



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

**ANÁLISE DE RESULTADOS DA TIPAGEM SANGUÍNEA
ANTES E APÓS A IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE
SEMIAUTOMAÇÃO**

Isabella Parussini Liu

Porto Alegre – Brasil
2012

Isabella Parussini Liu

**ANÁLISE DE RESULTADOS DA TIPAGEM SANGUÍNEA
ANTES E APÓS A IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE
SEMIAUTOMAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso de Biomedicina realizado no setor de imunohematologia do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob orientação do professor doutor:

Tor Gunnar Hugo Onsten

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre me apoiaram, me incentivaram, se preocuparam com o meu sucesso e me proporcionaram mais que o necessário para chegar até aqui, muitas vezes abdicando de outras coisas para si próprios.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Tor Gunnar Hugo Onsten, que acreditou em mim e me abriu as portas do Banco de sangue, investindo nessa nova experiência. Obrigada pela paciência e pela confiança.

À minha família, principalmente a meus pais e minha avó, pela ajuda, paciência, compreensão, confiança e dedicação. Certamente, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Antônio, que sempre, desde o início me ajudou e se preocupou com o meu sucesso. Obrigada por estar sempre presente, tanto nos momentos bons quanto nos ruins.

À equipe do banco de sangue, com quem eu tive a oportunidade de trabalhar e aprender durante esse semestre, principalmente Isabel, Tauana, Michelle, Fê, Bruna e Jandira. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pelo ótimo período de convivência. Também agradeço à Ana Paula, que sempre se mostrou pronta para me ajudar no que eu precisei.

Aos meus amigos, Arthur, Enzo, Rafaela, Elisa e Miriana, pelos momentos alegres e de descontração que vocês me proporcionam há tanto tempo e que também foi muito importante durante esse período.

ÍNDICE GERAL

I – INTRODUÇÃO	8
TIPAGEM SANGUÍNEA	8
SISTEMA ABO	10
<i>Subgrupos de A</i>	12
SISTEMA RH	14
<i>Fenótipo D-fraco</i>	17
SEMI-AUTOMAÇÃO DO PROCESSO	19
APLICAÇÕES CLÍNICAS	21
II – ARTIGO CIENTÍFICO	23
RESUMO	23
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
<i>População de estudo</i>	26
<i>Tipagem sanguínea semiautomatizada para os sistemas ABO e RhD</i>	27
<i>Resolvendo discrepâncias ABO</i>	29
<i>Confirmação ou exclusão do fenótipo D-fraco</i>	29
<i>Análise Estatística</i>	31
RESULTADOS	31
<i>Discrepâncias ABO</i>	31
<i>Fenótipo D-fraco e discrepâncias Rh</i>	32
<i>Reações que motivaram dúvida conforme a técnica</i>	33
DISCUSSÃO	34
REFERÊNCIAS	37
III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	38
IV – BIBLIOGRAFIA ADICIONAL	38

Liu, IP; Onsten, TGH. Análise de resultados da tipagem sanguínea antes e após a implantação da técnica de semiautomação.

A tipagem sanguínea consiste na determinação dos grupos sanguíneos, que se caracterizam pela presença ou ausência de determinados antígenos na membrana eritrocitária. As técnicas mais conhecidas de tipagem sanguínea utilizam lâmina, tubo ou, mais recentemente, microplacas comerciais. Na prática transfusional, é necessário que haja compatibilidade principalmente no que diz respeito aos sistemas ABO e RhD, a fim de evitar reações que podem culminar com a morte do receptor. Sabe-se que resultados duvidosos e inconclusivos encontrados na determinação de grupos sanguíneos podem estar relacionados a diferentes fatores, tais como subgrupos de A (principalmente o fenótipo A2) e o fenótipo D-fraco, ambos causados por alterações nos genes que codificam esses antígenos, levando a alterações na expressão dos mesmos. A técnica de semiautomação implantada no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) utiliza microplacas e equipamentos semiautomáticos interligados, capazes de conferir maior segurança e padronização ao processo de tipagem. Nesse contexto, os principais objetivos do trabalho foram analisar a técnica de semiautomação do Banco de Sangue do HCPA em relação à ocorrência de resultados duvidosos ou inconclusivos associados aos sistemas ABO e Rh, e à ocorrência de fenótipos variantes, como D-fraco e A2, associados a esses resultados. Ainda, faremos uma análise comparativa dos mesmos aspectos com a técnica manual anterior. Para tanto, todas as amostras provenientes dos doadores de sangue e plaquetas do Banco de Sangue do HCPA, durante um período de seis meses, foram submetidas ao processo de tipagem sanguínea semiautomatizada em microplacas para os sistemas ABO e RhD. Foram analisadas todas as amostras que apresentaram resultado discrepante associado a um ou ambos sistemas sanguíneos. O mesmo foi realizado para as amostras tipadas durante os seis meses imediatamente anteriores à implantação da semiautomação. Para resolver os casos de discrepância no sistema ABO (ocorrido na microplaca ou na lâmina), nos quais

as provas direta e reversa eram discordantes, foi utilizada a técnica em tubo. Em todas as amostras RhD negativas eram realizadas a pesquisa do fenótipo D-fraco em cartões gel-teste, para esclarecer se essa amostra era de fato negativa ou apenas fracamente positiva. Para resolver as amostras discrepantes, nas quais a tipagem RhD resulta negativa (em microplaca ou em tubo), mas no gel-teste resulta fracamente positiva, foi utilizada outra técnica em cartão gel-teste para confirmação. No total, encontrou-se uma taxa de discrepância ABO de 0,25%. Observou-se um aumento na ocorrência de discrepância ABO na técnica de semiautomação (TSA) em comparação à técnica manual (TM) ($p < 0.0005$). Desses casos, 15% apresentaram fenótipo A2. A principal reação que motivou dúvida na microplaca foi a reversa de A. As situações discrepantes relacionadas ao sistema Rh, totalizaram 0,18%. Não houve diferença significativa na ocorrência desses casos entre TM e TSA ($p = 1.0$). Observou-se um aumento na ocorrência do fenótipo D-fraco pela TSA em comparação à TM ($p < 0.0005$). Concluímos que a semiautomação, apesar de apresentar maior número de discrepâncias, apresenta consideráveis vantagens, como a possibilidade do interfaceamento. O aumento nas discrepâncias ABO encontradas pela TSA, provavelmente, não levaria ao aumento de tipagens errôneas, não tendo grande impacto no resultado final. Ainda, observamos que, pela TSA, um maior número de doadores foi classificado como D-fraco, comparado à TM.

I – INTRODUÇÃO

Tipagem sanguínea

Os grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária os quais possuem características polimórficas bem definidas por componentes da membrana. Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e são definidos por proteínas com seqüências de aminoácidos específicas ou por carboidratos ligados a essas proteínas ou lipídios. Pacientes que recebem transfusão de sangue e componentes sanguíneos podem desenvolver anticorpos dirigidos contra inúmeros antígenos eritrocitários e o desenvolvimento desses anticorpos eritrocitários está relacionado com a imunogenicidade antigênica, situações clínicas especiais e com a incidência dos antígenos na membrana da hemácia. Na prática transfusional, a compatibilidade para o sistema ABO e para o antígeno D do sistema Rh é fundamental na prevenção de reações hemolíticas, embora a compatibilização de outros antígenos, especialmente C, c, E, e do sistema Rh, assim como os principais antígenos dos sistemas Kell, Kidd, Duffy e MNS também seja desejável(1). Atualmente, já foram descritos 30 desses sistemas(2).

O sistema ABO, foi o primeiro a ser descoberto, em 1900, e continua sendo o mais importante de todos os grupos sanguíneos na prática transfusional, pois uma transfusão de sangue realizada com incompatibilidade maior ABO pode resultar na morte do paciente(3). A tipagem Rh D é igualmente obrigatória. O antígeno RhD é considerado o mais imunogênico do sistema seguido dos antígenos c, E, C, e. A probabilidade de imunização por RhD é muito mais alta quando comparada com outros antígenos de grupos sanguíneos humanos que ocasionalmente produzem anticorpos irregulares, tornando esse sistema de grande importância clínica(4).

A tipagem sanguínea é realizada como procedimento de rotina em serviços de hemoterapia, bem como outros exames imunohematológicos para a qualificação do sangue do doador, a fim de garantir a eficácia terapêutica e a segurança de uma futura doação. A determinação do grupo sanguíneo ABO era originalmente realizada em lâminas limpas de microscopia. Atualmente, as provas de aglutinação são realizadas através da utilização de métodos mais precisos, podendo ser utilizados os métodos em microplacas escavadas, tubos de ensaio, ou gel-centrifugação, mais recentes. O mesmo se aplica ao fator Rh, cuja determinação é realizada em microplacas escavadas ou centrifugação em tubos de ensaio(5).

Cada técnica apresenta suas vantagens e desvantagens, sendo, portanto, mais indicadas em diferentes situações. A técnica de tipagem sanguínea em lâmina de microscopia, por exemplo, é a menos vantajosa, sendo menos sensível que aquela realizada em tubo de ensaio, apresentando maior quantidade de resultados falso positivos em virtude da rapidez com que a mistura de reação seca favorecendo a agregação das células. Além disso, as reações são mais fracas e apresentam maior dificuldade na interpretação. Essa técnica não é recomendada para utilização rotineira, mas pode ser utilizada em tipagens ABO de emergência, sempre devendo ser suplementada por alguma das outras técnicas citadas. A técnica em tubo apresenta mais vantagens e é mais sensível que a técnica em lâmina para tipagem do sistema ABO. Algumas de suas vantagens incluem a possibilidade de incubação por tempo relativamente longo, sem secagem do conteúdo dos tubos, simplicidade de leitura e classificação dos resultados, além de ser mais limpa e higiênica(6).

A interpretação da hemaglutinação incompleta, que ocasionalmente pode vir a acontecer, pode variar entre laboratórios e mesmo entre indivíduos no mesmo laboratório. Existem muitos reagentes para tipagem sanguínea, e a disponibilidade está mudando continuamente, com tendência a substituição dos tradicionais reagentes policlonais pelos mono ou oligoclonais(7).

Sistema ABO

Descoberto pelo cientista austríaco Karl Landsteiner no ano de 1900, o sistema ABO foi o primeiro sistema sanguíneo a ser descrito, rendendo, ao seu descobridor, o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1930. Em 1909, Landsteiner classificou amostras de sangue de seres humanos nos conhecidos grupos A, B, AB e O e demonstrou que transfusões entre indivíduos dos grupos A ou B não resultariam em destruição de células sanguíneas novas, e que esta fatalidade ocorre apenas quando um indivíduo é transfundido com sangue pertencente a um grupo diferente(8).

O sistema ABO é o mais importante grupo sanguíneo na medicina transfusional. O gene *ABO* codifica as glicosiltransferases responsáveis pela transferência de resíduos específicos de açúcar ao substrato H e os convertem ao antígeno A ou B respectivamente(9). O também chamado “antígeno H” é a base para a manifestação de todos os antígenos do sistema ABO. Estudos anteriores demonstraram que a inabilidade do gene O em codificar as transferases A ou B é devido a uma diferença estrutural em relação aos nucleotídeos e não à falha da expressão das transferases A ou B. Nos testes sorológicos de rotina, o grupo sanguíneo O é caracterizado por não apresentar os antígenos A e B na membrana das hemácias; assim, os seus eritrócitos não aglutinam na presença dos soros anti-A, anti-B e anti-AB.(9)

Para que um indivíduo seja classificado em grupo sanguíneo A ou B normal, é necessário que praticamente todos os seus eritrócitos sofram aglutinação quando misturados, sob condições adequadas, com anticorpos anti-A ou anti-B. Para tanto, é necessário ao menos um alelo *ABO* funcional, ou seja, o processo de formação dos antígenos A ou B deve ocorrer corretamente desde o processo de transcrição e tradução até sua localização intracelular e atividade enzimática adequadas. Depois de prontos, os antígenos A ou B devem ser incorporados na membrana das células precursoras de eritrócitos. A

distribuição dos antígenos sobre a superfície celular deve estar de acordo, para permitir a hemaglutinação. Qualquer defeito neste complexo processo pode levar a fenômenos sorológicos anormais, dando origem aos subgrupos de A e B(7).

Sabe-se que os indivíduos possuem anticorpos de ocorrência natural contra o antígeno ABO que encontra-se ausente na superfície de suas hemácias, apesar da existência de evidências sugerindo que a produção de anti-A e anti-B seja estimulada por substâncias presentes na natureza. Algumas bactérias mostram-se quimicamente similares aos antígenos ABO e podem atuar como fonte de estímulo para formação de anticorpos, a qual inicia ao nascimento(3).

Os antígenos ABO não estão restritos à membrana dos eritrócitos. Também podem ser encontrados em diversas outras células como linfócitos, plaquetas, endotélio capilar, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, além de secreções e outros fluidos corporais como saliva, urina e leite (9).

A determinação do grupo sanguíneo ABO é realizada de maneira direta e reversa. A tipagem ABO direta é realizada em amostras de sangue, testando-se as hemácias com anticorpos anti-A, anti-B e anti-AB (exceto quando são utilizados anticorpos monoclonais, situação em que a aplicação de anti-AB deixa de ser obrigatória). A tipagem reversa sempre deve ser obrigatoriamente realizada, testando-se o soro ou plasma da amostra com suspensões de hemácias conhecidas A1 e B e, opcionalmente, A2 e O. É necessário ficar atento a qualquer discrepância observada entre as tipagens direta e reversa, não rotulando ou liberando o hemocomponente até que a discrepância tenha sido resolvida. Vários estados patológicos podem causar discrepâncias entre a classificação direta e reversa. Recomenda-se que seja realizada a investigação de subgrupos de A quando houver resultados discrepantes entre as provas

ABO direta e reversa ou na busca de concentrado de hemácias de subgrupo A2 para pacientes que apresentam anticorpo anti-A1 clinicamente significante(10).

Dependendo da tipagem sanguínea de um indivíduo, a IgM anti-A e/ou anti-B presentes no soro podem constituir uma barreira para as transfusões sanguíneas e para o transplante de órgãos ABO incompatíveis (9). A frequência dos antígenos ABO varia em diferentes populações.

Subgrupos de A

Como dito anteriormente, polimorfismos nos genes que codificam o sistema sanguíneo ABO podem levar a quantidades diminutas de antígenos A ou B em células sanguíneas vermelhas, dando origem aos subgrupos no sistema. A ocorrência de variantes devido à heterogeneidade dos alelos *A* e *B* representa um desafio para a prática imunohematológica. A1 e A2 são os principais subgrupos do grupo sanguíneo A e eles diferem um do outro, tanto qualitativa como quantitativamente. Subgrupos de A podem resultar em discrepâncias na tipagem sanguínea ABO(11).

Diferentes níveis de expressão de antígenos A ou B nos eritrócitos podem ser encontrados, sendo chamados de subgrupos de A ou B, conforme a intensidade de aglutinação dos eritrócitos com os reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti-A1 e anti-H. A reatividade do reagente anti-H com as hemácias dos diferentes grupos sanguíneos ABO tende a ser: O>A2>B>A2B>A1>A1B(9).

O fenótipo A2, comum em caucasianos, é detectado, sorologicamente, por meio da capacidade desses eritrócitos aglutinarem na presença de soro anti-A e de não aglutinarem com o soro lectina anti-A1, diferentemente do fenótipo A1 cujas hemácias são aglutinadas na presença desse reagente. O alelo A2 (*A201*) é caracterizado pela substituição de uma única base e uma deleção(9). Hoje em dia, se reconhece que o fenótipo A1 tem uma base

genética com o fenótipo A2 sendo definida por uma transferase de A2 que é relativamente ineficiente em relação à transferase de A1(12). Estudos anteriores demonstram que os fenótipos A2 e A1 apresentam diferenças sorológicas (reação com lectinas anti-A1 e anti-H), químicas (um glicolípido A ativo em células A1 está ausente em células A2) e enzimáticas (diferentes pH ótimos e Km)(7).

Os dois principais alelos de A, A1 e A2 são diferenciados sorologicamente de acordo com a reatividade das células com a lectina de sementes de *Dolichos biflorus*. A lectina de *D. biflorus* reage especificamente com células do subgrupo A1; logo, aglutina hemácias A1, mas não A2(11). O termo lectina se refere a uma classe de proteínas de origem não-imunológica, que podem aglutinar hemácias graças à sua propriedade de se ligar reversivelmente a carboidratos. O anticorpo anti-A1 aparece como uma aglutinina fria atípica no soro de indivíduos A2 ou A2B, que não têm o antígeno correspondente.

Subgrupos fracos de A podem ser definidos como eritrócitos do grupo A que reagem mais fracamente ou não reagem sorologicamente com anti-A comparados aos indivíduos com hemácias A2. Na maioria dos casos, os subgrupos de A resultam da expressão de um alelo alternativo fraco nos *loci* ABO(11).

A prevalência de subgrupos de A varia de acordo com o lugar e com a raça. As frequências observadas de A1 e A2 são geralmente compatíveis com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para a herança mendeliana dos genes alélicos A1 e A2. No entanto, em algumas populações, tais como negros e japoneses, a frequência do fenótipo A2B é significativamente mais elevada do que a frequência esperada com base na frequência do fenótipo A2(11).

Apesar de os fenótipos A1 e A2 serem os mais conhecidos, existem outros fenótipos de A que não são tão conhecidos, tais como o alelo A3 (A301), que apresenta alto grau de heterogeneidade e ao qual diversas mutações já foram associadas, ou o alelo Ax (A108), que possui uma única mutação resultando na substituição de um aminoácido. Vários estudos sobre outros subgrupos de A têm sido realizados, entretanto, devido às suas diferenças morfológicas, a base genética destes permanece desconhecida(9)(9)(8).

Apesar da existência de subgrupos de B, estes configuram casos muito mais raros, de maneira que, no presente trabalho, serão abordados apenas os subgrupos de A. Os subgrupos de B são caracterizados por fraca aglutinação dos eritrócitos com o soro anti-B e/ou anti-AB. Diferentemente dos subgrupos de A, a classificação dos subgrupos de B é ainda controversa.

Apesar de os anticorpos monoclonais anti-A e/ou anti-B reconhecerem e aglutinarem a maioria dos subgrupos ABO, a determinação daqueles que apresentam baixíssima expressão de antígenos é laboratorialmente trabalhosa. Nesses casos, a genotipagem ABO pode ser um complemento valioso à determinação correta do tipo sanguíneo do doador e do receptor (9).

Sistema Rh

O sistema sangüíneo Rh foi inicialmente descoberto ao estimular uma reação transfusional, que foi investigada por Levine e Stetson, em 1939, um ano antes de Landsteiner e Wiener descreverem um anticorpo obtido por meio da imunização de cobaias com hemácias de macacos *rhesus*. Este soro, recém descoberto, aglutinava cerca de 85% das hemácias humanas testadas e o determinante correspondente foi denominado fator Rh. As reações observadas por Levine eram semelhantes ao soro de animal anti-Rhesus, estimuladas em animais, relatadas por Landsteiner em 1940. Alguns anos mais tarde, concluiu-se que o anti-Rh do ser humano e do animal não reagem com o mesmo

antígeno e, portanto, não se tratavam do mesmo anticorpo, porém a nomenclatura Rh foi mantida(13, 14).

O Sistema Rh é altamente polimórfico e, atualmente, sabe-se que é constituído por mais de 49 antígenos, sendo o antígeno RhD, juntamente com outros quatro antígenos principais desse sistema, os responsáveis por 99% dos problemas clínicos associados ao sistema Rh(13). Estes outros antígenos principais compreendem dois pares de antígenos antitéticos: *C/c* e *E/e*(15) (Figura 1). O antígeno RhD, por ser o antígeno eritrocitário não-ABO mais significativo clinicamente, vem sendo implicado amplamente na etiologia de reações transfusionais hemolíticas, e, portanto, é considerado altamente imunogênico. Os antígenos *C* e *e* são menos imunogênico que *E* e *c*.

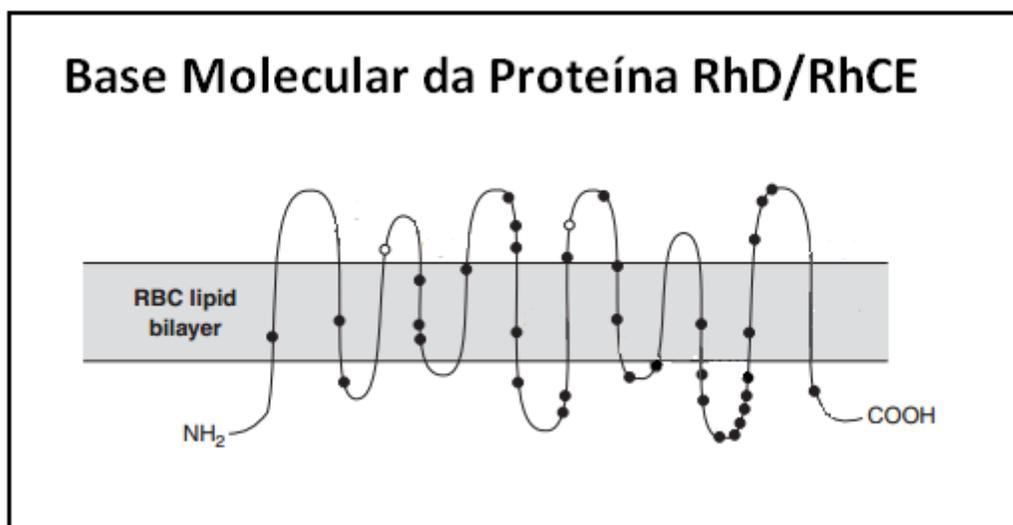


Figura 1: Proteína Rh. Composta por 417 aminoácidos, apresenta 12 segmentos transmembrana, 6 alças extracelulares e 5 alças intracelulares. Ambos segmentos carboxil e amino-terminal estão localizados intracelularmente. Os círculos pretos indicam as posições de aminoácidos que diferem entre RhD e RhCE, enquanto os círculos brancos representam os aminoácidos críticos para a expressão de antígenos *C/c* ou *E/e*. Adaptada de: *The Blood Group Antigen Factsbook. 2 ed: Academic Press; 2004*

O antígeno RhD é composto por 37 epítomos, formando um mosaico. Dessa maneira, qualquer alteração de aminoácidos dessa proteína pode afetar a expressão dos epítomos originais ou resultar na expressão de novos epítomos,

levando a variações na expressão dos antígenos RhD na membrana eritrocitária. As hemácias com fenótipo RhD fraco apresentam uma diferença *quantitativa* em relação às células RhD positivas normais, uma vez que apresentam todos os epítomos RhD, porém com uma redução dos níveis de antígeno na membrana da hemácia. Estima-se que a freqüência de RhD fraco na população seja inferior a 1%(15, 16). As hemácias RhD parcial apresentam uma diferença *qualitativa* frente às células RhD positivas normais, pois carecem de um ou mais epítomos que formam o antígeno RhD. Portanto, indivíduos portadores do fenótipo RhD-positivo podem ser classificados, do ponto de vista molecular, em três grupos: RhD-positivo, RhD fraco e RhD parcial. Geralmente, os fenótipos RhD parcial são expressos devido à presença de genes híbridos, os quais predominam em indivíduos de origem africana(4).

A distinção entre os fenótipos D-fraco e D-parcial é de importância clínica, pois o último é capaz de produzir anti-D(17). Desde então, diferenças entre a reatividade de vários reagentes, especialmente na detecção de RhD fraco e RhD parcial, têm criado uma discussão sobre o teste adequado para doadores de sangue, pacientes e receptores. A ocorrência de RhD parcial é rara na população em geral, e sua identificação é possível através do uso de soros monoclonais específicos ou técnicas de biologia molecular(4). Sorologicamente, o fenótipo RhD parcial pode comportar-se tanto como RhD fraco quanto como RhD-positivo, o que implica, preferencialmente, o uso de métodos moleculares para seu diagnóstico definitivo(18).

Tempos atrás, os reagentes utilizados na detecção do antígeno RhD eram elaborados a partir de anticorpos produzidos por mulheres sensibilizadas por RhD ou voluntários hiperimunizados. Esses anticorpos, denominados policlonais, eram efetivos, pois reconheciam inúmeros epítomos RhD, uma vez que eram produzidos através de um *pool* de soros humanos(4).

Atualmente, antissoros monoclonais anti-D IgG e IgM têm sido amplamente produzidos para substituir os policlonais na determinação do antígeno RhD. Vários indivíduos classificados como RhD fraco têm sido reclassificados, por apresentarem forte aglutinação com os atuais reagentes anti-D monoclonais(19). Estudos têm demonstrado que a reatividade dos reagentes anti-D monoclonais dependem da concentração e da avidéz do anticorpo.

O antígeno RhD é determinado através da adição do antissoro anti-RhD às hemácias. Em paralelo, realiza-se um controle negativo, através da utilização de um soro controle compatível com o antissoro utilizado. Nos casos em que, eventualmente, a reação for negativa para a presença do antígeno RhD, deve ser efetuada a pesquisa do antígeno D-fraco(10). Os anticorpos dirigidos contra os antígenos do sistema Rh geralmente são da classe IgG, raramente fixam o complemento, e reagem otimamente a 37°C(15).

Fenótipo D-fraco

As hemácias com fenótipo RhD fraco, descritas por Stratton (1946), diferem quantitativamente das células RhD positivas normais, por serem definidas historicamente como tendo todos os epítomos RhD presentes, mas com uma redução dos níveis de antígeno RhD, portanto são detectados apenas por alguns anticorpos anti-D mais potentes(4).

A nível molecular, as variantes do fenótipo RhD fraco são resultado de substituições de aminoácidos localizados nos segmentos transmembrana e intracelulares da proteína RhD (19) (Figura 2). Como essas alterações ocorrem nas regiões intracelular ou transmembrana, e não na superfície externa da hemácia, todos os epítomos RhD extracelulares estão presentes. O que acontece, é que a eficiência de inserção é afetada primariamente e,

consequentemente, a quantidade do antígeno RhD na membrana, refletindo a redução do número de sítios antigênicos nessas hemácias. Os RhD fraco mais comuns são: tipo 1, associado com o haplótipo *cDfraco*e; tipo 2, associado com o haplótipo *cDfraco*E; tipo 3, também associado com o haplótipo *cDfraco*E. Indivíduos pertencentes aos fenótipos RhD fraco não produzem aloanticorpo anti-D, mas podem possuir auto-anticorpo anti-D(4).

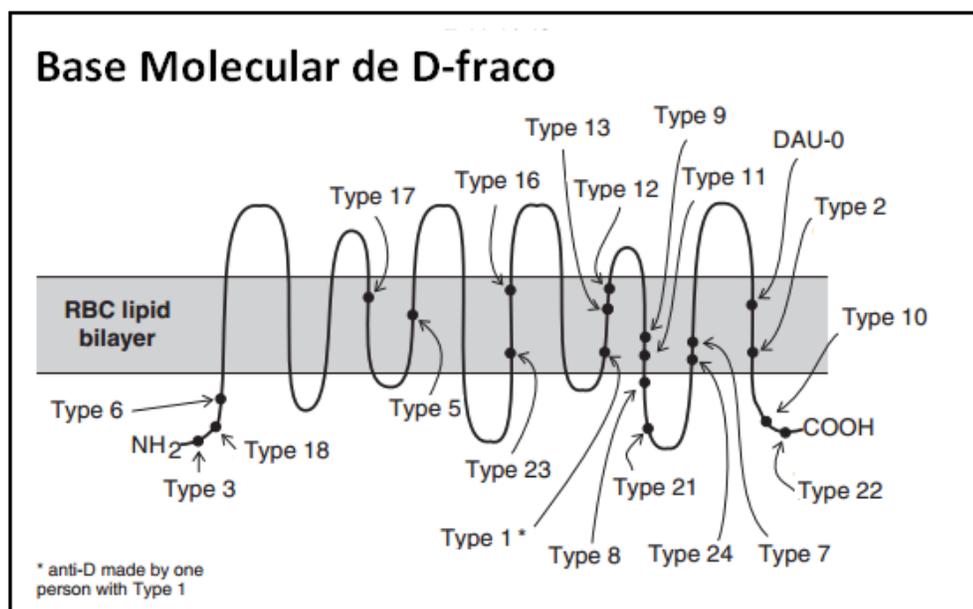


Figura 2: Os aminoácidos representados pelos círculos pretos indicam as substituições na proteína RhD, que ocorrem nas regiões transmembrana e intracelulares, originando os diferentes tipo de fenótipo RhD fraco. Modificada de: *The Blood Group Antigen Factsbook. 2 ed: Academic Press; 2004*

No Brasil, de acordo com a RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010, é necessário se testar as amostras até a fase de AGH, classificando os pacientes como RhD positivo de baixa expressão, caso a mesma seja positiva, a fim de se manter as reservas de sangue RhD negativo. Porém, tem sido constantemente observado que, no teste da AGH, vários reagentes anti-D não detectam todos os tipos de RhD fraco, o que tem colaborado para um aumento no número de casos de discrepâncias(19).

O significado clínico do antígeno RhD fraco é que, caso essas hemácias sejam transfundidas em indivíduos RhD negativo, poderão induzir a uma aloimunização, ou seja, formação de anticorpos frente a exposição do indivíduo a antígenos não próprios. Alguns autores defendem que indivíduos RhD fraco, especialmente mulheres em idade gestacional poderiam ser tratadas como RhD positivo quando forem doadoras e RhD negativo quando forem receptoras(20).

Semiautomação do processo

Introduzida há mais de 50 anos, a técnica de automação mais aperfeiçoada assume importante papel no diagnóstico de fenótipos variantes(18). É o caso da tecnologia da microplaca, que vem ganhando popularidade devido ao crescente volume de trabalho nos bancos de sangue e disponibilidade recente de sistema automatizado. Nessa técnica são utilizados pequenos volumes e baixa concentração de soro e hemácias, ao mesmo tempo em que há aumento da quantidade de amostras testadas, garantindo maior custo-benefício.

Há possibilidade de associar a técnica a *hardwares* de microplacas podendo reduzir ainda mais o tempo de operação. A técnica pode, ainda, ser automatizada através da captura *online* de dados, que podem promover redução dos erros de leitura e transcrição, economia de tempo, utilização de códigos de barras para amostras e identificação de microplacas e integração em sistema de computador para armazenamento de dados(6). Tanto a microplaca quanto o gel-teste apresentam a vantagem da automação, proporcionando otimização da rotina e maior segurança no processo.

O uso de sistemas totalmente automatizados é bastante eficiente na tentativa de atingir dois objetivos principais no campo da imunohematologia. São eles: 1) a redução dos riscos transfusionais relacionados a erros humanos

por proporcionar a automação das etapas-chave da rotina (identificação de amostras e reagentes, realizar e interpretar resultados) e 2) garantir a rastreabilidade de todos os elementos envolvidos no processo analítico, que é arquivado e permanece acessível após a realização do teste(21).

Os sistemas mais utilizados são baseados na utilização de:

- Microcolunas, que permitem que os resultados sejam vistos após a passagem das hemácias por uma matriz contendo os reagentes.
- Microplacas de poliestireno cujos poços são pré-revestidos com hemácias ou plaquetas liofilizadas, ou anticorpos anti-eritrócitos/anti-plaquetas(21).

Em alguns sistemas semi-automatizados, a leitura dos microtubos se dá através de câmeras (janelas e divisões), ficando a interpretação dos resultados de cada microtubo a cargo do gerenciador do sistema a partir da análise da imagem. Os resultados das reações podem ser positivos (1+, 2+, 3+ ou 4+) ou negativos. Essa interpretação dos resultados de cada microtubo fornecida pelo equipamento deve ser validada pelo operador por meio da verificação das imagens captadas. Se houver necessidade, em casos de discordância, o resultado pode ser alterado manualmente. Da mesma maneira, a interpretação global do teste também é definida pelo operador, conforme as especificidades de cada teste(22).

As vantagens apresentadas por essa técnica são: interface amigável, rastreabilidade, agilidade, possibilidade de importar e exportar dados de e para outros sistemas, e conexão em rede(22). A rastreabilidade, a leitura padronizada e o *software* para o cadastro e registro de resultados, fornecem maior segurança à rotina da imunohematologia.

Aplicações Clínicas

Casos de incompatibilidade ABO representam cerca de 37% dos comunicados de mortes associadas a transfusão nos EUA. Desses casos, cerca de 50% são decorrentes de erros humanos. Os erros podem ocorrer em qualquer etapa do processo, incluindo a identificação do paciente, a coleta e a rotulagem da amostra, a prova cruzada ou os testes pré-transfusionais de cabeça-cabeira(23, 24). Um estudo realizado em 2007, em São Paulo, revelou que ocorrência de incompatibilidade materno-fetal foi de 18,4% para o sistema ABO e de 7% para o RhD(25).

As complicações mais temidas durante uma transfusão sanguínea são as reações hemolíticas transfusionais, que podem ser fatais e correspondem à principal causa de morte imediata relacionada à transfusão de hemoderivados. As reações mais graves envolvem, obviamente, incompatibilidade ABO, onde a existência prévia de anticorpos circulantes pode levar à ativação do sistema complemento e consequente hemólise intravascular das hemácias transfundidas(24). As reações transfusionais hemolíticas agudas intravasculares estão sistematicamente entre as principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas a transfusão, prova disso é que, de 97 mortes relacionadas a transfusão notificadas à FDA nos anos de 2005 e 2006, 9 foram devido à incompatibilidade ABO(26).

De acordo com McIvor et al., uma das principais causas de incompatibilidade ABO em transfusões é o fenômeno "*wrong blood in tube*" (WBIT), em que a amostra presente no tubo não é do indivíduo identificado na etiqueta. As transfusões com incompatibilidade ABO são evitáveis, uma vez que resultam tipicamente de erros na identificação do paciente no momento de coleta ou administração de sangue. O New York State Department of Health atribuiu aproximadamente dois terços desses erros a fatores externos ao banco

de sangue, tais como: administração ao paciente errado e erros de flebotomia. Erros de identificação do paciente, no momento da coleta pode levar a dois tipos de erros que resultam em "WBIT": erro de identificação do paciente ou rotulagem errônea da amostra(26).

O sistema Rh também apresenta um grande interesse clínico, uma vez que seus anticorpos encontram-se envolvidos na destruição eritrocitária imunomediada. Como a imunização pode ocorrer em receptores RhD negativos, o antígeno RhD é de importância crítica para a transfusão sanguínea(20), pois tem um papel importante na destruição imune das hemácias em transfusões alogênicas, na doença hemolítica perinatal (DHPN), nas anemias hemolíticas auto-imunes e em transplantes de órgãos(4, 13).

A probabilidade de imunização por RhD é muito mais alta quando comparada com outros antígenos de grupos sanguíneos humanos que ocasionalmente produzem anticorpos irregulares, tornando esse sistema de grande importância clínica, principalmente porque o antígeno D é considerado o mais imunogênico do sistema Rh(4). Quase todos os anticorpos do sistema Rh resultam de aloimunização por transfusão ou gestação(15).

Somente durante o século XX a metodologia de hemaglutinação em tubo possibilitou o desenvolvimento e a prática da medicina transfusional. Entretanto, em 2007, a incompatibilidade ABO era responsável por mais óbitos que todos os vírus transmitidos por transfusão sanguínea(27). Para evitar a ocorrência de fatalidades associadas a transfusões sanguíneas devido à incompatibilidade ABO, é necessário estar atento aos casos discrepantes durante a tipagem sanguínea, não liberando resultados duvidosos. Para tanto, é preciso ter acesso a informações importantes do paciente, como sua história clínica, idade e diagnóstico, relato de transfusão e/ou gestação anteriores, medicações em uso através da consulta ao dossiê do paciente/doador(28).

II – ARTIGO

Análise de resultados da tipagem sanguínea antes e após a implantação da técnica de semiautomação.

Analysis of results of blood typing before and after the implantation of the semiautomated technique.

Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (setor de imunohematologia) – Serviço de Hemoterapia - Porto Alegre, RS.

Isabella Parussini Liu¹, Isabel Cristina Freitas², Jandira Alves Mesko³, Leda Maria Teixeira de Campos⁴, Tor Gunnar Hugo Onsten⁵

¹ *Aluna graduação Biomedicina, UFRGS. Estágio em pesquisa Banco de Sangue Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.*

² *Bióloga. Setor de Imunohematologia - Banco de Sangue Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.*

³ *Técnica de laboratório. Setor de Imunohematologia - Banco de Sangue Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.*

⁴ *Médica hemoterapeuta. Coordenadora do Setor de Imunohematologia Transfusional do Serviço de Hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.*

⁵ *Médico hematologista. Chefe do serviço de hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.*

Correspondência: *Tor Gunnar Hugo Onsten*

Chefia do serviço de hemoterapia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre, RS.

Rua São Manoel 543, 2º andar - Rio Branco

90620-110 – Porto Alegre-RS - Brasil

Tel.: (55 51) 3359.8322

E-mail: tonsten@hcupa.ufrgs.br

Resumo: A tipagem sanguínea consiste na determinação dos grupos sanguíneos, caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária, sendo o principal, o sistema ABO. Fatores como subgrupos de A (principalmente A2) e o fenótipo D-fraco podem estar associados a resultados discrepantes. Os objetivos do trabalho foram analisar a técnica de semiautomação para a tipagem sanguínea do Banco de Sangue do HCPA, em relação à ocorrência de resultados duvidosos ou inconclusivos e de fenótipos variantes como D-fraco e A2, e fazer uma análise comparativa dos mesmos aspectos com a técnica manual anteriormente usada. Para tanto, as amostras dos doadores de sangue e plaquetas do Banco de Sangue do HCPA durante seis meses foram tipadas pela técnica semiautomatizada em microplacas para os sistemas ABO e RhD, sendo analisadas todas as amostras que apresentaram discrepância associada a um ou ambos sistemas sanguíneos. Encontrou-se uma taxa de discrepância ABO de 0,25%. Observou-se aumento nos casos de discrepâncias ABO na técnica de semiautomação (TSA) em comparação à técnica manual (TM) ($p < 0.0005$). Desses casos, 15% apresentaram fenótipo A2. A taxa de discrepância Rh foi de 0,18%. Não houve diferença significativa na detecção desses casos entre TM e TSA ($p = 1.0$). Mais indivíduos foram classificados como fenótipo D-fraco pela TSA em comparação à TM ($p < 0.0005$). Concluímos que a semiautomação apresenta consideráveis vantagens, como a possibilidade do interfaceamento. Apesar de apresentar maior número de resultados discrepantes, esses provavelmente não teriam grande impacto no resultado final.

Palavras-chave: Tipagem sanguínea, métodos, tubo, semiautomação.

Abstract *Blood typing consists on the determination of blood groups, which are characterized by the presence or absence of antigens in the plasma membrane. Factors such as A subgroups (especially A2) and weak-D phenotype may be associated with discrepant results. The objectives of this study were to analyze the semiautomated technique (SAT) of blood typing on the Hospital de Clínicas*

de Porto Alegre's Blood Bank for the occurrence of equivocal or inconclusive results and variant phenotypes such as weak-D and A2 and to make a comparative analysis of these aspects with the previous technique. For this purpose, samples of blood and platelet donors of the HCPA's blood bank over a six-month period were typed by the SAT in microplates for ABO and RhD systems and all samples that had a discrepancy associated with one or both blood systems were analyzed. It was found a discrepancy rate on the ABO system of 0.25%. It was observed an increase in cases of ABO discrepancies using SAT compared to the manual technique (MT) ($p < 0.0005$). A total of 15% of these cases were A2 phenotype. The Rh discrepancy rate was 0.18%. There was no significant difference on the detection of these cases between MT and SAT. There was more individuals who were classified as weak-D phenotype by the SAT compared to MT ($p < 0.0005$). We conclude that SAT has considerable advantages, such as the possibility of interfacing. Although a higher number of discrepant results, these probably wouldn't have a great impact on the final result.

Key words: *Blood grouping, methods, tube, semiautomation.*

Introdução

A tipagem sanguínea é realizada como procedimento de rotina em serviços de hemoterapia para a qualificação do sangue do doador, a fim de garantir a eficácia terapêutica e a segurança de uma futura doação(1). O sistema ABO, foi o primeiro a ser descoberto, em meados de 1900, e continua sendo o mais importante de todos os grupos sanguíneos na prática transfusional (2), pois uma transfusão de sangue realizada com incompatibilidade maior ABO pode resultar na morte do paciente (3). O sistema Rh é altamente polimórfico e sabe-se que é constituído por mais de 49 antígenos(4), sendo o antígeno RhD, juntamente com outros quatro antígenos

principais desse sistema, os responsáveis por 99% dos problemas clínicos associados ao sistema Rh(5).

Introduzida há mais de 50 anos, a técnica de automação mais aperfeiçoada assume importante papel no diagnóstico de fenótipos variantes(6). É o caso da tecnologia da microplaca, que vem ganhando popularidade devido ao crescente volume de trabalho nos bancos de sangue. Nessa técnica são utilizados pequenos volumes e baixa concentração de soro e hemácias, ao mesmo tempo em que há aumento da quantidade de amostras testadas, garantindo maior custo-benefício. Fenótipos variantes relacionados ao sistema Rh, como D-fraco, e ao sistema ABO, como subgrupo A2, por exemplo, podem estar envolvidos nos casos discrepantes e duvidosos resultantes da tipagem sanguínea, sendo necessários ensaios confirmatórios a fim de esclarecer o grupo sanguíneo ao qual o doador pertence. Esse procedimento visa reduzir a chance de complicações posteriores para o futuro receptor de sangue.

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivos analisar a técnica de semiautomação que está sendo implantada no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em relação à detecção de resultados duvidosos e inconclusivos associados aos sistemas ABO e Rh, e à detecção de fenótipos variantes, principalmente D-fraco. Ainda, faremos uma análise comparativa dos mesmos aspectos com a técnica manual anteriormente utilizada.

Casuística e métodos/Material e Métodos:

População de estudo

Todas as amostras provenientes dos doadores de sangue e plaquetas do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n = 7363) no período de seis meses (Novembro de 2011 a Abril de 2012) foram submetidas ao

processo de tipagem sanguínea semiautomatizada em microplacas para os sistemas ABO e RhD. Também foram coletados os resultados das amostras submetidas ao processo de tipagem sanguínea manual em lâmina (n=7677) para os sistemas ABO e RhD durante os seis meses (Maio a Outubro de 2011) imediatamente anteriores à implantação da técnica semiautomatizada. Foram analisadas todas as amostras, de ambos períodos, que apresentaram resultado discrepante associado a um ou ambos sistemas sanguíneos. Os doadores do Banco de Sangue do HCPA geralmente compreendem indivíduos saudáveis com idade entre 18 e 65 anos, de ambos sexos. Entretanto, amostras de sangue de pacientes do HCPA que receberam autodoação (*stem cell*) eventualmente também são encaminhadas ao laboratório para serem tipadas utilizando a mesma técnica, e, portanto, existem indivíduos fora da faixa etária estabelecida para os doadores em geral na população em estudo.

Tipagem sanguínea semiautomatizada para os sistemas ABO e RhD

A técnica é realizada no módulo *Swing Twin Sampler* (DiaMed Micro Typing System), o qual é responsável pela pipetagem das amostras na microplaca, identificação automática através da leitura dos códigos de barras dos tubos de amostras, dos frascos de reagentes de hemácias-teste e diluentes e da microplaca. As microplacas (DiaMed-MP Teste) com anticorpos monoclonais dessecados e um controle negativo (RhD) vêm prontas para uso e são utilizadas para a determinação dos grupos sanguíneos ABO e RhD (Figura 1). Para maior segurança, cada microplaca também é identificada com um código de barras. A configuração das microplacas permite 12 determinações de grupos sanguíneos, por placa, incluindo prova direta e reversa. São necessários outros reativos adicionais, como as hemácias-teste para prova reversa (DiaCell-MP ABO) e solução de bromelina (ID-Diluent 1), cujos frascos são dispostos nos locais apropriados do equipamento. Após a pipetagem automática e um período de incubação de 10 minutos, a microplaca passa para o módulo *Lyra*

MP-reader (DiaMed Micro Typing System), responsável pela centrifugação, agitação, leitura e interpretação das reações de aglutinação da microplaca.

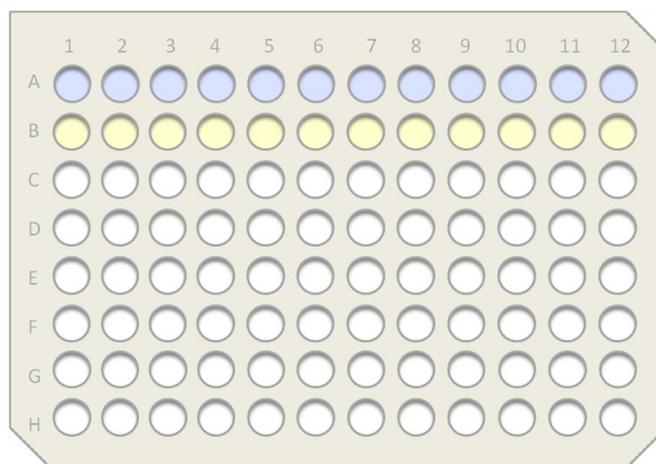


Figura 1: Microplaca utilizada para determinação dos sistemas sanguíneos ABO e Rh. Capacidade para 12 amostras (colunas). As amostras (fração de hemácias) são aplicadas nos poços contendo anti-A (A), anti-B (B), anti-AB (C), anti-D IgM (D), anti-D IgM/IgG (E), controle negativo (F). Nos dois últimos poços é realizada a prova reversa; na reversa de A (G) adiciona-se amostra de plasma e hemácias-teste A1, enquanto na reversa de B (H) adiciona-se hemácias-teste B à amostra de plasma do doador.

A leitura da placa é realizada através da utilização de câmeras digitais, e a interpretação dos resultados de cada poço é feita pelo gerenciador do sistema a partir da análise das imagens. Os resultados das reações podem ser positivos (1+, 2+, 3+ ou 4+) ou negativos. Essa interpretação dos resultados fornecida pelo equipamento deve ser validada pelo operador, que verifica as imagens captadas e, se necessário, as compara com a visualização da própria placa com auxílio de um suporte específico que possui um espelho de aumento. Se necessário, em casos de discordância, o resultado pode ser alterado manualmente pelo operador.

Os dados referentes à tipagem sanguínea manual dos doadores no período entre maio e outubro de 2011, anterior à implantação da

semiautomação, foram levantados a partir dos registros do caderno do setor de imunohematologia, juntamente com os relatórios das totalizações mensais fornecidos pelo sistema do hospital (AGH). No caderno eram anotadas, à caneta, a prova reversa do sistema ABO, o RhD e, nos casos RhD negativo, o resultado da pesquisa do fenótipo D-fraco. Tanto a prova direta ABO quanto a tipagem do RhD eram realizadas em lâmina, no setor de processamento do Banco de Sangue do HCPA, e as amostras eram posteriormente enviadas ao setor de imunohematologia, responsável pela prova reversa e pesquisa do fenótipo D-fraco das amostras RhD negativas. Esses resultados eram anotados no caderno e passados para o sistema, caso nenhuma discrepância fosse detectada.

Para o sistema ABO, foram consideradas discrepantes as amostras que apresentaram discordância entre as tipagens direta e reversa em microplaca ou em lâmina (manual). Para o sistema Rh foram consideradas discrepantes as amostras que inicialmente se mostraram RhD negativas (Figura 2), seja pela tipagem em microplaca ou em lâmina, mas que no teste confirmatório em cartão de gel-teste resultaram fracamente positivas.

Resolvendo discrepâncias ABO

As amostras que apresentaram discrepância entre as tipagens ABO direta e reversa em microplaca foram submetidas à técnica de tipagem em tubo de vidro para confirmação. Ambos métodos, tanto em microplaca quanto em tubo, são baseados na prova de aglutinação. No segundo caso, são utilizados os reagentes Anti-A Monoclonal e Anti-B Monoclonal (Lorne Reagents) para verificação do grupo ABO, Anti-D Duoclone Monoclonal e Controle Anti-D Monoclonal (Lorne Reagents) para sistema RhD, e Revercel A1 e B para prova reversa (Fresenius Kabi).

Confirmação ou exclusão do fenótipo D-fraco

Todas as amostras que resultaram negativas na análise de antígeno RhD em microplaca foram submetidas à técnica em gel-teste (ID-Coombs Anti-IgG, DiaMed e reagente ID-Diaclon Anti-D, DiaMed) para a pesquisa do fenótipo D-fraco (Figura 2). Nos casos em que a pesquisa de D-fraco resulta positiva, é realizado novo teste de confirmação utilizando um gel-teste DiaClon ABD-Confirmação (DiaMed) para confirmação dos grupos ABO e RhD e um gel-teste ID-Coombs anti-IgG (DiaMed), no qual é realizado o teste Coombs direto.

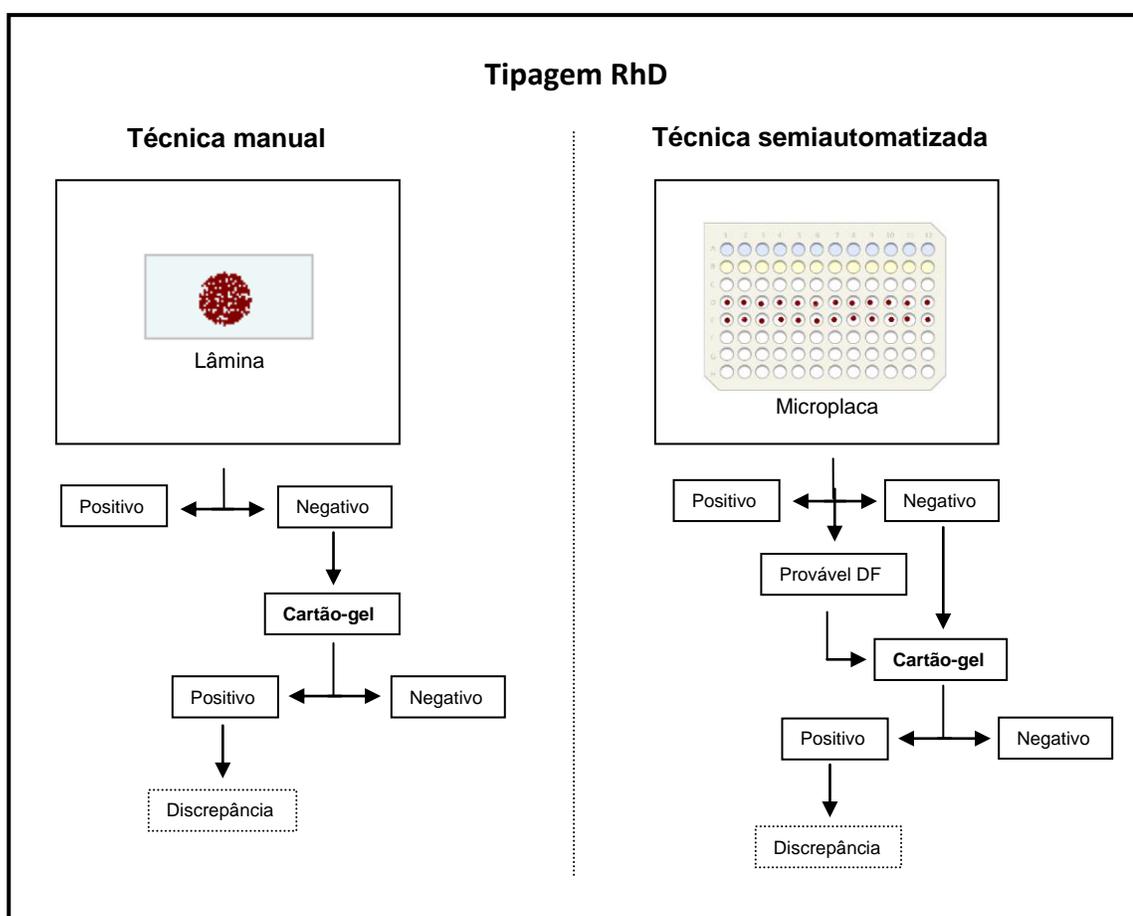


Figura 2: Esquema ilustrativo da fenotipagem RhD. Comparação entre as técnicas manual e semiautomatizada. Na técnica manual realiza-se apenas uma tipagem por lâmina, enquanto a microplaca tem capacidade para 12 determinações simultâneas.

Os cartões de gel-teste ID-Coombs Anti-IgG utilizados para pesquisa de D-fraco, passam por incubação a 37°C durante 13 minutos e centrifugação a 910 rpm durante 10 minutos. Os cartões DiaClon ABD-Confirmação não passam por incubação e são diretamente centrifugados. Após, a leitura dos cartões é realizada no módulo *Banjo ID-reader* (DiaMed Micro Typing System), responsável pela leitura e interpretação de ID-cartões.

Não foi realizada pesquisa para detecção do fenótipo D-parcial, uma vez que sua identificação não é possível através das técnicas convencionais, sendo necessária a realização de técnicas mais sofisticadas.

Análise Estatística

A análise dos dados obtidos e discrepâncias observadas foi baseada na estatística descritiva. Ainda, foi realizada uma análise comparativa entre os dados obtidos através da técnica de semiautomação durante o período entre Novembro/11 e Abril/12 (seis meses) e o histórico dos dados da técnica manual dos seis meses imediatamente anteriores (Maio/11 a Outubro/11) à implantação da técnica semiautomatizada, com relação à detecção de possíveis casos de discrepância nos sistemas ABO e Rh. Para isso, foi utilizado o Teste exato de Fisher, utilizado na comparação dados categóricos, e o teste de Pearson, com significância de $p < 0,05$, com objetivo de observar a presença de diferenças estatisticamente significativas.

Resultados

Discrepâncias ABO

No período de 12 meses, a taxa de discrepância ABO (Tabela 1) observada foi de 0,22% (33/15040). De um total de 33 casos, 28 ocorreram

durante o período da técnica semiautomatizada (TSA) e 5 ocorreram durante o período da técnica manual (TM).

Tabela 1

Resultados discrepantes associados ao sistema ABO durante a TM e a TSA

Período	Discrepante	Não Discrepante	Total
Mai/11 a Out/11 (TM)	5	7672	7677
Nov/11 a Abr/12 (TSA)	28	7335	7363
	33	15007	15040

$p < 0.0005$ (Odds ratio: 4,633; I.C 95%: 2.039 – 10.527)

Dentre os casos de discrepância ABO no período da TSA, dois apresentaram fenótipo A2, enquanto no período da TM três doadores apresentaram esse subgrupo de A. Portanto, cinco doadores foram classificados como fenótipo A2, representando 15% (5/33) dos casos de discrepância ABO. Um doador no período da TSA apresentou alto título do anticorpo irregular anti-M e outros três eram autodoadores de *stem cell*.

Fenótipo D-fraco e discrepâncias Rh

Com relação às discrepâncias relacionadas ao sistema Rh (Tabela 2), observamos que as situações discrepantes totalizaram 0,18% (27/15040) de todas as amostras analisadas durante o período de 12 meses. Também podemos observar que não houve diferença na ocorrência desses casos entre as técnicas manual e semiautomatizada ($p=1.0$).

Tabela 2

Resultados discrepantes associados ao sistema Rh durante a TM e a TSA

Período	Discrepante	Não Discrepante	Total
Mai/11 a Out/11 (TM)	14	7663	7677
Nov/11 a Abr/12 (TSA)	13	7350	7363
	27	15013	15040

$p = 1.0$ (Odds ratio: 0,968; I.C 95%: 0.455 – 2.061)

Vinte doadores apresentaram o fenótipo D-fraco no período da TM (Tabela 3), contra cinquenta e quatro doadores no período da TSA. Ainda, observamos que a prevalência do fenótipo D-fraco, no período de 12 meses e na população estudada, foi de 0,49% (74/15040).

Tabela 3

Resultados da tipagem Rh e pesquisa do fenótipo D-fraco durante a TM e a TSA

Período	Rh +	Rh -	DF	Total
Mai/11 a Out/11 (TM)	6704	953	20	7677
Nov/11 a Abr/12 (TSA)	6424	885	54	7363
	13128	1838	74	15040

p < 0.0005

Reações que motivaram dúvida conforme a técnica

Ao analisar a origem dos casos duvidosos relacionados às discrepâncias ABO na microplaca (Tabela 4), observamos a ocorrência de algumas reações que motivaram dúvida envolvendo os reagentes já presentes na microplaca. A maior frequência de reações duvidosas foi na tipagem reversa de A (R.A), que respondeu por quase metade dos casos (46,4%). Das treze reações duvidosas na R.A., onze ocorreram devido à detecção de micro-pó ou reação de uma cruz (1+) no poço da R.A., de maneira que não concordavam com a prova direta. Vinte e seis dos vinte e oito casos de discrepância ABO foram solucionados após técnica em tubo.

Tabela 4

Reações que motivaram dúvida na técnica em microplaca e na técnica em tubo

	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D	Anti-D	Controle	R.A.	R.B.
Microplaca	4	3	1	0	0	1	13	8
Tubo*	0	0		0	0	0	0	2

* Reação em tubo realizada a temperatura ambiente

As duas reações duvidosas em tubo, na R.B., representadas na Tabela 4 correspondem a amostras cuja tipagem em tubo não foi capaz de solucionar a

discrepância observada na microplaca. Não foi possível definir a causa dos resultados discrepantes, mas sabe-se que um dos casos era de um autodoador de *stem cell*.

Discussão

A automação da técnica de tipagem sanguínea vem ganhando espaço no cenário atual, em que surgem novas tecnologias capazes de assegurar maior segurança aos procedimentos transfusionais, acompanhando a enorme demanda nos bancos de sangue. As vantagens oferecidas pelos equipamentos semiautomatizados são inúmeras, uma vez que proporcionam uma maior padronização das técnicas convencionais e uma menor subjetividade na sua interpretação, além da possibilidade de interfaceamento. Como podemos observar, mesmo com o advento dessas novas tecnologias, as técnicas manuais anteriores ainda não podem ser de todo abolidas, tendo grande importância na confirmação de resultados por vezes duvidosos.

A partir dos resultados que obtivemos, podemos observar que há um aumento nos casos de discrepâncias ABO após a implantação da técnica semiautomatizada (Tabela 1). Entretanto, desses vinte e oito casos ocorridos na microplaca, vinte e seis foram resolvidos no teste em tubo. Dentre esses casos discrepantes (Tabela 4), observamos que uma importante parcela ocorreu nos poços da linha G da microplaca (Figura 1) em que é realizada a prova reversa do grupo A. Os resultados duvidosos, de acordo com as informações contidas na bula do kit (DiaMed-MP Teste), podem ser atribuídos a possíveis fatores, tanto internos quanto externos ao doador, dentre eles poderíamos citar variações na velocidade ou no tempo de agitação da microplaca, atraso na leitura e interpretação das reações (sedimentação), presença de anticorpos irregulares, contaminação bacteriana (ou de outros tipos) dos materiais. Todos esses elementos podem levar a reações equivocadas ou erros na leitura dessas reações. Entretanto, alguns desses fatores podem ser descartados

especificamente no nosso estudo, uma vez que a agitação da microplaca e a interpretação dos resultados é realizada em equipamento semiautomático (*MP-Reader*) em tempo hábil e na velocidade e no tempo de agitação padrões.

No caso do sistema Rh não foi observado aumento semelhante na detecção de casos discrepantes (Tabela 2), mas observou-se uma considerável elevação na classificação de indivíduos como fenótipo D-fraco após a implantação da semiautomação. O aumento na frequência do fenótipo D-fraco sem consequente aumento na frequência de casos de discrepância Rh, uma vez que esse é um dos principais fatores que leva a esse tipo de discrepância, pode ser explicado pelo fato do leitor de microplacas (*MP-reader*) ser capaz, na maioria das vezes, de discernir e detectar reações fracamente positivas, diferentemente da tipagem em lâmina, na qual essas reações poderiam ser interpretadas e classificadas equivocadamente. Dessa maneira, o novo sistema estaria colaborando, teoricamente, para a redução dos casos de discrepância Rh, pois seria capaz de evitar interpretações incorretas na tipagem RhD. O aumento do número de casos de D-fraco pode ser atribuído, como dito anteriormente, à capacidade do leitor de microplacas detectar as reações fracamente positivas para anti-D, as quais, anteriormente, seriam apenas detectadas no teste confirmatório em cartão-gel após tipagem previamente negativa em lâmina. Nesse período, como as reações eram apenas interpretadas a olho nu, muitas tipagens RhD fracamente positivas podem ter sido classificadas como positivas, gerando uma consequente queda na classificação dos casos de fenótipo D-fraco.

A automação apresenta diversas vantagens na sua implantação, uma vez que proporciona um aumento na quantidade de amostras testadas a cada vez, utiliza pequenos volumes de amostra, possibilita o interfaceamento (promovendo redução nos erros de leitura e transcrição e economia de tempo), permite a rastreabilidade dos resultados e uma maior padronização na leitura das reações (7). A rastreabilidade dos resultados proporcionada pela

automação foi de grande importância para a realização deste estudo, auxiliando na coleta dos dados. Isso se deve ao armazenamento dos resultados no computador sob a forma de registro escrito e foto digitalizada da reação observada, tanto na microplaca quanto nos cartões-gel. Esses resultados podem ser resgatados e visualizados no monitor a qualquer momento, apenas informando o número da amostra, a data da leitura ou o tipo de teste realizado. A mesma facilidade certamente não foi observada na coleta dos dados de tipagens referentes ao período anterior à implantação da semiautomação, uma vez que eram anotados manualmente em um caderno à caneta, sem registro de imagem. Entretanto, a automação também apresenta algumas desvantagens no que diz respeito ao tempo de processo do pipetador automático, podendo levar o dobro do tempo necessário para realização da mesma técnica manualmente. A principal desvantagem relacionada ao tempo está associada à lavagem da ponteira utilizada pelo equipamento, a qual deve ser lavada três vezes a cada amostra ou reagente pipetado em vez de utilizar ponteiras descartáveis.

As principais conclusões que podemos tirar do presente estudo são de que a implantação da semiautomação da técnica de tipagem sanguínea é acompanhada de importantes vantagens, principalmente a possibilidade de interfaceamento, a rastreabilidade dos resultados, favorecida pela geração de registros com imagem, e a padronização na interpretação das reações. A técnica, entretanto, também traz consigo algumas desvantagens, relacionadas principalmente ao tempo do processo. Ainda, observamos que algumas vezes a técnica semiautomatizada em microplacas gera resultados diferentes da técnica em tubo, com consequente aumento na classificação de indivíduos no fenótipo D-fraco e aumento nos casos duvidosos ou discrepantes na tipagem do sistema ABO. Entretanto, esses casos foram potencialmente solucionados na técnica em tubo, que permanece sendo padrão-ouro na tipagem sanguínea, e não gera grandes impactos no resultado final. Dessa maneira, o aumento nos casos de discrepância ABO observados na semiautomação não colabora para um aumento no risco de tipagens errôneas.

Referências

1. HENRY JB. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods. 20 ed. USA: Saunders; 2001.
2. "Karl Landsteiner - Biography". Nobelprize.org 2 Jul 2012. Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1930/landsteiner.html.
3. HARMENING D. Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4 ed: Revinter; 2006.
4. Reid M, Lomas-Francis C. The Blood Group Antigen Factsbook. 2 ed: Academic Press; 2004.
5. Nardoza LMM, Szulman A, Barreto JA, JUNIOR EA, Moron AF. BASES MOLECULARES DO SISTEMA RH E SUAS APLICAÇÕES EM OBSTETRÍCIA E MEDICINA TRANSFUSIONAL. Rev Assoc Med Bras. 2010;56(6):724-8.
6. Cozac APCNdC. Fenotipagem RhD: particularidades e implicações clínicas. Fleury Medicina e Saúde 2011. Available from: <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/artigos/Pages/fenotipagem-rhd-particularidades-e-implicacoes-clinicas.aspx>.
7. Chaves G. Maestro MasterSoftware - DiaMed. 2007.

III – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Após seis meses de utilização da técnica semiautomatizada, podemos fazer algumas considerações sobre a semiautomação. De maneira geral, os equipamentos utilizados na técnica semiautomatizada (Maestro Master Software – Diamed) mostraram-se bastante adequados para a execução da rotina do laboratório de imunohematologia, na execução das tipagens sanguíneas dos doadores. Não há dúvidas de que a nova técnica apresenta diversas vantagens e uma grande relação custo-benefício. Apesar disso, a técnica manual em tubo continua sendo padrão-ouro na tipagem sanguínea, por ser uma técnica bastante sensível, prática e mais acessível. Entretanto, pensando na segurança dos doadores e, principalmente, dos futuros receptores de transfusões sanguíneas, acreditamos que as perspectivas futuras apontam para o uso em uma escala cada vez maior das técnicas automatizadas, uma vez que elas oferecem proteção contra a identificação incorreta de amostras e erros de transcrição, que configuram os principais erros responsáveis por transfusões incompatíveis.

IV – BIBLIOGRAFIA

1. Martins ML, Cruz KVD, Silva MCF, Vieira ZM. Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2009;31:252-9.
2. Cozac AP. Estudo do potencial antigênico relativo dos antígenos de grupos sanguíneos menores em pacientes sob esquema de transfusão. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2009.

3. HARMENING D. Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão. 4 ed: Revinter; 2006.
4. Sabino JS. Determinação da incidência de Rh D fraco e Rh D parcial na população da área da abrangência do Hemocentro de Botucatu. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2008.
5. HENRY JB. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods. 20 ed. USA: Saunders; 2001.
6. BloodIndex. Blood Bank Zone [cited 2012 Abril]. Available from: http://www.bloodindex.org/blood_bank_zone.php.
7. Chester MA, Olsson ML. The ABO blood group gene: a locus of considerable genetic diversity. Transfus Med Rev. 2001 Jul;15(3):177-200. PubMed PMID: 11471121. Epub 2001/07/27. eng.
8. "Karl Landsteiner - Biography". Nobelprize.org 2 Jul 2012. Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1930/landsteiner.html.
9. Batissoco AC, Novaretti MCZ. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2003;25:47-58.
10. BRASIL MdS. Portaria MS nº1353 de 13 de Junho de 2011. Brasil2011.
11. Shastry S, Bhat S. Imbalance in A(2) and A(2)B phenotype frequency of ABO group in South India. Blood Transfus. 2010 Oct;8(4):267-70. PubMed PMID: 20967168. Pubmed Central PMCID: 2957492. Epub 2010/10/23. eng.

12. Svensson L, Rydberg L, De Mattos LC, Henry SM. Blood group A1 and A2 revisited: an immunochemical analysis. *Vox Sanguinis*. 2009;96(1):6.
13. Nardoza LMM, Szulman A, Barreto JA, JUNIOR EA, Moron AF. BASES MOLECULARES DO SISTEMA RH E SUAS APLICAÇÕES EM OBSTETRÍCIA E MEDICINA TRANSFUSIONAL. *Rev Assoc Med Bras*. 2010;56(6):724-8.
14. Reid M, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigen Factsbook*. 2 ed: Academic Press; 2004.
15. Girello A, Kühn T. *Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária*. São Paulo: Ed. Senac; 2002.
16. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):385-93. PubMed PMID: 9864185. Epub 1998/12/24. eng.
17. Westhoff CM. Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol*. 2006 Nov;13(6):471-5. PubMed PMID: 17053461. eng.
18. Cozac APCNdC. Fenotipagem RhD: particularidades e implicações clínicas. *Fleury Medicina e Saúde* 2011. Available from: <http://www.fleury.com.br/medicos/medicina-e-saude/artigos/Pages/fenotipagem-rhd-particularidades-e-implicacoes-clinicas.aspx>.
19. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*. 2005 Feb;88(2):130-5. PubMed PMID: 15720611. Epub 2005/02/22. eng.

20. Kumar L. Difficulties in Immunohaematology: The Weak D Antigen. *MJAFI*. 2005;61(4). Epub 350.
21. Morelati F, Barcellini W, Manera MC, Paccapelo C, Revelli N, Villa MA, et al. New technologies in immunohaematology. *Blood Transfus*. 2007 Apr;5(2):58-65. PubMed PMID: 19204755. Pubmed Central PMCID: 2535883. Epub 2007/04/01. eng.
22. Chaves G. Maestro MasterSoftware - DiaMed. 2007.
23. Chiaroni J, Legrand D, Dettori I, Ferrera V. Analysis of ABO discrepancies occurring in 35 French hospitals. *Transfusion*. 2004 Jun;44(6):860-4. PubMed PMID: 15157252. Epub 2004/05/26. eng.
24. Ludwig L, Zilly A. Reações transfusionais ligadas ao sistema ABO. *NewsLab*. 2007;84(1).
25. Baiochi E, Camano L, Sass N, Colas OR. Frequências dos grupos sanguíneos e incompatibilidades ABO e RhD em puérperas e seus recém-nascidos. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2007;53:44-6.
26. MacIvor D, Triulzi DJ, Yazer MH. Enhanced detection of blood bank sample collection errors with a centralized patient database. *Transfusion*. 2009 Jan;49(1):40-3. PubMed PMID: 18798804. Epub 2008/09/19. eng.
27. Pellegrino Jr J. A automação para todas as rotinas de imunohematologia (DiaMed). 2007.
28. Oliveira MdCVC. FENOTIPAGENS ABO e RhD - Discrepâncias (DiaMed). 2007.