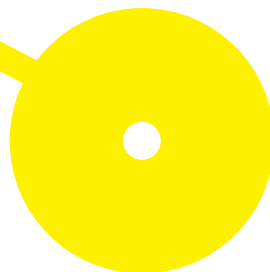




# Comparação entre a fenotipagem eritrocitária pelo MDmulticard<sup>®</sup> e a genotipagem em doentes com prova de antiglobulina humana direta positiva

Helena Maria Conceição Rodrigues Sousa

09/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**

**Comparação entre a fenotipagem eritrocitária pelo MDmulticard® e a genotipagem em doentes com prova de antiglobulina humana direta positiva**

**Autor**

Helena Maria Conceição Rodrigues Sousa

**Orientadores**

Prof. Doutora Sandra Marlene Mota/Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto  
Dra Carla Monteiro/ Centro Hospitalar Universitário de São João

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo de Especialização em Imunohemoterapia e Transplantação pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Professora Doutora Sandra Marlene Mota, pela sua dedicação, partilha de conhecimentos, simpatia e pelo aconselhamento na revisão da tese, sendo o seu contributo fundamental para a concretização deste mestrado.

À Doutora Carla Monteiro, pelas críticas, conselhos, disponibilidade e conhecimento partilhado, mas sobretudo, pelo estímulo e ajuda na escolha e orientação do tema deste projeto.

Ao Serviço de Imunohemoterapia do Centro Hospitalar e Universitário S. João, pela oportunidade de realização deste estudo.

Aos professores e colegas do mestrado, a quem agradeço o convívio e aprendizagem que me proporcionaram.

A todos os meus colegas do serviço de Imunohemoterapia, que me acompanharam e apoiaram na realização deste mestrado, em especial:

- Aos meus colegas do laboratório de Imunohematologia, pela amizade, colaboração e paciência ao longo destes dois anos.
- À minha colega Dina Hortelão pela sua compreensão e apoio nos momentos mais difíceis.

À minha família, especialmente ao meu marido pelo seu carinho e apoio incondicional em todos os momentos, à minha filha pelo seu incentivo e colaboração e à minha sobrinha Bruna pela sua disponibilidade, sugestões e auxílio na concretização deste trabalho.

A todos os que de algum modo me ajudaram a completar esta etapa do meu percurso académico,

Muito obrigada.

## **Resumo**

Os testes pré-transfusionais podem ser um desafio em doentes com TAD positiva, como no caso das anemias hemolíticas autoimunes. Na impossibilidade da realização da fenotipagem, nestes doentes, a genotipagem demonstrou ser uma ferramenta indispensável na superação das limitações das técnicas sorológicas. Com o MDmulticard® Basic Extended Phenotype surge uma nova abordagem à fenotipagem eritrocitária, rápida e simples com possibilidade de substituir a genotipagem em alguns doentes.

Este estudo observacional analítico transversal teve como objetivo comparar a fenotipagem obtida no MDmulticard® para os antigénios Duffy, Kidd e Ss com o fenótipo inferido pela genotipagem por PCR-SSP, em doentes com TAD positiva. Foram estudados, por ambas as técnicas, 32 doentes com TAD positiva que necessitavam de transfusão de eritrócitos.

A deteção de antigénios eritrocitários pelo MDmulticard® mostrou um coeficiente de  $k = 1$  para todos os antigénios testados à exceção do Fya que apresentou  $k=0,93$ . Foram encontrados valores de sensibilidade e especificidade para Fya de 95,0% e 92,3%, respetivamente, e de 100% para os restantes antigénios testados.

Os resultados obtidos são promissores, mas seria importante realizar estudos com um maior número de doentes e esclarecer as discrepâncias encontradas, de forma a estender a utilização deste cartão a este grupo específico de doentes.

**Palavras-chave:** Transfusão de sangue; antigénios do grupo sanguíneo; aloimunização; anemia hemolítica autoimune, genotipagem.

## **Abstract**

Pre-transfusion testing can be a challenge in TAD-positive patients, as in the case of autoimmune hemolytic anemias. If phenotyping is not possible in these patients, genotyping has proved to be an indispensable tool in overcoming the limitations of serological techniques. With the MDmulticard® Basic Extended Phenotype comes a new, fast and simple approach to erythrocyte phenotyping that can replace genotyping in some patients.

This cross-sectional analytical observational study aimed to compare the phenotype obtained on the MDmulticard® for the Duffy, Kidd and Ss antigens with the phenotype inferred by PCR-SSP genotyping in TAD-positive patients. Thirty-two TAD-positive patients requiring red cell transfusion were studied using both techniques.

The detection of erythrocyte antigens by the MDmulticard® showed a coefficient of  $k = 1$  for all the antigens tested, with the exception of Fya, which showed  $k = 0.93$ . Sensitivity and specificity values for Fya were 95.0% and 92.3%, respectively, and 100% for the other antigens tested.

The results obtained are promising, but it would be important to carry out studies with a larger number of patients and clarify the discrepancies found, in order to extend the use of this card to this specific group of patients.

**Keywords:** Blood transfusion; blood group antigens; alloimmunization; autoimmune hemolytic anemia, genotyping.

## Índice

1. Introdução.....	12
1.1. Os eritrócitos.....	32
1.2. Grupos sanguíneos.....	42
1.2.1. Sistema MNS (ISBT 002).....	42
1.2.2. Sistema Duffy (ISBT 008).....	62
1.2.3. Sistema Kidd (ISBT 009).....	72
1.3. Aloimunização eritrocitária.....	92
1.4. Métodos para identificação dos antígenos dos grupos sanguíneos.....	122
1.4.1. Determinação de grupos sanguíneos em amostras TAD+.....	142
1.4.2. Genotipagem / Fenotipagem.....	172
1.4.3. Discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo.....	192
1.4.4. A técnica de PCR-SSP.....	202
1.4.4.1. Kits SSP BAGene.....	212
1.4.5. O cartão de fluxo lateral MDmulticard® - Técnica de Fluxo Lateral.....	212
1.4.5.1. MD multicard®.....	222
1.4.5.2. Aplicabilidade.....	232
2. Objetivo.....	252
3. Metodologia.....	252
4. Resultados.....	272
5. Discussão.....	322
6. Conclusão.....	372
7. Referências Bibliográficas.....	382
ANEXOS.....	472

## Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da membrana celular e os seus componentes associados.....	32
Figura 2 - Os ags de grupo sanguíneo na membrana do eritrócito.....	42
Figura 3 - Estrutura do DARC.....	72
Figura 4 - Diagrama representativo da glicoproteína Kidd na membrana celular do eritrócito..	82
Figura 5 - Prevalência aproximada de aloacs de eritrócitos por doença.....	102
Figura 6 - Representação esquemática de fatores que se acredita influenciar a probabilidade de aloimunização.....	112
Figura 7 - Princípio da reação de PCR-SSP.....	212
Figura 8 - Cartão MDmulticard® basic extended phenotype.....	232
Figura 9 - Gráfico de barras com a percentagem de amostra agrupadas por sexo.....	272
Figura 10 - Gráfico de barras para a frequência de idades.....	282
Figura 11 - Gráfico de barras para a frequência de TAD+.....	282
Figura 12 - Gráfico de barras para a frequência de serviço.....	292

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resultados obtidos da genotipagem e fenotipagem para o sistema de grupo sanguíneo Kidd, em 32 amostras de doentes com TAD+.....	<u>302</u>
Tabela 2 – Resultados obtidos da genotipagem e fenotipagem para o sistema de grupo sanguíneo Duffy, em 32 amostras de doentes com TAD+.....	<u>302</u>
Tabela 3 – Resultados obtidos da genotipagem e fenotipagem para o sistema de grupo sanguíneo MNS, em 32 amostras de doentes com TAD+.....	<u>302</u>
Tabela 4 – Valores de medida de concordância (Kappa de Cohen), especificidade e sensibilidade por gene.....	<u>312</u>

## **Lista de abreviaturas**

- ACKR1 – Gene recetor de quimiocina atípico 1
- AHAI – Anemia hemolítica autoimune
- Ac – Anticorpo
- Ag – Antigénio
- ATP – Adenosina trifosfato
- CSUSJ – Centro Hospitalar e Universitário São João
- DARA – Daratumumab
- DARC – Duffy Antigen Receptor for Chemokines
- DHRN – Doença Hemolítica do Recém-nascido
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- FY – Sistema Duffy
- Fya – antigénio Fya
- Fyb – antigénio Fyb
- GPA – Glicoforina A
- GPB – Glicoforina B
- GPI – Glicosilfosfatidilinositol
- GP – Glicoforina
- GYPA – Gene GYPA
- GYPB – Gene GYPB
- GYPE – Gene GYPE
- Hb – Hemoglobina
- HLA – Antígenos leucocitários Humanos
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M

ISA – Isatuximab

ISBT – Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue

JK – Sistema Kidd

Jka – antigénio Jka

Jkb – antigénio Jkb

KELL – Sistema Kell

MM – Mieloma Múltiplo

MNS – Sistema MNS

MUR – MNS 10

NGS – Sequenciação de nova geração

PAI – Pesquisa de anticorpos irregulares

PBM – Patient blood management/Gestão de sangue do doente

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PCR-SSP – Reação em cadeia da polimerase – primers de sequência específica

PEG – Polietilenoglicol

RH – Sistema Rh

Rhlg – Imunoglobulina anti-D

S – Antigénio S

s – Antigénio s

SNP – Single Nucleotide Polymorphism

TAD – Teste de antiglobulina direto

TCPH – Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas

## 1. Introdução

A Imunohemoterapia é uma especialidade médica com uma área de intervenção abrangente, que vai da Medicina Transfusional até às patologias do sistema hemostático (hemorrágicas e trombóticas). É composta por duas vertentes indissociáveis e complementares, a clínica e a laboratorial, e caracteriza-se por recorrer a componentes sanguíneos e aos seus derivados, para tratar doenças e condições clínicas dos doentes. Entre as técnicas utilizadas estão as transfusões de sangue e seus componentes (como eritrócitos, plaquetas e plasma), as aférese terapêuticas, o Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas (TCPH), e ainda a administração de fatores da coagulação (1).

De salientar que o aperfeiçoamento da intervenção clínica neste ramo e uma melhor articulação com outras especialidades médicas e cirúrgicas são o resultado do contributo da área laboratorial com tecnologias cada vez mais sofisticadas, mas também do conhecimento alcançado ao longo de muitos anos (1).

Vemos ao longo da história que o processo transfusional, atualmente mais simples e quase inofensivo (“praticamente” isento de riscos), realizado hoje rotineiramente em todo o mundo, só foi possível graças ao trabalho e esforço de muitos investigadores, tais como: William Harvey, Jean Denis, Richard Lower, James Blundell, Braxton Hicks e mais tarde, Karl Landsteiner, Alex Wiener e Coombs. Estes investigadores, com a clarificação de problemas tão graves como a hemólise ou a coagulopatia, e com a introdução de novas abordagens e ferramentas permitiram chegar à segurança e eficácia dos dias de hoje. Porém, concomitantemente com a evolução e o desenvolvimento da ciência também a sociedade mudou, o que se traduziu no emergir de novos desafios (2–7).

Deste modo, uma população cada vez mais envelhecida e ainda, um claro aumento no número de doentes do foro hemato-oncológico, tendem a aumentar as necessidades de sangue e dos seus derivados (8). Temos ainda que o número de doentes hemato-oncológicos tratados com TCPH tem sido igualmente crescente e a sua grande maioria necessitam de suporte transfusional antes e/ou após o transplante (9). Outro grupo de doentes que, com alguma frequência têm necessidade de ser transfundidos são os oncológicos, principalmente os idosos que se apresentam sintomáticos com anemias graves, situações de trauma e hemorragias ativas, com ou sem doença coronária associada (10). No entanto, a tendência atual no uso de terapias com componentes e derivados sanguíneos, para a recuperação e tratamento de doentes segue uma

lógica restritiva e personalizada, sendo a prescrição médica criteriosa, pois o seu uso não é isento de complicações e há sempre um risco associado (9–13).

Neste sentido, temos o programa *Patient Blood Management* (PBM), um programa de gestão do sangue do doente que consiste em *guidelines*/diretrizes baseadas na evidência e que assenta em 3 pilares fundamentais: otimização da hematopoiese, minimização da hemorragia e gestão da tolerância à anemia, em 3 momentos distintos: no pré-operatório, no intra-operatório e no pós-operatório. Este conceito faz parte das boas práticas transfusionais, limitando as transfusões de eritrócito ou outros componentes às situações exclusivamente necessárias, como aquelas em que o aporte de oxigénio aos tecidos depende da transfusão de eritrócitos. O seu objetivo é promover a segurança dos doentes, diminuindo não só a morbilidade como a mortalidade associada à transfusão, enquanto otimiza a hemoglobina e as reservas de ferro (14).

Com vista a reduzir estes riscos, foi implementado em 2008 em Portugal, um sistema de vigilância centralizado, designado de hemovigilância, que abrange toda a cadeia transfusional. Inclui monitorização, notificação, investigação e análise de eventos adversos, bem como desenvolvimento e implementação de recomendações para prevenir a sua ocorrência ou recorrência (13).

Apesar de tudo o que já foi mencionado, a máxima “A transfusão de uma unidade de sangue para o doente correto, no momento correto e nas condições corretas”, que preconiza uma utilização segura, clinicamente eficaz e eficiente do sangue humano doado, continua a desafiar-nos. Um exemplo disso é a transfusão segura – isenta de reações adversas e ou infeções, com que a área laboratorial ainda se depara, mesmo à luz do conhecimento atual, nomeadamente nos estudos imunohematológico dos doentes que necessitam do suporte transfusional (15).

A descoberta do sistema sanguíneo ABO, assim como o uso do soro antiglobulina, foram marcos na história da transfusão sanguínea. Estas descobertas, associadas aos trabalhos que estudaram o efeito das enzimas proteolíticas sobre o comportamento dos eritrócitos, vieram ajudar a compreender a estrutura e os aspetos bioquímicos/imunológicos dos antigénios (ags), podendo agora ser entendidos, aumentando o conhecimento acerca do eritrócito a nível sorológico (3).

## 1.1. Os eritrócitos

O sangue é um tecido conjuntivo com propriedades especiais, apresenta-se como um líquido viscoso de cor vermelha e é constituído pela porção celular, eritrócitos, leucócitos e plaquetas, que circulam em suspensão num meio líquido, o plasma. Tem como funções o transporte de nutrientes, gases respiratórios e resíduos do metabolismo, assim como a proteção contra substâncias estranhas, manutenção da hemóstase, temperatura corporal, entre outros (16).

Os eritrócitos são o tipo mais comum das células sanguíneas e num adulto representam cerca de 40% do volume de sangue. São células redondas, bicôncavas com cerca de 7,5 µm de diâmetro, anucleadas e desprovidas de organelos. No citoplasma contêm hemoglobina (Hb) e têm a capacidade de produzir energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP), de modo a cumprir todas as suas funções. A sua forma e dimensão permitem-lhe desempenhar a sua função de transporte de gases no corpo (16,17).

A membrana eritrocitária separa o meio intra e extracelular e é responsável pelas características antigénicas (18). A membrana é composta por uma dupla camada lipídica (colesterol e fosfolípidos), e por um conjunto de proteínas periféricas, integrais ou transmembranares que interagem com as proteínas do citoesqueleto (Figura 1) (18–21).

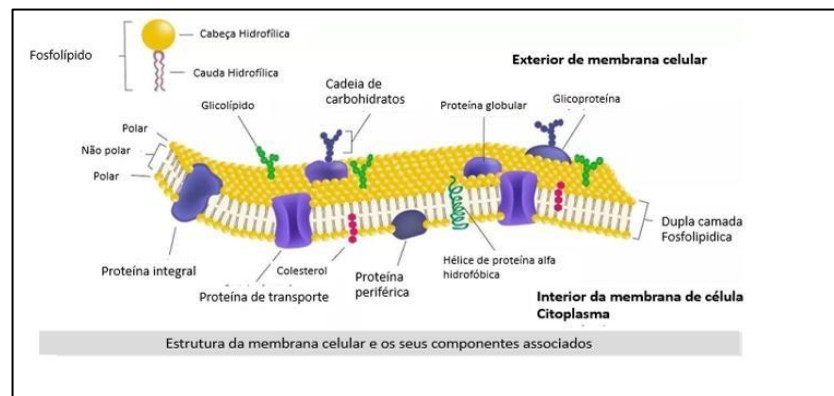


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da membrana celular e os seus componentes associados. Fonte: Adaptado de biologydictionary.net

As estruturas proteicas nos eritrócitos expressam antigenicidade e estão inseridas na membrana como proteínas de uma só passagem, como proteínas de múltiplas passagens ou como proteínas ancoradas à membrana por ligações da molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Figura 2) (20).

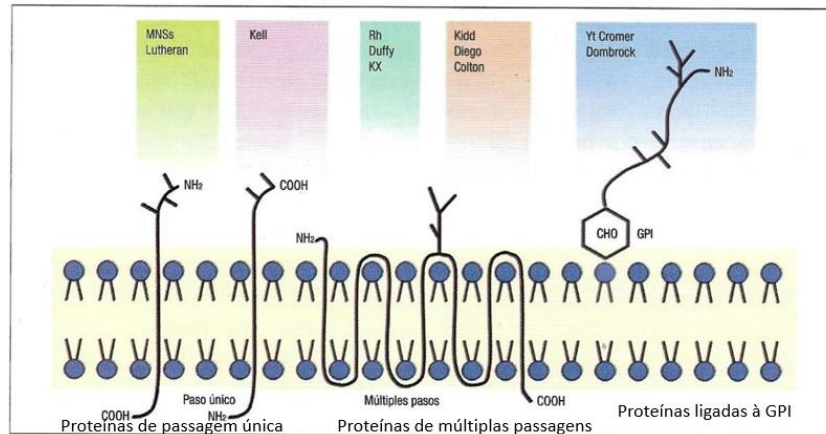


Figura 2 - Os ags de grupo sanguíneo na membrana do eritrócito. Fonte: Adaptado de Buelvas *et al.* (2015). (22)

## 1.2. Grupos sanguíneos

O sistema sanguíneo ABO foi o primeiro a ser descoberto, sendo até hoje o clinicamente mais importante na prática transfusional e na transplantação. A descoberta do sistema sanguíneo Rh levou à compreensão, e posterior prevenção, da doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHRN). Embora os sistemas de grupo sanguíneo ABO e Rh sejam os mais importantes, muitos outros anticorpos (acs) dirigidos contra ags de outros grupos sanguíneos são capazes de causar reações transfusionais hemolíticas ou DHRN, como é o caso dos sistemas MNS, Duffy e Kidd (23,24).

Decidiu-se denominar coleção aos ags que estão relacionados de forma bioquímica ou genética, mas não possuem as características necessárias para formar um grupo sanguíneo. A série corresponde aos ags que não é possível incluir nos sistemas de grupo nem numa coleção. Geralmente, os ags que pertencem a sistemas de grupo sanguíneo estão a nível molecular melhor caracterizados do que os ags atribuídos a uma coleção ou série (25,26).

### 1.2.1. Sistema MNS (ISBT 002)

Este sistema MNS, é quase tão complexo como o sistema Rh (23,27). Os ags M e N foram descobertos por Landsteiner e Levine em 1927. Atualmente já se conhecem 49 ags deste sistema (25). Todos os ags são “transportados” por sialoglicoproteínas, glicoforina A (GPA), glicoforina B (GPB), ou variantes de glicoforina (GP) (28). Estes ags resultam de eventos de conversão dos genes *GYP A* e *GYP B* que codificam a GPA e a GPB respetivamente e cuja localização é no cromossoma 4 (4 q31.21) (29). O *GYP A* codifica os ags M e N, inseridos na glicoforina A e o *GYP B*

codifica os ags S e s, inseridos na glicoproteína B (20). Os restantes ags deste sistema são raros, e resultam de uma substituição de aminoácidos ou múltiplos rearranjos entre *GYPA* e *GYPB*. Esses rearranjos estão na origem da diversidade antigénica deste sistema (30).

Junto ao gene *GYPB* encontra-se um terceiro gene, *GYPE*, que possivelmente estará também relacionado com os outros ags MNS. O gene *GYPE* não codifica ags detetáveis na superfície do eritrócito, mas pensa-se que esteja envolvido em rearranjos de genes que codifiquem proteínas e lipídeos. Os ags deste sistema estão desenvolvidos no nascimento e são úteis em casos de exclusão de paternidade. Os ags M, N, S, s, são homólogos e polimórficos em todas as populações que foram estudadas (30). Alguns ags clinicamente significativos, mas de baixa incidência surgem devido a recombinação entre genes. O ag MUR (MNS 10) é um deles, mas a frequência na China e na Tailândia, chega aos 7 e 10%. Nos indivíduos de raça negra o ag U, aparece em cerca de 99% (30). Os indivíduos U-, habitualmente são S- s- e/ou não têm GPB ou ela está alterada. Os ags de baixa prevalência, são o resultado de alterações num único aminoácido, ou então em moléculas híbridas GPA/GPB. O fenótipo S-s-U- surge quando há uma deleção do exon 2-6 do gene *GYPB*, no fenótipo S-s-U+ é caracterizado pela ausência do ag S e por uma expressão fraca do ag U na membrana do eritrócito. Os aloacs para ags do sistema MNS, habitualmente não são clinicamente significativos, embora acs contra ags MNS de baixa e alta prevalência, tenham dado origem a doença DHRN (22).

Estes acs apresentam efeito de dose, ou seja, reagem com mais evidência e apresentam títulos mais altos quando se utilizam células homocigóticas. A relevância clínica deste sistema traduz-se quando o ac reage ou não a 37°C, podendo ser ignorado caso este não reaja a 37°C. As enzimas proteolíticas papaína e ficina desdobram as sialoglicoproteínas (SGP) da membrana em locais bem definidos. Utilizando estas técnicas a reatividade anti-M e anti-N desaparece. São também destruídos pelo reagente ZZAP, uma solução de ditioneitol (DTT) e papaína, mas não são afetados só por DTT, nem pela cloroquina ou tratamento com ácido. O anti-U reage com eritrócitos, tratados ou não, com enzimas (31).

O anti-M, é um aloac IgM ou IgG, é relativamente frequente e não costuma reagir a 37°C, ou seja, nos casos em que são reativos a essa temperatura podem causar reação transfusional aguda ou tardia e são então considerados clinicamente significativos. Provas de compatibilidade a quente eliminam a reatividade da maioria dos acs anti-M. Embora não seja comum, este ac já foi implicado na DHRN (31).

O anti-N não é frequente (28). Habitualmente é IgM e comporta-se como crioaglutinas de reatividade fraca. Alguns são IgG fortes e foram encontrados em indivíduos com fenótipos raros uma vez que estas pessoas não têm a glicoforina que expressa o ag N por exemplo M+N-S-s-U- (32).

O anti-S e anti-s são ativos a 37°C e são da classe IgG e originam reações transfusionais hemolíticas e DHRN muito graves, contudo não são frequentes. O Anti-U não é habitual, contudo existem casos descritos na literatura como sendo responsável pela morte de doentes (30). O Anti-MUR pode causar DHRN e reações hemolíticas graves (33). Em Hong Kong e na Tailândia este ac é depois de anti-A e anti-B o mais comum. Os acs que reagem com ags de baixa frequência deste sistema podem causar reações transfusionais graves, sendo normalmente detetados após estes eventos (22).

### **1.2.2. Sistema Duffy (ISBT 008)**

Este sistema de grupo sanguíneo, foi descoberto em 1950 por Cutbush e Ikin (34,35). O nome Duffy surge em homenagem a um doente hemofílico que desenvolveu o ac, até então desconhecido o anti-Fya. O anti-Fyb, só seria descoberto um ano depois.

Os ag Duffy estão presentes em diferentes células do corpo humano, nas células epiteliais dos ductos coletores do rim e também nos vasos sanguíneos, cérebro, coração e pulmões. Não estão presentes no fígado dos adultos, nas plaquetas, granulócitos e linfócitos. Desempenham um papel na resposta inflamatória, na rejeição do enxerto e provavelmente na histocompatibilidade. A glicoproteína Duffy, atua não só como recetor de várias quimiocinas, incluindo a interleucina-8 (IL-8) a que se atribuiu um papel a nível inflamatório, mas também nos eritrócitos como recetor para o Plasmodium vivax e Plasmodium knowlesi. Desempenha um papel também nas células endoteliais, facilitando a quimiotaxia nos fenómenos de inflamação ou de resposta imunitária (36,37).

É no braço longo do cromossoma 1, perto do centrómero (1q22,23) que se localiza o gene ACKR1 (gene do recetor de quimiocina atípico 1), também conhecido como DARC (Duffy Antigene Receptor for Chemokines) (Figura 3) ou FY que vai codificar a glicoproteína que expressa os 5 ag deste sistema, são eles: Fya, Fyb, Fy3, Fy5 e Fy6 (38).

Os ags Fya e Fyb são codificados por 2 alelos codominantes FYA (FY\*01) e FYB (FY\*02) e diferem entre eles num só nucleótido. No alelo FYA a base é a guanina (G) e no alelo FYB é a adenina (A). Nos indivíduos de raça negra, existe o alelo FY\*02N.01, que vai originar o fenótipo Fy (a-b-). Estes

são os ags mais comuns e mais importantes na prática clínica, pois são os mais imunogénicos e podem dar origem a 4 possíveis fenótipos. Estes 3 Fy (a+b-), Fy (a-b+), Fy (a+b+) são comuns na população branca e asiática, e Fy (a-b-) frequente na população africana.

Encontram-se descritas expressões fracas de Fyb, designadas de Fyx. É herdado do alelo Fya e Fyb, que se expressa com uma pronunciada diminuição quantitativa do número de ags Fyb que estão na superfície do eritrócito (39).

Os eritrócitos com o fenótipo Fy (a-b-), não tem glicoproteínas Duffy, sendo assim resistentes à invasão pelo *Plasmodium vivax* (40). Esta mutação existente na raça negra é então uma vantagem seletiva nas áreas onde a doença é endémica, sendo um mecanismo de resistência à malária. Caracteriza-se pela presença do alelo FY\*02N.01, provocado por uma mutação nonsense na região promotora -67 T>C na região GATA do gene FY. Os africanos com o fenótipo Fy(a-b-) carecem de glicoproteínas nos seus eritrócitos, mas não noutros tecidos, o que explica o facto de não produzirem anti-Fyb quando são transfundidos com concentrados eritrócitos Fy(a-b+) (41).

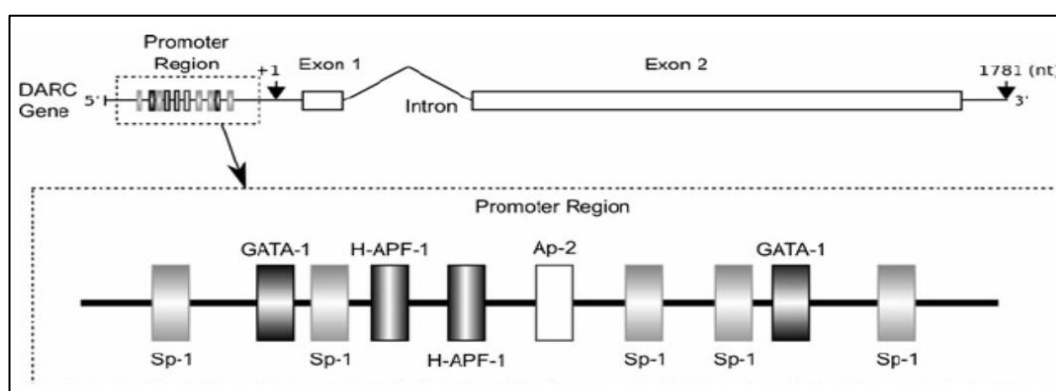


Figura 3 - Estrutura do DARC. Adaptado de Oliveira (2012). (40)

Os ag Fya e Fyb, são sensíveis à ficina, papaína e resistentes à tripsina. Estes ags, já se encontram presentes na 6ª semana de gestação (42). O ac anti-Fya, é muito mais comum que o ac anti-Fyb. São habitualmente IgG1, e podem fixar o complemento, mas geralmente não o fazem. O tipo IgM é raro. O anti-Fya e anti-Fyb, acs clinicamente significativos, podem causar reações transfusionais hemolíticas imediatas ou tardias e podem originar DHRN. Estes acs não ocorrem naturalmente, mas sim devido a aloimunização decorrente de transfusão, gravidez ou transplante. São acs que reagem melhor com células homozigóticas (41).

### 1.2.3. Sistema Kidd (ISBT 009)

Em 1951 Allen *et al.* publicaram um artigo relatando a descoberta do Anti-Jka no soro de uma doente, a Sra. Kidd, cujo bebê sofreu de doença de hemolítica do recém-nascido (43).

A glicoproteína Kidd é uma proteína de passagem múltipla que funciona como um transportador de ureia, como se observa na figura 4 (20,44). O sistema de grupo sanguíneo Kidd é constituído por dois ags, Jka e Jkb (que apenas diferem num só nucleótido, polimorfismo do gene *SLC14A1* na posição 838, resultando num aminoácido aspartato ou asparagina respetivamente) e Jk3 que é um ag de alta incidência (45,46).

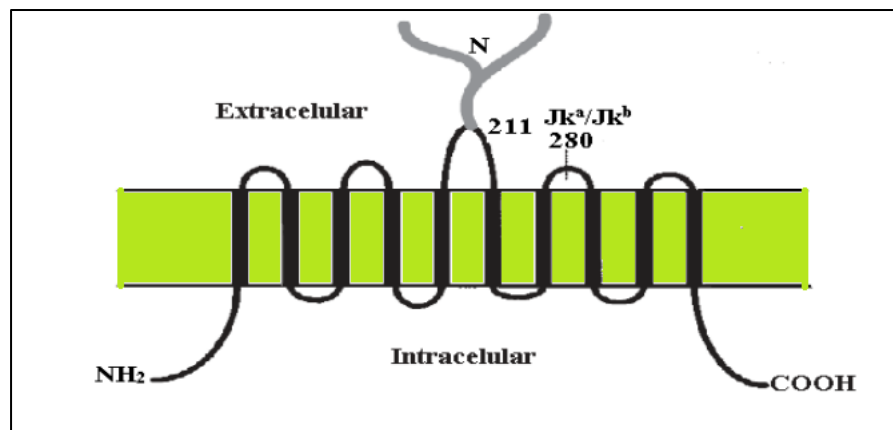


Figura 4 - Diagrama representativo da glicoproteína Kidd na membrana celular do eritrócito. Adaptado de Daniels (2013). (47)

Os ags Jka e Jkb estão presentes nas populações caucasiana e asiática, sendo mais frequente o Jka na população negra. O Jk3 é expresso em indivíduos com o fenótipo Jk(a+b-), Jk(a-b+) e Jk(a+b+) e geralmente só tem significado clínico naqueles com o fenótipo raro Kidd-nulo, Jk(a-b-). O fenótipo Jk (a-b-) deve-se a um alelo silencioso que se encontra em homozigotia. Os eritrócitos Jk (a-b-) mostram um defeito no transporte da ureia, sendo resistentes à lise induzida pela ureia (48). No cromossoma 18 (18q11-12) está localizado o gene *HUT11/UT-B/JK (SLC14A1)* que produz os três alelos (45).

O ac anti-Jka é mais frequente que o anti-Jkb e habitualmente são IgG, IgG1 e ou IgG3, e cerca de metade fixam o complemento (IgG3) podendo causar hemólise (45). São acs que por vezes só reagem com células que têm o ag em homozigotia. Como estes acs são fracos, rapidamente diminuem e por vezes desaparecem, sendo por isso os responsáveis por reações tardias. Com alguma frequência é necessário adicionar soro humano fresco como fonte de complemento, ou uso de eritrócitos tratados com enzimas e prova de antiglobulina (48). Podem ser responsáveis

por reações hemolíticas, mas raramente por DHRN, quando surge é geralmente leve, e deve-se ao Jka. Os indivíduos com fenótipo nulo Jk(a-b-) as sensibilizações desenvolvem Jk3, e podem provocar reações hemolíticas imediatas ou tardias (48).

As reações transfusionais hemolíticas tardias surgem quando os acs se desenvolvem rapidamente na resposta anamnésica com ags dos eritrócitos transfundidos, destruindo os eritrócitos (49).

### **1.3. Aloimunização eritrocitária**

A aloimunização surge quando um indivíduo é exposto a ags que não estão presentes nos seus eritrócitos, aquando da realização de um transplante, transfusão sanguínea ou gravidez, que podem ativar o seu sistema imune que vai dar origem à produção de acs anti-eritrócito (50,51).

A aloimunização mais frequente ocorre como resultado de gestação ou transfusão incompatíveis, e pode então causar reações transfusionais hemolíticas, diminuindo o tempo de vida dos eritrócitos transfundidos (52). Por vezes, associada à presença de aloanticorpos podem coexistir autoanticorpos que vão implicar uma maior complexidade na execução das provas pré-transfusionais e uma dificuldade acrescida na obtenção de unidades compatíveis (53).

Para prevenir a imunização nos doentes com patologias que preveem um programa de pluritransfusões, nomeadamente o mieloma múltiplo (MM), leucemias, linfoma, aplasia medular, síndrome mielodisplásico e anemia aplásica, bem como em mulheres em idade fértil (<50), está aconselhada a seleção de eritrócitos com o mesmo fenótipo Rh e Kell de modo a evitar a sensibilização nesses sistemas. Nas hemoglobinopatias (p.e. talassemia e anemia falciforme), associadas a um elevado risco de imunização (Figura 5), os recetores devem ser fenotipados também para os sistemas Kidd, Duffy e MNS (54,55).

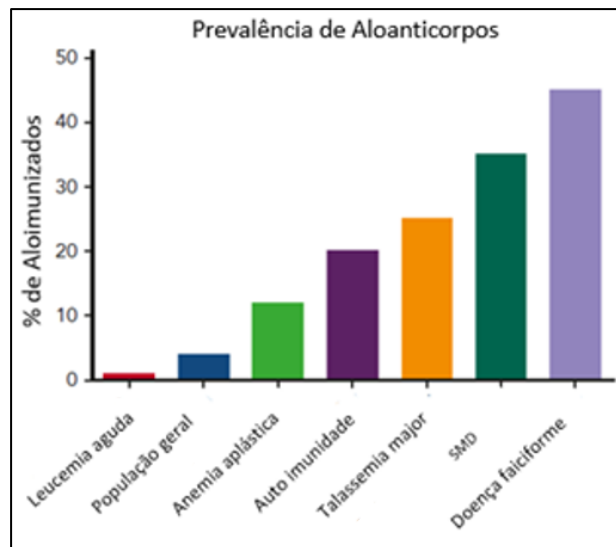


Figura 5 - Prevalência aproximada de aloacs de eritrócitos por doença. Fonte: Adaptado de Tormey *et al.* (2019). (55)

Esta abordagem é alargada, muitas vezes, à anemia hemolítica autoimune (AHA), pelas dificuldades laboratoriais impostas, uma vez que normalmente apresentam um teste de antiglobulina direto (TAD) positivo, devido à presença de autoac que se encontram ligados aos eritrócitos, e conseqüentemente uma pesquisa de acs irregulares positiva, pela presença destes autoac, que podem “esconder” potenciais aloac (quando presentes). De salientar que existe uma clara associação entre AHA e a doença neoplásica, levando a um aumento das incompatibilidades sanguíneas (53).

Por outro lado, com o avanço tecnológico e científico na saúde têm surgido novos tratamentos para determinadas patologias que utilizam acs monoclonais que estão associados a uma interferência nos testes sorológicos. Exemplo disso são os fármacos para o tratamento do MM, como o Daratumumab (DARA) ou o Isatuximab (ISA), que consistem em acs monoclonais dirigidos ao CD38 presente em eritrócitos e se traduz na pesquisa de acs irregulares (PAI) positiva e em provas incompatíveis (56,57). Muitas são as estratégias adotadas, sendo que uma delas é a realização do fenótipo alargado antes do início da terapêutica ou a genotipagem após o início do tratamento (58).

A presença de ags de alta ou baixa frequência pode também ser um problema para a obtenção de unidades compatíveis, isto porque se o ag é de alta frequência na população, vai ser muito difícil encontrar um dador para esse recetor que não o tenha (55).

Os doentes sujeitos a múltiplas transfusões, desenvolvem, com alguma frequência, acs não só contra ags dos eritrócitos comuns na população como também contra ags de alta frequência ou até mesmas variantes de determinado ag. Nestas situações é muitas vezes difícil encontrar eritrócitos compatíveis (55).

A aloimunização depende de várias condições, em primeiro lugar da imunogenicidade do ag, depois de uma serie de fatores relacionados com o doente como a doença de base, a idade, a quantidade e frequência de transfusões realizadas, fatores genéticos, as diferenças antigénicas existentes entre ele e o dador, ou seja, a discrepância fenotípica entre eles, a expressão do HLA (Ags Leucocitários Humanos), entre outros (Figura 6) (51,59,60).

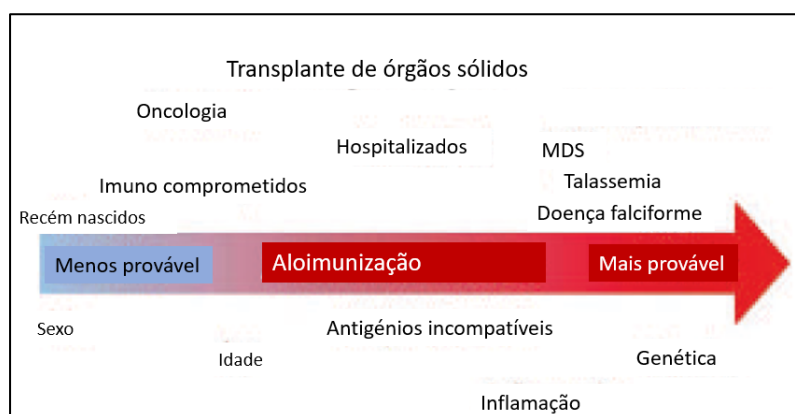


Figura 6 - Representação esquemática de fatores que se acredita influenciar a probabilidade de aloimunização. Adaptado de Gehrie *et al.* (2019). (60)

São os ags dos sistemas Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS os que geralmente são responsáveis pela aloimunização. Os acs que se produzem como resposta a esta imunização reagem a 37°C e podem causar hemólise, razão pela qual são tão importantes para a prática clínica na medicina transfusional (31).

A DHRN surge também como uma consequência da produção de acs anti-eritrócitos, quando a mãe produz acs da classe IgG, contra os eritrócitos do feto causando a sua destruição (52). Podem originar anemia fetal muito grave e por vezes abortos. Estes recém-nascidos podem apresentar icterícia e problemas neurológicos, após o nascimento (22).

A taxa de aloimunização é maior nos recetores de transfusão do que a provocada por gravidez, isto deve-se ao facto das mães estarem expostas a pequenas quantidades de células fetais e a exposição se dar apenas para o(s) ag(s) do feto que tiveram origem paterna (61,62).

Como medida para diminuir ou evitar a aloimunização, a fenotipagem alargada ou até a genotipagem tem sido aconselhada, permitindo assim conhecer os ags eritrocitários não só dos doentes como dos dadores, tentando assim obter a tão desejada transfusão compatível (42,63).

#### **1.4. Métodos para identificação dos antigénios dos grupos sanguíneos**

Temos 45 sistemas de grupos sanguíneos dos quais fazem parte mais de 351 ags, atualmente reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (*International Society of Blood Transfusion, ISBT*) (64) (Anexo I). Um sistema de grupo sanguíneo caracteriza-se pela combinação de ags presentes nos eritrócitos, que podem ser herdados por um único gene ou por um conjunto de dois ou mais genes homólogos e é definido serologicamente por um ac específico. Os sistemas ABO e Rh são os mais importantes para a realização de uma transfusão segura e eficaz, e por isso mesmo, são realizados rotineiramente. Por outro lado, a extensão a outros sistemas, tais como Duffy, Kidd e MNS é, em algumas situações, necessária.

Existem diferentes métodos para identificação dos ags dos grupos sanguíneos (65).

A fenotipagem eritrocitária, conhecida como tipagem sanguínea, é um procedimento laboratorial utilizado para determinar os diversos ags. Envolve a análise direta dos ags expressos na superfície do eritrócito utilizando antissoros específicos. Para a sua realização existem diferentes métodos (p.e. método de aglutinação em microplaca, método de microcoluna de gel) sendo os mais comuns baseados nas reações ag-ac específicas que dão origem à formação de aglutinados (66). Este método serológico baseado na hemaglutinação continua a ser o método mais utilizado, porém, quando manual, apresenta limitações como erros de interpretação e transcrição de resultados, incapacidade de responder a um grande volume de trabalho, que foram solucionados com a adaptação desta metodologia a equipamentos (67).

A automatização adaptada à técnica de aglutinação em coluna (cartões) e a utilização de antissoros monoclonais vieram revolucionar os laboratórios de imunohematologia, tornando-se num método-padrão e permitindo a melhoria da qualidade bem como a facilidade de leitura dos resultados (68).

A automatização, por seu lado, leva a que utilize pequenas quantidades de reagentes, possua alta sensibilidade, precisão e reprodutibilidade, o que reduz drasticamente os erros de identificação causados por fatores humanos (68).

No entanto, quando os métodos tradicionais de fenotipagem eritrocitária não podem ser usados (p.e. quando um paciente foi transfundido), os métodos de genotipagem baseados em DNA (ácido desoxirribonucleico) tornam-se numa ferramenta imprescindível, que tem sido usada na Medicina Transfusional (26,67).

A base molecular de muitos ags dos grupos sanguíneos é já conhecida, e mostra-nos uma enorme diversidade genética, especialmente nos sistemas ABO e Rh. Estes conhecimentos permitiram desenvolver diversos protocolos para deduzir o fenótipo alargado eritrocitário, utilizando técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) que são úteis na prática transfusional (69).

Relativamente às técnicas de genotipagem de grupos sanguíneos podemos dividi-las em técnicas de *low-throughput*, *medium-throughput* e *high-throughput*.

Um exemplo de técnicas de *low-throughput* inclui o PCR com primers de sequência específica (*PCR-sequence specific primers*, PCR-SSP) que é baseado principalmente na deteção de um polimorfismo num único nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Este PCR deteta os ags fracos e os subtipos do sistema ABO, mas não deteta mutações genéticas não contempladas na plataforma de genotipagem ou mutações desconhecidas/ainda não descritas (70).

Por outro lado, as técnicas de *medium-throughput* incluem PCR em tempo real, sequenciação de DNA pelo método de Sanger e a pirosequenciação (70,71). Embora eficazes para variantes comuns e bem caracterizadas, estes métodos serológicos e/ou moleculares tradicionais são insuficientes e não garantem a caracterização completa de todos os ags de grupos sanguíneos raros, fracamente detetáveis, recombinantes (RH, MNS) e parciais (70).

Um exemplo de técnicas de *high-throughput* é a Sequenciação de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS) que tem a capacidade de caracterizar ags de grupos sanguíneos em populações geneticamente diversas, de prever perfis completos de grupos sanguíneos sem conhecimento prévio de base molecular, identificando genótipos raros, nulos ou novos, ultrapassando as limitações anteriormente apresentadas (70).

Atualmente estão disponíveis muitas outras metodologias que permitem a identificação dos ags eritrocitários, como por exemplo tecnologia de magnetização de eritrócitos, testes de *chip* de proteína, teste de citometria de fluxo, testes baseados em papel e o uso de dispositivos biossensores de última geração que estão equipados com acs sintéticos gerados por impressão molecular, entre outros (70–72).

Embora se continuem a desenvolver novas tecnologias sejam elas baseadas em *microarrays*, em *microbalance* de cristais de quartzo ou ensaios de fluxo lateral, provavelmente não vão substituir os testes sorológicos nos próximos anos.

#### **1.4.1. Determinação de grupos sanguíneos em amostras TAD+**

O teste de antiglobulina direta veio permitir detetar acs incompletos, que não provocavam aglutinação dos eritrócitos no meio salino, como na DHRN e na anemia hemolítica autoimune (73). O Teste de Antiglobulina Direto (TAD) deteta habitualmente sensibilização *in vivo* de eritrócitos com IgG e/ou componentes do complemento, quando utilizamos soro antiglobulina poliespecífico (IgG, C3d,) mas permite também a deteção de acs de diferentes isótipos de imunoglobulinas como IgA, IgM, entre outros (74,75).

Uma TAD+ deve-se a várias condições: acs dirigidos aos próprios ags; aloacs que reagem com os eritrócitos recentemente transfundidos; acs antifosfolipídios; aloacs maternos que atravessam a placenta e se ligam às células fetais; hipergamaglobulinemia, doentes a quem foi administrado gamaglobina endovenosa em altas doses e drogas (76–78).

Na reação transfusional a TAD pode demonstrar IgG e/ou C3d, dependendo da especificidade e da natureza do ac do recetor. Na DHRN não será necessário o teste para as proteínas do complemento, pois terão sido as IgG maternas a causar a sensibilização dos eritrócitos do filho. Assim, para a interpretação de uma TAD+, que pode surgir sem manifestações clínicas de hemólise, é necessário possuir algumas informações acerca do doente tais como: se foi transfundido recentemente, quais os fármacos que está a tomar, se está a receber globulina antitímócito, se há hemólise *in vivo*, entre outros (79).

Estudos mostram que, embora baixa, há uma incidência de indivíduos com TAD+ e o facto não implica que os eritrócitos destes indivíduos tenham uma sobrevida menor. Não foram evidenciadas anemias nem causas de doença imune (22). Outros trabalhos sobre o tema apontam para o facto do sexo feminino e a gravidez possam ser um fator a ter em causa para o aparecimento de TAD+. Do mesmo modo que a toma de determinados medicamentos, como por exemplo, anticoncepcionais orais, anti-hipertensores, entre outros. Nestes casos de TAD+ não têm significado clínico.

Um resultado de TAD+ em contexto de provas pré-transfusionais acarreta dificuldades a nível laboratorial, como por exemplo na seleção dos eritrócitos para transfundir aos doentes com AHAI (80).

A AHAI é uma patologia autoimune caracterizada pela produção de acs contra os próprios eritrócitos e que pode ser classificada como quente ou fria, baseada na classe da imunoglobulina (IgG ou IgM) que origina a hemólise. Os autoacs quentes são IgG e reagem a 37°C enquanto os autoacs frios são IgM e reagem a temperaturas mais baixas (81,82).

Laboratorialmente a diferenciação entre a AHAI a quente e a frio é essencial, pois o diagnóstico, prognóstico e as estratégias terapêuticas são distintas. Enquanto quase todos os autoacs frios podem ser evitados, se os testes forem efetuados a 37°C ou se utilizarmos antiglobulina anti-IgG; o mesmo não acontece com a AHAI a quente, representa cerca de 75% dos casos de AHAI, em que 12 a 40% desenvolvem aloacs (taxa superior a outros doentes politransfundidos). Interfere com os testes de rotina efetuados e há um número significativo de casos que apresentam anemia grave e conseqüentemente vão necessitar de transfusão de eritrócitos (81,83–85).

Ao longo do tempo, muitas abordagens têm sido sugeridas para a resolução deste problema por parte do laboratório de imunohematologia. No passado, em situações de urgência, em que não era possível aguardar, era transfundida a unidade estudada com um resultado “menos incompatível” ou recorria-se à diluição do soro/plasma do doente, assumindo que o título do autoac era inferior ao título do aloac e que era possível diminuir/anular o autoac e identificar o aloac, que manteria reações mais fortes (75).

Atualmente esta designação de “unidade menos incompatível” ou testar o soro/plasma diluído do doente são procedimentos desatualizados, pese embora ser uma técnica rápida e fácil, mas ainda assim pouco confiável e arriscada (86).

Selecionar a unidade “ideal” para transfundir os doentes com AHAI e TAD+, obriga a procedimentos mais elaborados que os testes pré-transfusionais rotineiros, isto porque os testes clássicos são muitas vezes difíceis ou até mesmo impossíveis de interpretar, devido a interferência de autoacs que normalmente são panreativos e mascaram os aloacs. A dificuldade que se coloca a nível laboratorial é assim detetar os aloacs clinicamente significativos contra eritrócitos dos grupos sanguíneos, Rh, Kell, Kidd, Duffy e MNS, que podem estar presentes, devido a transplante, gravidez, transfusões anteriores, e podem provocar reações transfusionais hemolíticas, mas que se encontram mascarados pelos autoacs (83).

Para resolver de forma segura a problemática destes doentes, são necessários procedimentos mais complexos, nomeadamente as técnicas de autoadsorção ou aloadsorção (85).

Porém estas técnicas apresentam desvantagens tais como: nem sempre dispormos do volume de eritrócitos necessário (em anemias graves ou quando o doente é uma criança); e ainda, impossibilidade de ser realizada se o paciente foi transfundido há menos de 3 meses porque há mistura dos seus eritrócitos com os do dador (85). Neste caso estaríamos a adsorver os autoacs – com os eritrócitos do próprio e a adsorver os aloacs – com os eritrócitos dos dadores, não permanecendo no soro/plasma do paciente, os aloacs para que possam ser identificados. A solução passa pela aloadsorção ou adsorção alogénica, que é indiscutivelmente um teste mais complicado e trabalhoso, com resultados mais difíceis de interpretar, que pode não detetar acs contra ags de alta frequência e, tal como as autoadsorções, pode demorar várias horas (entre 4 a 6 horas) (86).

O uso de uma unidade de eritrócitos fenotipicamente compatível nos doentes com autoacs, parece ser uma boa estratégia, dado que evita possíveis aloimunizações posteriores, assim como deixa de ser necessária a realização de técnicas demoradas, como as adsorções. Esta fenotipagem alargada parece apropriada nos hospitais onde as unidades estão fenotipadas e disponíveis (22).

No entanto, também esta estratégia apresenta limitações: nas situações em que o doente apresenta um fenótipo raro, como por exemplo: E-, K-, Fy(a-b-), S-, ou Jka-Fyb-s-, obriga a rastrear muitas unidades para encontrar aquela que é apropriada; o doente não pode ter sido transfundido há menos de 3 meses; ags parciais ou variantes podem não ser detetados e a realização do fenótipo alargado nem sempre é possível, uma vez que a TAD+ dificulta ou impossibilita a sua obtenção. Nestes casos é realizada a genotipagem, que tem um custo mais elevado, necessita de pessoal técnico especializado e pode levar mais de 6 horas a realizar (69).

Uma vantagem adicional da genotipagem em doentes com autoac é que esta pode mostrar-nos os ags de um doente, mesmo os de alta prevalência, que poderiam passar despercebidos quando realizamos a adsorção alogénica (81). A genotipagem é também vantajosa quando a expressão do ags nos eritrócitos está “deprimida” (enfraquecida), como pode acontecer nos doentes com AHAI (81).

De forma a diminuir os riscos da realização de uma transfusão sanguínea têm sido estabelecidos procedimentos a nível clínico e laboratorial para assegurar que as boas práticas são cumpridas e

se utilizam testes sensíveis e específicos, e as novas metodologias, para isso muito têm contribuído (67).

#### **1.4.2. Genotipagem / Fenotipagem**

A fenotipagem eritrocitária e a genotipagem são, como vimos, duas abordagens diferentes para a determinação dos ags eritrocitários. A fenotipagem envolve a análise direta dos ags expressos na superfície do eritrócito, (na maioria das vezes, deteta o produto do gene) utilizando antissoros específicos, esta metodologia apesar de simples e rápida apresenta boa sensibilidade e especificidade, baixo custo, e viabilidade de execução, mas tem várias limitações, como p.e: ainda não existem no mercado antissoros para determinados grupos sanguíneos e alguns apresentam custos elevados (87). A falta de antissoros que não necessitem de prova de antiglobulina para evidenciar a positividade, a determinação de ags de fraca expressão, a existência de transfusões recentes, as interferências medicamentosas (Dara) ou a presença de uma TAD+, são também outras desvantagens deste método (88,89).

Como a reação ag-ac pode ser influenciada por vários fatores nomeadamente a localização do ag na membrana do eritrócito e a densidade antigénica, é necessário recorrer a outras técnicas e reagentes de modo a permitir identificar os ags ou acs. São exemplo, os potenciadores como polietilenoglicol (PEG), os meios de baixa força iónica, o tratamento dos eritrócitos com enzimas ou até utilizar reagentes que vão desnaturar as proteínas ou reduzir as ligações de dissulfito para os conseguir identificar (90).

A genotipagem é uma técnica mais recente, utiliza-se em situações em que a sorologia é difícil ou impossível de ser realizada, embora seja mais cara e demorada (o que pode limitar o seu uso em determinadas situações) e não está ainda disponível em todos os laboratórios de medicina transfusional. A genotipagem pode detetar até aqueles que são raros e difíceis de encontrar por meio de testes serológicos, sendo considerada esta técnica mais precisa e fiável (91).

Os testes moleculares em imunohematologia vão detetar SNPs, que são os responsáveis pelas alterações de aminoácidos da proteína e consequentemente alterar o fenótipo. No entanto, em algumas situações, os ags não são produtos diretos dos genes, como é o caso do sistema ABO em que os genes codificam enzimas, que depois têm um papel importante na formação dos ags. De qualquer forma, a partir do genótipo é possível inferir o fenótipo. Porém, na presença de genes homólogos, como é o caso dos sistemas MNS, GYPA e GYPB, a genotipagem é mais complicada

de realizar devido à troca de sequências de DNA entre os genes, que podem dar origem a novos ags e até variantes (29).

A genotipagem supera algumas das limitações da fenotipagem sendo assim uma mais-valia para os laboratórios de Imunohematologia aquando da obtenção de eritrócitos para transfusão. Ela é utilizada para determinar os ags de doentes que receberam transfusão de CE nos últimos 3 meses, que apresentam os seus eritrócitos revestidos com imunoglobulina ou frações do complemento, que têm anemia hemolítica autoimune, que estão a realizar terapias com acs monoclonais e que interferem com os testes pré-transfusionais. Serve também para inferir fenótipos de eritrócitos quando os antissoros comerciais não estão disponíveis, resolver discrepâncias nas determinações de grupo sanguíneo, por exemplo nas mulheres grávidas identificar fenótipo D fraco e D parcial, determinar quem deve realizar a imunoglobulina RhIg, e nas mulheres em idade fértil permite evitar, no caso de precisarem de transfusão, a utilização de eritrócitos D negativo, componente que é sempre escasso (89).

As técnicas moleculares trouxeram outros benefícios como por exemplo a descoberta de novos sistemas de grupos sanguíneos e a capacidade de realizar a chamada transfusão personalizada (92).

Apesar da genotipagem ser muito importante nas situações acima referidas apresenta também algumas limitações como por exemplo quando as mutações encontradas não se encontram descritas na literatura ou não estão presentes nas plataformas de genotipagem utilizada. Quando isto acontece torna-se necessário sequenciar o gene completo (92).

Embora não resolva todos os problemas a nível laboratorial tem sido inestimável o seu contributo e veio melhorar a precisão e a segurança na determinação dos ags sanguíneos, não só na população que necessita de transfusão, mas também na população dadora (93).

A determinação do ou dos ags pelos métodos moleculares pode assim facilitar a avaliação complexa de ac e orientar a seleção mais apropriada dos eritrócitos a transfundir a doentes com determinadas patologias como a talassemia, a doença falciforme e a anemia hemolítica autoimune (50,93).

### **1.4.3. Discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo**

A genotipagem por vezes não se correlaciona com o fenótipo encontrado pelos métodos sorológicos uma vez que a genotipagem apenas prevê o fenótipo. Os genes podem ter uma expressão enfraquecida ou até estarem silenciados o que pode implicar uma interpretação dos resultados diferente. Esta também nos tem mostrado novos polimorfismos que vão dar origem a resultados discrepantes quando utilizamos diferentes metodologias. Sendo assim necessário recorrer a uma combinação de várias técnicas moleculares para conseguirmos deduzir o fenótipo correto (93).

Estas técnicas podem detetar alelos e variantes alélicas de grupo sanguíneo, sequenciar uma parte do gene ou até a totalidade do gene, de modo a ser possível investigar mutações que permitam compreender a ausência ou uma expressão mais fraca do ag na membrana do eritrócito. Estas mutações são muitas vezes responsáveis pelas divergências entre o resultado obtido por fenotipagem e genotipagem, isto porque vão dar origem a alterações no gene que vão afetar a sua transcrição e tradução (93).

Apesar de os testes moleculares serem em muitos aspetos mais credíveis que os testes de fenotipagem tradicionais e resolverem muitos problemas, também apresentam limitações como vimos anteriormente.

A interpretação correta de um teste molecular é indispensável para que possamos garantir um genótipo verdadeiramente negativo ou positivo. De realçar que, quando a discrepância entre os resultados da fenotipagem e genotipagem se constata estas vão ser investigadas o que vai permitir verificar se não terá sido devido a falha humana ou de equipamento (93).

Como já foi referido nos métodos sorológicos os resultados falsos negativos são devidos habitualmente à não deteção dos ags variantes ou de baixa expressão, o que é sem dúvida um problema grave em amostras de dadores, já que estas dádivas ao serem transfundidas podem induzir a sensibilização nos doentes negativos para estes ags (93).

Nestes testes os resultados falsos positivos acontecem essencialmente em amostras de indivíduos transfundidos recentemente ou com TAD+ ou com pan-aglutinação(93).

Resumidamente, as principais causas de discrepâncias entre os dois métodos devem-se a transfusões recentes, TAD+, variantes Rh, mutações nos locais de transcrição dos genes (91).

Na literatura surgem vários trabalhos que abordam estas discrepâncias entre fenotipagem e genotipagem quando se investigam ags pertencentes a vários sistemas de grupos sanguíneos (91,94,95).

#### **1.4.4. A técnica de PCR-SSP**

A aplicação desta técnica tem simplificado a determinação molecular de grupos sanguíneos, desde que se desenvolveram protocolos que permitem amplificar vários sistemas nas mesmas condições de amplificação. A PCR-SSP está implementada em muitos laboratórios e é técnica de referência para a genotipagem de grupos sanguíneos (70).

É uma técnica de biologia molecular usada para identificar e amplificar sequencias específicas de DNA associadas a genes de interesse (70,96).

O termo SSP, descreve uma variante da PCR em que apenas a sequencia primer na extremidade 3' é responsável pela especificação do alelo a ser identificado. Para uma análise PCR-SSP completa, várias amplificações são realizadas em paralelo. As amostras de PCR nas quais o primer se liga ao seu alvo específico, têm um amplificado específico após a PCR, enquanto as amostras sem essa ligação específica de primer não (96). A avaliação do resultado é realizada por eletroforese em gel de agarose.

A técnica de PCR-SSP é um método que permite a amplificação de DNA de cadeia dupla, mesmo quando a informação da sequência está disponível apenas numa extremidade (Figura 7). É baseada no facto de que primers de oligonucleotídeos emparelhados (correspondência exata) são utilizados de uma forma mais eficaz para amplificar uma determinada sequência alvo, do que oligonucleotídeos que não estão totalmente emparelhados, com a ajuda da Taq-polimerase. Os pares de primers são criados para apresentarem uma complementaridade perfeita com a sequência de um alelo ou de um grupo de alelos (91).

Obedecendo a condições de PCR controladas, os pares de primers, perfeitamente emparelhados, amplificam a sequência alvo (dando origem a um resultado positivo) enquanto que pares de primers que não apresentam este emparelhamento perfeito, não amplificam a sequência alvo (resultado negativo) (96,97).

Os resultados obtidos do PCR-SSP baseiam-se na presença/ausência de um fragmento específico de DNA amplificado. Em cada reação de PCR um par de primer é incluído que serve de

controle interno. Este par de primer amplifica uma região conservada do gene *HGH* o qual está presente em todas as amostras de DNA e é assim utilizado para verificar a qualidade da reação de PCR (97).

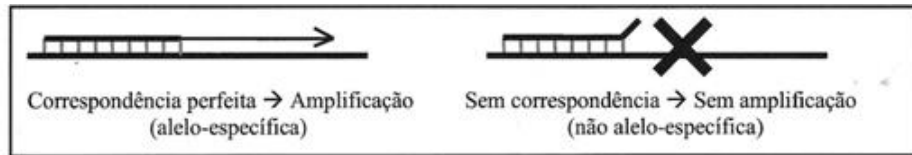


Figura 7 - Princípio da reação de PCR-SSP. Fonte: Adaptado de BAGdiagnostics. (97)

#### 1.4.4.1. Kits SSP BAGene

Estes kits são dispositivos de diagnóstico utilizados para a genotipagem dos grupos sanguíneos Kidd, MNS e Duffy por genética molecular e podem ser usados sem testes sorológicos adicionais. A genotipagem com estes kits é realizada utilizando como material o DNA purificado dos leucócitos. O procedimento do teste é realizado utilizando o PCR-SSP (70,96).

É importante seguir rigorosamente as instruções do fabricante (97).

#### 1.4.5. O cartão de fluxo lateral MDmulticard® - Técnica de Fluxo Lateral

De forma a ultrapassar limitações existentes nas metodologias utilizadas em medicina transfusional, têm surgido novas metodologias no mercado, como é o caso da técnica de fluxo lateral. Esta é uma técnica imunocromatográfica em que uma amostra líquida se move por ação capilar, através de um suporte sólido que pode ser de nitrocelulose, papel de filtro ou agarose, nas quais estão presentes moléculas que vão interagir com a amostra. Esta técnica consiste em colocar a amostra numa zona absorvente, que está impregnada com substâncias, que vão permitir que a reação ocorra. Quando a amostra se conjuga com as moléculas presentes no suporte (acs específicos) dá-se uma reação colorimétrica (os acs estão conjugados com partículas coloridas ou fluorescentes, habitualmente ouro coloidal e microesferas de latex) (98).

Estes cartões ou placas, para teste de fluxo lateral, não são mais do que membranas sobrepostas que estão colocadas num cartão de apoio, para permitir a sua utilização e estabilidade. A amostra que contém o ag liga-se ao ac que está presente na membrana porosa de nitrocelulose e migra,

ao longo da tira, para a zona de deteção. A linha de controlo indica que o fluxo de líquido foi adequado. A linha de teste informa se ocorreu a reação ag-ac (98).

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos de fluxo lateral durante os últimos anos têm sofrido uma grande evolução, para isso muito tem contribuído a tecnologia, as suas aplicações e também a indústria. Tem alcançado um sucesso comercial considerável e é utilizado cada vez mais (98).

Estes testes têm sido adotados por variadíssimas áreas desde a medicina, a segurança alimentar, área forense, entre outras (98).

#### **1.4.5.1. MDmulticard®**

O cartão de fluxo lateral *MDmulticard® basic extended phenotype* para a deteção simultânea dos ags Duffy, Kidd, MNS (ags clinicamente significativos) surgiu há alguns anos no mercado e apresenta-se como um ensaio de fácil execução, rápido, preciso e de baixo custo quando comparado com os testes moleculares. Baseia-se na técnica de fluxo lateral com ponto final estável e sem centrifugação, podendo ser menos propenso a interferência por uma TAD+, o que a comprovar-se, seria uma mais valia para as situações mencionadas anteriormente (98).

Permite realizar a determinação simultânea dos seis ags proteicos  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ ,  $Jk^a$ ,  $Jk^b$ , S e s, que estão presentes na superfície dos eritrócitos, e que são os clinicamente relevantes em cada um destes sistemas de grupo sanguíneo. Este cartão deteta também as expressões fracas de  $Fy^b$  (designado  $Fy^x$ ) (99).

O cartão *MDmulticard®* é composto por uma membrana de nitrocelulose presa a uma caixa de plástico cujo tamanho se assemelha a um cartão de multibanco. Na membrana existe uma zona de aplicação central ladeada por duas áreas de deteção. A zona de deteção, contém linhas paralelas de reagente com ac. Do lado direito S e s, e do lado esquerdo  $Fy^a$ ,  $Fy^b$ ,  $Jk^a$  e  $Jk^b$  (Figura 8). Na parte inferior um ponto de controlo de processo, designado *Val*, e um ponto de controlo automático designado *Ctl* (Anexo II).

Cada cartão contém vários reagentes. Os reagentes de acs que consistem em acs monoclonais (de origem murino/humano) que estão especialmente impregnados na membrana do dispositivo de fluxo lateral. Para a realização deste procedimento é necessária a utilização do diluente F como solução tampão que possui duas funções: diluição da amostra e solução de lavagem (Anexo II).

A técnica é de execução simples e direta que requer muito pouca manipulação, e não requer instrumentos especializados, podendo ser realizado em qualquer local. O tempo total do procedimento é de 9 minutos.

A interpretação dos resultados é feita do seguinte modo: reação positiva banda vermelha com maior ou menor intensidade; a ausência de banda é considerada um resultado negativo (Anexo II).

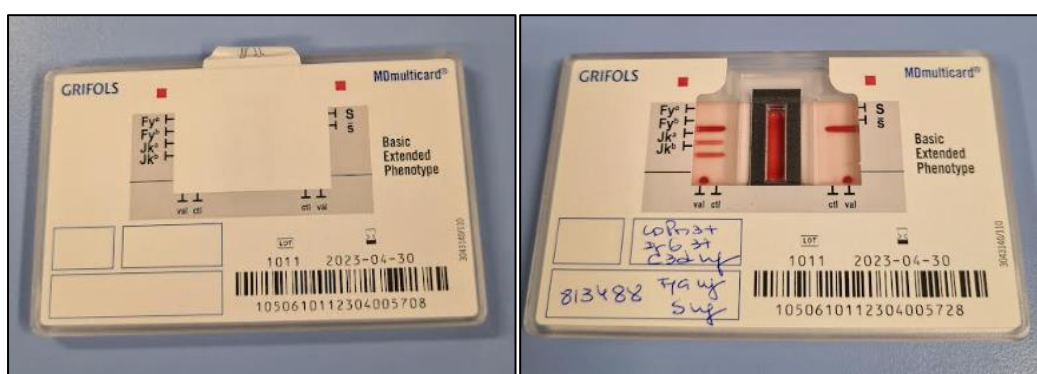


Figura 8 – Cartão MDmulticard® basic extended phenotype. Do autor.

Comparado com métodos tradicionais, parece ser uma alternativa não só simples como rápida na obtenção de resultados, no entanto a sua fiabilidade é muitas vezes questionada devido à falta de estudos sobre o seu comportamento quando utilizado em indivíduos com TAD+.

#### 1.4.5.2. Aplicabilidade

Os serviços de Imunohemoterapia têm recomendado a utilização da fenotipagem alargada de modo a evitar a aloimunização contra ags eritrocitários. Sendo um teste que permite efetuar a determinação de 6 ags clinicamente significativos de execução fácil, com ponto final estável e sem centrifugação, já é utilizado na rotina, nas situações em que é necessário transfundir com rapidez, evitando assim a aloimunização de doentes críticos, nos sistemas MNS, Duffy e Kidd (100).

Esta correspondência profilática de ag reduz o risco de reações transfusionais, evita a aloimunização adicional e melhora o tempo de resposta. Também evita o uso das adsorções, técnicas trabalhosas para remover os autoac ou os acs de drogas, para assim podermos detetar os possíveis aloacs que podem estar presentes. Permite que o atendimento ao doente seja melhor e mais seguro (75).

Nas situações mais complexas a nível laboratorial este cartão pode ser um excelente complemento, isto porque permite a confirmação de fenótipos fracos, determinar grupos sanguíneos em recém-nascidos com volume de amostra muito baixa (volume mínimo de 25 µl) e caso seja menos propenso à interferência por uma TAD+, será uma mais-valia sempre que se queira transfundir este tipo de doentes que devido às suas patologias se apresentam com TAD+ como p.e. anemias hemolíticas autoimunes (100).

Seria então um cartão que serviria como alternativa às técnicas moleculares, uma vez que a fenotipagem dos grupos sanguíneos através da utilização de ensaios de hemaglutinação realizada antes da transfusão de eritrócito, é inadequada (100).

Em determinadas situações, tem sido a determinação molecular a permitir a dedução do fenótipo alargado a partir do genótipo. No entanto, os métodos que atualmente estão disponíveis no laboratório, exigem um tempo de execução longo e pessoal qualificado para os realizar, não podendo ser executados em qualquer local e limitando a sua utilização em situações de urgência (69,101).

O cartão *MDmulticard*<sup>®</sup> oferece potencial para a sua utilização nestas situações (TAD+) e seria utilizado como método alternativo.

## **2. Objetivo**

Neste estudo pretendemos comparar os resultados da fenotipagem dos ags Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s, obtidos com o MDmulticard®, da Grifols em doentes com TAD+, com os resultados da genotipagem utilizando os Kits de PCR-SSP da BAGene.

## **3. Metodologia**

Realizou-se um estudo observacional analítico transversal, realizado através da consulta de registos do serviço de Imunohemoterapia do CHUSJ (Centro Hospitalar e Universitário São João) no período compreendido entre dezembro de 2019 e junho de 2023.

A população em estudo foi constituída pelos doentes que apresentavam um resultado positivo para a TAD e que necessitaram de transfusão no CHUSJ.

A amostra foi constituída por doentes com TAD positiva do CHUSJ que necessitaram de transfusão no CHUSJ no período compreendido entre dezembro de 2019 e junho de 2023 e que não tinham realizado transfusão nos últimos 3 meses.

Os dados foram obtidos a partir da aplicação Sistema Integrado de Bancos de Sangue (SIBAS), que contém toda a informação relativa ao serviço de medicina transfusional do CHUSJ. Foi recolhida a idade e sexo dos doentes bem como a intensidade de reação da TAD e os resultados da fenotipagem e genotipagem para os ags Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s, que são as nossas variáveis em estudo. Os dados obtidos foram sistematizados numa base utilizando o Microsoft Excel 365™.

Para a realização da fenotipagem foram utilizadas amostras de sangue periférico colhidas por punção venosa em tubos com anticoagulante K2EDTA.

Para a obtenção dos resultados da fenotipagem foi utilizado o cartão *MDmulticard*® Basic Extended Phenotype (Grifols) de acordo com as especificações do fabricante (Anexo II).

Neste estudo, os cartões *MDmulticard*® utilizados tinham na sua membrana os seguintes acs monoclonais: anti-Fya clone P3TIM, anti-Fyb clone SpA264LBg1, anti-Jka clone P3HT7, anti-Jkb clone P3.143, anti-S clone MS.94, anti-s clone P3BER todos de origem rato/humano.

Os registos obtidos da genotipagem, foram consultados na base de dados SIBAS. Os resultados provêm da utilização dos Kits KKD-TYPE e MNS-TYPE BAGene (BAG DIAGNOSTICS).

O DNA genómico foi extraído de leucócitos do sangue periférico usando um kit de extração de DNA da Qiagen (QIAasymphony® DNA Mini Kit).

Todos os resultados foram obtidos após a execução das técnicas laboratoriais, segundo as instruções do fabricante, assim como de acordo com os procedimentos existentes nos laboratórios de imunohematologia e de biologia molecular do serviço de Imunohemoterapia deste hospital (97).

Foi realizada uma análise descritiva dos dados utilizando o software Microsoft Excel 365™. Para comparar os resultados obtidos na fenotipagem e na genotipagem foi aplicado o teste estatístico Coeficiente de Concordância Kappa utilizando IBM SPSS Statistics versão 29.0.1.0 (171). As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

Foi ainda calculada a sensibilidade e especificidade com base nas seguintes fórmulas de cálculo:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{\text{Verdadeiros positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiros negativos}}{\text{Verdadeiros negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

O protocolo deste estudo foi autorizado pelo Conselho de Administração do Centro Hospitalar e Universitário S. João, após ter sido aprovado pela Comissão de Ética e pela Comissão de Proteção de Dados desta Instituição (Anexo III).

#### 4. Resultados

No período entre dezembro de 2019 e junho de 2023, estudaram-se 33 doentes que apresentavam TAD+ e para os quais tinha sido solicitado o envio de transfusão de eritrócitos e obedeciam à condição de inclusão definida previamente, ou seja, não tinham realizado transfusão nos últimos 3 meses.

Foi excluída uma amostra que não tinha resultado para a genotipagem, uma vez que apresentava uma contagem de leucócitos muito baixa, e consequentemente a quantidade de DNA não era suficiente para permitir a realização deste teste.

Assim, a amostra em estudo foi composta por 32 doentes, 15 do sexo feminino (46,9%) e 17 do sexo masculino (53,1%) (Figura 9), com idades compreendidas entre os 32 anos e os 93 anos (média de idades  $64,41 \pm 15,46$  anos) cujas patologias associadas são do foro hematológico. Como podemos observar nas figuras 10 e 12, respetivamente. Verifica-se que é do serviço de Hematologia Hospital Dia que provêm mais amostras, seguido pelos serviços de Medicina Mulheres e de Urgência. Destes 32 doentes, 11 (34,4%) apresentavam TAD 4+, 12 (37,5%) TAD 3+, 4 (12,5%) TAD 2+ e 5 (15,6%) TAD 1+ como se verifica na Figura 11.

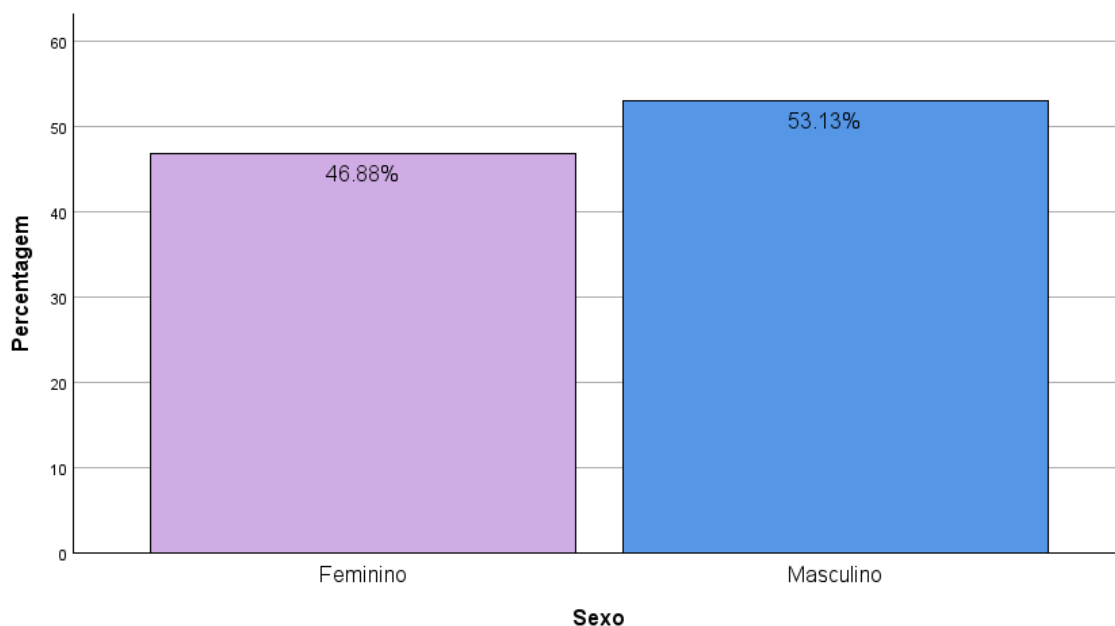


Figura 9 - Gráfico de barras com a percentagem de amostra agrupadas por sexo.

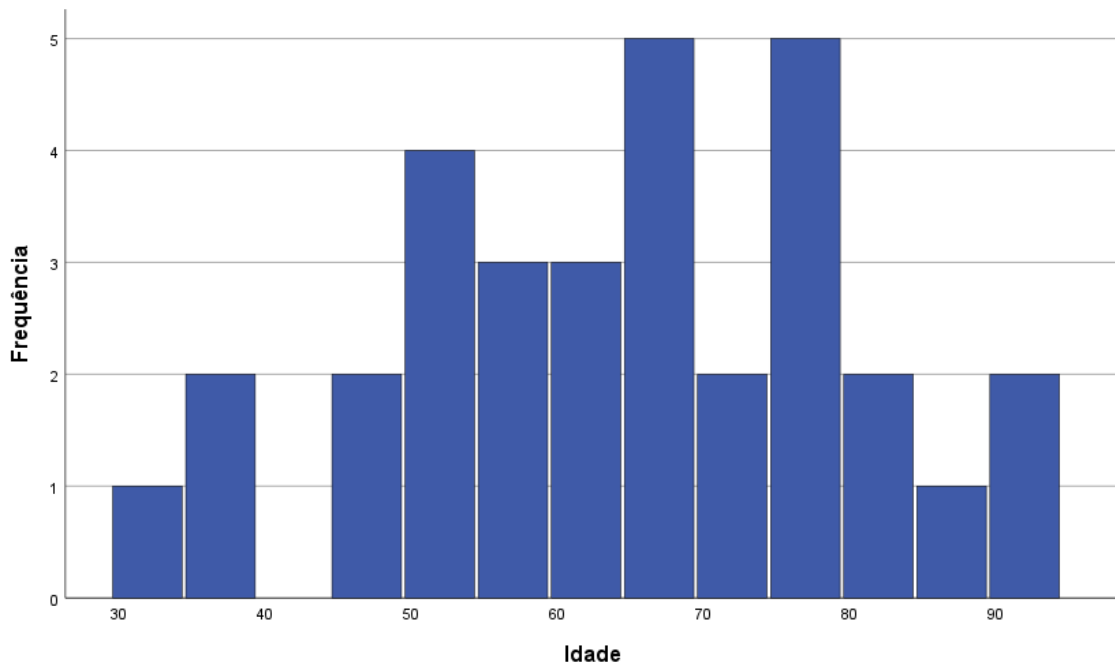


Figura 10 – Gráfico de barras para a frequência de idades.

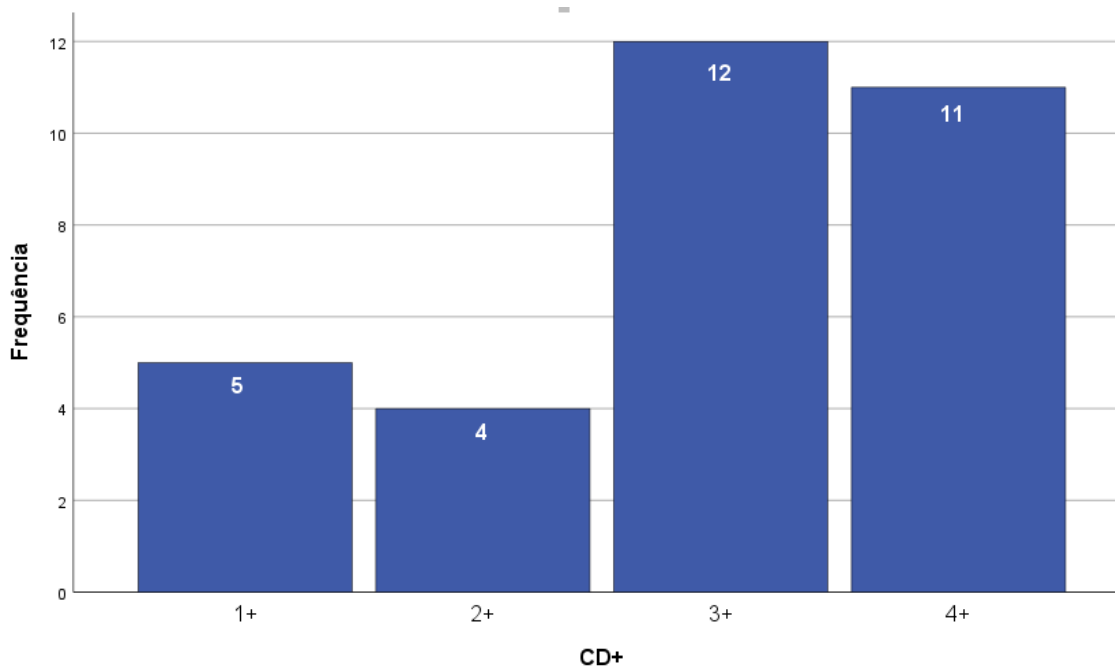


Figura 11 – Gráfico de barras para a frequência de TAD+.

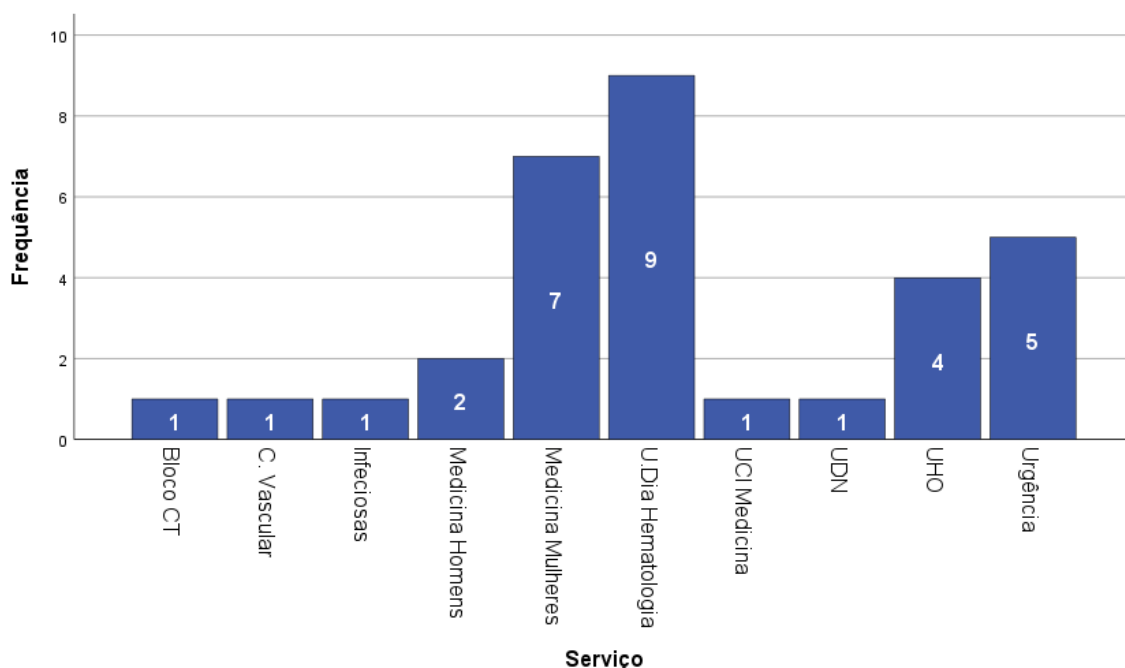


Figura 12 - Gráfico de barras para a frequência de serviço.

Nas tabelas 1, 2 e 3 encontram-se descritos os resultados obtidos pela fenotipagem realizada pelo cartão *MDmulticard® basic extended phenotype* pelo método de fluxo lateral e a genotipagem pela técnica PCR-SSP utilizando os Kits KKD-TYPE e MNS-TYPE BAGene, para os sistemas Kidd, Duffy e MNS.

Sete amostras apresentaram o fenótipo Jk(a+b-), 14 o fenótipo Jk(a+b+) e 11 o fenótipo Jk(a-b+). Para o sistema Duffy encontramos os seguintes resultados: 8 amostras Fy(a+b-), 10 Fy(a-b+) e 14 Fy(a+b+), no qual está presente o resultado discrepante. No sistema MNS, foram encontradas 7, 16 e 9 amostras com os fenótipos S+s-, S+s+ e S-s+, respetivamente. Não se encontraram amostras com o fenótipo Jk(a-b-), Fy(a-b-) e S- s-.

Ao comparar os resultados de genotipagem e fenotipagem, foi observada total concordância para todos os ags dos sistemas sanguíneos Kidd e MNS. A discrepância encontrada refere-se ao sistema Duffy, nomeadamente o ag Fya. Uma amostra foi fenotipada pelo cartão como Fya+, tendo a genotipagem dado o resultado FY\*B/FY\*B, ou seja, o fenótipo inferido foi Fya-, como podemos ver na Tabela 2.

Tabela 1 - Resultados obtidos da genotipagem e fenotipagem para o sistema de grupo sanguíneo Kidd, em 32 amostras de doentes com TAD+.

Genótipo	Fenótipos							
	JK(a+b-)	%	JK (a+b+)	%	JK(a-b+)	%	JK(a-b-)	%
<b>Alelos do Sistema Kidd</b>								
JK*A/JK*A	7	21,88	0		0		0	
JK*A/JK*B	0		14	43,75	0		0	
JK*B/JK*B	0		0		11	34,37	0	
JK*/JK*	0		0		0		0	

Tabela 2 - Resultados obtidos da genotipagem e fenotipagem para o sistema de grupo sanguíneo Duffy, em 32 amostras de doentes com TAD+.

Genótipo	Fenótipos							
	Fy(a+b-)	%	Fy(a+b+)	%	Fy(a-b+)	%	Fy (a-b-)	%
<b>Alelos do Sistema Duffy</b>								
FY*A/FY*A	8	25	0		0		0	
FY*A/FY*B	0		11	34,37	0		0	
FY*B/FY*B	0		1 <sup>#</sup>	3,12	6	18,75	0	
FY*02N.01	0		0		0		0	
FY*02W.01	0		0		0		0	
FY*A/FY*02W.01	0		2	6,24	0		0	
FY*B/FY*02W.01	0		0		4	12,48	0	

<sup>#</sup> - Resultado discrepante

Tabela 3 - Resultados obtidos da genotipagem e fenotipagem para o sistema de grupo sanguíneo MNS, em 32 amostras de doentes com TAD+.

Genótipo	Fenótipos							
	S+s-	%	S+s+	%	S-s+	%	S-s-	%
<b>Alelos do Sistema MNS</b>								
GYPB*S	7	21,88	0		0		0	
GYPB*s	0		0		9	28,12	0	
GYPB*S; GYPB*s	0		16	50	0		0	

A discrepância entre genotipagem e fenotipagem verificou-se numa amostra que apresentava uma TAD 4+.

Todos os resultados para o Kappa de Cohen revelam uma concordância praticamente perfeita, uma vez que todos se encontram dentro do intervalo de valores entre 0,81 e 1,00, obtendo-se assim resultados estatisticamente significativos (102). Destaca-se que apenas o gene *Fya* demonstrou um valor inferior ao máximo (1,0) situando-se nos 0,934. Os resultados desta análise, descrito nas tabulações cruzadas (Anexo IV) revelam especificidade e sensibilidade de 100%, excetuando o gene *Fya*. Os resultados de *Fya* revelaram uma especificidade de 92,3% e uma sensibilidade de 95,0% (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores de medida de concordância (Kappa de Cohen), especificidade e sensibilidade por gene.

<b>Gene</b>	<b>Kappa</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Sensibilidade</b>
<i>Fya</i>	0,934	92,3 %	95,0 %
<i>Fyb</i>	1,000	100 %	100 %
<i>Jka</i>	1,000	100 %	100 %
<i>Jkb</i>	1,000	100 %	100 %
<i>S</i>	1,000	100 %	100 %
<i>s</i>	1,000	100 %	100 %

## 5. Discussão

A transfusão de eritrócitos é uma terapêutica essencial para vários tratamentos médicos e cirúrgicos, cujo efeito terapêutico procurado é sem dúvida o fornecimento de oxigênio, principalmente aos tecidos cardíacos e neurológicos que necessitam de elevada oxigenação. Contudo pode levar a eventos adversos e reações transfusionais por promover a exposição do recetor a ags estranhos levando à formação de acs, a aloimunização (103).

A importância da correspondência fenotípica alargada para os ags dos sistemas de grupo sanguíneo clinicamente significativos, tem sido sugerida como medida preventiva para todos os doentes com necessidade de serem transfundidos cronicamente, diminuindo assim o risco de aloimunização, como a doença falciforme, a talassemia; ou ainda quando temos dificuldade em estudar o doente, como na AHAI (104,105).

Amostras TAD positivas são conhecidas como complexas para os sistemas de tipagem sanguínea. As amostras destes doentes geralmente causam reações falso positivas, especialmente quando a tipagem é realizada pelo teste de coombs indireto (42).

Neste estudo comparamos a fenotipagem eritrocitária Jka, Jkb, Fya, Fyb, S e s, pela metodologia de fluxo lateral e o perfil genotípico dos alelos JK\*A, JK\*B, FY\*A, FY\*B, GYPB\*S e GYPB\*s, pela genotipagem por PCR-SSP para obtenção do fenótipo em 32 amostras de doentes com TAD+.

Com base nos resultados obtidos, e comparando com estudos similares, verificamos que os dados demográficos da nossa amostra não estão totalmente de acordo com o referido na literatura para pacientes com patologia do foro hematológico, porque embora seja concordante no predomínio do sexo masculino (53,1% masculino vs 46,9% feminino), a idade média destes doentes na nossa amostra é de 64 anos, enquanto a mencionada na literatura ronda os 73 anos (106). No entanto, é de realçar que a amostra estudada se foca apenas nos pacientes com este tipo de patologias, que apresentam TAD+, tenham transfusões anteriores, mas sem transfusão nos últimos 3 meses.

Relativamente às frequências fenotípicas obtidas para os sistemas Duffy, Kidd e MNS (S e s) de uma forma geral vão de encontro ao descrito na literatura. Verificou-se uma frequência superior dos fenótipos Fy(a+b+) e Jkb (a+b+), sendo estes os resultados esperados na população estudada, população caucasiana (42).

No caso dos ags S e s observamos na nossa amostra uma frequência superior do fenótipo S+s+ relativamente ao S-s+, assim como o fenótipo Jk (a-b+) com uma frequência superior ao Jk (a+b-), contrariamente ao que se encontra relatado (42). Estas diferenças são pouco acentuadas, o que sugere ser o reflexo do pequeno número de amostras analisadas. Constatou-se também a inexistência dos fenótipos Fy (a-b-), Jk(a-b-) e S-s-, pois estes fenótipos nulos são característicos da raça negra (42).

Apesar do número relativamente pequeno de amostras utilizadas, foi ainda assim possível constatar que este cartão permite a deteção fiável dos ags dos vários sistemas abordados, até os que apresentam expressão fraca, tal como o ag Fyx. Facto demonstrado com os nossos resultados, em que dos 6 doentes FY\*02W.01 (mutação no gene FY que causa uma expressão fraca do Fyb), todos foram detetados como Fyb+ no cartão *MDmulticard*<sup>®</sup>. Caesar *et al.* já fazia referência à maior sensibilidade do *MDmulticard*<sup>®</sup>, quando comparado com as diferentes técnicas serológicas e atribui estas diferenças não só à formulação dos reagentes bem como às condições e propriedades deste teste à base de nitrocelulose (107).

Em particular nestes doentes com TAD+ a necessitar de transfusão compatível de eritrócitos, a possibilidade de seleccionar unidades Fyb+, pode assim aumentar-lhes a disponibilidade de unidades de eritrócitos.

Em doentes com AHAI, ou outras patologias em que as suas amostras apresentam uma TAD+, a fenotipagem eritrocitária, pelo método sorológico, falha ao determinar o real perfil de ags do grupo sanguíneo do doente, especialmente se utilizamos a prova de Coombs indireta, dando origem a resultados falso positivo (42). Neste estudo foi possível, mesmo neste tipo de amostras obter uma concordância entre a fenotipagem realizada para estes seis ags, e a genotipagem de 96,88%, tendo-se obtido um coeficiente Kappa de Cohen de 1 para todos os ags testados à exceção do Fya, para o qual se obteve 0,934. A concordância obtida foi similar aos dados de estudos realizados anteriormente, como o de Young-Lan Song *et al.* (11 amostras com TAD+) (Anexo V), e o de Beate Mayer (28 amostras com TAD+) (108).

A avaliação de desempenho mostrou também uma sensibilidade e especificidade de 100%, exceto para o sistema Duffy.

Estes resultados mais baixos de coeficiente K de Cohen, de sensibilidade e especificidade devem-se ao facto de uma das amostras apresentar um resultado discrepante para o ag Fya (fenotipicamente apresenta-se como Fya+ e genotipicamente como Fya-). Ainda que não

tenhamos esclarecido esta discrepância, no pior cenário a determinação incorreta do fenótipo deste doente implicaria a seleção de uma unidade positiva para este ag, podendo por isso ser transfundida uma unidade incompatível, o que poderia causar aloimunização ou até reação transfusional, mais ou menos grave dependendo do historial desse doente (66).

Esta discrepância de resultados observada pode dever-se a vários fatores. Um dos fatores poderá ser a interferência da TAD 4+ na determinação do ag Fya no cartão *Mdmulticard*<sup>®</sup>. De acordo com a casa comercial, quando os eritrócitos do paciente estão revestidos com ac IgG, podem ocorrer reações fracas com o anti-Fya do *MDmulticard*<sup>®</sup> (único ac monoclonal da classe IgG neste cartão) (Anexo II). No entanto outras amostras tinham de igual modo os seus eritrócitos revestidos com um número elevado de acs (2 amostras com TAD 4+ e 5 amostras com TAD 3+), e foi possível a obtenção do fenótipo correto.

Uma outra explicação para a discrepância observada poderá ser a presença de mutações que alteram os locais de ligação dos primers, o que impossibilita a amplificação do gene e leva a um resultado falso negativo. Não podemos também excluir a possibilidade de ter havido falta de informação acerca do histórico transfusional, que surge com alguma frequência, nos doentes que realizam transfusões noutras instituições públicas ou privadas. Assim se este doente tiver sido transfundido à menos de 3 meses com unidade(s) Fya+, iríamos detetar erradamente os eritrócitos transfundidos.

Atualmente o conhecimento sobre a genética dos grupos sanguíneos tem vindo a aumentar, o que tem permitido que técnicas de biologia molecular, como a sequenciação, esclareçam discrepâncias e os casos em que as técnicas sorológicas são incapazes de fornecer os resultados corretos (72). Deste modo, a resolução da discrepância encontrada, deveria ter sido realizada em laboratórios de referência, de forma a garantir a correta informação acerca do ag Fya deste doente.

Estes resultados vão ao encontro dos apresentados noutro estudo publicado por Beate Mayer e colaboradores, aquando da utilização do *MDmulticard*<sup>®</sup> em 28 indivíduos com TAD+, no qual também foram encontradas discrepâncias para este mesmo ag (três falsos positivos (Fya) (100).

Este tema, discrepâncias entre fenotipagem serológica e o perfil antigénico inferido pela genotipagem, é um assunto abordado em vários artigos (104,109). A genotipagem tem sido utilizada pela medicina transfusional sempre que as técnicas sorológicas não podem ser utilizadas, nomeadamente quando se pretende a correta tipagem sanguínea de doentes que

realizaram múltiplas transfusões, quando os antissoros não estão disponíveis no mercado e também para testar unidades de sangue de dadores com ag negativo (87,89).

O sucesso do cartão *MDmulticard*<sup>®</sup> está relacionado, não só, com a quantidade de amostra utilizada (necessitando de pequenas quantidades de amostra 25 µl), mas também com a facilidade de execução e rapidez (apenas 9 minutos) na obtenção de resultados, não necessitando de equipamentos especializados, nem de alta tecnologia, o que muitas vezes inviabiliza a utilização de determinadas técnicas (Anexo II). Esta técnica de fluxo lateral, pode ter propriedades técnicas que contribuem para um melhor desempenho na determinação de múltiplos ags aplicando a amostra uma só vez e evitando assim a necessidade de diferentes fases, tempos de incubação e centrifugação, exigindo pouca intervenção do utilizador (100).

É de destacar algumas propriedades que talvez possam influenciar de forma positiva o desempenho deste cartão, nomeadamente o facto de nesta técnica os eritrócitos que não reagem serem removidos do sistema de deteção e saírem da matriz para o lado oposto à área de aplicação. Desta forma, um número maior de células pode ser carregado no referido sistema permitindo visualizar os ags, mesmo quando apresentam fraca expressão. Noutras metodologias os pequenos aglutinados e aqueles que não aglutinam compartilham o mesmo espaço, dificultando o reconhecimento de reações de aglutinação.

Outra vantagem é o facto de não ser necessária a centrifugação, isto porque evita forças de cisalhamento elevadas presentes nas técnicas dependentes de centrifugação. Se a força de ligação for menor que a força de cisalhamento exercida pelas forças centrífugas a ligação será interrompida surgindo aglutinados menores e que podem ser difíceis de visualizar. Assim aglutinados formados por eritrócitos com ags expressos de forma fraca e/ou acs com baixa afinidade e /ou avidéz para ags específicos, podem neste método ser detetados (110).

O facto de que os acs utilizados nesta técnica serem concentrados, secos e imobilizados numa pequena área, em posições distintas da matriz da técnica de fluxo lateral à base de nitrocelulose, permite uma maior aderência dos eritrócitos. Melhora a taxa de contacto, aumentando assim o número de eritrócitos que interagem com o respetivo ac e consequentemente aumentando a sensibilidade diagnóstica (111). A secagem e imobilização de acs pode levar a modificações nas suas características físico-químicas, estabilidade e atividade em relação aos acs que se apresentam na forma líquida (111).

Por último, o uso de clones bem selecionados associados à técnica de fluxo lateral à base de nitrocelulose pode fornecer um método rápido para a realização da fenotipagem eritrocitária para vários sistemas sanguíneos (100).

Apesar do número reduzido de amostras utilizado, os resultados são muito promissores. Sugere-se a realização de trabalhos com um maior número de amostras com esta especificidade (TAD+) assim como o esclarecer de todas as discrepâncias, o que permitiria comprovar de forma inequívoca o seu desempenho e possíveis limitações, indicando se pode ser usado com segurança e confiabilidade, como sugere este estudo.

Uma das limitações, porventura uma das mais relevantes e ainda por elucidar, prende-se com o facto de não sabermos ainda até que ponto o grau da TAD poderá influenciar estes resultados.

Este cartão tem vindo a ser utilizado na nossa instituição, no entanto após este estudo, sugere-se a sua disponibilização de uma forma generalizada com vista a um atendimento mais rápido e seguro ao doente, mas também como método complementar as técnicas sorológicas. Também se sugere a sua utilização para outras patologias que necessitam de transfusões crónicas.

## 6. Conclusão

Dada a grande concordância nos resultados obtidos pelos dois métodos conclui-se que a técnica de fluxo lateral *MDmulticard® Basic Extended Phenotype* é eficaz e confiável na fenotipagem dos ags clinicamente significativos: Duffy (Fya, Fyb), Kidd (Jka, Jkb) e Ss (S,s).

A fenotipagem associada a este cartão apresenta assim várias vantagens e pode ser considerada uma ferramenta alternativa, nomeadamente para superar as limitações das técnicas sorológicas baseadas na hemaglutinação (como p.e. a impossibilidade de fenotipar alguns ags em doentes com TAD+ e permitir detetar fenótipos fracos - ag Fyx), permitindo assim simplificar e tornar mais célere a rotina nos laboratórios de imunohematologia e ainda reduzir os riscos de possíveis aloimunizações.

Ainda assim a técnica de fluxo lateral nunca poderá substituir completamente a genotipagem, uma vez que esta última é a única capaz de inferir o fenótipo em doentes transfundidos há menos de 3 meses. No entanto, o acesso a estas duas metodologias permitiria adequar/ajustar a metodologia usada, tendo por base as vantagens/limitações e custos de cada uma, aos históricos/características dos doentes e ao tempo de resposta pretendido.

Em estudos posteriores era fundamental ter uma amostragem maior e sequenciar os resultados discrepantes, no sentido de confirmar/comprovar os resultados obtidos e de esclarecer assim as discrepâncias encontradas.

As experiências e métodos usados no passado podem-nos parecer rudimentares, mas sem eles jamais poderíamos atingir os padrões de segurança de que hoje dispomos. Só ao fim destes 400 anos, e depois de muita pesquisa, trabalho e perseverança, foi possível evoluir e caminhar em busca da simplicidade e segurança, tal como a temos hoje.

Num futuro próximo, prevê-se uma medicina transfusional cada vez mais personalizada, socorrendo-se de técnicas de elevada sensibilidade e especificidade, que facilitam e permitem a correspondência perfeita entre doadores e recetores.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Ferreira da Cunha Monteiro Á, Luísa Borregana Lopes dos Santos D, José Mendonça Figueiredo M, Maria Helena Dias Alves D. Rede de Referência Hospitalar Imunohemoterapia Grupo de Trabalho.
2. Goodnough LT, Panigrahi AK. Blood Transfusion Therapy. Vol. 101, Medical Clinics of North America. W.B. Saunders; 2017. p. 431–47.
3. Muller JY. Nobel prize and the history of blood transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2019 Sep 1;26(3):135–43.
4. Learoyd P. The history of blood transfusion prior to the 20th century–part 2. Vol. 22, *Transfusion Medicine*. 2012. p. 372–6.
5. Garraud O, Lefrère JJ. Blood and blood-associated symbols beyond medicine and transfusion: Far more complex than first appears. Vol. 12, *Blood Transfusion*. 2014. p. 14–21.
6. Boulton F, Roberts DJ. Blood transfusion at the time of the First World War – Practice and promise at the birth of transfusion medicine. Vol. 24, *Transfusion Medicine*. 2014. p. 325–34.
7. Learoyd P. The history of blood transfusion prior to the 20th century – Part 1. Vol. 22, *Transfusion Medicine*. 2012. p. 308–14.
8. Stauder R, Valent P, Theurl I. Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management. *Blood*. 2018 Feb 1;131(5):505–14.
9. Shah N, Andrews J, Goodnough LT. Transfusions for anemia in adult and pediatric patients with malignancies. *Blood Rev*. 2015 Sep 1;29(5):291–9.
10. Gonzalez CA. Blood Transfusion in Patients with Immunohaematological Problem. *Int J Cancer Res Ther*. 2018;
11. Goodnough LT, Levy JH, Murphy MF. Concepts of blood transfusion in adults. Vol. 381, *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2013. p. 1845–54.
12. Madjdpour C, Spahn DR. Allogeneic red blood cell transfusions: Efficacy, risks, alternatives and indications. Vol. 95, *British Journal of Anaesthesia*. Oxford University Press; 2005. p. 33–42.

13. Vasudev R, Sawhney V, Dogra M, Raina TR. Transfusion-related adverse reactions: From institutional hemovigilance effort to National Hemovigilance program. *Asian J Transfus Sci.* 2016 Jan 1;10(1):31–6.
14. Laermans J, Van Remoortel H, Avau B, Bekkering G, Georgsen J, Manzini PM, et al. Adverse events of iron and/or erythropoiesis-stimulating agent therapy in preoperatively anemic elective surgery patients: a systematic review. *Syst Rev.* 2022 Dec 1;11(1).
15. Goel R, Tobian AAR, Shaz BH. Noninfectious transfusion-associated adverse events and their mitigation strategies. *Blood.* 2019 Apr 25;133(17):1831–9.
16. Hoffbrand AV, Moss P. Hoffbrand's Essential Haematology. 7th ed. Blackwell W, editor. 2016.
17. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. 2008; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/112/10/3939/1482604/zh802208003939.pdf>
18. Machnicka B, Czogalla A, Hryniewicz-Jankowska A, Bogusławska DM, Grochowalska R, Heger E, et al. Spectrins: A structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters. Vol. 1838, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2014. p. 620–34.
19. Sachwell TJ, Hawley BR, Bell AJ, Leticia Ribeiro M, Toyne AM. The cytoskeletal binding domain of band 3 is required for multiprotein complex formation and retention during erythropoiesis. *Haematologica.* 2015;100(1):133–42.
20. Reid ME, Mohandas N. Red Blood Cell Blood Group Antigens: Structure and Function. *Semin Hematol.* 2004;41(2):93–117.
21. Pinto WDJ, De Marialva JE, Guida Cardoso SM, Arcanjo Areas M. Topologia das principais proteínas da membrana e do citoesqueleto eritrocitário. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.* 2013 Aug 21;12(1):106.
22. Buelvas A, Díaz E, González G. *Inmunohematología básica y aplicada.* 1st ed. GCIAMT, editor. 2015.
23. Thornton NM, Grimsley SP. Clinical significance of antibodies to antigens in the ABO and Xg blood group systems. 2016.
24. Hosoi E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest.* 2008 Aug;55(3–4):174–82.

25. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, Chen Q, Daniels G, Denomme G, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sang.* 2019 Jan 1;114(1):95–102.
26. Storry JR, Olsson ML. Genetic basis of blood group diversity. Vol. 126, *British Journal of Haematology.* 2004. p. 759–71.
27. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood.* 2000 Jan 15;95(2):375–87.
28. Gholamrezazade A, Amirizadeh N, Oodi A. Genotyping analysis of the MNS blood group system of thalassemia patients with alloantibodies in Iran. *Transfusion and Apheresis Science.* 2021 Feb 1;60(1).
29. Lopez GH, Wilson B, Turner RM, Millard GM, Fraser NS, Roots NM, et al. Frequency of Mi a (MNS7) and Classification of Mia-Positive Hybrid Glycophorins in an Australian Blood Donor Population. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2020 Jul 1;47(4):279–87.
30. Lane WJ, Gleadall NS, Aeschlimann J, Vege S, Sanchis-Juan A, Stephens J, et al. Multiple GYPB gene deletions associated with the U- phenotype in those of African ancestry. *Transfusion (Paris).* 2020 Jun 1;60(6):1294–307.
31. Reid M, Francis C. *The Blood Group Antigen FactsBook.* ELSEVIER SCIENCE. 2012.
32. Kaur P, Basu S, Kaur G, Kaur R, Das B. Anti N Antibody in a Patient of Renal Failure on Hemodialysis. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion.* 2014 Jan 1;30:174–6.
33. Li S, Wei L, Fang Q, Ji Y, Lin L, Gao Y. Successful prenatal management of two fetuses affected by antibodies against GP.Mur with prenatal genotyping analysis and a literature review. Vol. 19, *Blood Transfusion.* Edizioni SIMTI; 2021. p. 135–43.
34. Höher G, Fiegenbaum M, Almeida S. Molecular basis of the Duffy blood group system. Vol. 16, *Blood Transfusion.* Edizioni SIMTI; 2018. p. 93–100.
35. Hariri D, Bordas J, Elkins M, Gallay B, Spektor Z, Hod-Dvorai R. The Role of the Duffy Blood Group Antigens in Renal Transplantation and Rejection. A Mini Review. *Transpl Int.* 2023 Oct 13;36:11725.
36. Gai PP, Van Loon W, Siegert K, Wedam J, Kulkarni SS, Rasalkar R, et al. Duffy antigen receptor for chemokines gene polymorphisms and malaria in Mangaluru, India. *Malar J.* 2019 Sep 24;18(1).

37. Kano FS, de Souza AM, de Menezes Torres L, Costa MA, Souza-Silva FA, Sanchez BAM, et al. Susceptibility to Plasmodium vivax malaria associated with DARC (Duffy antigen) polymorphisms is influenced by the time of exposure to malaria. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
38. Jens E, Pagliarini T, Novaretti MCZ. Sistema de grupo sanguíneo Duffy: Biologia e prática transfusional Duffy blood group system: Biology and transfusion practice. Vol. 27, *Rev. bras. hematol. hemoter*. 2005.
39. Veldhuisen B, Van Der Schoot CE, De Haas M. Blood group genotyping: From patient to high-throughput donor screening. Vol. 97, *Vox Sanguinis*. 2009. p. 198–206.
40. Kikuchi Oliveira TY, Harris EE, Meyer D, Jue CK, Silva WA. Molecular evolution of a malaria resistance gene (DARC) in primates. *Immunogenetics*. 2012 Jul;64(7):497–505.
41. Maheshwari A, Killeen RB. Duffy Blood Group System. 2023.
42. Harmening D. *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*. 5th ed. 2006.
43. Lundevall J. THE KIDD BLOOD GROUP SYSTEM. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*. 1956;38(1):39–42.
44. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. Vol. 93, *Vox Sanguinis*. 2007. p. 331–40.
45. Lawicki S, Covin RB, Powers AA. The Kidd (JK) Blood Group System. *Transfus Med Rev*. 2017 Jul;31(3):165–72.
46. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. Kidd Blood Group System. In: *The Blood Group Antigen FactsBook*. Elsevier; 2012. p. 373–81.
47. Daniels G. *Human Blood Groups*. 3rd ed. Blackwell W, editor. 2013.
48. Irshaid NM, Eicher NI, Hustinx H, Poole J, Olsson ML. Novel alleles at the JK blood group locus explain the absence of the erythrocyte urea transporter in European families. *Br J Haematol*. 2002;116(2):445–53.
49. Goel R, Tobian AAR, Shaz BH. Noninfectious transfusion-associated adverse events and their mitigation strategies. *Blood*. 2019 Apr 25;133(17):1831–9.
50. Pessoni LL, Ferreira MA, Silva JCR da, Alcântara KC de. Red blood cell alloimmunization among hospitalized patients: transfusion reactions and low alloantibody identification rate. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2018 Oct 1;40(4):326–31.
51. Poole J, Daniels G. Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfus Med Rev*. 2007 Jan;21(1):58–71.

52. Gupta GK, Balbuena-Merle R, Hendrickson JE, Tormey CA. Immunohematologic aspects of alloimmunization and alloantibody detection: A focus on pregnancy and hemolytic disease of the fetus and newborn. Vol. 59, *Transfusion and Apheresis Science*. Elsevier Ltd; 2020.
53. Delaney M, Apelseth TO, Bonet Bub C, Cohn CS, Dunbar NM, Mauro Kutner J, et al. Red-blood-cell alloimmunization and prophylactic antigen matching for transfusion in patients with warm autoantibodies. *Vox Sang*. 2020 Aug 1;115(6):515–24.
54. da Costa DC, Pellegrino J, Guelsin GAS, Ribeiro KAR, Gilli SCO, Castilho L. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(1):35–8.
55. Tormey CA, Hendrickson JE. Transfusion-related red blood cell alloantibodies: induction and consequences. *Blood*. 2019 Apr 25;133(17):1821–30.
56. Lancman G, Arinsburg S, Jhang J, Jay Cho H, Jagannath S, Madduri D, et al. Blood transfusion management for patients treated with anti-CD38 monoclonal antibodies. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
57. Afifi S, Michael A, Lesokhin A. Immunotherapy: A New Approach to Treating Multiple Myeloma with Daratumumab and Elotuzumab. Vol. 50, *Annals of Pharmacotherapy*. SAGE Publications Inc.; 2016. p. 555–68.
58. Izaguirre EC, del Mar Luis-Hidalgo M, González LL, Castaño CA. New method for overcoming the interference produced by anti-CD38 monoclonal antibodies in compatibility testing. *Blood Transfusion*. 2020 Jul 1;18(4):290–4.
59. Karafin MS, Westlake M, Hauser RG, Tormey CA, Norris PJ, Roubinian NH, et al. Risk factors for red blood cell alloimmunization in the Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study (REDS-III) database. *Br J Haematol*. 2018 Jun 1;181(5):672–81.
60. Gehrie EA, Tormey CA. The influence of clinical and biological factors on transfusion-associated non-ABO antigen alloimmunization: Responders, hyper-responders, and non-responders. Vol. 41, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. S. Karger AG; 2014. p. 420–9.
61. Hendrickson JE, Delaney M. Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn: Modern Practice and Future Investigations. *Transfus Med Rev*. 2016 Oct;30(4):159–64.
62. British Committee for Standards in Haematology, Milkins C, Berryman J, Cantwell C, Elliott C, Haggas R, et al. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood

- transfusion laboratories. British Committee for Standards in Haematology. *Transfus Med.* 2013 Feb;23(1):3–35.
63. Arthur CM, Stowell SR. The Development and Consequences of Red Blood Cell Alloimmunization. *Annu Rev Pathol.* 2023 Jan 24;18:537–64.
  64. ISBT. Table of blood group systems. 2023.
  65. Mujahid A, Dickert FL. Blood Group Typing: From Classical Strategies to the Application of Synthetic Antibodies Generated by Molecular Imprinting. *Sensors (Basel).* 2015 Dec 31;16(1).
  66. Hendrickson JE, Tormey CA. Red Blood Cell Antibodies in Hematology/Oncology Patients: Interpretation of Immunohematologic Tests and Clinical Significance of Detected Antibodies. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2016 Jun;30(3):635–51.
  67. Li HY, Guo K. Blood Group Testing. Vol. 9, *Frontiers in Medicine.* Frontiers Media S.A.; 2022.
  68. Malomgré W, Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing. *Anal Bioanal Chem.* 2009 Mar;393(5):1443–51.
  69. Westhoff CM. Blood group genotyping. *Blood.* 2019 Apr 25;133(17):1814–20.
  70. Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, Amorim A, Bastos P, Rocha C, et al. Technologies involved in molecular blood group genotyping. *ISBT Sci Ser.* 2011 Jul;6(1):1–6.
  71. Anstee DJ. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood.* 2009 Jul 9;114(2):248–56.
  72. Kim TY, Yu HB, Phan MTT, Jang JH, Cho D. Application of Blood Group Genotyping by Next-Generation Sequencing in Various Immunohaematology Cases. *Transfusion Medicine and Hemotherapy.* 2022 Apr 11;49(2):88–97.
  73. Parker V, Tormey CA. The direct antiglobulin test: Indications, interpretation, and pitfalls. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Feb 1;141(2):305–10.
  74. Berentsen S, Hill A, Hill QA, Tvedt THA, Michel M. Novel insights into the treatment of complement-mediated hemolytic anemias. *Ther Adv Hematol.* 2019 Jan;10:204062071987332.
  75. Garratty G, Petz LD. Approaches to selecting blood for transfusion to patients with autoimmune hemolytic anemia. Vol. 42, *Transfusion.* 2002. p. 1390–2.
  76. Liunbruno GM, Tognaccini A, Bonini R, Curciarello G, Masini I, Ringressi A, et al. The role of the direct antiglobulin test in pre-transfusion investigations and the approach to selecting

- blood for transfusion in autoimmune haemolytic anaemia: Results of a regional survey. *Blood Transfusion*. 2008;6(3):156–62.
77. Kerkar AS, Bhagwat SN, Sharma JH. A Study of Clinical and Serological Correlation of Positive Direct Antiglobulin Test in Blood Bank at a Tertiary Care Center. *J Lab Physicians*. 2022 Sep;14(03):223–30.
  78. Behzadifard M, Arianezhad A, Bandehzadeh A, Gholampour M. Severe hemolysis with negative direct antiglobulin test: A case report. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022 Sep 1;81.
  79. Hill A, Hill QA. Autoimmune hemolytic anemia. *Hematology*. 2018 Nov 30;2018(1):382–9.
  80. Melve GK, Hervig T, Øvrebø R, Nesthus I. [Blood transfusion and pretransfusion testing in patients with warm autoimmune haemolytic anaemia]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2004 Nov 18;124(22):2918–20.
  81. Raos M, Lukic M, Pulanic D, Vodanovic M, Cepulic BG. The role of serological and molecular testing in the diagnostics and transfusion treatment of autoimmune haemolytic anaemia. Vol. 20, *Blood Transfusion*. Edizioni SIMTI; 2022. p. 319–28.
  82. Smith LA. Autoimmune hemolytic anemias: characteristics and classification. *Clin Lab Sci*. 1999;12(2):110–4.
  83. Buetens OW, Ness PM. Red blood cell transfusion in autoimmune hemolytic anemia. 2003.
  84. Chaudhary RK, Das SS. Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside. Vol. 8, *Asian Journal of Transfusion Science*. 2014. p. 5–12.
  85. Laine EP, Leger RM, Arndt PA, Calhoun L, Garratty G, Petz LD. In vitro studies of the impact of transfusion on the detection of alloantibodies after autoadsorption. *Transfusion (Paris)*. 2000 Nov;40(11):1384–7.
  86. Petz LD. “Least incompatible” units for transfusion in autoimmune hemolytic anemia: should we eliminate this meaningless term? A commentary for clinicians and transfusion medicine professionals. *Transfusion (Paris)*. 2003 Nov;43(11):1503–7.
  87. Nathalang O, Asisathaporn K, Intharanut K, Chaibangyang W, Leetrakool N, Mitundee S, et al. Genotyping Approach to Predict Coa and Cob Antigens in Thai Blood Donor Populations. *J Blood Med*. 2023;14:133–40.
  88. Afifi S, Michael A, Lesokhin A. Immunotherapy: A New Approach to Treating Multiple Myeloma with Daratumumab and Elotuzumab. Vol. 50, *Annals of Pharmacotherapy*. SAGE Publications Inc.; 2016. p. 555–68.

89. Fasano RM, Chou ST. Red Blood Cell Antigen Genotyping for Sickle Cell Disease, Thalassemia, and Other Transfusion Complications. Vol. 30, *Transfusion Medicine Reviews*. W.B. Saunders; 2016. p. 197–201.
90. Das SS, Chaudhary R. Utility of adsorption techniques in serological evaluation of warm autoimmune haemolytic anaemia. *Blood Transfusion*. 2009;7(4):300–4.
91. Sarihi R, Oodi A, Dadkhah Tehrani R, Jalali SF, Mardani F, Azarkeivan A, et al. Blood group genotyping in alloimmunized multi-transfused thalassemia patients from Iran. *Mol Genet Genomic Med*. 2021 Jul 1;9(7).
92. Elkins MB, Davenport RD, Bluth MH. *Molecular Pathology in Transfusion Medicine: New Concepts and Applications*. Clin Lab Med. 2018 Jun;38(2):277–92.
93. Menegati SFP, Santos TD, Macedo MD, Castilho L. Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. *Transfus Apher Sci*. 2020 Feb;59(1):102585.
94. Kulkarni S, Choudhary B, Gogri H, Patil S, Manglani M, Sharma R, et al. Molecular genotyping of clinically important blood group antigens in patients with thalassaemia. *Indian Journal of Medical Research*. 2018 Dec 1;148(6):713–20.
95. Osman NH, Sathar J, Leong CF, Zulkifli NF, Raja Sabudin RZA, Othman A, et al. Importance of extended blood group genotyping in multiply transfused patients. *Transfus Apher Sci*. 2017 Jun;56(3):410–6.
96. Buckingham L, Flaws M. *Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods and Clinical Applications*. 1st ed. Davis FA, editor. 2007.
97. BAG Diagnostics. <https://www.bag-diagnostics.com/en/downloads.html?textsuche=dl-filter=&produktzuordnung%5B%5D=130&dateifunktionen%5B%5D=4>.
98. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):111–20.
99. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of duffy antigens. *Transfusion (Paris)*. 2000 Mar;40(3):310–20.
100. Mayer B, Müller J, Candela-García MJ, Manteau AC, Weinstock C, Pruß A. Evaluation of the New Lateral Flow Card MDmulticard® Basic Extended Phenotype in Routine Clinical Practice. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2018 Oct 1;45(5):341–6.

101. Belsito A, Magnussen K, Napoli C. Emerging strategies of blood group genotyping for patients with hemoglobinopathies. Vol. 56, *Transfusion and Apheresis Science*. Elsevier Ltd; 2017. p. 206–13.
102. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data [Internet]. Vol. 33. 1977. Available from: <https://about.jstor.org/terms>
103. Van Buren NL, Gorlin JB, Corby SM, Cassidy S, FritchLilla S, Nelson SC, et al. How do I incorporate red cell genotyping to improve chronic transfusion therapy? *Transfusion (Paris)*. 2020 Jan;60(1):16–25.
104. Guelsin GAS, Sell AM, Castilho L, Masaki VL, Melo FC, Hashimoto MN, et al. Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(5):311–6.
105. Hindawi S, Badawi M, Elfayoumi R, Elgemmezi T, Al Hassani A, Raml M, et al. The value of transfusion of phenotyped blood units for thalassemia and sickle cell anemia patients at an academic center. *Transfusion (Paris)*. 2020 Feb;60 Suppl 1:S15–21.
106. Singhal D, Kutyna MM, Chhetri R, Wee LYA, Hague S, Nath L, et al. Red cell alloimmunization is associated with development of autoantibodies and increased red cell transfusion requirements in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2017 Dec;102(12):2021–9.
107. Caesar A, Meyer S, Trost N, Neuenschwander K, Geisen C, Frey BM, et al. A uniform method for the simultaneous blood group phenotyping of Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s<sup>-</sup>, P1, k applying lateral-flow technique. *Vox Sang*. 2018 Feb;113(2):177–84.
108. Mayer B, Müller J, Candela-García MJ, Manteau AC, Weinstock C, Pruß A. Evaluation of the New Lateral Flow Card MDmulticard® Basic Extended Phenotype in Routine Clinical Practice. *Transfus Med Hemother*. 2018 Oct;45(5):341–6.
109. NasrEldin E, Khaled SAA, Abdelhameed NO, Atwa M, Thabet MM, Elsayh KI, et al. Genotyping versus phenotyping of non-ABO erythrocyte antigens in patients with the Mediterranean hemopathic syndromes: Effect of transfusion therapy. *PLoS One*. 2021;16(7):e0251576.
110. Phillips P, Voak D, Knowles S, Campbell G, Crane B, Downie DM, et al. An explanation and the clinical significance of the failure of microcolumn tests to detect weak ABO and other antibodies. *Transfus Med*. 1997 Mar;7(1):47–53.
111. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus*. 2007 Nov;5(4):227–40.

## ANEXOS

### Anexo I: Tabela dos sistemas de grupos sanguíneos

Table of blood group systems v11.2 31-JUL-2023

No.	Systemname	System symbol	Genename(s)*)*	LRG	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	792	4	9q34.2	
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, (GYPE)</i>	793; 794	50	4q31.21	CD235a CD235b
003	P1PK	P1PK	<i>A4GALT</i>	795	3	22q13.2	CD77
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	796; 797	56	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	<i>BCAM</i>	798	28	19q13.2	CD239
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	799	38	7q33	CD238
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	800	6	19p13.3	
008	Duffy	FY	<i>ACKR1</i>	801	5	1q21-q22	CD234
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	802	3	18q11-q12	
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	803	23	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	804	6	7q22	
012	Xg	XG	<i>XG, CD99</i>	805; 1023	2	Xp22.32	CD99†
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	806	9	1p34.2	
014	Dombrock	DO	<i>ART4</i>	807	10	12p13-p12	CD297
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	808	4	7p14	
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	809	4	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	137; 138	9	6p21.3	

Page 1 of 3

Table of blood group systems v11.2 31-JUL-2023

No.	Systemname	System symbol	Genename(s)*)*	LRG	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
018	H	H	<i>FUT1; FUT2</i>	810; 811	1	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	<i>XK</i>	812	1	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	813	13	2q14-q21	CD236
021	Cromer	CROM	<i>CD55</i>	127	20	1q32	CD55
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	814	13	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	815	6	11p13	CD44
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	816	3	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	817	1	11p15.5	CD151
026	JohnMiltonHagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	818	8	15q22.3-q23	CD108
027	I	I	<i>GCNT2</i>	819	1	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALNT1</i>	820	3	3q25	
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	821	1	9p13	
030	Rh-associated glycoprotein	RHAG	<i>RHAG</i>	822	6	6p12.3	CD241
031	FORS	FORS	<i>GBGT1</i>	826	1	9q34.13-q34.3	
032	JR	JR	<i>ABCG2</i>	823	1	4q22.1	CD338
033	LAN	LAN	<i>ABCB6</i>	824	1	2q36	
034	Vel	VEL	<i>SMIM1</i>	827	1	1p36.32	
035	CD59	CD59	<i>CD59</i>	41	1	11p13	CD59
036	Augustine	AUG	<i>SLC29A1</i>	1027	4	6p21.1	

Page 2 of 3

Table of blood group systems v11.2 31-JUL-2023

No.	Systemname	System symbol	Genename(s) *	LRG	Number of antigens	Chromosomal location	CD numbers
037	Kanno	KANNO	<i>PRNP</i>		1	20p13	
038	SID	SID	<i>B4GALNT2</i>		1	17q21.32	
039	CTL2	CTL2	<i>SLC44A2</i>		2	19p13.2	
040	PEL	PEL	<i>ABCC4</i>	1183	1	13q32.1	
041	MAM	MAM	<i>EMP3</i>		1	19q13.33	
042	EMM	EMM	<i>PIGG</i>		1	4p16.3	
043	ABCC1	ABCC1	<i>ABCC1</i>		1	16p13.11	
044	Er	ER	<i>PIEZO1</i>	1137	5	16q24.3	
045	CD36	CD36	<i>CD36</i>		1	7q21.11	CD36

\*As defined by the HUGO Gene Nomenclature Committee <http://www.genenames.org/> †MIC2 product. ( ) nogene product on normal RBCs

Blue = provisionally assigned

3043141/12  
(05/2020)

# MDmulticard® Basic Extended Phenotype Português

Cartão de reagentes formulado utilizando anticorpos monoclonais para a detecção dos seguintes antígenos: Fy<sup>a</sup> (FY1), Fy<sup>b</sup> (FY2), Jk<sup>a</sup> (JK1), Jk<sup>b</sup> (JK2), S (MNS3), s (MNS4)

Para a tipagem sanguínea com múltiplos parâmetros em doadores e doentes

### UTILIZAÇÃO PREVISTA E PRINCÍPIO

O MDmulticard® permite a tipagem simultânea dos grupos sanguíneos anteriormente mencionados utilizando o princípio do fluxo lateral<sup>1</sup>.

Os antígenos proteicos Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S e s estão presentes na superfície dos eritrócitos.

Os anticorpos contra estes antígenos são capazes de causar reações à transfusão ou a doença hemolítica do feto e do recém-nascido<sup>2,3</sup>.

Uma faixa vermelha (resultado positivo) formada pelo acúmulo de eritrócitos na respectiva zona impregnada com Anti-Fy<sup>a</sup>, Anti-Fy<sup>b</sup>, Anti-Jk<sup>a</sup>, Anti-Jk<sup>b</sup>, Anti-S e Anti-s indica a presença do respetivo antígeno. A ausência da faixa (resultado negativo) indica a ausência do(s) respetivo(s) antígeno(s).

O MDmulticard® Basic Extended Phenotype Anti-Fy<sup>a</sup> deteta todos os fenótipos positivos para Fy<sup>a</sup>, incluindo o Fy<sup>a</sup> (Fy<sup>a</sup> fraco)<sup>4</sup>. O Fy<sup>a</sup> é herdado como um alelo de Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup> e atua como um fenotipo fraco de Fy<sup>b</sup> com uma redução quantitativa marcada do número de antígenos Fy<sup>b</sup> na superfície do eritrócito<sup>5-8</sup>. Não existe qualquer Anti-Fy<sup>a</sup><sup>9-10</sup>.

Cada MDmulticard® contém controles internos (val e cti).

- **Val** permite a cada teste verificar se a) foi adicionado sangue e b) as características de fluxo do teste estão corretas (val = controle de procedimento);
- **Cti** permite a cada teste verificar se os eritrócitos estão a reagir com qualquer dos componentes incluídos nas diferentes formulações de anticorpos.

### REAGENTES

Os reagentes de anticorpos consistem em anticorpos monoclonais e são especificamente formulados e impregnados na membrana do dispositivo de fluxo lateral.

A maioria dos reagentes contém material bovino e porcino e 0,1% (p/v) de azida de sódio como conservante.

### MDmulticard® Basic Extended Phenotype

Anticorpo	Clones utilizados	Origem
Anti-Fy <sup>a</sup>	P3TIM	Murina/humana
Anti-Fy <sup>b</sup>	SpA264LBg1	Murina/humana
Anti-Jk <sup>a</sup>	P3HT7	Murina/humana
Anti-Jk <sup>b</sup>	P3.143	Murina/humana
Anti-S	MS-94	Murina/humana
Anti-s	P3BER	Murina/humana

### Controles internos

**Val:** Anticorpo policlonal purificado de coelho direcionado contra os eritrócitos humanos.

**Cti:** reagente contendo todos os componentes das diferentes formulações de anticorpo exceto o anticorpo.

Pronto a usar. Apenas para uso profissional.

**Cuidado:** Todos os produtos devem ser tratados como potencialmente infecciosos. O material de cultura de células humanas foi considerado não reativo quando analisado quanto a HBsAg, anti-HCV e anti-VIH-1/2. Nenhum método conhecido pode oferecer a garantia de que os produtos derivados do sangue humano não transmitem agentes infecciosos. Por isso, devem ter-se cuidados adequados na utilização e eliminação deste produto.

Não utilize o MDmulticard® quando a embalagem exterior de alumínio ou a etiqueta de proteção central estiver danificada.

### ESTABILIDADE

Não expor a temperaturas extremas. Conserve a 2 - 8 °C quando não estiver a ser utilizado. Não utilize depois do prazo de validade. Se forem conservados adequadamente, os cartões continuam estáveis, na embalagem original selada, até ao prazo de validade indicado. Após a abertura da embalagem de MDmulticard® (10 cartões), conserve os cartões restantes na embalagem fechada a 2 - 8 °C. Sob estas condições, os cartões devem ser utilizados num prazo de 2 meses. O cartão deve ser utilizado no prazo de 8 horas após a etiqueta protetora central ter sido removida.

### RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Colha amostras de sangue utilizando técnicas de aceitáveis de punção venosa. As amostras podem ser colhidas em anticoagulantes habitualmente utilizados (p. ex. EDTA, CPDA, ACD, citrato). São preferíveis eritrócitos em fresco para os testes. As amostras sanguíneas que apresentam hemólise maciça ou contaminação não devem ser utilizadas. As amostras sanguíneas que não são utilizadas imediatamente ou que requerem transporte devem ser conservadas a 2 - 8 °C.

### PROCEDIMENTO

#### Reagentes fornecidos

MDmulticard® Basic Extended Phenotype, 1x10 cartões, contendo reagentes Anti-Fy<sup>a</sup>, Anti-Fy<sup>b</sup>, Anti-Jk<sup>a</sup>, Anti-Jk<sup>b</sup>, Anti-S e Anti-s, Ref. 210506

#### Materiais necessários, mas não fornecidos

- Diluent F, 1x50 ml, Ref. 210504
- Tubos de ensaio 12 x 75 mm, p. ex. Ref. 401855
- Pipeta (tamanho de gota ~50 µl)
- Temporizador

Tanto os reagentes como as amostras a serem analisadas devem ser levados à temperatura ambiente (18 - 25 °C) antes do teste.

#### Procedimento de teste

##### Método de sedimentação de eritrócitos

1. Remova a etiqueta protetora central do MDmulticard® que cobre a zona de aplicação do cartão.
2. Misture 1 gota (50 µl) do sedimento de eritrócitos com 8 gotas (400 µl) de Diluent F num tubo de ensaio. Também é possível misturar volumes menores de eritrócitos e Diluent F, se forem utilizadas as proporções corretas (1 parte de eritrócitos mais 8 partes de Diluent F). O volume mínimo da suspensão resultante deve ser de 100 µl.
3. Adicione duas gotas (100 µl) da suspensão resultante na zona de aplicação do MDmulticard®.
4. Após 30 segundos, adicione 6 gotas (300 µl) de Diluent F à zona de aplicação.
5. Após 4 minutos, adicione 6 gotas (300 µl) de Diluent F à zona de aplicação.
6. Efetue a leitura e registre os resultados após 4 minutos.

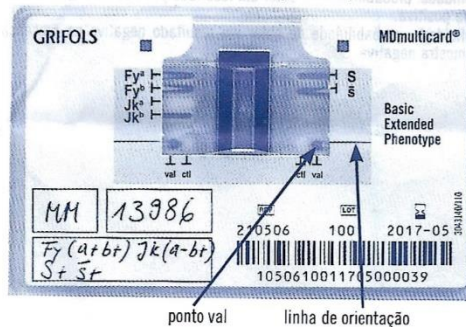
### RESULTADOS

#### Interpretação

Reação positiva = Faixa vermelha

Reação negativa = Ausência de faixa

- As expressões mais fracas da faixa podem ser indicativas de expressões fracas de grupos sanguíneos, tais como Jk<sup>a</sup> ou Fy<sup>a</sup> fracos. Podem também representar reações mistas, p. ex. após a transfusão.
- MDmulticard® Basic Extended Phenotype Anti-Fy<sup>a</sup> deteta todos os fenótipos de Fy<sup>a</sup>, incluindo Fy<sup>a</sup> (Fy<sup>a</sup> fraco)<sup>4</sup>. A detecção do fenotipo Fy<sup>a</sup> foi validada utilizando o método sedimentação de eritrócitos (consultar as CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS). O Fy<sup>a</sup> é herdado como um alelo de Fy<sup>a</sup> e Fy<sup>b</sup>, e comporta-se como um fenotipo fraco de Fy<sup>b</sup>, com uma redução quantitativa marcada do número de antígenos Fy<sup>b</sup> na superfície dos eritrócitos<sup>5-8</sup>. Não existe qualquer Anti-Fy<sup>a</sup><sup>9-10</sup>.
- As "meias faixas" devem ser interpretadas como resultados positivos e são indicativas de reações de campo mistas, p. ex. após a transfusão.
- As faixas em forma de "seta" são indicativas de reações positivas muito fortes.
- Em caso de dificuldade em compatibilizar as faixas às marcações da etiqueta do cartão, aconselhamos a inclinar o cartão até que a linha de orientação fique alinhada com o ponto val (ver figura). Nesta posição, todas as faixas ficam exatamente alinhadas com a marcação da etiqueta do cartão.



- Os resultados apresentam um critério de avaliação estável e podem ser lidos até 48 horas após a realização do teste, quando conservados entre 2 - 8 °C.

### CONTROLE DE QUALIDADE

Os eritrócitos positivos e negativos a antígenos devem ser analisados todos os dias em que os reagentes são utilizados para assegurar a sua reatividade adequada.

### LIMITES DO PROCEDIMENTO

1. Todos os testes devem ser efetuados à temperatura ambiente (18 - 25 °C).
2. Os eritrócitos podem perder a expressão dos antígenos durante a conservação, fornecendo reações positivas mais fracas do que os eritrócitos em fresco.
3. Se o ponto val não estiver visível, o teste não é válido e deve ser repetido utilizando um novo cartão.
4. Se o ponto ctl der um resultado positivo, o teste não é válido. O teste deve ser repetido utilizando um novo cartão. Nesse caso, existe a probabilidade de existência de autoanticorpos ou de reatividade dos eritrócitos com um dos componentes que constituem as formulações de anticorpos.
5. As amostras altamente lipêmicas, que contêm um título elevado de auto ou aloanticorpos ou que contêm um elevado teor de hemoglobina podem, por vezes, provocar reações mais fracas, falsos negativos ou falsos positivos. A lavagem das hemácias com solução de NaCl a 0,9% seguida pela aplicação do Método de Sedimento de Hemácias (ver capítulo Procedimentos de teste) pode, nestes casos, melhorar os resultados.
6. As suspensões de eritrócitos com uma concentração demasiado alta ou demasiado baixa podem causar resultados aberrantes.
7. A suspensão de eritrócitos a ser aplicada com o método do sangue coagulado deve idealmente ter um hematócrito de aproximadamente 10%.
8. Podem ocorrer resultados falsos positivos ou falsos negativos devido a contaminação dos materiais de teste, temperatura e/ou tempo de reação inadequados, conservação inadequada dos materiais, omissão dos reagentes do teste e determinados estados de saúde.
9. Quaisquer modificações aos procedimentos de teste descritos nas instruções de utilização requerem a validação do usuário.
10. Algumas categorias de antígenos e fenótipos fracos tais como, Jk<sup>a</sup> fraco e células TSEN+, S+ ou outras podem produzir reações fracas, variáveis ou negativas. Nestes casos, podem ser necessários estudos adicionais para confirmar o grupo sanguíneo<sup>11</sup>.
11. Os eritrócitos cobertos com aloanticorpos ou autoanticorpos (teste de antiglobulina direto positivo) poderão produzir reações falsas.
12. Em casos raros, podem ocorrer sombras não específicas ou bandas muito fracas, mesmo quando os resultados são negativos. Nestes casos, deve ser feita novamente uma segunda lavagem com 300 µl de Diluent F, o que pode melhorar os resultados.

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

O MDmulticard® Basic Extended Phenotype foi testado com dador, amostras clínicas e neonatais de fenótipo Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S e s conhecido recolhido em EDTA, citrato, CPDA ou ACD. A população da amostra representava todos os principais fenótipos Kidd, Duffy, S e s. O número total de testes (n), a sensibilidade e a especificidade foram calculados e são apresentados abaixo.

	MDmulticard® Basic Extended Phenotype			
	n	Sensibilidade [%]	n	Especificidade [%]
Fy <sup>a</sup>	85	100	47	100
Fy <sup>b</sup>	98	100	34	100
Jk <sup>a</sup>	98	100	34	100
Jk <sup>b</sup>	99	100	33	100
S	68	100	63	100
s	115	100	17	100

Sensibilidade: probabilidade de obter um resultado positivo na presença de uma amostra positiva.

Especificidade: probabilidade de obter um resultado negativo na presença de uma amostra negativa.

A sensibilidade do reagente Anti-Fy<sup>a</sup> foi avaliada num outro estudo, com um foco especial na capacidade de detetar Fy<sup>a</sup>.

Tipagem molecular	Fenótipo deduzido a partir do genótipo	n	Valores prévios de serologia			MDmulticard® Basic Extended Phenotype		
			Fy (a+b-)	Fy (a+b+)	Fy (a-b+)	Fy (a+b-)	Fy (a+b+)	Fy (a-b+)
FY*A   FY*02W.01/02	Fy(a+b+)	38	21	17	0	0	38	0
FY*B   FY*02W.01/02	Fy(a-b+)	52	0	0	52	0	0	52
FY*02W.01/02   FY*02W.01/02	Fy(a-b+)	2	0	0	2	0	0	2
<b>Total</b>		<b>92</b>	<b>21</b>	<b>17</b>	<b>54</b>	<b>0</b>	<b>38</b>	<b>54</b>

O produto MDmulticard® Basic Extended Phenotype está em conformidade com as da IVD-D 98/79/CE.

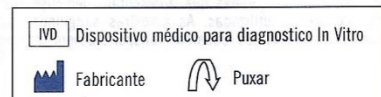
### GARANTIA

Este produto tem a garantia de atuar conforme descrito no rótulo e na literatura do produto. A Medion Grifols Diagnostics AG rejeita qualquer garantia implícita de comercialização ou de adequação para qualquer outro efeito, e em caso algum a Medion Grifols Diagnostics AG será responsável por quaisquer danos consequenciais resultantes da garantia anteriormente expressa.

### BIBLIOGRAFIA

1. Schwind P, Loster K. 2004. Point-of-care multi-parameter typing of 10 blood groups with stable end-point. *Transfusion*. 44 (9S): 121 A.
2. Mollison PL. 2014. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 12<sup>th</sup> Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
3. Issitt PD. 1998. *Applied Blood Group Serology*. 4<sup>th</sup> ed. Miami: Montgomery Scientific Publications.
4. Caesar A, Meyer S, Trost N, Neuenschwander K, Geisen C, Frey BM, Schwind P. 2018. A uniform method for the simultaneous blood group phenotyping of Fya, Fyb, Jka, Jkb, S, s, P1, k applying lateral-flow technique. *Vox Sang*. 113(2): 177-184.
5. Olsson ML, Smythe JS, Hansson C, Poole J, Mallinson G, Jones J, Avent ND, Daniels G. 1998. The Fy(x) phenotype is associated with a missense mutation in the Fy(b) allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *British Journal of Haematology*. 103: 1184-1191.
6. Tournamille C, Le Van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y. 1998. Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood*. 92: 2147-2156.
7. Parasol N, Reid M, Rios M, Castilho L, Harari I, Kosower NS. 1998. A novel mutation in the coding sequence of the FY\*B allele of the Duffy chemokine receptor gene is associated with an altered erythrocyte phenotype. *Blood*. 92: 2237-2243.
8. Yazdanbakhsh K, Rios M, Storry JR, Kosower N, Parasol N, Chaudhuri A, Reid ME. 2000. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. *Transfusion*. 40: 310-320.
9. Murphy MT, Templeton LJ, Fleming J, Ferguson M, Peterkin M, Fraser RH. 1997. Comparison of Fyb status as determined serologically and genetically. *Transfusion Medicine*. 7: 135-141.
10. Hult A, Hellberg A, Wester ES, Olausson P, Storry JR, Olsson ML. 2005. Blood group genotype analysis for the quality improvement of reagent test red blood cells. *Vox Sang*. 88: 265-70.
11. Wester ES, Storry JR, Olsson ML. 2011. Characterization of Jk(a+)(weak): a new blood group phenotype associated with an altered JK\*01 allele. *Transfusion*. 51 (2): 380-92.

 Medion Grifols Diagnostics AG, Bonnstrasse 9, CH-3186 Düringen/Switzerland



**GRIFOLS**

## Anexo III: Autorizações da realização do estudo.



### DELIBERAÇÃO DO CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO


Após apreciação e pareceres favoráveis da Comissão de Ética e do Centro de Epidemiologia Hospitalar, considerando que se encontram reunidos os requisitos e demais trâmites previstos no circuito para submissão de projetos de investigação no Centro Hospitalar Universitário de S. João e em conformidade com as disposições legais em vigor, o Conselho de Administração – ao abrigo das competências previstas no Artigo 71.º dos Estatutos dos hospitais, centros hospitalares, institutos portugueses de oncologia e unidades locais de saúde, aprovados pelo Decreto-Lei n.º 52/2022, de 4 de agosto – delibera:

1. Aprovar a realização do projeto de investigação:
  - “Comparação entre a fenotipagem eritrocitária pelo MDmulticard® e a genotipagem em doentes com prova de coombs direta positiva”.
  - Serviço(s) onde decorrerá o projeto de investigação: Imunohemoterapia.
  - Investigador(a) principal: Helena Maria Conceição Rodrigues Sousa.
2. Remeta-se à Comissão de Ética para os procedimentos adequados e demais trâmites convenientes.

CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO DO CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DE S. JOÃO, EPE • REUNIÃO DE 2 DE FEVEREIRO DE 2023			
Presidente do Conselho de Administração			
Prof.ª Doutora Maria João Baptista			
Diretor Clínico	Enfermeiro Diretor	Vogal Executiva	Vogal Executiva
Prof.º Doutor Roberto Roncon	Enfermeiro Paulo Emilio Mota	Dra. Sofia Leal	Dra. Fernanda Oliveira

> Comissão de Ética  
> Centro de Epidemiologia Hospitalar  
> Direção Clínica

□ CES 349/2022

**Centro de Epidemiologia Hospitalar**  
Tomei conhecimento. Nada a opor. À DC.  
27 de Janeiro de 2023  
A Diretora do Centro de Epidemiologia Hospitalar  
  
(Prof.ª Doutora Ana Azevedo)



SÃO JOÃO

n.º 349 / 22

DIRECÇÃO CLÍNICA  
3 0 JAN 2023

PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO

## Realização de Investigação

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração  
do Centro Hospitalar de São João

Nome do Investigador Principal:

Helena Maria Conceição Rodrigues Sousa

Título da Investigação:

Comparação entre a fenotipagem eritrocitária pelo MDmulticard® e a genotipagem em doentes com prova de coombs direta positiva

Pretendendo realizar no(s) Serviço(s) de:

Imunohemoterapia

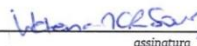
a investigação em epígrafe, solicito a V. Exa., na qualidade de Investigador/Promotor, autorização para a sua efetivação.

Para o efeito, anexo toda a documentação referida no dossier da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de São João/Faculdade de Medicina da Universidade do Porto respeitante à investigação, à qual enderecei pedido de apreciação e parecer.

Com os melhores cumprimentos.

O Investigador/Promotor

Porto, 5 de Dezembro de 2022.


  
assinatura



Encarregado  
da Protecção de Dados  
Data Protection Officer

Entrada   
09/01/2023

\*Centro Hospitalar São João -  
Centro de Epidemiologia Hospitalar

27, 1, 2023  


CES-IM005-0

## Anexo IV: Tabulações cruzadas

### Resumo de processamento de casos para o gene Fya

Resumo de processamento de casos						
	Casos					
	Válido		Omisso		Total	
	N	%	N	%	N	%
G-Fya * F-Fya	32	100,0%	0	0,0%	32	100,0%

### Tabulação cruzada G-Fya \* F-Fya

Tabulação cruzada G-Fya * F-Fya					
			F-Fya		Total
			0	1	
G-Fya	0	Contagem	12	1	13
		% em G-Fya	92,3%	7,7%	100,0%
		% em F-Fya	100,0%	5,0%	40,6%
	1	Contagem	0	19	19
		% em G-Fya	0,0%	100,0%	100,0%
		% em F-Fya	0,0%	95,0%	59,4%
Total		Contagem	12	20	32
		% em G-Fya	37,5%	62,5%	100,0%
		% em F-Fya	100,0%	100,0%	100,0%

### Medida de concordância Kappa de Cohen (Fya)

Medidas Simétricas					
		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	0,934	0,064	5,297	<,001
N de Casos Válidos		32			

- a) Não considerando a hipótese nula.  
 b) Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Resumo de processamento de casos para o gene Fyb

Resumo de processamento de casos						
	Casos					
	Válido		Omisso		Total	
	N	%	N	%	N	%
G-Fyb * F-Fyb	32	100,0%	0	0,0%	32	100,0%

Tabulação cruzada G-Fyb \* F-Fyb

Tabulação cruzada G-Fyb * F-Fyb					
			F-Fyb		Total
			0	1	
G-Fyb	0	Contagem	8	0	8
		% em G-Fyb	100,0%	0,0%	100,0%
		% em F-Fyb	100,0%	0,0%	25,0%
	1	Contagem	0	24	24
		% em G-Fyb	0,0%	100,0%	100,0%
		% em F-Fyb	0,0%	100,0%	75,0%
Total	Contagem	8	24	32	
	% em G-Fyb	25,0%	75,0%	100,0%	
	% em F-Fyb	100,0%	100,0%	100,0%	

Medida de concordância Kappa de Cohen (Fyb)

Medidas Simétricas					
		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	1,000	,000	5,657	<,001
N de Casos Válidos		32			

- a) Não considerando a hipótese nula.  
 b) Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Resumo de processamento de casos para o gene Jka

Resumo de processamento de casos						
	Casos					
	Válido		Omisso		Total	
	N	%	N	%	N	%
G-Jka * F-Jka	32	100,0%	0	0,0%	32	100,0%

Tabulação cruzada G-Jka \* F-Jka

Tabulação cruzada G-Jka * F-Jka					
			F-Jka		Total
			0	1	
G-Jka	0	Contagem	11	0	11
		% em G-Jka	100,0%	0,0%	100,0%
		% em F-Jka	100,0%	0,0%	34,4%
	1	Contagem	0	21	21
		% em G-Jka	0,0%	100,0%	100,0%
		% em F-Jka	0,0%	100,0%	65,6%
Total	Contagem	11	21	32	
	% em G-Jka	34,4%	65,6%	100,0%	
	% em F-Jka	100,0%	100,0%	100,0%	

Medida de concordância Kappa de Cohen (Jka)

Medidas Simétricas					
		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	1,000	,000	5,657	<,001
N de Casos Válidos		32			

- a) Não considerando a hipótese nula.  
 b) Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Resumo de processamento de casos para o gene Jkb

Resumo de processamento de casos						
	Casos					
	Válido		Omisso		Total	
	N	%	N	%	N	%
G-Jkb * F-Jkb	32	100,0%	0	0,0%	32	100,0%

Tabulação cruzada G-Jkb \* F-Jkb

Tabulação cruzada G-Jkb * F-Jkb					
			F-Jkb		Total
			0	1	
G-Jkb	0	Contagem	7	0	7
		% em G-Jkb	100,0%	0,0%	100,0%
		% em F-Jkb	100,0%	0,0%	21,9%
	1	Contagem	0	25	25
		% em G-Jkb	0,0%	100,0%	100,0%
		% em F-Jkb	0,0%	100,0%	78,1%
Total	Contagem	7	25	32	
	% em G-Jkb	21,9%	78,1%	100,0%	
	% em F-Jkb	100,0%	100,0%	100,0%	

Medida de concordância Kappa de Cohen (Jkb)

Medidas Simétricas					
		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	1,000	,000	5,657	<,001
N de Casos Válidos		32			

- a) Não considerando a hipótese nula.  
 b) Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Resumo de processamento de casos para o gene S

Resumo de processamento de casos						
	Casos					
	Válido		Omisso		Total	
	N	%	N	%	N	%
G-S * F-S	32	100,0%	0	0,0%	32	100,0%

Tabulação cruzada G-S \* F-S

Tabulação cruzada G-S * F-S					
			F-S		Total
			0	1	
G-S	0	Contagem	9	0	9
		% em G-S	100,0%	0,0%	100,0%
		% em F-S	100,0%	0,0%	28,1%
	1	Contagem	0	23	23
		% em G-S	0,0%	100,0%	100,0%
		% em F-S	0,0%	100,0%	71,9%
Total		Contagem	9	23	32
		% em G-S	28,1%	71,9%	100,0%
		% em F-S	100,0%	100,0%	100,0%

Medida de concordância Kappa de Cohen (S)

Medidas Simétricas					
		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	1,000	,000	5,657	<,001
N de Casos Válidos		32			

- a) Não considerando a hipótese nula.
- b) Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

Resumo de processamento de casos para o gene s

Resumo de processamento de casos						
	Casos					
	Válido		Omisso		Total	
	N	%	N	%	N	%
G-s * F-s	32	100,0%	0	0,0%	32	100,0%

Tabulação cruzada G-s \* F-s

Tabulação cruzada G-s * F-s					
			F-s		Total
			0	1	
G-s	0	Contagem	7	0	7
		% em G-s	100,0%	0,0%	100,0%
		% em F-s	100,0%	0,0%	21,9%
	1	Contagem	0	25	25
		% em G-s	0,0%	100,0%	100,0%
		% em F-s	0,0%	100,0%	78,1%
Total		Contagem	7	25	32
		% em G-s	21,9%	78,1%	100,0%
		% em F-s	100,0%	100,0%	100,0%

Medida de concordância Kappa de Cohen (s)

Medidas Simétricas					
		Valor	Erro Padrão Assintótico <sup>a</sup>	T Aproximado <sup>b</sup>	Significância Aproximada
Medida de concordância	Kappa	1,000	0,000	5,657	<,001
N de Casos Válidos		32			

- a) Não considerando a hipótese nula.  
 b) Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

# Anexo V: MDmulticard® - A new member for the immunohematology toolbox

## MDMULTICARD®- A NEW MEMBER FOR THE IMMUNOHEMATOLOGY TOOLBOX

Young-Lan Song<sup>1</sup>, Gabriella Rizzi<sup>1</sup>, Antigoni Zorbas<sup>1</sup>, Ariane Caesar<sup>2</sup>, Peter Schwind<sup>2</sup>, Christoph Gassner<sup>3</sup>, Charlotte Engström<sup>1</sup>, Beat M. Frey<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Immunohematology, Blood Transfusion Service Zurich, Swiss Red Cross, Switzerland  
<sup>2</sup> Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, Switzerland  
<sup>3</sup> Molecular Diagnostics & Research, Blood Transfusion Service Zurich, Swiss Red Cross, Switzerland



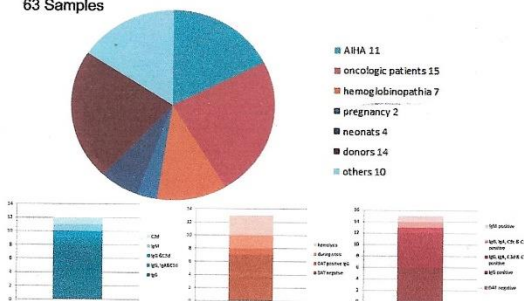
### Background

The MDmulticard® Basic Extended Phenotype (Medion Grifols Diagnostics, Duedingen, CH) was launched in September 2016 and allows simultaneous typing for Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, S, s antigens using lateral flow technique.[1]

### Aims

In order to implement the MDmulticard® as an additional analytic platform we examined a series of samples taken from patients suffering from clinical conditions known to hamper serological red blood cell (RBC) antigen typing.

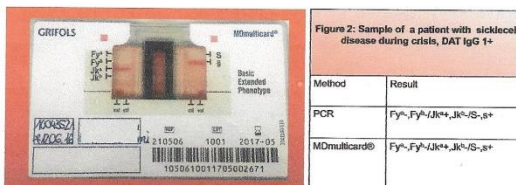
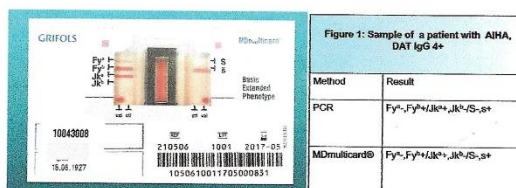
63 Samples



### Methods

Samples of patients suffering from positive DAT including warm and cold autoimmune hemolysis (AIHA) and sepsis, sickle cell disease, paraproteinemia due to Multiple Myeloma or Morbus Waldenström and samples of newborns as well as samples of healthy blood donors (three with known weak Fy<sup>a</sup>) were assessed by MDmulticard® Basic Extended Phenotype. [2]

The results were compared with the findings by alternative test methods, either by standard serology typing (gel-card on Erytra®, Medion Grifols, Duedingen, CH or BioRad, Cressier, CH) or by commercial molecular typing (inno-train GmbH, Kronberg I. T., D).



### Results

The MDmulticard® was easy to handle and provided rapid results (in average 9 minutes from test start) making the method suitable for emergency applications. In general, the results were confirmed by alternative methods or known pre-values.

Two of known Fy<sup>a</sup> negative samples showed false positive reactions by MDmulticard® due to the patients' strongly positive DAT (3+ and 4+). One sample delivered a weak Jk<sup>b</sup> positive result by MDmulticard® although the patient was known to be Jk<sup>b</sup> negative by PCR. Clinical evaluation revealed recent transfusion of Jk<sup>b</sup> positive RBC concentrates. In two IgM-DAT positive samples, the predicted phenotype by PCR was accurately diagnosed by MDmulticard® upon washing the patient's RBCs with NaCl 0.9%. [3] A similar observation was made with cord blood cells. Another sample from a patient with severe cold AIHA needed to be washed with warm NaCl 0.9%.



Figure 3: Sample of a patient with Multiple Myeloma, DAT IgM 1+

Method	Result	
	normal	washed RBC with NaCl 0.9%
PCR	Fy <sup>a</sup> -Fy <sup>b</sup> +/Jk <sup>a</sup> +/Jk <sup>b</sup> -/S <sup>a</sup> -/S <sup>b</sup> +	
MDmulticard®	not interpretable	Fy <sup>a</sup> -Fy <sup>b</sup> +/Jk <sup>a</sup> +/Jk <sup>b</sup> -/S <sup>a</sup> -/S <sup>b</sup> +

### Summary

MDmulticard® allows reliable RBC typing even of DAT positive samples. MDmulticard® may be applied to samples of patients suffering from clinical conditions such as sickle cell disease, AIHA or paraproteinemia impairing standard serological typing. In pre-transfused patients or such with a strongly positive DAT, the distinct positive reaction by MDmulticard® allows to differentiate between false positive reactions and inherited antigen positive RBCs. For emergency situations, the MDmulticard® proves to provide rapid and reliable antigen typing which allows transfusing the patient with phenotype compatible RBC concentrates.



Figure 4: Sample of a patient before and after incompatible transfusion

Method	Result	
	before transfusion	after transfusion
MDmulticard®	Fy <sup>a</sup> -Fy <sup>b</sup> +/Jk <sup>a</sup> +/Jk <sup>b</sup> -/S <sup>a</sup> -/S <sup>b</sup> +	mixed field reactions in Fy <sup>a</sup>

### References

- [1] Herziger et al., 2017
- [2] Weinstock et al., 2017
- [3] Metaxas -Bühler, 1986

Swissttransfusion Jahrestagung 2016, 23. bis 24. August, Bern