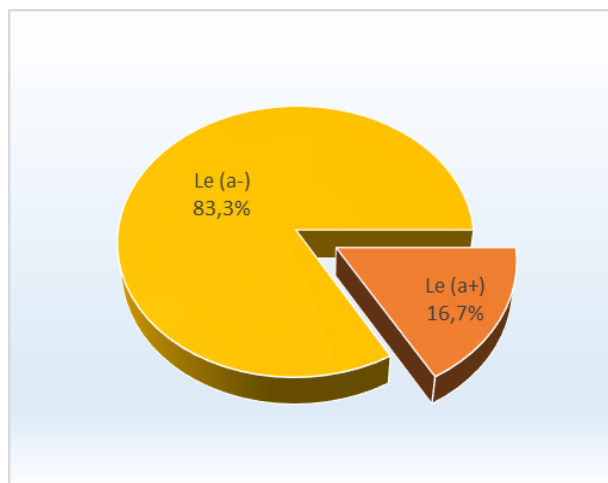


Figura 45 – Total do antígeno Le (a+) e antígeno Le (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

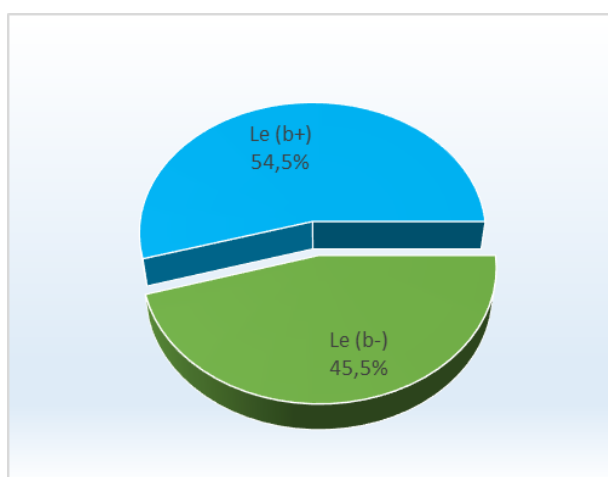


Figura 46 – Total do antígeno Le (b+) e antígeno Le (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Sobre os antígenos do sistema MNS, os mais importantes são o M, N, S, s e U. A ocorrência dos antígenos M e N é alta na população (78% caucasianos, 74% negros, 72% caucasianos e 75% negros), concordando com os dados encontrados nesse trabalho. Já o antígeno S varia em uma frequência de 55% em caucasianos e 31% em negros, enquanto o s possui uma ocorrência maior (89% caucasianos e 93% negros)^{18,21}. Alguns desses dados são semelhantes ao nosso estudo, com exceção ao antígeno s que não

foi encontrado em nenhum dos doadores cadastrados (Figuras 47, 48, 49, 50 e 51).

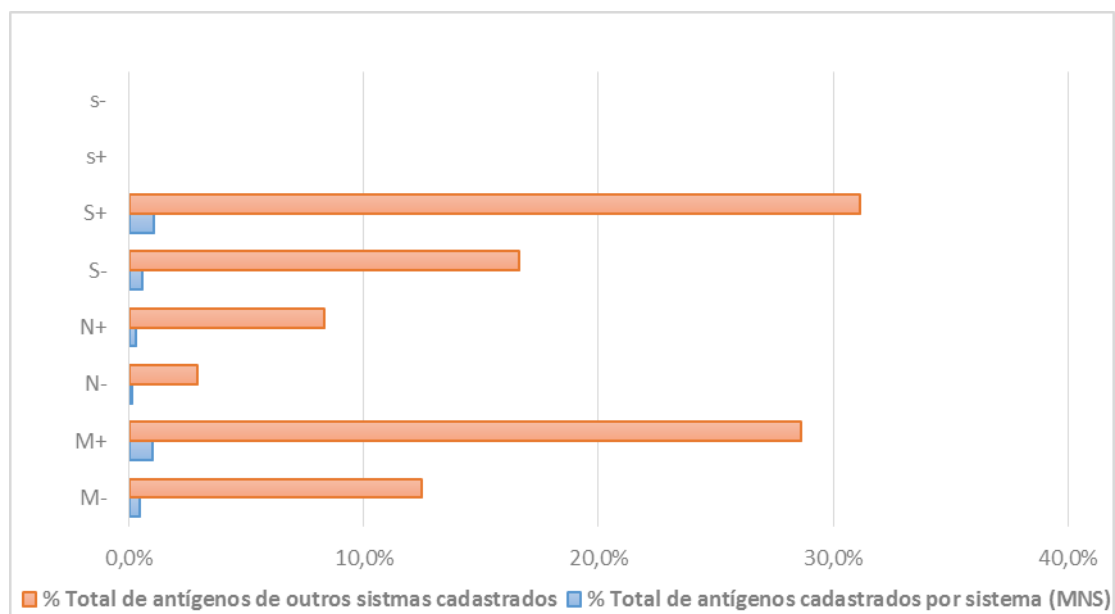


Figura 47 – Comparação entre total de antígenos do sistema MNS em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

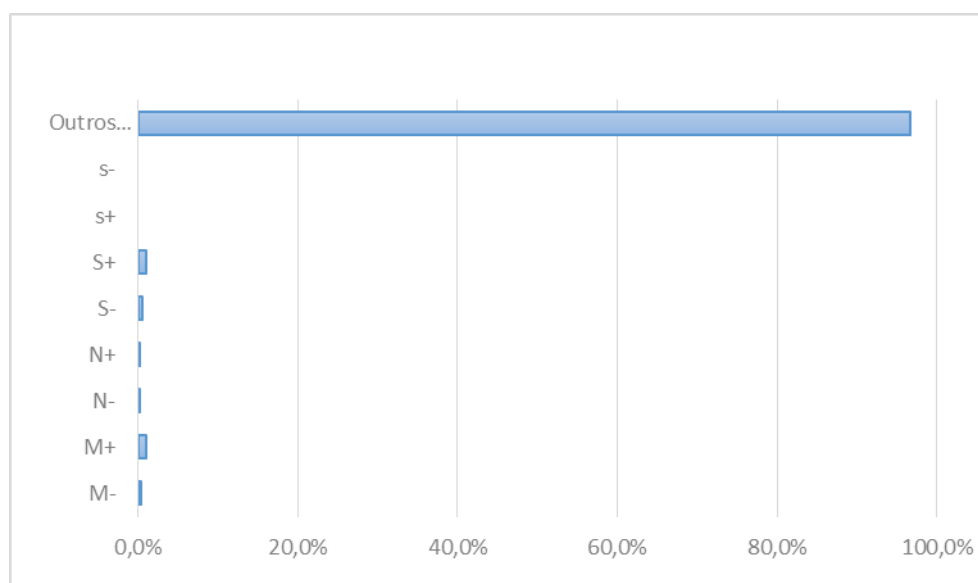


Figura 48 – Total dos antígenos do sistema MNS e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

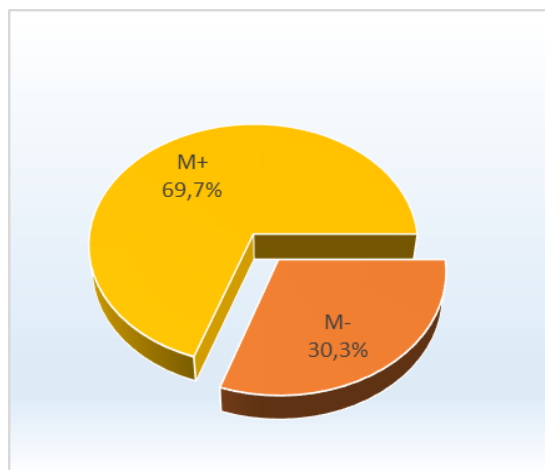


Figura 49 – Total do antígeno M+ e antígeno M- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

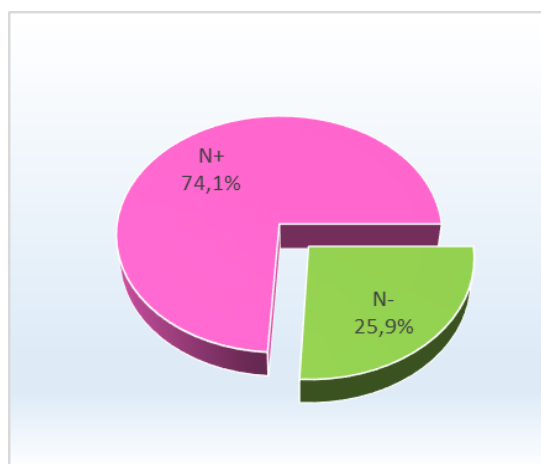


Figura 50 – Total do antígeno N+ e antígeno N- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

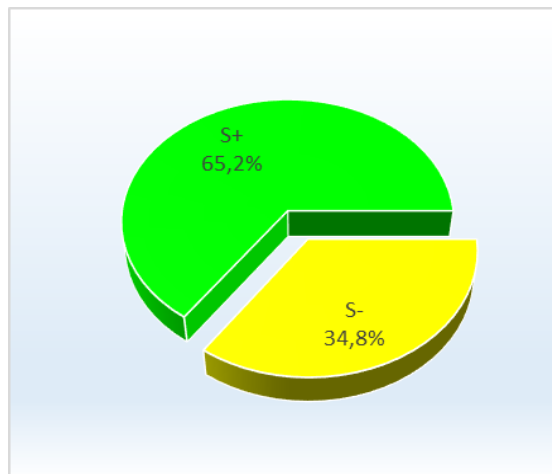


Figura 51 – Total do antígeno S+ e antígeno S- na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

O sistema Kidd é constituído por dois antígenos Jk^a e Jk^b , os quais possuem frequências similares entre as populações, sendo que o $Jk(a)$ (76% caucasianos e 92% negros) é um pouco mais frequente do que o $Jk(b)$ (72% caucasianos e 49% negros)^{19,20}. Neste estudo, encontramos frequências similares com as da literatura como representado nas figuras 52, 53, 54 e 55 abaixo.

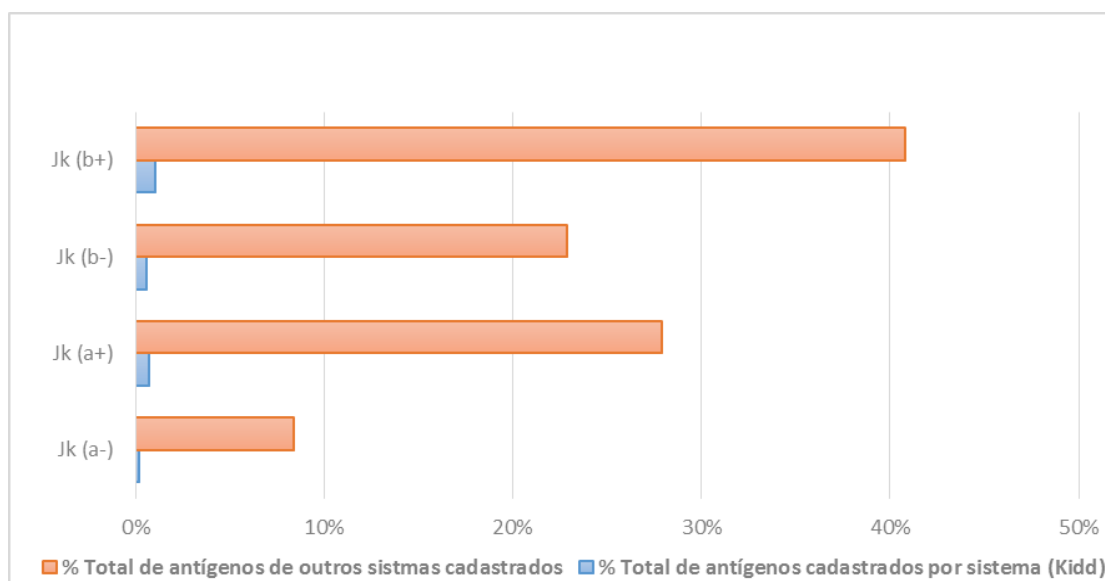


Figura 52 – Comparação entre total de antígenos do sistema Kidd em relação ao total de antígenos de outros sistemas cadastrados

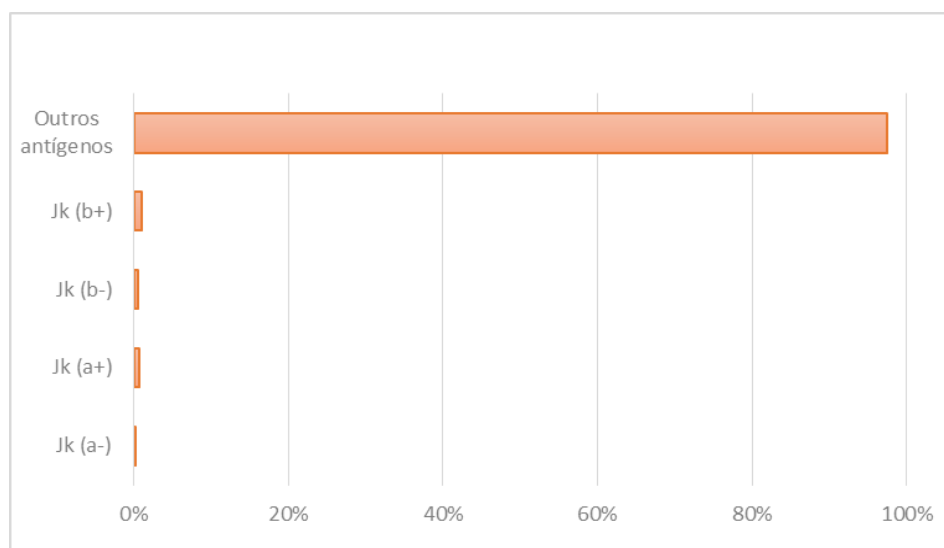


Figura 53 – Total dos antígenos do sistema Kidd e de outros sistemas de grupos sanguíneos cadastrados

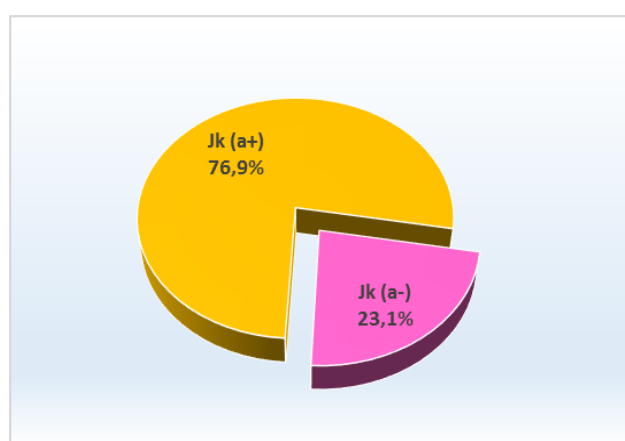


Figura 54 – Total do antígeno Jk (a+) e antígeno Jk (a-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

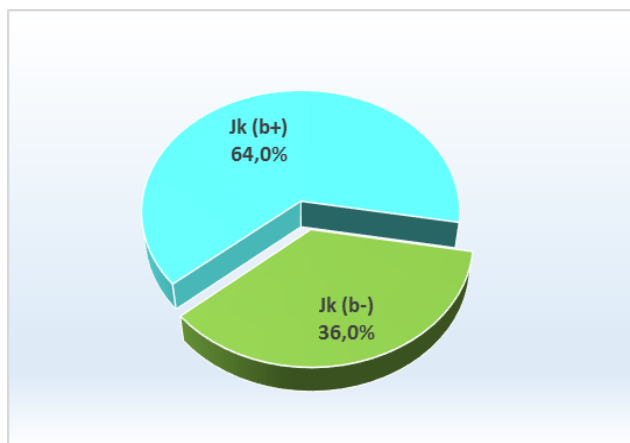


Figura 55 – Total do antígeno Jk (b+) e antígeno Jk (b-) na população estudada dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

No nosso estudo foram cadastrados um total de 7.074 antígenos, diminuindo a necessidade de fenotipar novamente um determinado doador para que deste modo, o mesmo tenha o seu fenótipo validado (2 ou mais fenotipagens realizadas) e podermos validar outros utilizando o mesmo recurso financeiro. Como citado no nosso estudo, 89% dos doadores foram cadastrados e 11% foram validados. Diante disso, tivemos uma economia de R\$42.252,00 (R\$18.992,00 do sistema Rh e R\$23.260,00 de outros sistemas) devido as fenotipagens cadastradas que foram resgatadas de livros de bancada (ano de 2001 a 2007) e consequentemente não sendo necessária a realização da repetição do teste.

Castilho, et al (2015) afirmam que a maioria dos anticorpos de grupos sanguíneos são formados em resposta aos antígenos presentes nas hemácias, como resultados de transfusão ou gestação. Alguns anticorpos causam a destruição imunológica das hemácias transfundidas que apresentam o antígeno correspondente, podendo resultar em reações transfusionais hemolíticas imediatas ou tardias¹². No nosso estudo, de um total de 31.942 doadores de sangue, dos quais foram realizadas a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) na rotina laboratorial, 77 apresentaram a PAI positiva. Para elaboração da soroteca/plasmateca (caixa contendo alíquotas de diferentes anticorpos em microtubos) constituída por painéis de soros/plasmas raros,

realizamos novamente a PAI (das 77 amostras que apresentaram o resultado positivo (PAI+) inicialmente na rotina laboratorial) e posteriormente, a Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI), o tratamento com Dithiothreitol (DTT) se necessário e a titulação de anticorpos. Destas (77) amostras com PAI positiva, 21 foram incluídas na constituição da soroteca/plasmateca, pois consideramos como critérios de inclusão: a importância clínica, a especificidade e o título dos anticorpos (apresentado reatividade com diluição maior que $\frac{1}{2}$). Do total de anticorpos identificados (77), os de maior prevalência foram: anti-D, anti-M, anti-E, Anti-Dia, anti-D+C e anti-Le^a (Figura 56).

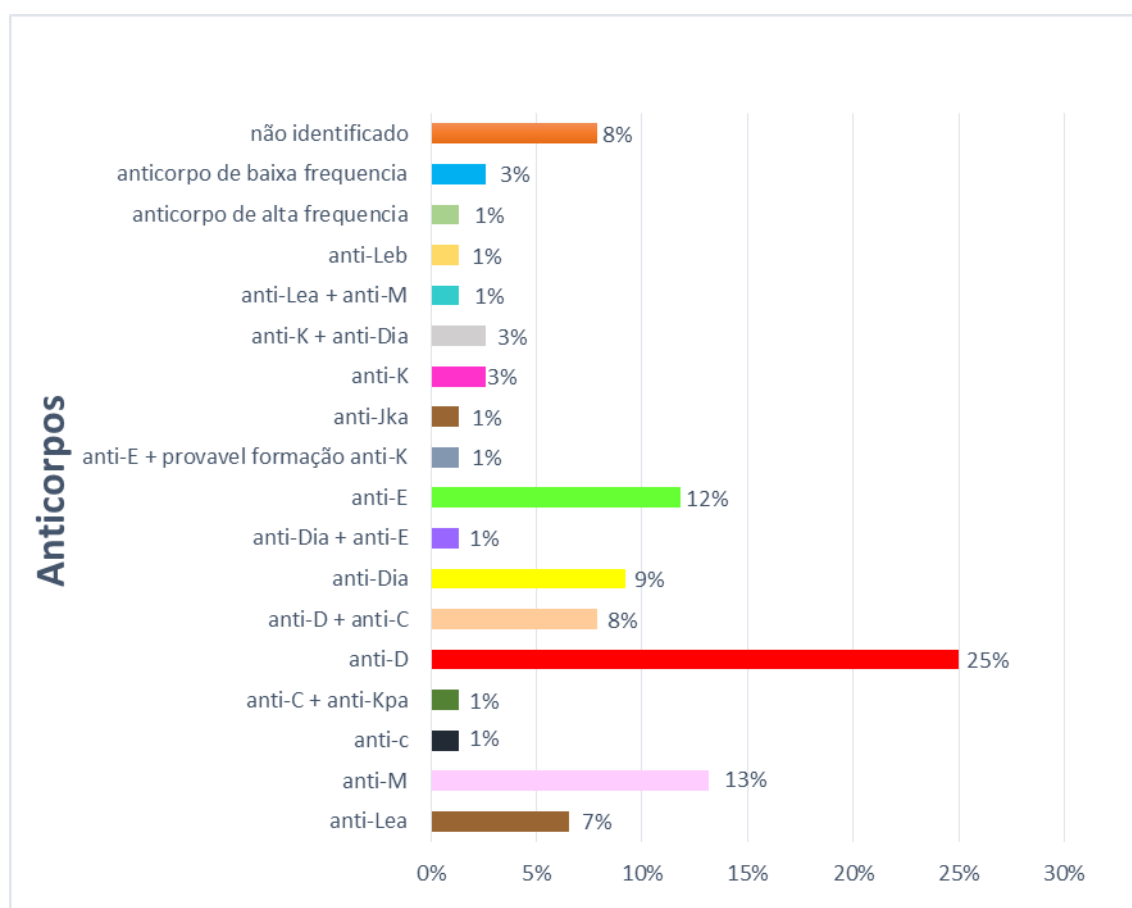


Figura 56 – Total de anticorpos identificados nas 77 amostras de soro dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Em relação aos anticorpos que constituíram a soroteca/plasmateca (21), destacamos: anti-Dia (19,0%), anti-M (19,0%), anti-E (14,3%) e anti-K (9,5%) (Figura 57).

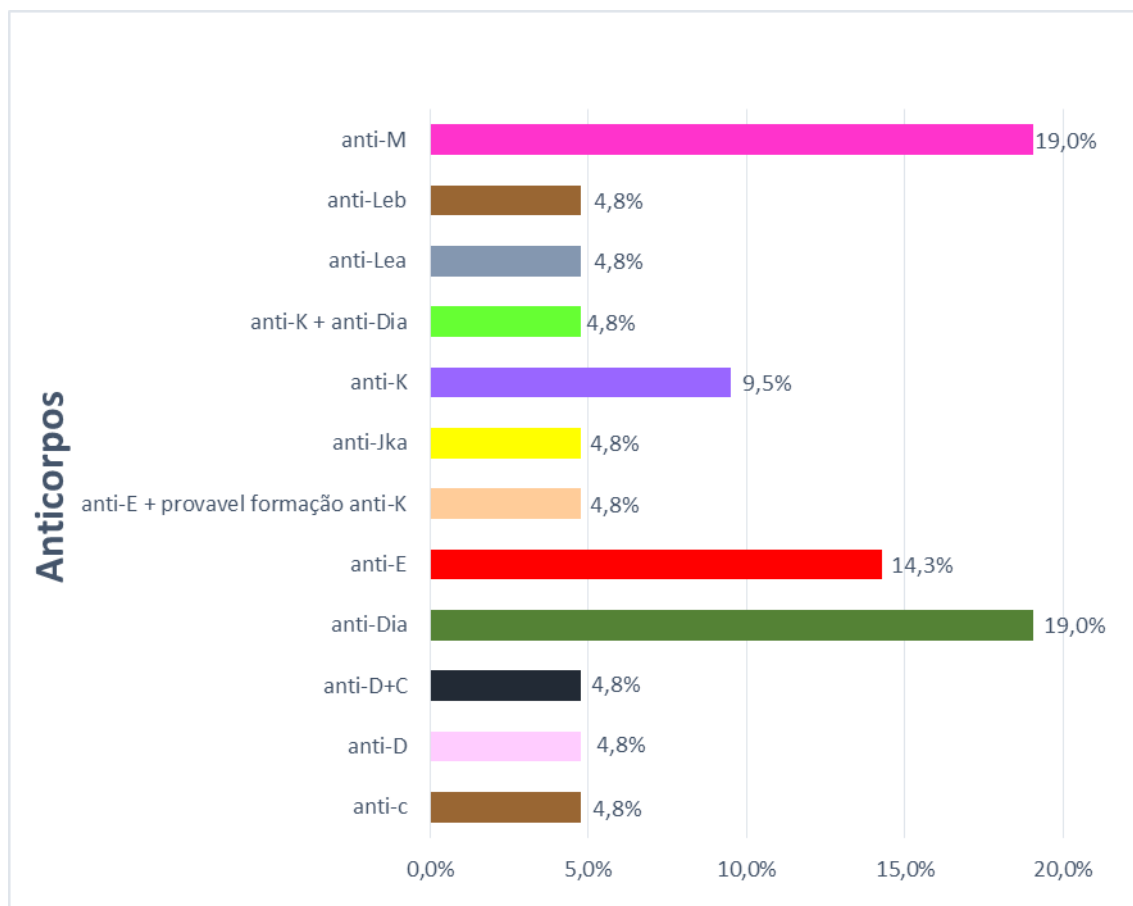


Figura 57 – Total de anticorpos que constituíram a soroteca/plasmateca dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Após seis meses da montagem da soroteca/plasmateca, realizamos o monitoramento do título dos anticorpos através da técnica de titulação. Alguns anticorpos mantiveram o título, outros diminuíram o título e outros perderam totalmente o título (Figura 58 e Quadro 9). Através da técnica de titulação, observamos a reatividade do anticorpo, sendo que quanto maior for a diluição e houver a presença da reação de aglutinação, maior é a reatividade do anticorpo.

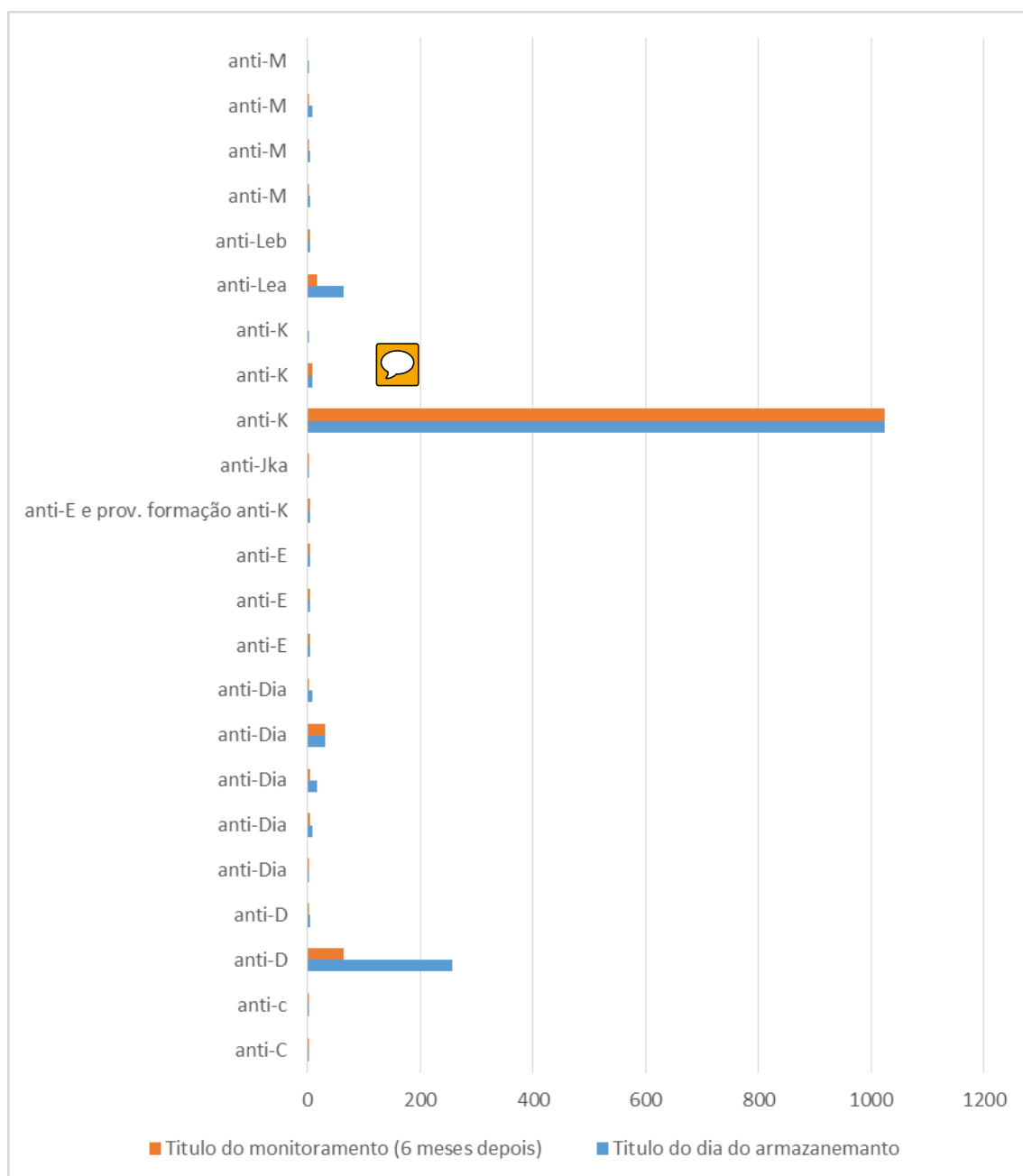


Figura 58 – Título dos anticorpos da soroteca/plasmateca no dia do armazenamento e no dia do monitoramento (6 meses depois)

Quadro 9 – Título dos anticorpos da confecção da soroteca/plasmateca e do monitoramento

Anticorpo	Título Coleta	Título Monitoramento
anti-C	2 (G)	1 (G)
anti-c	2 (T)	1 (T)
anti-D	256 (T)	64 (T)
anti-D	4 (T)	2 (T)
anti-Dia	2 (G)	2 (G)
anti-Dia	8 (G)	4 (G)
anti-Dia	16 (G)	4 (G)
anti-Dia	32 (G)	32 (G)
anti-Dia	8 (T)	2 (T)
anti-E	4 (G)	4 (G)
anti-E	4 (G)	4 (G)
anti-E	4 (G)	4 (G)
anti-E e provável formação anti-K	4 (G)	4 (G)
anti-Jka	2 (G)	1 (G)
anti-K	1024 (G)	1024 (G)
anti-K	8 (T)	8 (T)
anti-K	1 (G)	0 (G)
anti-Lea	64 (T)	16 (T)
anti-Leb	4 (T)	4 (T)
anti-M	4 (T)	2 (T)
anti-M	4 (T)	1 (T)
anti-M	8 (T)	2 (T)
anti-M	2 (T)	0 (T) e 2 (G)

(T) = Tubo e (G) = Gel

O anticorpo anti-M normalmente é classificado como IgM (reativo à 22°C) mas também pode ser encontrado como IgG (reativo à 37°C), sendo neste caso, considerado de importância clínica. Não reage com células tratadas com enzimas (papaína e ficsina). Pode ser encontrado no soro ou plasma de indivíduos que nunca receberam transfusão ou nunca tiveram gestação²⁰. Nesse estudo, 4 sorotecas/plasmatecas são de anticorpos anti-M, sendo que tres deles foram classificados como IgM e **diminuíram** o título durante o período do monitoramento e apenas um teve a redução da reatividade com consequente perda do título total e foi classificado como IgG.

Segundo Girelo & Kun (2011), os anticorpos do sistema Kell tem significado clínico, geralmente são da classe IgG (reativos à 37°C), podendo

ocasionar reações hemolíticas graves imediatas ou tardias, assim como DHFRN grave. A anemia da DHFRN pode ser severa porque o anti-K causa a supressão da eritropoese²⁰. Harmenig (2006), afirma que o anti-K exibe efeito de dose, contudo nem sempre esse efeito fica evidente. Muitos fatores além da zigose gênica podem enfraquecer ou afetar de alguma forma a expressão antigênica^{2,6}. Das três sorotecas/plasmatecas de anti-K, duas mantiveram o título e um perdeu totalmente o título depois de seis meses de monitoramento.

Anticorpos do sistema Kidd são estimulados por gestação ou transfusão, assim como a maioria dos anticorpos imunes e irregulares. São geralmente da classe IgG, possuem reatividade com enzimas e ao longo do tempo ocorre uma diminuição dessa reatividade até se tornarem indetectáveis^{20,21}. Encontramos apenas um doador de sangue com o anticorpo anti-Jk^a, sua reatividade foi considerada fraca, pois seis meses após o armazenamento, quando realizamos o monitoramento detectamos perda de título (de 1/2 para 1/1), porém apresentou reatividade no teste com o soro puro (1/1). Nossos achados corroboram com os dados da literatura^{20,21}.

Daniels & Bromilow (2007) afirmaram que todos os antígenos do sistema Rh devem ser considerados como significativos, pois possuem potencial para causarem reações transfusionais e doença hemolítica do feto e recém-nascido (DHFRN). O anti-D é o anticorpos mais importante na medicina transfusional depois do anti-A e anti-B. Sua ocorrência é geralmente da classe IgG, causa reações transfusionais e DHFRN graves e severas. O antígeno D é considerado altamente imunogênico, com uma média de 50% de aloimunizações. O anticorpo anti-c é clinicamente o mais importante depois do anti-D, geralmente causam severa DHFRN, enquanto que anti-C e anti-E raramente causam DHFRN^{12,19}.

Do total de doadores com PAI positivo (77), 19 apresentaram o anti-D, 9 anti-E, 1 anti-c, 1 associação do anti-C + anti-Kp^a. Porém nem todos fazem parte da soroteca/plasmateca, devido ao baixo título ou ao descarte da bolsa de plasma, antes que pudéssemos selecioná-la.

Os dois anticorpos anti-D da soroteca/plasmateca diminuíram o título após 6 meses de monitoramento, sendo que em um deles houve perda da reatividade com redução de dois títulos (1/256 para 1/64) e o outro de um título (1/4 para 1/2). Porém, os dois anticorpos ainda possuem reatividade. Os anticorpos anti-E, os quais constituíram 4 sorotecas/plasmatecas não perderam nenhum título, o anti-C e anti-c perderam um título, porém ainda possuem reatividade com a diluição 1/1.

Anticorpos do sistema Diego geralmente são imunes, da classe IgG. Anti-Di^a pode ser de ocorrência natural e podendo estar envolvido com reações transfusionais imediatas e tardias como também severa DHFRN^{2,19}. De acordo com Quinley (2011), anti-Di^a é raro na maioria da população, mas etnicamente deve ser considerado como anticorpo dirigido contra antígeno de baixa incidência.

De todos os doadores com PAI positivo, 9% apresentaram o anticorpos anti-Di^a, sendo que 5 sorotecas/plasmatecas contêm esse anticorpo. Em relação ao título e monitoramento desses anticorpos, 2 anti-Di^a mantiveram o título até o monitoramento, e os outros 3 perderam dois títulos, mas ainda possuem reatividade.

Os anticorpos Lewis geralmente são produzidos por pessoas Le (a-b-), sendo considerados naturais, porque estão presentes na membrana do eritrócito desde o nascimento¹⁸. São geralmente da classe IgM, portanto não causam DHFRN pois não atravessam a placenta. O anticorpos anti-Le^a é o anticorpo mais encontrado desse sistema, sendo da classe IgM na maior parte das vezes, porém pode-se encontrar também como sendo da classe IgG. O anticorpos anti-Le^b não é tão comum quanto anti-Le^a^{18,20,21}. Neste trabalho, de um total de 77 doadores com PAI positivo, 6 apresentaram o anti-Le^a e 1 anti-Le^b, ambos da classe IgM. Na soroteca/plasmateca, temos uma soroteca de cada anticorpo. Anti-Le^a diminui o título após seis meses de monitoramento, porém continuou com boa reatividade e anti-Le^b manteve o título. Ambos

passaram pelo tratamento com DTT para determinar a classe do anticorpo (IgM).

Até o presente momento, foram utilizados 62 microtubos de anticorpos da soroteca/plasmateca, gerando para o serviço uma economia de **20.600,00** reais em reagentes. Os anticorpos foram utilizados na triagem prévia de bolsas de concentrado de hemácias, sendo que as que apresentaram resultado negativo (bolsas compatíveis) foram posteriormente testadas com anti-soros comerciais.

Observamos com o uso uma economia de R\$5.150,00 se a fenotipagem prévia com as amostras da soroteca/plasmateca for realizada em tubo em relação do teste na técnica em gel a qual gerou uma economia de R\$51.500,00.

A média de idade que encontramos nos doadores que fazem parte da soroteca/plasmateca foi de 42,5 anos (Figura 59). Os doadores considerados caucasianos e do sexo feminino foram os mais prevalentes (Figura 60 e 61).

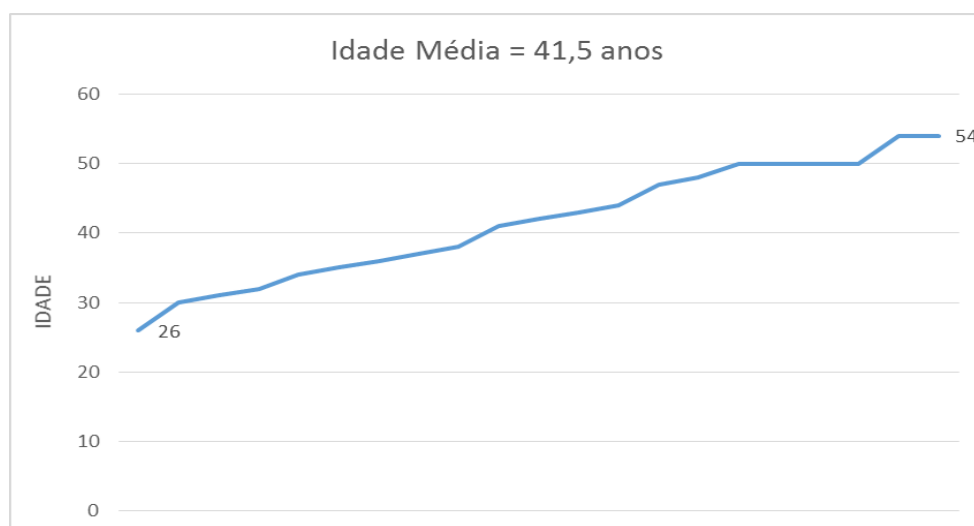


Figura 59 – Idade média dos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliqüotadas na soroteca/plasmateca



Figura 60 – Sexo em relação aos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliqotadas na soroteca/plasmateca

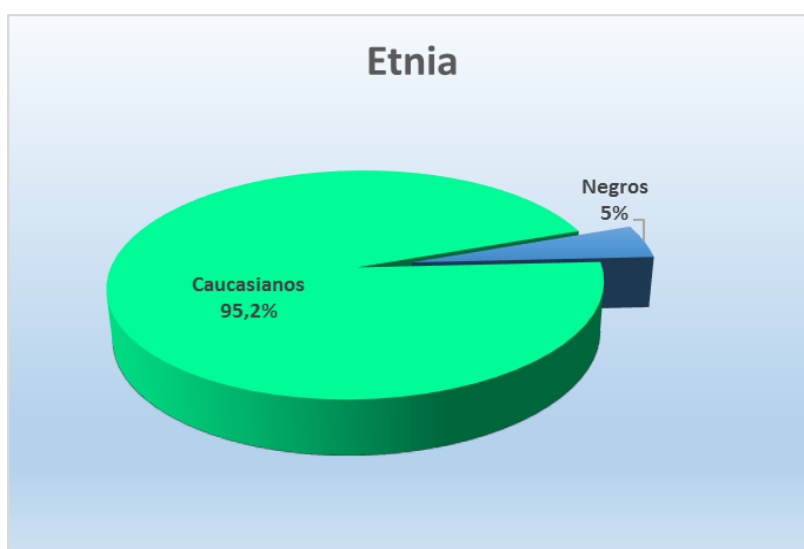


Figura 61 – Etnia em relação aos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliqotadas na soroteca/plasmateca

De acordo com Castilho, et al (2015), os grupos sanguíneos do sistema ABO mais frequentemente encontrados são os tipos “O” (44% caucasianos, 49% negros e 43% asiáticos) e “A” (33% caucasianos, 19% negros e 27% asiáticos). Em relação ao sistema Rh, a maior parte da população expressa o antígeno D, ou seja, é considerada Rh positivos.

Em nosso estudo, encontramos que a maior parte dos doadores com PAI positivo são dos grupos “O” e “A”, e Rh positivos (Figura 62 e 63), concordando com a literatura¹².

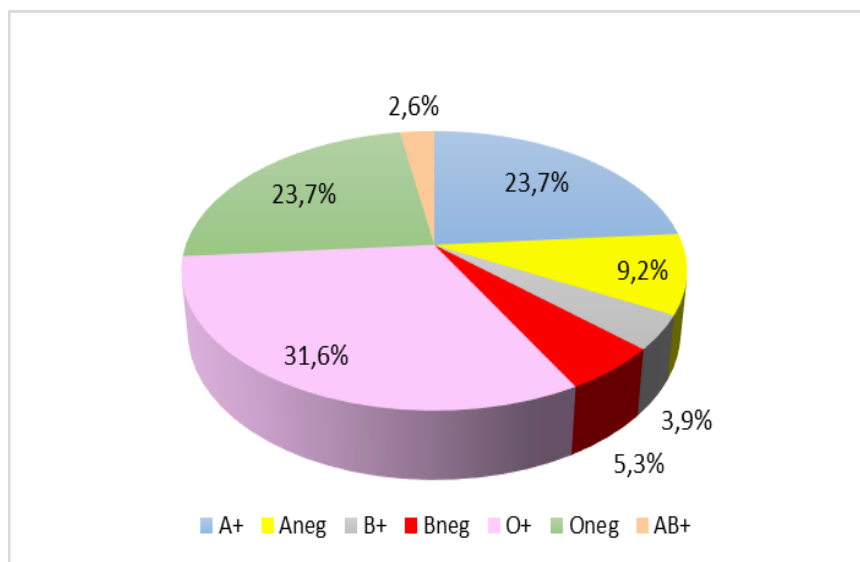


Figura 62 – Grupo sanguíneo em relação ao total de doadores de sangue com PAI positivo

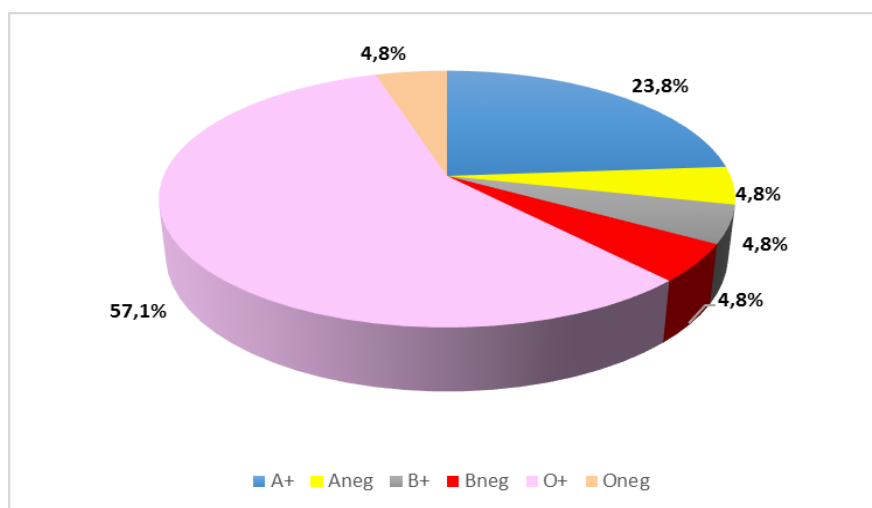


Figura 63 – Grupo sanguíneo em relação aos doadores de sangue das amostras de soro/plasma aliquoteadas na soroteca/plasmateca

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a elaboração do Banco de Doadores de Hemácias com diferentes fenótipos, foi de suma importância para o nosso serviço, para que os pacientes em esquema de transfusão de concentrado de hemácias possam ser transfundidos o mais compatível possível, prevenindo assim, a aloimunização a antígenos eritrocitários e otimizando a prática transfusional.

A atualização dos dados contidos nos relatórios gerados pelo Sistema Informatizado de Banco de Sangue do Hemocentro de Botucatu (SBS), proporcionou uma maior agilidade no momento da seleção da bolsa de concentrado de hemácia com fenótipo doador/receptor compatível.

O rastreamento dos resultados das fenotipagens contidos nos livros de bancada (ano 2001 a 2007), com posterior realização do registro desses fenótipos no sistema informatizado SBS, gerou uma significativa economia para o serviço, pois não haverá necessidade **da realização** da repetição do teste nas amostras que foram validadas.

As técnicas de Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) utilizadas na rotina do laboratório de Imuno-hematologia mostraram-se eficazes, pois quando repetidos os testes antes da realização da Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI), obtivemos os mesmos resultados dos testes iniciais realizados na rotina laboratorial.

Com as técnicas utilizadas na realização da IAI nas amostras com a PAI positiva foi possível identificar 88,1% dos anticorpos, mostrando a eficiência dessas técnicas na rotina laboratorial.

Com o monitoramento do título dos anticorpos contidos nas amostras das sorotecas/plasmatecas, após 6 meses do armazenamento, podemos concluir que as reatividades de 66,7% desses anticorpos apresentaram alteração pelo descongelamento, apresentando diferentes padrões de reatividades.

O congelamento de pequenas alíquotas possibilita um aumento da viabilidade de anticorpos estocados.

As sorotecas/plasmatecas contendo soros e plasmas com anticorpos de importância clínica mostrou ser uma estratégia efetiva para atender e agilizar a transfusão de receptores de sangue alossensibilizados, como também para seleção de bolsa de concentrado de hemácias com fenótipo doador/receptor compatível, devido não somente ao grau de dificuldade que se apresente no momento da seleção da bolsa a ser transfundida, mas também devido à dificuldade de aquisição e ao alto custo dos anti-soros dirigidos contra antígenos considerados de alta incidência.



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baiochi E, Nardozza, LMM. Aloimunização. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, v. 31, n. 6, p. 311-9, jun, 2009.
2. Girello, AL, Künn, TIBB. Outros sistemas de grupos sanguíneos de importância transfusional. In: Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária. 3ed. São Paulo: Senac, 2011. p. 127-222.
3. Bonifácio, SL, Novaretti, MCZ. Funções biológicas de antígenos eritrocitários. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 31, n. 2, p. 104-11, jan, 2009.
4. Martins, ML, Cruz, KVD, Silva, MCF, Vieira, ZM. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de paciente atendidos na Fundação Hemominas. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 35, n. 4, p. 252-58, 2009.
5. Martins, PRJ, Alves, VM, Pereira, GA, Souza, HM. Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 30, n. 4, p.272-76, mar, 2008.
6. Harmening, DM. Técnicas modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p. 36-161.
7. Beiguelman, B. Os Sistemas Sanguíneos Eritrocitários. 3ed. Ribeirão Preto, 2003.
8. Zago, MA, Falcão, RP, Pasquini, R. Medicina transfusional. In: Zago, AM, Covas, TD. Hematologia Fundamentos e Prática. 1ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2005. p. 951-75.
9. Nardozza, LMM, Szulman, A, Barreto, JA, Araujo, E, Moron, AF. Bases Moleculares do Sistema Rh e Suas Aplicações em Obstetrícia e Medicina

Transfusional. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 56, n. 6, p. 724-8, ago, 2010.

10. Silva, CRG, Jorge, AOC, Hirtsch, IMV. Aloanticorpo Anti-Di (a) em Gestante. Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia, v.26, n.4, p. 285-7, dez, 2004.

11. RDC nº 1.353, de 13 de junho de 2011. Disponível em: <<http://brasilsus.com.br/legislacoes/gm/108431-1353.html>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

12. Castilho, L, Junior JP, Reid, ME. Fundamentos da Imuno-hematologia. 1ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2015. p.1-45. 

13. Leonart, MSS. Controle de qualidade na preservação de eritrócitos para transfusão. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, n. 3, p. 192-93, jan, 2010.

14. Castilho, L, Junior, JP. Blood group genotyping. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 26, n. 2, p. 135-40, jun 2004.

15. Dwyre DM, Holland, PV. Transfusion associated graft versus host disease. Vox Sang, v. 95, p. 85-93, 2008.

16. Geiger, TL, Howard, SC. Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile nonhemolytic transfusion reactions: good prophylaxis or bad practice? Transfus Med Rev, vol. 27, p. 1-12, 2007.

17. Callera, F, Silva, ACO, Moura, AF, Melo, DB, Melo, CMT. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 26, n. 2, p. 78-83, jun, 2004.

18. Reid, ME, Francis, CL, Olsson, ML. The blood group antigen. 3ed. USA, 2012.

19. Daniels, G, Bromilow, I. Essential Guide to Blood Groups. 1ed. USA, 2007. p. 33-44.

20. Quinley, ED. Immunohematology Principles & Practice. 3ed. Philadelphia, 2011. p. 139-87
21. Buelvas, AC, Díaz, EM, González, GL. Inmunohematología básica y aplicada. 1ed. Colombia, 2014. p. 103-57