



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Jessica Hanser Nunes Kahl

**IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA MMA (MONOCYTE MONOLAYER ASSAY) NA
ROTINA DE TESTES PRÉ-TRANSFUSIONAIS DO LABORATÓRIO DE IMUNO-
HEMATOLOGIA DO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE
SANTA CATARINA.**

Florianópolis
2021

Jessica Hanser Nunes Kahl

**IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA MMA (MONOCYTE MONOLAYER ASSAY) NA
ROTINA DE TESTES PRÉ-TRANSFUSIONAIS DO LABORATÓRIO DE IMUNO-
HEMATOLOGIA DO CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE
SANTA CATARINA.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Médicas.

Orientador: Prof. Phd Emil Kupek.

Coorientadora: DsC Andrea Petry.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kahl, Jessica Hanser Nunes

Implantação da técnica MMA (Monocyte Monolayer Assay) na rotina de testes pré transfusionais do laboratório de Imunohematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Santa Catarina. / Jessica Hanser Nunes Kahl ; orientador, Emil Kupek, coorientador, Andrea Petry, 2021. 66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas-Novo, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciências Médicas-Novo. 2. Imunohematologia. 3. Transfusão. 4. Reação transfusional. 5. MMA. I. Kupek, Emil . II. Petry, Andrea. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas Novo. IV. Título.

Jessica Hanser Nunes Kahl

Implantação da técnica mma (monocyte monolayer assay) na rotina de testes pré-transfusionais do laboratório de imuno-hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Tania Silva Frode Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Eduardo Monguilhott Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Emil Kupek, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Emil Kupek, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado a todos os receptores de sangue.

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, especialmente ao meu esposo William, que sempre esteve ao meu lado e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos. Sem o apoio dele não teria vindo até aqui. Obrigado William, por ser aquela pessoa que me impulsiona todos os dias a me reinventar e fazer tudo aquilo que quero.

Ao meu orientador Emil Kupek, pela acolhida, todo o apoio e orientação.

A minha coorientadora Andrea Petry que me guiou, quando pensava em desistir e me estimulou a seguir em frente.

Ao meu querido amigo Everaldo Schorner, sem ele este trabalho não se concretizaria. Agradeço de todo o coração por sempre abrir as portas e me dar a oportunidade de aprender e me desenvolver, desde os tempos de estágio até os dias de hoje. Sou grata por toda a paciência, atenção, orientação, carinho e por compartilhar tantos conhecimentos comigo.

Uma homenagem especial a minha amiga Andreia Hoffmann, que me acompanhou durante esta jornada, com tanta paciência, por tantas noites de plantão, sempre disposta a me ajudar a passar por todas as adversidades.

A toda equipe do HEMOSC e da Fundação Pró-Sangue por toda a colaboração. E a todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

RESUMO

O ensaio MMA (Ensaio de Monocamada de Monócitos/ Monocyte Monolayer Assay) é uma simulação *in vitro* do comportamento dos anticorpos, demonstrando assim as reações que ocorreriam no sistema retículo endotelial após uma transfusão de hemácias incompatíveis. Desta forma, é capaz de determinar o significado clínico dos anticorpos e assim avaliar a possibilidade de haver uma Reação Transfusional Hemolítica. O presente estudo teve como objetivo validar a técnica MMA, afim de verificar se o ensaio satisfaz os requisitos especificados e se é adequado para o uso pretendido. Além disso visou apresentar o custo por teste realizado. Trata-se de um estudo quantitativo-qualitativo de natureza descritiva, realizado no laboratório de Imuno-hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) de Florianópolis. Foram utilizadas 90 amostras de pacientes aloimunizados atendidos pelo serviço. Em primeiro momento foi realizado o teste MMA das 90 amostras aleatoriamente. Após a obtenção destes resultados foram aplicados os testes preconizados pela RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, seguindo as diretrizes publicadas no "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos" afim de validar o ensaio. Foram avaliadas a seletividade, linearidade, precisão e exatidão do método, além de serem determinados os limites de detecção e quantificação. Verificou-se que o ensaio atendeu todos os critérios testados, sendo assim é eficaz em avaliar o significado clínico dos aloanticorpos. Foi observado que a implantação do MMA no laboratório de imunohematologia se justifica tanto por ser uma técnica não invasiva. Quanto, por se tratar de um teste acessível a instituição, por não demandar a aquisição de equipamentos específicos, não gerando gastos de manutenção e assim não demandando maiores investimentos a instituição, uma vez que se trata de um teste de baixa rotatividade.

Palavras-chave: MMA (Monocyte Monolayer Assay). Testes pré-transfusionais. Aloimunização.

ABSTRACT

The MMA (Monocyte Monolayer Assay) is an in vitro simulation of the behavior of the antibodies, thus demonstrating the reactions that would occur in the endothelial reticulum system after a transfusion of incompatible red blood cells. Thus, it is able to determine the clinical significance of the antibodies and assesses the possibility of happening a Hemolytic Transfusion Reaction. The present study aimed to validate the MMA technique, in order to verify that the test meets the specified requirements and is suitable for the intended use. In addition, it aimed to present the cost per test performed. This is a quantitative-qualitative study of a descriptive nature, carried out in the Immunohematology laboratory of the Hematology and Hemotherapy Center of the State of Santa Catarina (HEMOSC) in Florianópolis. 90 samples of alloimmunized patients treated by the service were used. At first, the MMA test of 90 samples was performed randomly. After obtaining these results, the tests recommended by RE No. 899, of May 29, 2003, of the National Health Surveillance Agency, which determines the publication of the "Guide for validation of analytical and bioanalytical methods" in order to validate the test, were applied. Were evaluated the selectivity, linearity, precision and accuracy of the method in addition to determining the limits of detection and quantification. It was observed that the implantation of MMA in the immunohematology laboratory is justified both because it is a non-invasive technique. How much, because it is a test accessible to the institution, because it does not demand the acquisition of specific equipment, not generating maintenance expenses and thus not requiring greater investments to the institution, since it is a test of low turnover.

Keywords: MMA (Monocyte Monolayer Assay). Pre-transfusion tests. Alloimmunization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo de membrana eritrocitária apresentando os principais sistemas de antígenos eritrocitários.....	16
Figura 2 - Diagrama de aloimunização de um antígeno de grupo sanguíneo teórico.....	19
Figura 3 - Estrutura geral das imunoglobulinas.....	20
Figura 4 - Mecanismo de formação da MAC.....	23
Figura 5 - Esquema patofisiologia de reação transfusional hemolítica (HTR).....	25
Figura 6 - Exemplo de reagente de hemácias para identificação de anticorpos.....	27
Figura 7 - Esquema do procedimento do teste MMA.....	35
Figura 8 - Exemplos de monócitos que realizaram fagocitose de hemácias.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo de isogrupos de imunoglobulinas.....	21
Quadro 2 – Atividade biológica das citocinas.....	26
Quadro 3 – Significado clínico dos aloanticorpos dos sistemas de antígenos eritrocitários....	28
Quadro 4 – Interpretação do índice monocitário.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do estudo de efeito matriz.....	42
Tabela 2 - Resultados do teste de shapiro wilk.....	42
Tabela 3 - Resultados do Teste de levene.....	45
Tabela 4 - Resultados da regressão linear simples.....	46
Tabela 5 - Resultados do teste de durbin watson.....	47
Tabela 6 - Resultados da Repetibilidade.....	49
Tabela 7 - Resultados em MI (%) da leitura em microscópio de quatro avaliadores.....	50
Tabela 8 - Regressão linear multivariada para leitura do mi (%).....	51
Tabela 9 - Custos por teste MMA.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de distribuição normal dos dados.....	43
Gráfico 2 - Amplitude interquartil.....	44
Gráfico 3 - Box plot.....	45
Gráfico 4 - Regressão linear simples.....	46
Gráfico 5 - Resíduos da regressão linear.....	47
Gráfico 6 - Intervalo de confiança 95%.....	48
Gráfico 7 - Distribuição dos residuais.....	52
Gráfico 8 - Gráfico de bland-altman: residuais versus valor observado das leituras de MI.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD – Citrato ácido dextrose.

ADCC - Citotoxicidade mediada por Célula dependente de Anticorpos.

AHAI – Anemia Hemolítica Autoimune.

AIHA - Anemia Hemolítica Induzida por Drogas.

APC - Células Apresentadoras de Antígenos.

ATP – Adenosina Trifosfato.

BCR - Receptor de célula B.

CD16 – Aglomerado de moléculas de diferenciação.

CGSH - Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados.

CLT – Quimioluminescência.

CNSR - Cadastro Nacional de Sangue Raro.

CO₂ - Dióxido de Carbono.

CPD – Citrato fosfato dextrose.

CV – Coeficiente de Variação.

CR - Receptores de Complemento.

Cr⁵¹ – Cromo 51

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

DP- Desvio Padrão.

2,3-DPG – 2,3 - Difosfoglicerato.

FcγR – Receptor do fragmento Fc da imunoglobulina gama.

HDFN - Doença Hemolítica do Feto e Recém-Nascido.

IgA - Imunoglobulina A.

IgD - Imunoglobulina D.

IgE - Imunoglobulina E.

IgG - Imunoglobulina G.

IgM - Imunoglobulina M.

ISBT – Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue.

LD – Limite de detecção.

LQ – Limite de quantificação.

MAC - Complexo de ataque a membrana.

MCP – Proteína Quimiotática de Monócitos.

MI - Índice Monocitário.

MHC II - Complexo de Histocompatibilidade de Classe II.

MMA - Ensaio de Monocamada de Monócitos/ Monocyte Monolayer Assay.

NK – Natural Killer.

PAI - Pesquisa de Anticorpos Irregulares.

RhD – Antígeno D do Sistema de Grupo Sanguíneo Rh.

RTH - Reações Transfusionais Hemolíticas.

RTHA - Reação Transfusional Hemolítica Aguda.

RTHT - Reação Transfusional Hemolítica Tardia.

LT CD4+ - Linfócito T auxiliary.

TAD – Teste de antiglobulina direto.

TCR - Receptor de célula T.

TNF – Fator de Necrose Tumoral.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Antígenos eritrocitários	15
1.2	Aloimunização	16
1.3	Mecanismo de reação imunológica	17
1.4	Reações Transfusionais Hemolíticas	22
1.5	Testes pré-transfusionais	27
1.6	Sangue Raro	30
1.7	Monocyte Monolayer Assay	31
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos	32
4	METODOLOGIA.....	33
4.1	Delineamento do estudo	33
4.2	Descrição do cálculo do tamanho amostral	33
4.3	Procedimento experimental	34
4.3.1	Isolamento de monócitos	34
4.3.2	Adsorção de hemácias	35
4.3.3	Fagocitose	35
4.4	Análise microscópica.....	37
4.5	Análise dos dados	40
4.5.1	Seletividade.....	40
4.5.2	Linearidade	40
4.5.3	Limite de detecção	41
4.5.4	Limite de Quantificação	41
4.5.5	Exatidão	41
4.5.6	Precisão	42

	s: desvio padrão das replicatas.....	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	Avaliação da Seletividade.....	42
5.2	Avaliação da Linearidade	44
5.3	Determinação do Intervalo	49
5.4	Determinação do Limite de Detecção e Quantificação	49
5.5	Avaliação da Exatidão	49
5.6	Avaliação da Precisão.....	50
5.7	VALIDAÇÃO DA MICROSCOPIA	50
5.8	MMA: Aspectos práticos.....	54
5.9	Custo por teste MMA	58
6	CONCLUSÃO.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

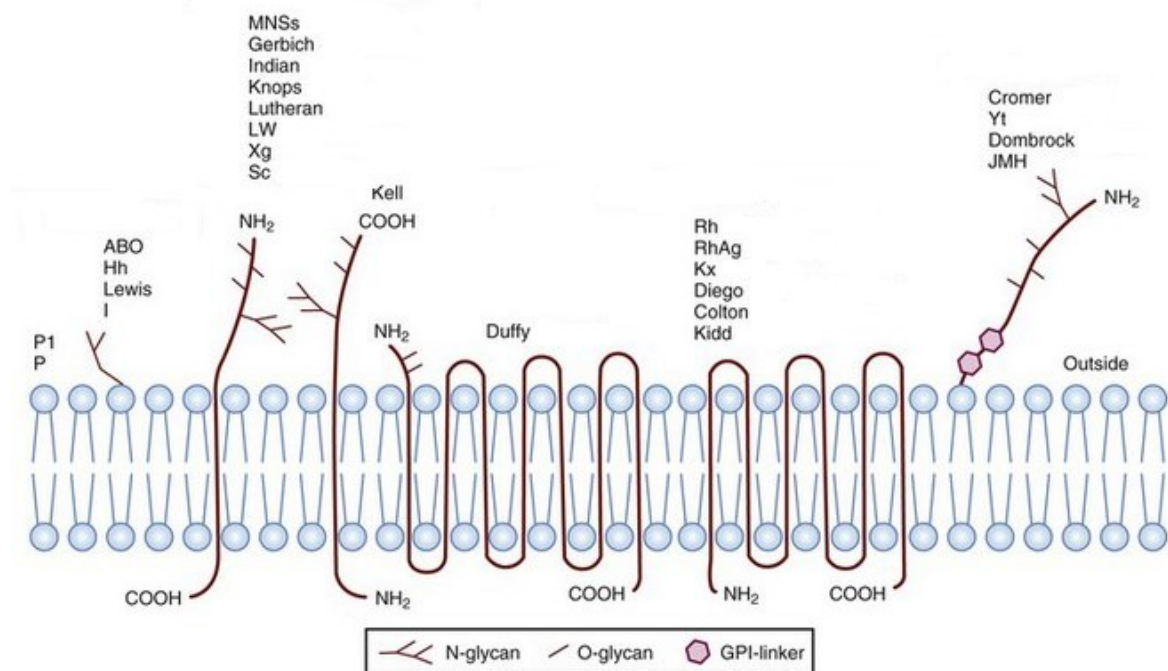
Antígenos eritrocitários estão presentes na membrana das hemácias. Tratam-se de proteínas, glicoproteínas, glicolipídios que podem variar sua expressão de acordo com seu determinante genético (REID, 2012). Essas variações induzem a formação de aloanticorpos, que podem ocorrer naturalmente devido a imunização por antígenos presentes no ambiente, como é o caso dos anticorpos do sistema de grupo sanguíneo ABO, ou como resultado de contato com antígenos eritrocitários estranhos através de transfusão sanguínea ou gestação. Este fenômeno é denominado aloimunização (GIRELLO, 2016).

Um sistema de grupo sanguíneo consiste em um ou mais antígenos que são governados por um único gene ou por um complexo de dois ou mais genes homólogos intimamente ligados. Os sistemas de grupos sanguíneos são geneticamente distintos entre si. Os genes que representam os sistemas de grupos sanguíneos foram identificados e sequenciados e muito é conhecido sobre as suas estruturas, entretanto pouco se sabe sobre suas funções. Até então, é conhecido que os antígenos eritrocitários podem agir como transportadores de membrana, facilitando a transferência de substâncias para a célula; como receptores e moléculas de adesão, como é o exemplo dos antígenos do sistema Duffy que possuem a função de receptores de merozoítas (*Plasmodium Vivax*) e é uma receptora de citocinas nos eritrócitos ligando uma variedade de quimiocinas pró inflamatórias agudas e crônicas. Ainda pode-se citar os antígenos dos sistemas, MNS, Lutheran, LW, Sciama, Indian e Gerbich que também possuem função de moléculas de adesão; Podem também atuar como glicoproteínas protetoras que impedem a lise destas células pela ação do sistema complemento; como componentes estruturais para manter a forma e integridade das hemácias; como constituintes do glicocálice, matriz extracelular responsável por proteger a célula de ataque microbiano e danos mecânicos; ou ainda possuírem função enzimática (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009; DANIELS, 2013).

Existem 325 antígenos agrupados em 38 sistemas de grupos sanguíneos humanos formalmente registrados, além de 5 coleções e 24 séries. Essa classificação é determinada pela ISBT (Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea) que está envolvida na terminologia numérica com base genética para antígenos de superfície de células vermelhas. Esses antígenos são definidos sorologicamente pelo uso de anticorpos específicos. Todos os antígenos recebem um número ISBT exclusivo e essa terminologia é mantida e atualizada. Sendo assim os sistemas

consistem em um ou mais antígenos controlados em um único locus de gene, ou por dois ou mais genes homólogos intimamente ligados com pouca ou nenhuma recombinação observável entre eles. As coleções consistem em antígenos sorológicos, bioquímicos ou geneticamente relacionados, que não se enquadram nos critérios exigidos para o status do sistema ISBT. As séries são subdivididas em duas classificações. A Série 700 ou também chamada de antígenos de baixa incidência com uma incidência inferior a 1% e que não se encaixam em um sistema ou coleção. E a Série 901 ou a chamada antígenos de alta incidência com uma incidência superior a 90% e que também não podem ser incluídos em um sistema ou coleção. Dentre estes sistemas, alguns são considerados de importância transfusional. Então, além dos sistemas ABO e Rh, ainda deve-se citar como os principais sistemas de grupos sanguíneos Kell, Duffy, Kidd, Lewis, MNS e Diego na prática transfusional como ilustra a figura 1 (INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION, 2021).

FIGURA 1 - MODELO DE MEMBRANA ERITROCITÁRIA APRESENTANDO OS PRINCIPAIS SISTEMAS DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.



Fonte: (WESTHOFF; STORRY; SHAZ, 2018)

1.2 ALOIMUNIZAÇÃO

Aloanticorpos eritrocitários são anticorpos desenvolvidos contra antígenos eritrocitários esse processo chama-se aloimunização. Este fenômeno pode ocorrer em

transfusões de sangue incompatíveis, como também durante a gestação, onde pequenas quantidades de hemácias fetais podem atravessar a barreira placentária e alcançar a circulação sanguínea materna. Quando um indivíduo é exposto a antígenos eritrocitários estranhos ao seu organismo, ele é capaz de rejeitá-lo através da produção de anticorpos. Estudos observacionais demonstraram que as incidências deste fenômeno ocorrem em 0,3 a 2% da população geral. Esta estimativa varia de acordo com a diversidade genética da população, como também nos casos de receptores com múltiplas transfusões, onde estão incluídos pacientes com doenças hematológicas crônicas ou adquiridas que necessitam de transfusões frequentemente. A frequência de aloimunização encontra-se entre 0,009% e 0,6% em doadores saudáveis, 1,4% e 4,24% em indivíduos previamente transfundidos, 44%, em pacientes com neoplasias hematológicas, 20% em pacientes com talassemia, e 18,7% em portadores de doença falciforme (PESSONI; FERREIRA; SILVA; ALCÂNTARA, 2018).

Há alguns fatores que podem estar atrelados ao desenvolvimento da aloimunização, como idade, sexo, composição genética do paciente, bem como o número e a frequência das transfusões a que ele foi submetido. Por exemplo, a probabilidade de mulheres previamente sensibilizadas durante o período gestacional terem sido aloimunizadas pode ser maior que a dos homens, devido ao fator de exposição sofrido. Indivíduos que passaram por múltiplas transfusões devido a várias causas como hemoglobinopatias, doenças hematológicas, variados tipos de câncer, transplantes de órgãos, falência renal tem a prevalência deste fenômeno aumentada, uma vez que o número de episódios de transfusão e unidades de sangue recebidas pode ser maior nesses grupos (ARORA, 2020). O estado pró-inflamatório causado por algumas patologias pode ser correlacionado com o desenvolvimento de aloanticorpos. Outro fator importante é a diferença fenotípica entre as hemácias do doador e o receptor, desse modo a presença de um dado antígeno nas hemácias transfundidas pode aloimunizar o receptor que não possui o antígeno expresso na membrana de suas hemácias. Ainda, cabe ressaltar a imunogenicidade do antígeno, ou seja, a sua capacidade de estimular a produção de anticorpos no receptor que também pode ser associada a ocorrência da aloimunização (CRUZ et al., 2011; KUKAR; HANDA; MAHARISHI; SYAL).

1.3 MECANISMO DE REAÇÃO IMUNOLÓGICA

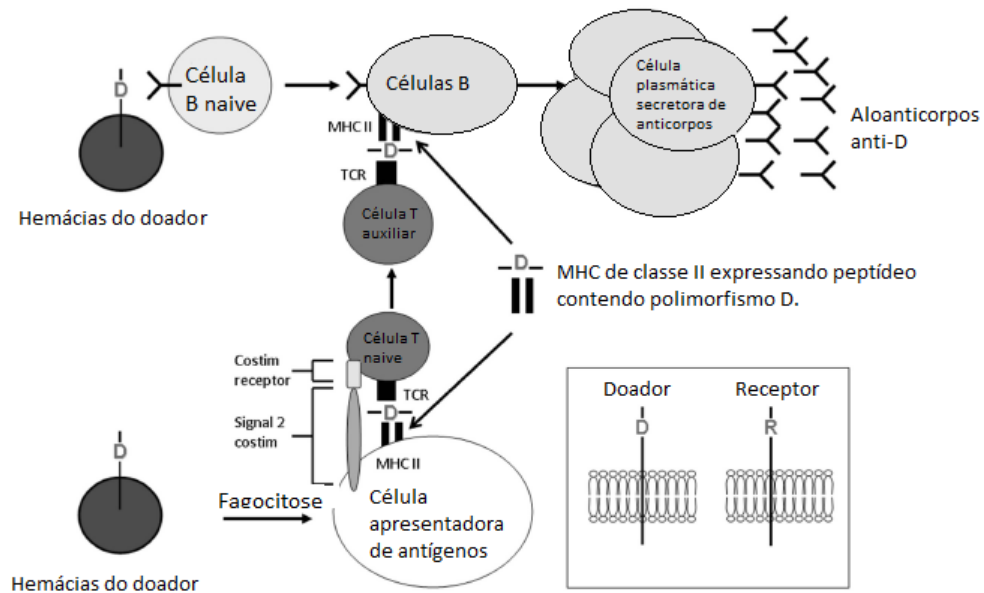
A maioria dos antígenos de grupos sanguíneos humanos são polimorfismos de aminoácidos, proteínas da superfície dos glóbulos vermelhos que podem diferir entre doador e

receptor. Considere hipoteticamente que o polimorfismo do doador é designado como "D" e o polimorfismo receptor como "R", indicando antígenos genéricos de grupos sanguíneos. Quando o receptor é transfundido com eritrócitos que expressam o antígeno D, dois eventos ocorrem simultaneamente conforme esquematizado na figura 2 (AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, 2020):

a) as Células Apresentadoras de Antígenos (APC) (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) fagocitam as hemácias que expressam o antígeno D, processam proteoliticamente suas proteínas em peptídeos e apresentam alguns desses peptídeos no bolso de ligação do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC II) que está presente na superfície das APCs. Neste contexto, o complexo peptídeo/MHC II irá interagir com o receptor de células T (TCR) presente na superfície das células T CD4⁺ específicos para este complexo. As células T são então ativadas quando recebem sinais coestimuladores de uma APC que está apresentando o peptídeo que elas reconhecem ligado a moléculas de MHC de classe II (MURPHY, 2017).

b) as células B são ativadas, estas codificam genes de imunoglobulina específicos para epítopos determinados pela estrutura tridimensional do antígeno D. Cada célula B expressa sua própria imunoglobulina de superfície, que serve como receptor de célula B (BCR). O BCR permite que a célula B detecte antígenos (por exemplo, o doador teórico Antígeno "D") reconhecido por uma imunoglobulina particular. Assim, se o BCR liga um antígeno com afinidade suficiente, a célula B internaliza o BCR, juntamente com o antígeno, por endocitose mediada por receptor. O antígeno é processado em peptídeos e carregado no MHC II da célula B. O complexo MHC II / peptídeo nas células B são reconhecidos por células T auxiliares específicas para o antígeno que já se diferenciaram. As células T auxiliares produzem citocinas que fazem as células B proliferarem e sua progênie diferenciar-se em células plasmáticas secretoras de anticorpos e em células B de memória. Esse reconhecimento entre as células T auxiliares e as células B ocorre através de receptores expressos pelas células T, o CD40L que se liga ao CD40 expresso pelas células B. Essa ligação inicia a proliferação celular e a secreção de anticorpos, assim na membrana dos linfócitos B podem ser encontrados diferentes isotipos de cadeias pesadas das imunoglobulinas e assim podem expressar os diferentes isotipos de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE). Anticorpos IgM são produzidos em primeiro momento após ativação dos linfócitos B e passam a ser do isotipo IgG após um processo de *switching* onde a porção da região constante da cadeia pesada dos anticorpos é alterada (AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, 2020).

FIGURA 2 - DIAGRAMA DE ALOIMUNIZAÇÃO DE UM ANTÍGENO DE GRUPO SANGUÍNEO TEÓRICO.

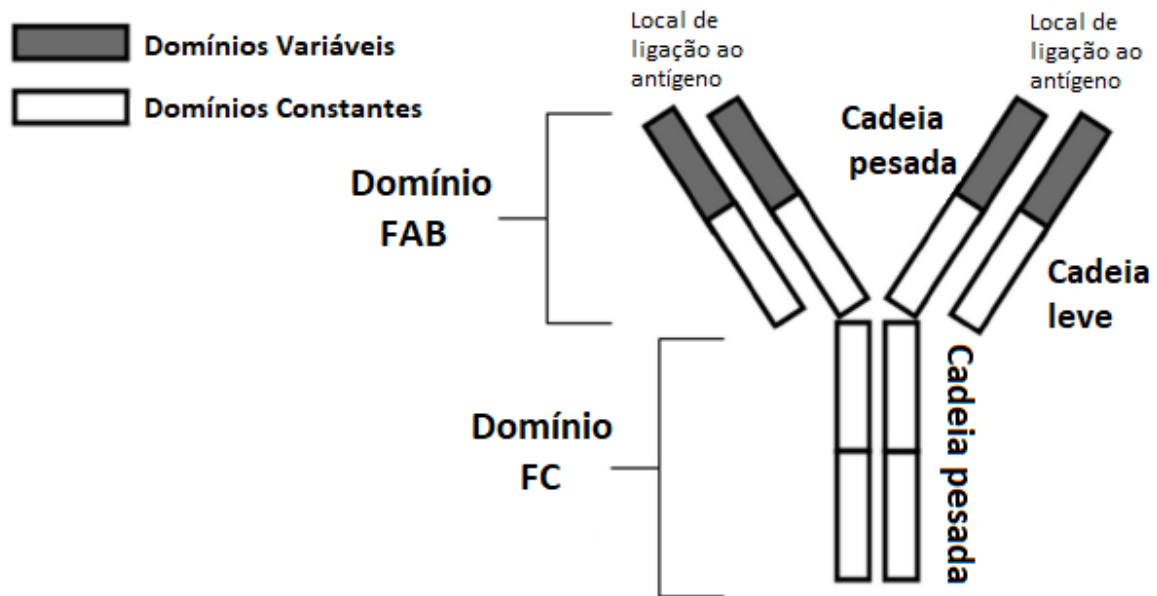


Fonte: Adaptado de AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (2020) “D” e “R” representam polimorfismos no doador e receptor de antígenos de grupo sanguíneo teórico, respectivamente. MHC II = complexo de histocompatibilidade de classe II, TCR = Receptor de célula T.

Uma vez que as células plasmáticas sofrem diferenciação, os anticorpos são secretados e distribuídos por todo o corpo. Essas moléculas possuem uma forma de “Y” e consistem em três segmentos de igual tamanho, conectados por uma porção flexível conforme apresentado na figura 3. Todos os anticorpos são constituídos por pares de cadeias polipeptídicas pesadas e leves que são ligadas por pontes de dissulfeto e o termo imunoglobulina se refere a todas proteínas. Em cada imunoglobulina as duas cadeias pesadas e as duas cadeias leves são iguais, conferindo a molécula dois sítios idênticos de ligação ao antígeno. Isso confere a capacidade de se ligar simultaneamente a dois antígenos idênticos na superfície aumentando a força total de interação, que é chamada de avides. As cadeias pesada e leve são codificadas por diferentes sequências de DNA. Cada cadeia contém uma região variável distinta que representa a parte recombinante da molécula e que varia de anticorpo para anticorpo e também se liga ao antígeno. As imunoglobulinas podem ser funcionalmente divididas em dois domínios. O domínio Fab que abrange as regiões variáveis das cadeias pesada e leve, a região constante da cadeia leve e uma região constante da cadeia pesada. Na sua forma mais simples, um domínio Fab liga o antígeno, mas não ativa os mecanismos efetores. O domínio Fc, constituído por apenas regiões

constantes de cadeia pesada, ativa mecanismos efetores, permitindo a destruição do alvo. Além disso, as regiões constantes Fc diferem o isotipo e subclasse de anticorpos; (ABBAS, 2015).

FIGURA 3 - ESTRUTURA GERAL DAS IMUNOGLOBULINAS.



Fonte: (MURPHY, 2017)

Existem cinco isotipos diferentes de imunoglobulinas: Imunoglobulina M (IgM), Imunoglobulina G (IgG), Imunoglobulina E (IgE), Imunoglobulina A (IgA) e Imunoglobulina D (IgD). Suas características gerais são apresentadas no quadro 1.

QUADRO 1 - RESUMO DAS CLASSES DE IMUNOGLOBULINAS.

Imunoglobulina	Estrutura	Características
IgA Subclasses (IgA1 e IgA2)	Monomérica ou dimérica	Encontrada em mucosa responsável por neutralizar patógenos do trato intestinal, respiratório e urogenital. Raramente causam hemólise em reações transfusionais.
IgE	Monomérica	Relacionadas a processos alérgicos ou parasitários uma vez que estes anticorpos se ligam aos receptores Fc de mastócitos e induzir liberação de histamina quando encontram o antígeno.
IgD	Monomérica	Imunoglobulina de membrana. Faz parte do receptor de membrana de células B (BCR). Função ainda não esclarecida.
IgM	Monomérica ou pentamérica	Primeira a ser produzida pelas células B após ativação. Geralmente presente na corrente sanguínea e não nos tecidos devido a seu alto peso molecular. Podem interagir com sistema complemento.
IgG Subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4)	Monomérica	A mais abundante no plasma, são encontradas também nos espaços extracelulares de tecidos. Possui capacidade de atravessar a barreira placentária. Podem interagir com sistema complemento.

Fonte: Adaptado de ABBAS (2015).

Em geral, IgM e IgG podem causar hemólise em reações transfusionais como também em casos de anemia hemolítica autoimune. Cada isotipo de imunoglobulina difere no número de domínios Fab e Fc. O número de regiões Fab afeta a avidéz de ligação ao antígeno. Por exemplo, a IgM é um pentâmero, assim possui um total de 10 domínios Fab, resultantes de 5 unidades de imunoglobulinas idênticas que são conectadas por uma proteína adicional chamada proteína J e uma ligação dissulfeto. Dessa forma a molécula de IgM possui alta avidéz e ativa potentemente o sistema complemento (ROITT et al., 2013).

Os anticorpos IgG são divididos em quatro subclasses: IgG1 a IgG4. Cada subclasse tem uma região constante diferente, constituindo domínios Fc distintos. Cada domínio Fc tem uma capacidade diferencial de ativar, complementar ou interagir com os receptores Fc nos fagócitos. IgG1 e IgG3 geralmente são mais potentes a esse respeito, IgG2 ativa fracamente o complemento e IgG4 em grande parte carece de atividade efetora. Assim, pacientes com autoanticorpos de subclasse IgG4 não sofrem hemólise das hemácias. Em contraste, as subclasses de imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG3 podem ser causadoras de hemólise

(AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, 2020; YUNG; SEEBACH; BAERENZUNG; PENDERGRAST; CSERTI-GAZDEWICH; BRANCH, 2019)).

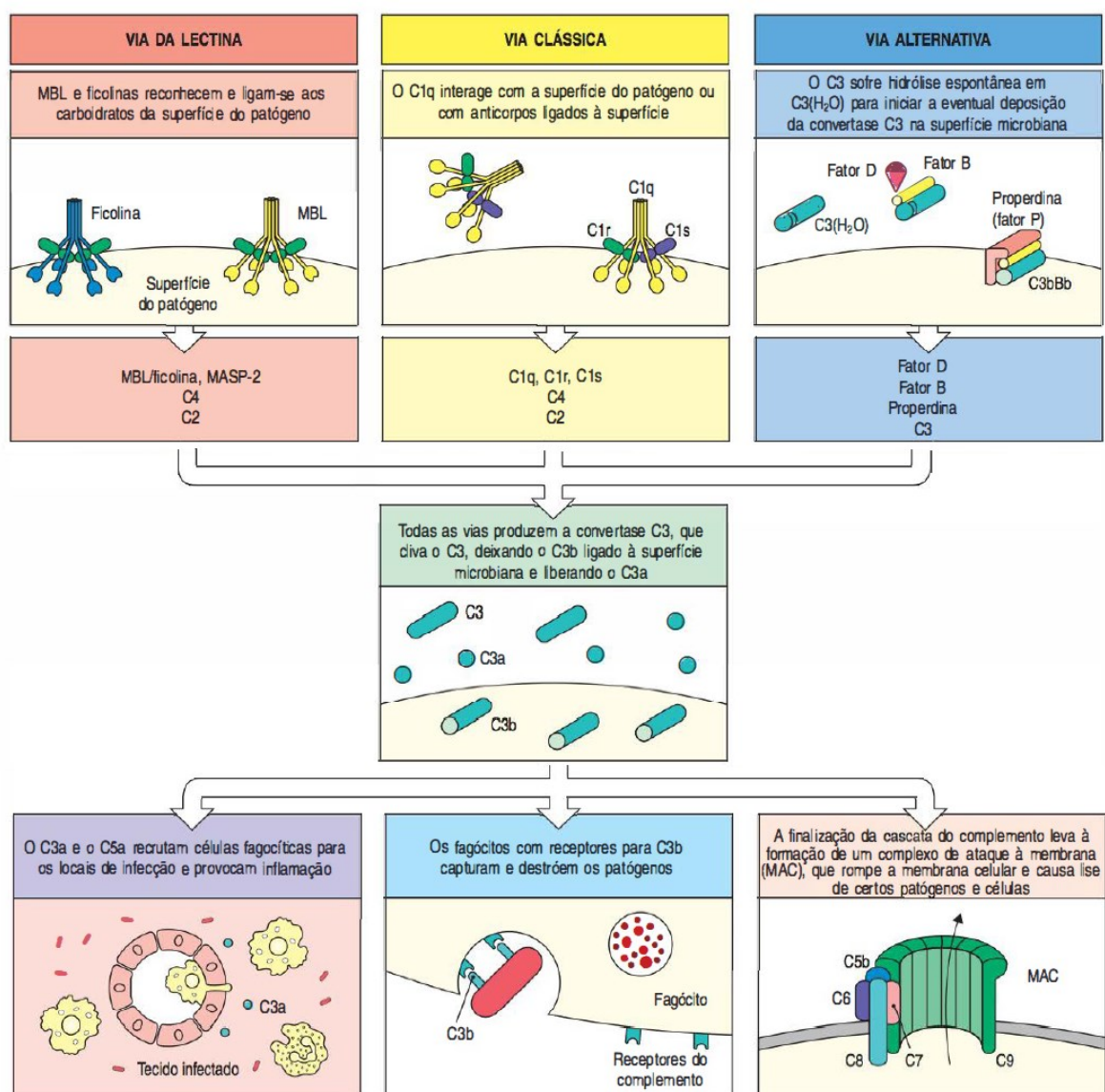
1.4 REAÇÕES TRANSFUSIONAIS HEMOLÍTICAS

Reações Transfusionais Hemolíticas (RTH) são a ocorrência de lise ou acelerado processo de remoção das hemácias em um receptor de sangue. Este processo é causado em geral, por incompatibilidade imunológica entre doador e receptor. As RTH podem ser classificadas em relação ao tempo de ocorrência que segue a transfusão ou o local de destruição das hemácias. A Reação Transfusional Hemolítica Aguda (RTHA) acontece dentro de 24 horas da transfusão. É considerada Reação Transfusional Hemolítica Tardia (RHTT), a reação que ocorre após 24 horas da transfusão, tipicamente 5 a 7 dias depois. Em geral RTHA é de ocorrência intravascular, enquanto que RHTT é extravascular (BRASIL, 2014; MASSEY; POOLE, 2009).

A hemólise é considerada intravascular quando as hemácias podem ser destruídas no interior dos vasos na circulação sanguínea através da ativação da cascata clássica do sistema complemento. Este sistema é caracterizado por um conjunto de mais de 30 proteínas plasmáticas solúveis presentes no sangue e em outros líquidos corporais, que são produzidos pelo fígado e na ausência de infecção circulam de forma inativa. Ele foi descoberto na década de 1890 por Jules Bordet como um componente termolábil do plasma normal que aumenta a opsonização e a morte de bactérias pelos anticorpos e, assim, essa atividade "complementa" as ações dos anticorpos. A opsonização refere-se ao revestimento do patógeno por anticorpos e/ou proteínas do sistema complemento, facilitando a captura e destruição pelas células fagocíticas. A via clássica deste sistema é ativada quando o componente C1, que é constituído por uma proteína de reconhecimento C1q, associada a proteases C1r e C1s, interage com os domínios Fc dos anticorpos ligados ao antígeno ou diretamente com a superfície do patógeno. Após esta interação ocorre a produção de uma enzima, a C3 convertase, que possui atividade de protease clivando o componente 3 do sistema complemento C3. A C3 convertase liga-se a superfície covalentemente, onde cliva C3 para produzir grandes quantidades de C3b, principal molécula efetora do sistema complemento e C3a, proteínas responsáveis por indução da anafilaxia. O C3b liga-se covalentemente à superfície do patógeno e age como uma opsonina, permitindo que os fagócitos que possuem receptores para as proteínas do sistema complemento capturem e destruam o microrganismo revestido com C3b. O C3b também pode se ligar à C3

convertase, originando outra enzima, a C5 convertase. Esta cliva a C5, liberando o peptídeo C5a e produzindo o C5b. O C5b interage com outro conjunto de proteínas do sistema complemento (C6 a C9) formando o complexo de ataque a membrana (MAC – *Membrane attack complex* ou Complexo de Ataque a Membrana). O MAC é uma estrutura em forma de tubo oco inserido na membrana da célula-alvo e que fornece um canal entre o interior de uma célula-alvo e seu ambiente externo, resultando em lise osmótica do alvo. A figura 4 ilustra este mecanismo (MURPHY, 2014).

FIGURA 4 - MECANISMO DE FORMAÇÃO DA MAC.



Fonte: (MURPHY, 2017).

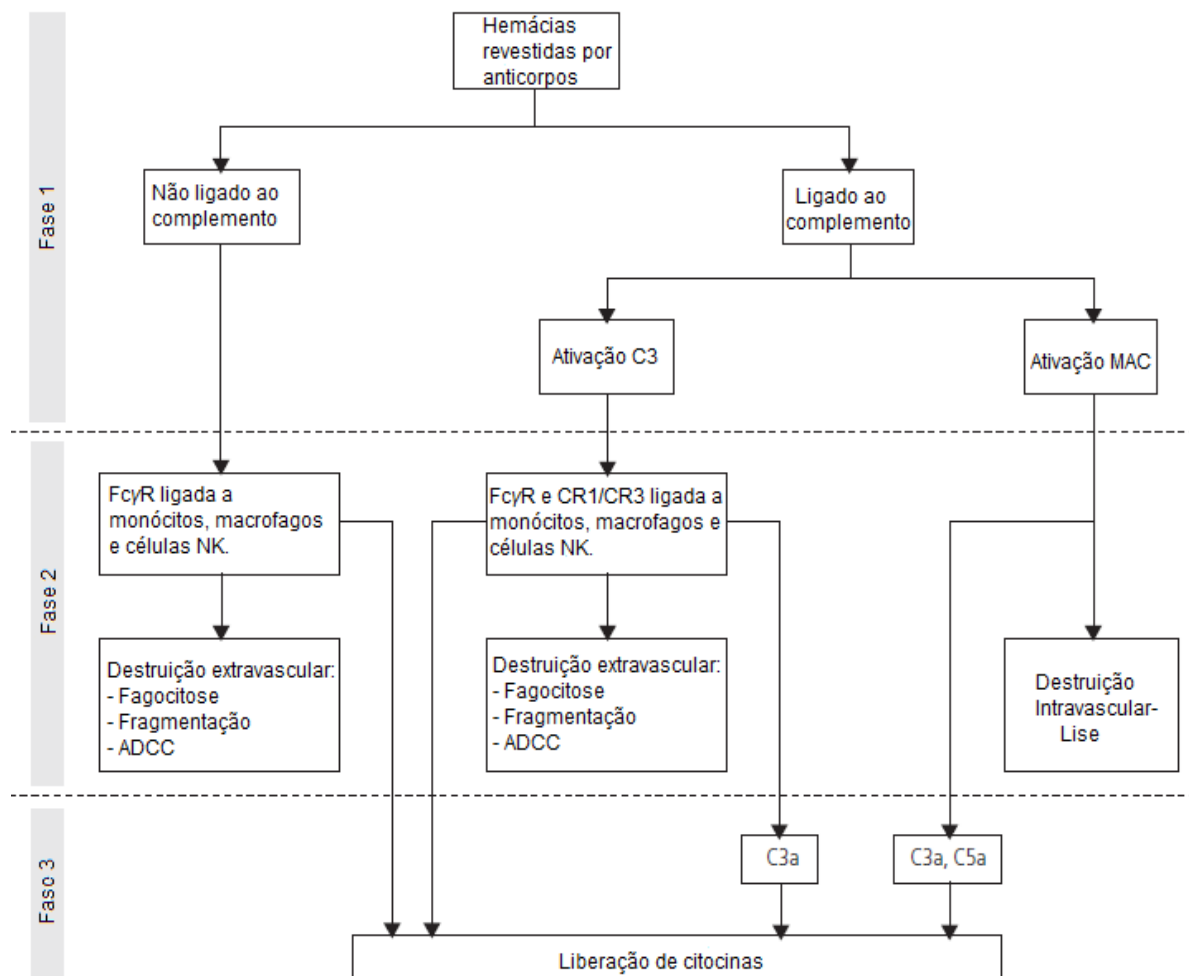
Os mecanismos efetores induzidos pela ligação de anticorpos têm efeitos diferentes em bactérias, vírus, partículas e vários tecidos humanos. Em geral, uma vez que um anticorpo IgG esteja ligado a um eritrócito, o eritrócito alvo pode sofrer fagocitose mediada por fagócitos. Se o anticorpo puder iniciar a ativação da cascata do sistema complemento, a deposição de C3b na superfície dos glóbulos vermelhos que facilita a fagocitose pelas células fagocíticas ao se ligar aos receptores do sistema complemento CR1 e CR1g ao mesmo tempo que se liga ao antígeno. Finalmente, se a ativação do sistema complemento estiver concluída, o MAC será inserido na membrana dos eritrócitos, causando lise osmótica. Ainda neste panorama, a destruição mediada pela ativação da cascata do sistema complemento não é comumente encontrada. Em casos de incompatibilidade do sistema ABO, anti-A e anti-B podem destruir hemácias *in vivo* através deste mecanismo, mas é uma via mais rara para outros aloanticorpos. Nos casos de transfusões incompatíveis de glóbulos vermelhos, o MAC é formado levando a lise celular. Este tipo de reação é normalmente causado por anticorpos IgM, que ativam o sistema complemento com eficiência, levando à rápida formação do MAC. Contudo este tipo de reação também pode ser induzida por anticorpos do tipo IgG₁, IgG₂ ou IgG₃. Este mecanismo acontece raramente nos casos de anemia hemolítica autoimune, hemoglobínúria paroxística fria, síndrome de aglutininas frias e anemia hemolítica induzida por drogas. A liberação do conteúdo de glóbulos vermelhos diretamente na circulação pode ser altamente tóxica graças a hemoglobina livre. Embora esta seja eliminada pela haptoglobina, esse sistema é facilmente sobrecarregado (GARRATTY, 1983; WHITLOCK, 2010).

A hemólise extravascular é um mecanismo pelo qual os eritrócitos são destruídos fora do espaço intravascular, predominantemente no baço e no fígado (ZIMRING, 2007; WHITLOCK, 2010). E este evento combina mecanismos celulares e humorais. Existem dois mecanismos celulares pelos quais este tipo de hemólise pode acontecer: Por meio de anticorpos do tipo IgG que se ligam ou não ao sistema complemento. Na via onde anticorpos IgG interagem diretamente com fagócitos através de seus receptores Fc sem a necessidade de ligação do complemento, as hemácias podem ser engolidas ou lisadas por enzimas lisossomais excretadas pelo monócito. Já no caso pela qual a hemólise é causada por anticorpos que se ligam ao sistema complemento, hemácias sensibilizadas por anticorpos, ativam a proteína C3 que cliva em subunidades C3b e iC3b e estas se ligam a dois receptores específicos do sistema complemento, CR1 e CR3, ambos expressos em células fagocíticas do tipo macrófagos e monócitos promovendo a liberação de C3a no plasma, proteína com função de anafilaxia (MASSEY;

POOLE, 2009). Segundo Flegel (2015), em ambos os mecanismos, a destruição dos eritrócitos pode acontecer através de:

- a) Fagocitose: as hemácias são englobadas por endocitose pelos macrófagos, forma-se um vacúolo em torno da célula, este se fundirá com um lisossomo que contém enzimas lisossomais, que degradará os eritrócitos, gerando fragmentos que serão liberados pela célula e metabolizados pelo organismo.
- b) Fragmentação: hemácias sensibilizadas são fagocitadas em parte, deixando uma porção fora do macrófago, esta porção se transforma em esferócito, que é muito rígido para atravessar a circulação esplênica e, portanto, é mais suscetível a destruição precoce.
- c) ADCC – Citotoxicidade mediada por Célula Dependente de Anticorpo. Esse processo é desencadeado quando o anticorpo ligado à superfície de uma célula interage com receptores Fc na célula Natural Killer - NK. As células NK, são células granulares não T e não B que expressam o receptor $Fc\gamma RIII$ (CD16) na sua superfície, o qual reconhece as subclasses IgG 1 e IgG3. Quando estas células encontram as célula-alvo revestidas com IgG, elas a eliminam por apoptose.

FIGURA 5 - ESQUEMA PATOFISIOLOGIA DE REAÇÃO TRANSFUSIONAL HEMOLÍTICA (HTR).



Fonte: (MASSEY; POOLE, 2009)

Citocinas são liberadas durante uma RTH como consequência da geração das anafilatoxinas C3a e C5a e da interação entre as porções Fc dos monócitos e as hemácias recobertas por IgG. Alguns efeitos biológicos das citocinas nas RTH são listados no quadro 2.

QUADRO 2 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS CITOCINAS.

Terminologia	Atividade Biológica
Citocinas pro inflamatórias	
TNF, IL-1	Febre, hipotensão, choque, morte, mobilização dos leucócitos da medula, ativação das células T e B, indução de citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , MCP), indução de moléculas de adesão.
IL-6	Febre, resposta proteica de fase aguda, produção de anticorpos pela célula B, ativação da célula T.
IL- 23	Estimula a secreção de IL-17.
IL-17	Estimula a secreção de IL-6 e IL-8 e aumenta a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)
Quimiocinas	
IL-8	Quimiotaxia de neutrófilos, linfócitos, ativação de neutrófilos, liberação de histamina dos basófilos
MCP-1	Quimiotaxia dos monócitos, indução de explosão respiratória, indução de moléculas de adesão, indução de IL-1.
Citocinas anti-inflamatórias	
IL- 1ra	Inibição competitiva dos receptores IL-1 tipo I e II.
IL-10	Inibe a proliferação de Linfócitos Th1 e produção de (IFN)- γ e IL-2. Ação inibitória das interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α e da quimocina MIP-1 α . Inibe a função de APC dos monócitos.

Fonte: Adaptado de Murphy (2017).

A Incompatibilidade ABO estimula a liberação de altas concentrações de TNF-a (Fator de Necrose Tumoral) no plasma, dentro de duas horas, seguido pelas quimiocinas IL-8 (interleucina) e MCP (Proteína quimiotática de monócitos). Na hemólise mediada por IgG, TNF-a é produzido em concentrações mais baixas juntamente com IL-1 e IL-6. A produção de IL-8 nesse caso segue um curso de tempo semelhante ao da incompatibilidade ABO. Ainda, a

hemólise mediada por IgG, diferente da incompatibilidade ABO, resulta na liberação do antagonista do receptor de IL-1, IL-1ra (MASSEY; POOLE, 2009).

1.5 TESTES PRÉ-TRANSFUSIONAIS

Testes pré-transfusionais são realizados para prevenir que hemocomponentes não compatíveis acabem sendo transfundidos gerando uma RTH. Os testes pré-transfusionais preconizados incluem: tipagem ABO, tipagem RhD, detecção de anticorpos (Pesquisa de Anticorpos Irregulares-PAI) e prova de compatibilidade. Estes testes demonstram *in vitro* interações dos antígenos eritrocitários com anticorpos gerando a presença ou a ausência de aglutinação dos eritrócitos, ou ainda hemólise (AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, 2020). A aglutinação é uma reação reversível que ocorre através da sensibilização da hemácia pela ligação dos anticorpos ao seu antígeno correspondente e subsequente formação de um botão de hemácias aglutinadas ligadas através de pontes de hidrogênio, forças eletrostáticas, Van der Waals e ligações hidrofóbicas (GIRELLO, 2016).

A detecção e a identificação de anticorpos irregulares, ou seja, anticorpos que não fazem parte do sistema ABO, é possível através de reagentes (figura 6) que são fabricados com hemácias que possuem uma conformação de antígenos previamente conhecida, levando em consideração a presença dos anticorpos que geralmente possuem significado clínico, conforme ilustrado no quadro 3.

FIGURA 6 - EXEMPLO DE REAGENTE DE HEMÁCIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS.

Cell	Rh-hr								MNS				Kell				P	Lewis		Duffy		Kidd		Others	Cell	Results
	D	C	E	c	e	f	C ^w	V	M	N	S	s	K	k	Kp ^a	Js ^a	P1	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b			37 C AHG
1	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	Bg(a+)	1	
2	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0		2	
3	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	+		3	
4	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0		4	
5	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+		5	
6	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+		6	
7	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0		7	
8	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+		8	
9	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+		9	
10	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+	Yt(b+)	10	
11	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+		11	
AC																								AC		

Fonte: (AMERICAN ASSOCIATION BLOOD BANKING, 2020)

QUADRO 3 - SIGNIFICADO CLÍNICO DE ALGUNS ALOANTICORPOS DOS SISTEMAS DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.

Geralmente clinicamente significativa	As vezes clinicamente significativa	Clinicamente insignificante se não reativo a 37°C	Geralmente clinicamente insignificante
A e B	AnWj	A1	Chido/Rogers
Diego	At ^a	H	Cost
Duffy	Colton	Le ^a	JMH
H no O _h	Cromer	Lutheran	HLA/Bg
Kell	Dombrock	M, N	Knops
Kidd	Gerbich	P1	Le ^b
P	Indian	Sd ^a	Xg ^a
PP1P ^k	Jr ^a		
Rh	Kx		
S, s, U	Lan		
Vel	Landsteiner-Wiener		
	Sciana		
	Yt ^a		

Fonte:(REID et al., 2012).

A seleção de hemocomponentes nos casos em que a pesquisa de anticorpos irregulares é negativa, considera rotineiramente a compatibilidade dos antígenos do sistema ABO e o antígeno RhD, contudo, não considera os outros sistemas de antígenos presentes no sangue, pois torna-se inviável, devido ao tempo disponível para o atendimento da solicitação, que é curto e precisa ser realizado com agilidade. Dessa forma, pode haver a ocorrência da aloimunização. Há exceções, onde esse posicionamento muda e são selecionados concentrados de hemácias considerando tanto o sistema ABO e o antígeno RhD, quanto outros antígenos de grupos sanguíneos, como medida profilática, evitando a sensibilização do receptor. Em geral, ocorre nos casos de indivíduos politransfundidos, que por conta de sua patologia necessitarão de transfusões recorrentes ou também quando o receptor desenvolveu uma especificidade de aloanticorpos. Essa medida é tomada para evitar que outros aloanticorpos contra outros antígenos se desenvolvam.

A sensibilização e subsequente aloimunização é um agravante, mas em primeiro momento não causa complicações ao paciente. É na recorrência e frequência das transfusões o

momento em que este agravante pode se tornar um problema crítico. Nesses casos, os serviços de transfusão têm que selecionar e transfundir eritrócitos sem os antígenos correspondentes aos aloanticorpos adquiridos. As investigações sobre aloimunização eritrocitária são realizadas, em geral, apenas antes de um novo evento transfusional; dessa forma, a presença de aloanticorpos pode não ser detectada por não haver novas indicações de transfusão ou simplesmente porque o título dos aloanticorpos diminuiu com o decorrer do tempo, havendo assim a perda de sensibilidade do teste, o que impossibilita a identificação da especificidade dos aloanticorpos. No entanto, caso futuramente seja necessária nova transfusão e o paciente receba o antígeno estranho para o qual já tenha sido sensibilizado, devido a memória imunológica, ele apresentará uma resposta imune secundária bem mais rápida que a anterior, podendo resultar em reação hemolítica grave. Esse tipo de situação pode ser evitado através da análise do histórico do paciente, contudo devido ao uso de serviços hemoterápicos de diferentes instituições, nem sempre há um acesso direto e completo das informações acerca dos pacientes (ALVES et al., 2012).

Os laboratórios de imuno-hematologia das diferentes instituições, detectam e determinam a especificidade dos aloanticorpos, avaliam seu significado clínico, e então selecionam concentrados de hemácias para realizar o teste de compatibilidade. A avaliação do significado clínico é obtida através da literatura e é um reflexo da prática clínica, uma vez que, é definido quando é frequentemente associado com Doença Hemolítica do Feto e Recém-Nascido (HDFN), HTR ou com notável diminuição da sobrevivência das hemácias transfundidas e subsequente queda da hemoglobina. Contudo, há alguns fatores que podem limitar as informações em relação ao significado clínico destes anticorpos, uma vez que não há garantia de que todos os casos que ocorrem sejam realmente publicados, por exemplo. Também deve-se considerar a variabilidade na forma como os aloanticorpos podem se comportar de indivíduo para indivíduo. O grau de significância varia entre anticorpos da mesma especificidade, sendo que alguns causam a destruição dos eritrócitos em horas ou até minutos, enquanto outros podem causar uma diminuição na sobrevivência eritrocitária por apenas alguns dias, como podem também não reduzirem esse tempo de sobrevivência. Dentre a classificação, são considerados potencialmente significantes os aloanticorpos que reagem na etapa do teste de antiglobulina indireto a 37°C, e os que reagem em temperatura ambiente ou abaixo (aloanticorpos frios) geralmente não são clinicamente significativos, porém como citado anteriormente, há exceções no comportamento destes, que podem acontecer apesar de não terem sido notificadas (AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, 2020).

Aloanticorpos eritrocitários clinicamente significantes se desenvolvem em mais de 30% dos pacientes que recebem múltiplas transfusões, o que pode ser um agravante no caso de terapia transfusional de longa duração (CRUZ et al., 2011). Pacientes politransfundidos tem alta probabilidade de formar aloanticorpos eritrocitários isolados ou em combinação com autoanticorpos ou até mesmo a outras especificidades de aloanticorpos. Quando há o desenvolvimento de aloanticorpos contra antígenos de baixa frequência populacional, há uma maior disponibilidade de hemocomponentes antígeno negativo disponíveis no estoque, o que facilita o processo pela busca de bolsas compatíveis. Entretanto, quando os aloanticorpos desenvolvidos são contra antígenos de alta frequência populacional ou ainda contra certas combinações de antígenos, para que a transfusão possa acontecer, será necessário o uso de sangue raro, e nesse panorama encontrar bolsas compatíveis pode demandar tempo e não ser nada fácil.

1.6 SANGUE RARO

São considerados doadores de sangue raro, indivíduos que não possuem a presença de antígenos de alta frequência, ou ainda que apresentam uma combinação de diferentes antígenos específicos negativos. Esse conceito, varia de acordo com a região geográfica onde determinada população se localiza, uma vez que, a raridade é determinada pela frequência com que um fenótipo é expresso pela população. Assim, o que pode ser raro no Japão, pode não ser raro na Europa. No Brasil devido a miscigenação, o cenário é bem diferenciado (SCHORNER, 2015). Segundo nota informativa Nº 8/2019-CGSH/DAET/SAS/MS atualmente é existente o Cadastro Nacional de Sangue Raro (CNSR), um banco de dados centralizado, que conta com informações do quantitativo de doadores raros cadastrados nos hemocentros públicos do país, facilitando a busca e aumentando as chances de se encontrar doador compatível nesses casos. De modo geral, quando identificado um paciente necessitando de transfusão de um tipo sanguíneo considerado raro, o serviço de hemoterapia solicita para a Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH) a consulta ao CNSR, por intermédio do Hemocentro Coordenador do estado, para verificar se existe no Brasil doador compatível cadastrado. Após a identificação do doador no CNSR, esta informação é transmitida ao Hemocentro Coordenador do estado, ao qual cabe informar ao serviço de hemoterapia solicitante. Ressalta-se que os doadores são convocados para doação de sangue pelo próprio serviço de hemoterapia ao qual ele se encontra cadastrado. Em se efetivando a coleta do sangue, a bolsa é transportada até o serviço de hemoterapia que

dá suporte ao serviço de saúde no qual o paciente receberá o tratamento. Essa é uma alternativa que melhora a agilidade em todo o processo pela busca de sangue compatível nestes casos especiais, contudo, o tempo ainda pode ser um inimigo, dado que, dependendo da clínica do paciente o aguardo pode não ser uma opção, podendo até mesmo ser fatal.

1.7 MONOCYTE MONOLAYER ASSAY

O ensaio MMA (Ensaio de Monocamada de Monócitos/ Monocyte Monolayer Assay) é uma simulação *in vitro* do comportamento dos anticorpos, demonstrando assim as reações que ocorreriam no sistema retículo endotelial após uma transfusão de hemácias incompatíveis. O teste utiliza monócitos primários e as hemácias do doador opsonizadas pelos anticorpos do receptor, afim de avaliar se haverá fagocitose ou não destes eritrócitos sensibilizados. Desta forma é capaz de determinar o significado clínico dos anticorpos. Pode ser aplicado tanto nos casos de receptores que possuam aloanticorpos contra antígenos de alta frequência populacional, como também quando há a presença de múltiplos aloanticorpos e em circunstâncias onde devido a limitação técnica, não se consegue definir a especificidade destes aloanticorpos. Ainda, é possível utilizar esse ensaio em pacientes com Anemia Hemolítica Autoimune (AHAI), Anemia Hemolítica Induzida por Drogas (AIHA) e HDFN (CONRADO et al., 2017; GARRATTY, 1990).

Os resultados dos testes MMA, são assertivos em avaliar os riscos de uma reação transfusional hemolítica tardia. O teste MMA representa a melhor ferramenta de análise de risco quando unidades de hemocomponentes compatíveis não estão disponíveis para transfusão. Nessas situações pode-se confiar apenas nos relatos da literatura e na experiência clínica prévia, ou além disso, realizar este teste afim de complementar toda a análise da decisão de transfusão de sangue incompatível. Esta técnica é usada em vários locais a mais de 35 anos para determinar o potencial hemolítico dos anticorpos (TONG et al., 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Neste cenário anteriormente comentado, observa-se que há uma lacuna no que diz respeito a atender a demanda de solicitação de sangue nos casos urgentes, em que não há bolsa compatível disponível. Dependendo da situação, por exemplo, quando há a necessidade de uso de sangue raro, mesmo que haja o Cadastro Nacional de Sangue Raro como alternativa para

solucionar a questão, há limitações envolvidas, afinal esse processo depende de tempo, ao qual o paciente não pode aguardar. Outro exemplo é o do quadro laboratorial dos pacientes com Anemia Hemolítica Autoimune. Os achados imuno-hematológicos desses casos cursam com a presença de autoanticorpos que podem ser frios, quentes ou uma mistura dos dois tipos. Estes autoanticorpos interferem fortemente nas análises, mascarando resultados de testes pré-transfusionais como a prova de compatibilidade, que costuma apresentar-se incompatível. Dentro desta circunstância, devido a limitação das técnicas imuno-hematológicas, não é possível assegurar que esta incompatibilidade se deva apenas pela presença dos autoanticorpos, e isso gera insegurança para que a transfusão ocorra.

O ensaio MMA vem como uma alternativa, uma ferramenta adicional que pode auxiliar no momento decisivo de realizar transfusões de concentrados de hemácias incompatíveis, com uma margem de segurança, uma vez que testa *in vitro* a capacidade hemolítica dos aloanticorpos e avalia a probabilidade do acontecimento ou não de uma Reação Transfusional Hemolítica. Em outras palavras, este ensaio torna possível transfundir bolsas incompatíveis, proporcionando um nível de segurança tanto para as equipes médicas, quanto para quem receberá esse sangue.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Validar a técnica MMA, verificando se o ensaio satisfaz os requisitos especificados e são adequados para uso pretendido.

3.2 ESPECÍFICOS

a) Garantir que o ensaio MMA, atende aos critérios da resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", avaliando a seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão.

b) Avaliar se o ensaio MMA, é eficaz em prever a capacidade hemolítica dos aloanticorpos.

c) Apresentar o custo por teste, avaliando se a implantação é economicamente viável a instituição.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo quantitativo-qualitativo de natureza descritiva, realizado no laboratório de Imuno-hematologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC) de Florianópolis. Aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo Seres Humanos da instituição sob o número 18198119.1.0000.0121. Os dados coletados bem como as amostras, foram utilizados de forma anônima, sem revelar a identidade dos indivíduos. Dessa forma não se fez necessário o emprego do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram utilizadas 90 amostras de pacientes aloimunizados, atendidos pelo laboratório de imuno-hematologia. Para seleção das amostras, como fator de inclusão, foram considerados os casos com PAI (Pesquisa de Anticorpos Irregulares) positiva, que possuísem aloanticorpos ou autoanticorpos quentes identificados através do teste de Painel de Hemácias, sem restrição de idade e sexo. Estando excluídos, casos de amostras que apresentaram PAI positiva e autoanticorpos frios identificados através do Painel de hemácias.

Em primeiro momento foi realizado o teste MMA das 90 amostras aleatoriamente. Devido ao fato de nem todas as amostras possuírem resultado positivo foi utilizado este número superior ao previsto no cálculo amostral. Após a obtenção destes resultados foram aplicados os testes preconizados pela RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, afim de validar o ensaio.

4.2 DESCRIÇÃO DO CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

O Índice Monocitário (MI) que resulta do ensaio MMA, varia entre zero e 100%, com média em torno de 20% (CONRADO et al., 2017, GARRATTY, 2004) e uma distribuição assimétrica que pode ser aproximada com distribuição normal na escala logarítmica. Nesta escala, a média é -01.61 e a amplitude entre -15 e zero, com desvio padrão (DP) de 2.50.

Sem os testes MMA, o rastreamento de rotina por tipagem ABO, RHD e por PAI reduz o risco de Reação Transfusional Hemolítica (HTR), mas não o elimina, particularmente em pacientes politransfundidos. Contudo, na prática transfusional este risco é tratado como não existente, o que leva a principal pergunta da pesquisa: “Qual o potencial dos testes MMA para reduzir o risco de HTR? ” Sendo MI a principal forma de medir o risco, a pergunta se traduz

em redução do risco de HTR após aplicação dos testes MMA. MI de 5% ou maior indica uma elevação clinicamente significativa do risco, logo o tamanho da amostra deve considerar como tamanho de efeito a diferença entre a média e este valor na escala logarítmica, com DP de 2.5 na mesma escala, o poder estatístico de 80% (erro tipo II ou beta de 20%) e o erro tipo I (alfa) de 5%. O programa estatístico Stata, versão 12.0, foi utilizado para calcular o tamanho de amostra de no mínimo 26 pacientes.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O ensaio avaliado é o MMA (Monocyte Monolayer Assay), descrito a seguir em três etapas que ocorrem paralelamente.

4.3.1 Isolamento de monócitos

Inicialmente, é necessário realizar a separação dos monócitos que é feita através de uma alíquota de 60 a 80 de uma bolsa de sangue total de doador saudável, coletada recentemente e sem passar por processo de refrigeração. A seguir, deve-se abrir a alíquota e despejar seu conteúdo em tubos falcon de 15 mL. Realiza-se a centrifugação destes tubos a 1800-1500 rpm por 10 minutos para separar o plasma rico em plaquetas. Após centrifugação, com uma pipeta, retira-se o plasma deixando um volume de 1 ml acima da cama limítrofe entre plasma e hemácias. Ressuspende-se estas células com solução tampão PBS (Ph: 7.4). Reserva-se esta suspensão. Após distribui-se 5ml de um líquido de gradiente de densidade (Histopaque® 1077 Sigma) em tubos falcon de 15 ml conforme necessidade (cerca de 6 tubos). A suspensão de células preparadas anteriormente, é despejada cuidadosamente com uma pipeta pasteur, nos tubos contendo Histopaque®. Estes tubos são levados a centrifugação durante 1 hora a 1500 rpm 20°C. Decorrido este tempo, obtém-se uma separação das células dentro dos tubos em camadas, assim a camada *buffy coat* (exemplificada na figura 7) é retirada com uma pipeta pasteur e colocada em um novo tubo falcon de 15 mL, para realizar a lavagem destas células. São lavadas de 2 a 3 vezes com solução tampão PBS (Ph: 7.4) (centrifugações de 10 minutos 1800 rpm 20°C). Ressuspende-se o botão de células obtidos com 6 ml de meio de cultura (RPMI 1640 Gibco®). Reserva-se. Preparar uma placa de cultura (12 poços de fundo chato) colocando 1 lamínula circular (13mm) em cada poço para cada reação. Sempre deverá haver 1 poço para controle positivo e 1 para controle negativo além dos poços teste. A suspensão de células da

buffy coat é distribuída com uma pipeta pasteur nos poços das placas de cultura anteriormente preparadas. A placa é incubada durante 1 hora a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, para os monócitos realizarem aderência as lamínulas. Após 1 hora de incubação, retira-se a placa da estufa e realiza-se cerca de 3 lavagens dos poços através de uma pipeta pasteur com solução tampão PBS (pH: 7,4), retirando assim os monócitos não aderentes.

4.3.2 Adsorção de hemácias

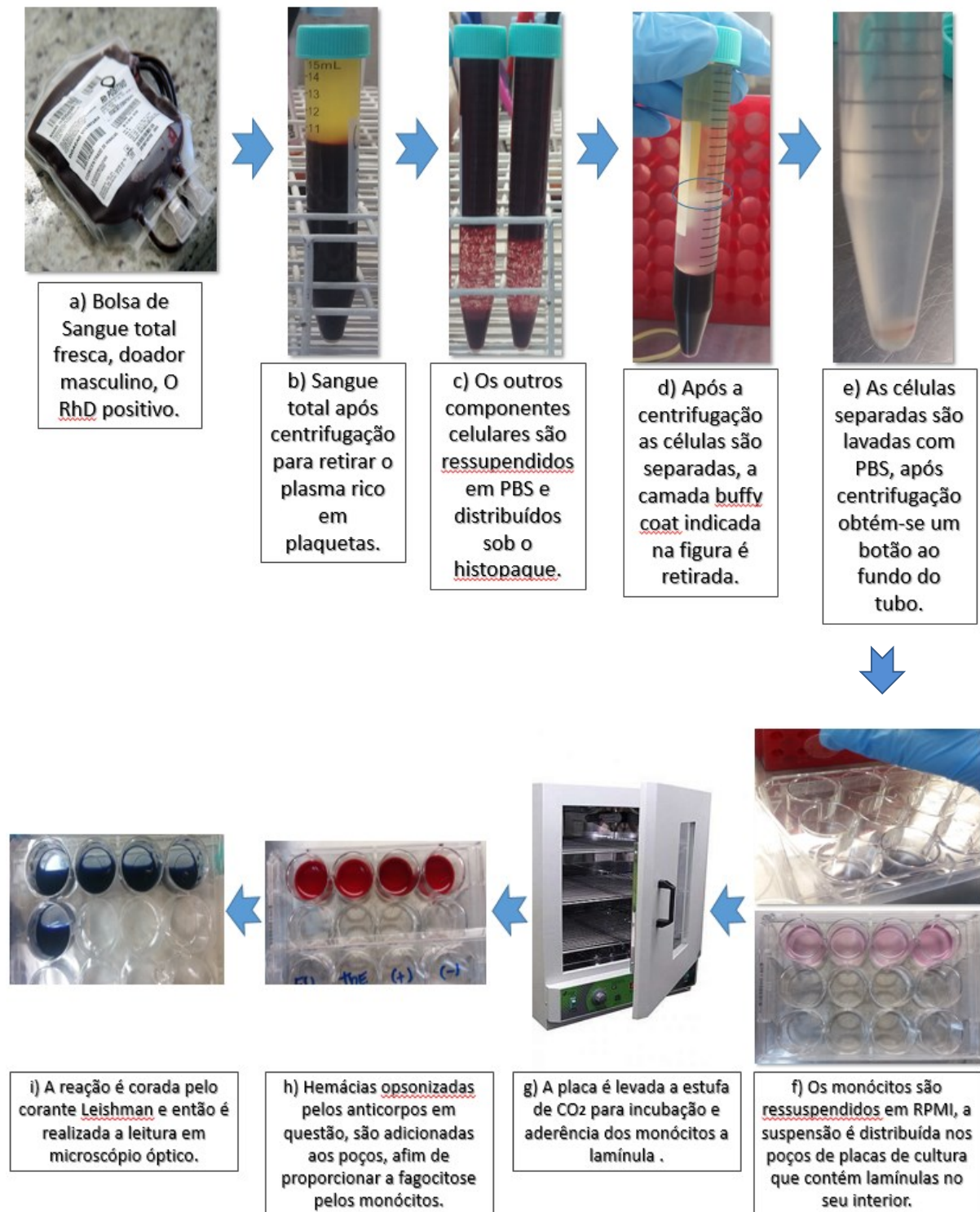
Enquanto isso, as hemácias de uma bolsa selecionada e previamente compatibilizada para o receptor, são sensibilizadas com o soro ou plasma do mesmo. São realizadas 3 lavagens destas hemácias com solução tampão PBS (pH: 7,4) (centrifugações de 60 segundos a 3400 rpm). Paralelamente, são separadas e lavadas as mesmas hemácias não sensibilizadas usadas anteriormente, para uso como controle negativo e hemácias comerciais já sensibilizadas Controcel®, como controle positivo. Preparar uma reação de adsorção com as hemácias anteriormente preparadas e o soro ou plasma do receptor na proporção (1:2), incubar durante 1 hora a 37°C em banho-maria. São realizadas 3 lavagens destas hemácias com solução tampão PBS (pH: 7,4) (centrifugações de 60 segundos a 3400 rpm). Depois da última lavagem, uma alíquota destes eritrócitos é coletada e é realizado o teste da antiglobulina direto (TAD). Espera-se resultado positivo da reação caracterizado pelo aparecimento de aglutinação eritrocitária, para garantir que houve sensibilização das hemácias. Às hemácias lavadas, é adicionado soro fresco do tipo sanguíneo AB de doador de sangue na proporção (1:2), a reação é incubada por 15 minutos a 37°C. Passado este tempo, a reação é lavada novamente por 3 vezes como realizado anteriormente e os eritrócitos sensibilizados são reconstituídos em meio de cultura (RPMI 1640 Gibco®) na proporção (1:4). Reserva-se esta suspensão para a próxima etapa.

4.3.3 Fagocitose

Finalizado o tempo de incubação da suspensão de monócitos na estufa, e realizadas as lavagens, adiciona-se a suspensão de hemácias sensibilizadas nos poços da placa que é incubada por mais 1 hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após retirar a placa da estufa, lavar cada poço 3 vezes através de uma pipeta pasteur com solução tampão PBS (pH:7,4) removendo assim as células não aderentes. A lamínula nos poços é então corada por corante hematológico Leishman (LEISHMANN-CORANTE HEMATOLÓGICO 0,2% - Laborclin)

conforme especificações do fabricante. A lamínula é retirada de cada um dos poços e colocada sob uma lâmina para que a leitura seja realizada através de microscópio óptico. As principais etapas de todo o procedimento estão ilustradas na figura 7.

FIGURA 7 - ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DO TESTE MMA.



A reação em lâmina/lamínula é examinada em microscópio para encontrar o Índice Monocitário (MI) que avalia a relevância clínica dos aloanticorpos. O MI é calculado através da seguinte fórmula (NOUMSI et al.,2015).

$$MI = \frac{n^{\circ} \text{ hemácias fagocitadas}}{n^{\circ} \text{ total de monócitos}} \cdot 100$$

O MI é interpretado através dos parâmetros descritos em estudos anteriores conforme quadro 4, onde foram obtidos os seguintes resultados de significância clínica através da interpretação do Índice Monocitário quando hemácias incompatíveis foram transfundidas.

QUADRO 4 - INTERPRETAÇÃO DO ÍNDICE MONOCITÁRIO.

Índice de Monócitos (MI)	Reação clínica
Menor ou igual a 5%	Associado a anticorpos clinicamente não significantes. Baixo risco de hemólise e reação transfusional.
De 5,1% a 20%	Associado a anticorpos clinicamente significantes. 33% dos pacientes tiveram sinais clínicos de reação transfusional.
Maior ou igual a 20%	Associado a anticorpos clinicamente significantes. 64% dos pacientes tiveram sinais clínicos de reação transfusional.

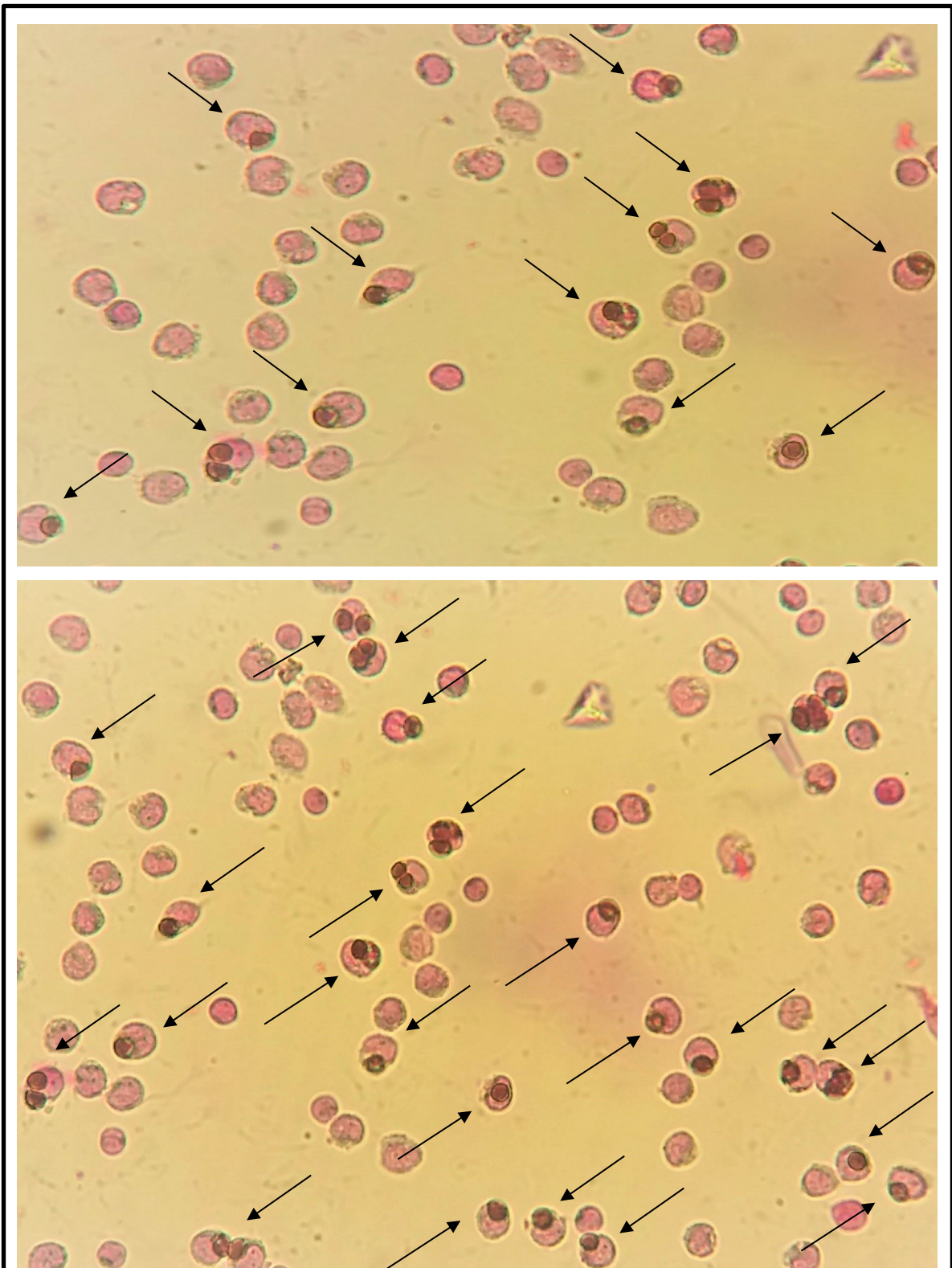
FONTE: (ARNDT; GARRATTY, 2004; CONRADO ET AL, 2017)

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Após o fim da reação, as lamínulas circulares foram coradas por corante Leishman de acordo com as orientações do fabricante e posicionadas sobre lâmina para possibilitar a leitura em microscópio em aumento de 40x. As amostras foram avaliadas por um microscopista. Como padrão, em cada lamínula foram contados 200 monócitos, dentre estes, foram contados o número de monócitos que realizaram fagocitose de hemácias, para então realizar o cálculo do MI conforme apresentado anteriormente.

As leituras das reações eram iniciadas pela leitura dos controles positivo e negativo. Após constatação de que os controles estavam dentro dos parâmetros aceitáveis, ou seja, controle positivo com MI maior que 5,1% e controle negativo com MI menor ou igual a 5%, seguia-se a análise das amostras. Microscopicamente foram considerados monócitos que realizaram a fagocitose, aqueles que possuísssem hemácias dentro de seu limite citoplasmático, conforme apresenta a figura 8.

FIGURA 8 - EXEMPLOS DE MONÓCITOS QUE REALIZARAM FAGOCITOSE DE HEMÁCIAS.



Fonte: Kahl, 2020.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para apresentar o desempenho do método MMA foi necessário realizar cálculos de alguns parâmetros segundo RE nº899, de 29 de maio de 2003 durante o processo de validação, onde foi aplicado o DOQ-CGCRE-008/ RE 899, 29 de maio 2003 ANVISA (INMETRO, 2016) para realizar as análises. Em todos os testes estatísticos empregados foi considerado o nível de confiança de 5%; deste modo foram consideradas associações estatisticamente significantes aquelas as quais o valor de p foi inferior a 0,05.

4.5.1 Seletividade

A seletividade avalia o efeito de interferentes na matriz da amostra que pode conter componentes que prejudicam o desempenho da medição, aumentando ou reduzindo o sinal do analito. Dessa forma, no estudo de seletividade é verificada a existência de efeito matriz. O estudo de efeito matriz pode ser conduzido de diversas formas dependendo do material disponível. No caso da presente validação, foram preparados dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem. Ambos os grupos com a mesma concentração para cada nível (baixa, média e alta). Foram considerados como interferentes da matriz amostras que possuíam aloanticorpos de mais de uma especificidade. Para avaliar a homogeneidade das variâncias foi utilizado um teste f (Snedecor) e para comparação das médias por nível de concentração um teste t (Student).

4.5.2 Linearidade

A linearidade de um método demonstra a sua habilidade em obter resultados proporcionais a concentração do analito na amostra. Isto ocorre dentro de um dado intervalo entre a menor e a maior concentração, denominado faixa linear de trabalho. Para construir a faixa linear de trabalho, primeiramente foram testadas cinco amostras em cinco diferentes concentrações. Então, visualmente a faixa de trabalho foi selecionada. Foram plotadas as concentrações em título dos aloanticorpos no eixo x e no eixo y os resultados de MI do teste MMA em porcentagem em um gráfico. Após, foram testadas três replicatas de cada nível de

concentração, plotadas também no gráfico, para confirmar a linearidade da faixa de trabalho selecionada.

A análise da presença de valores aberrantes (*outliers*) foi feita pela construção de gráficos de amplitude interquartil através da estimativa da variabilidade, calculando limite superior e inferior. A homocedasticidade dos dados foi calculada através do teste de Levene. Foi aplicada uma regressão linear simples através do método dos mínimos quadrados ordinários, para avaliar o modelo. Ainda foi aplicado o teste de Durbin-Watson para avaliar a auto correlação dos resíduos.

4.5.3 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) de um procedimento analítico é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Foi determinado através da estimativa pelo desvio padrão do branco pela seguinte equação:

$$LD = X + t_{(n-1,1-a)} \cdot s$$

X: Média dos valores dos brancos das amostras.

t: Abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança.

s: desvio padrão amostral dos brancos das amostras.

4.5.4 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. O LQ foi determinado a partir do LD através da equação:

$$LQ = LD \cdot 3,3$$

4.5.5 Exatidão

No presente estudo foi realizada uma comparação entre a técnica avaliada e método de referência validado. Neste caso, foi realizada a comparação com a mesma técnica já validada

e utilizada no laboratório de Imuno-hematologia da Fundação Pró-Sangue. Foram testadas 5 amostras representativas em toda a faixa de concentração, tanto pelo laboratório de Imuno-hematologia do HEMOSC, quanto pelo laboratório da Fundação Pró-Sangue. O objetivo foi avaliar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois serviços em laboratórios diferentes, dentro das mesmas condições de trabalho, com as mesmas amostras. Para realizar a análise destes resultados, foram utilizados, o teste F para avaliar se as variâncias são estatisticamente iguais e o teste t Student para verificar se as médias dos resultados dos dois métodos podem ser consideradas estatisticamente iguais.

4.5.6 Precisão

Este parâmetro foi definido através da análise da Repetibilidade e é a condição de medição num conjunto de condições as quais incluem o mesmo procedimento de medição, mesmos operadores, mesma condição de operação e o mesmo local durante um período curto de tempo. Assim, foram realizadas 5 corridas com 5 replicatas em 5 diferentes concentrações. A precisão é estabelecida através do Coeficiente de Variação (CV) que se dá através da equação:

$$CV = \frac{s}{X} \cdot 100$$

s: desvio padrão das replicatas.

X: valor médio das replicatas

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE

Os resultados obtidos do estudo de efeito matriz por nível de concentração encontram-se na tabela 1.

TABELA 1 - RESULTADOS DO ESTUDO DE EFEITO MATRIZ.

Curva MI (%)								
Sem efeito matriz			Com efeito matriz			p-valor		
Título	MI 1	MI 2	MI 3	MI 1	MI 2	MI 3	Teste F	Teste t
64	10,5	11	12	12	11	13	0,74	0,16
256	29,5	30	29	27,5	28	29,5	0,37	0,08
2048	27,5	26,5	27	26,5	27	28	0,60	0,38

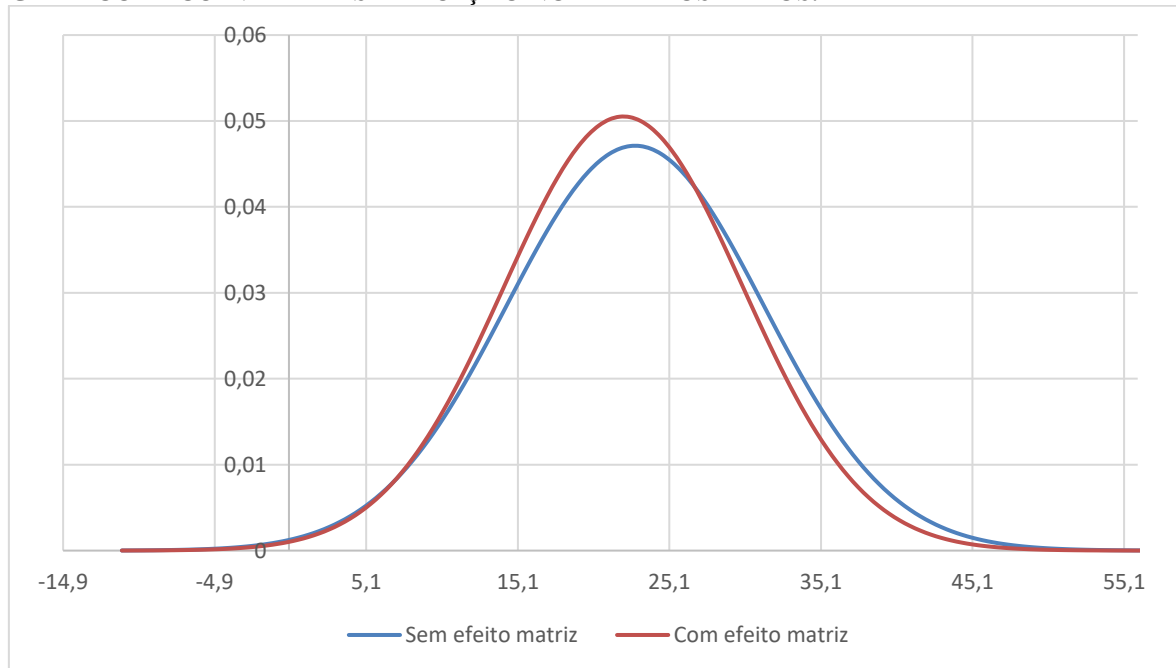
O teste F (Snedecor) de homogeneidade das variâncias, por nível de concentração, apresentou valores de p acima de 0,05, ou seja, não foram estatisticamente significativos. Desta forma, segundo Documento Orientativo DOQ-CGCRE-008/ RE 899, 29 de maio 2003 ANVISA (INMETRO, 2016), se o teste F não for significativo, a matriz não causa efeito sobre a precisão por nível de concentração.

O teste t (Student) de comparação de médias, por nível de concentração, apresentou valores de p acima de 0,05, os quais não foram estatisticamente significantes. Assim, ainda segundo Documento Orientativo DOQ-CGCRE-008/ RE 899, 29 de maio 2003 ANVISA (INMETRO, 2016), se o teste t (Student), não for significativo, a matriz não causa efeito sobre o resultado por nível de concentração. Cabe ressaltar que para realização do teste t, foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, para isso realizou-se o teste de Shapiro-Wilk, conforme apresentado na tabela 2.

TABELA 2 - RESULTADOS DO TESTE DE SHAPIRO-WILK

Shapiro Wilk	Título: 64	Título: 256	Título: 2048
Tamanho da amostra	6	6	6
Média	11,67	28,55	30,55
Desvio padrão	1,21	1,06	2,99
W	0,91	0,83	0,88
p-valor	0,42	0,12	0,31

Com valores de p superiores 0,05, o teste demonstrou que os resultados obtidos seguiram uma distribuição normal. Assim, os dados atenderam as exigências e foram aprovados no teste de seletividade. A curva de distribuição normal dos dados representada no gráfico 1.

GRÁFICO 1 - CURVA DE DISTRIBUIÇÃO NORMAL DOS DADOS.

5.2 AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE

A análise de outliers por nível de concentração foi realizada através dos gráficos de amplitude interquartil e box plot e não detectou valores aberrantes conforme ilustrado nos gráficos 2 e 3.

GRÁFICO 2 - AMPLITUDE INTERQUARTIL.

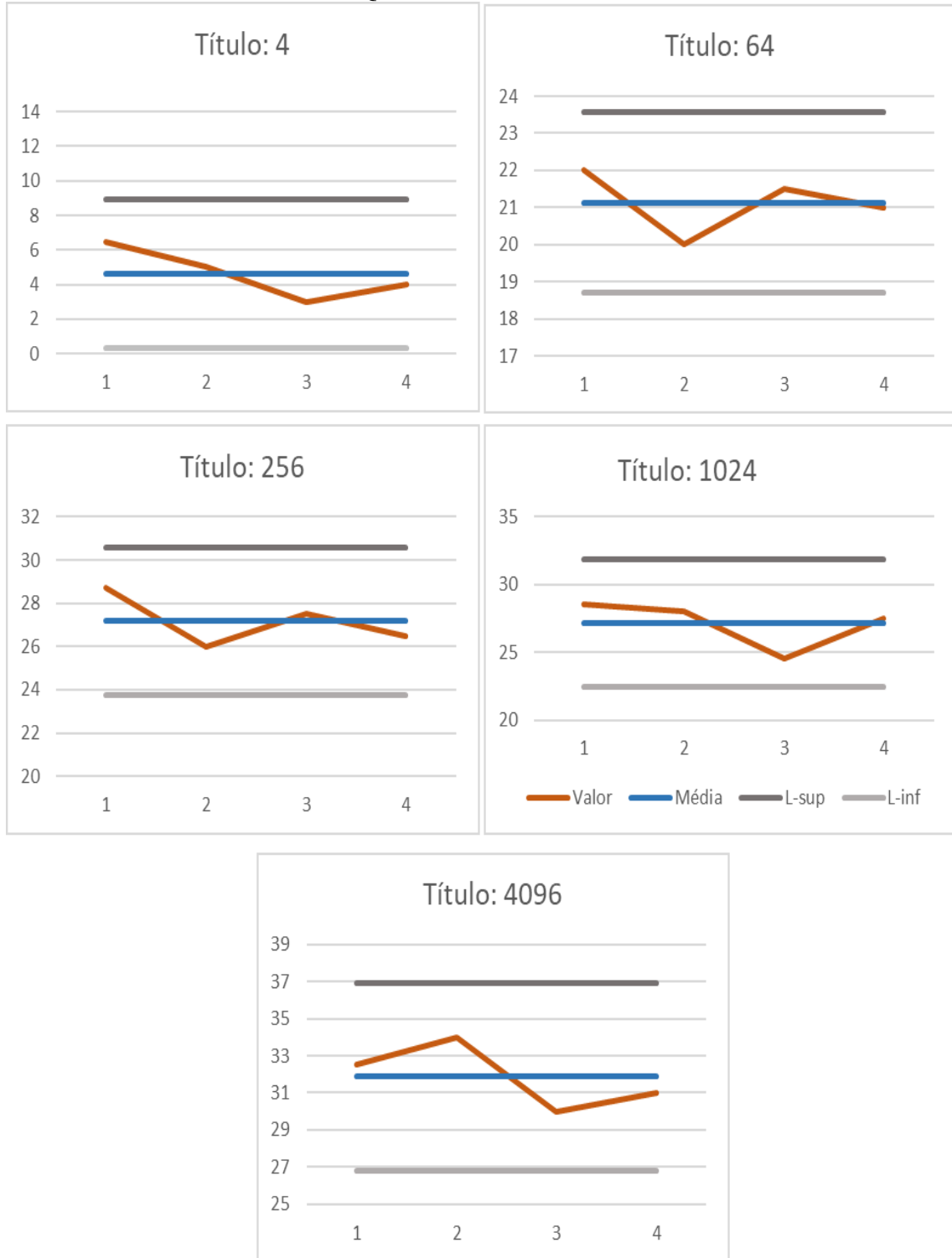
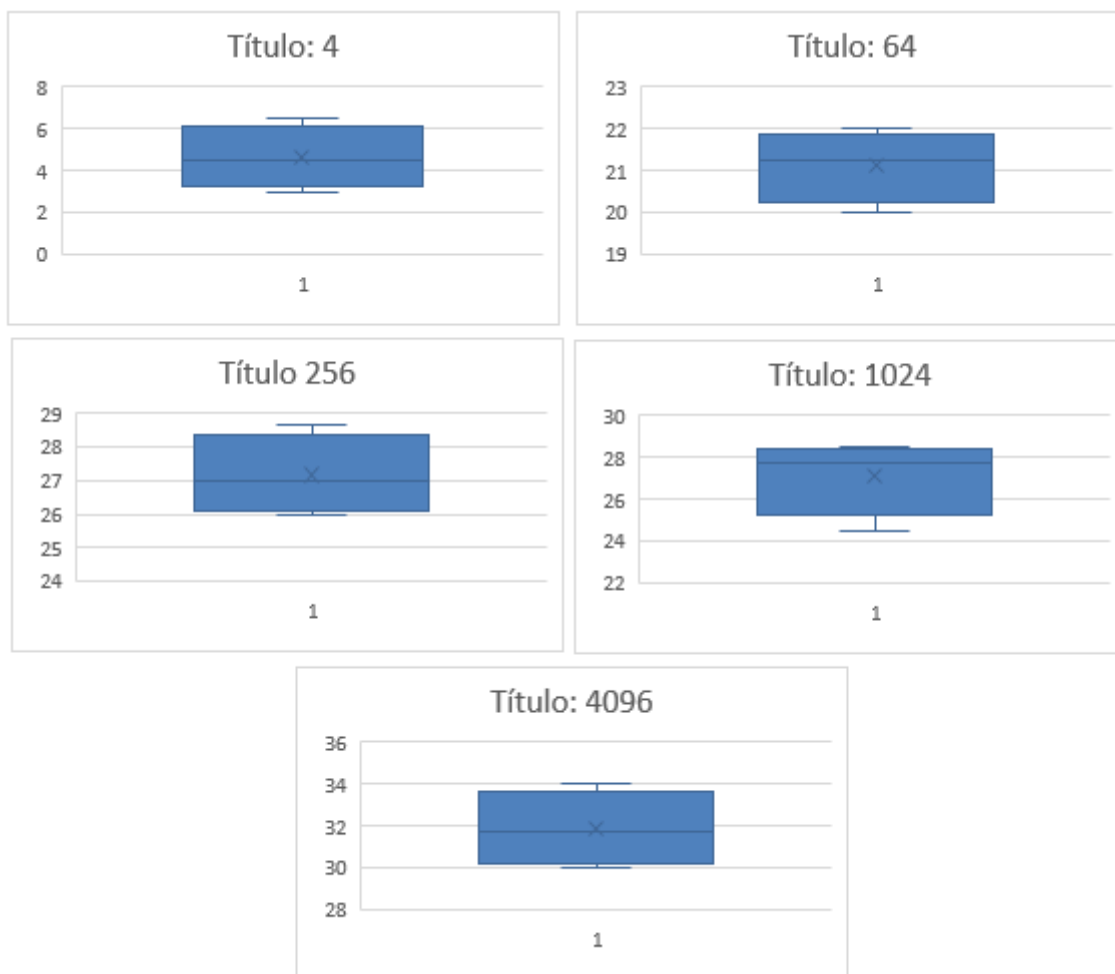


GRÁFICO 3 - BOX PLOT.

Foi avaliada também a homocedasticidade dos dados através do teste de Levene, que mostrou dados homogêneos, onde o F calculado foi menor que F tabelado, conforme ilustra a tabela 3.

TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE DE LEVENE

	F calculado	F tabelado
MI	0,746	3,056

F tabelado para $\alpha= 5\%$, segundo o número de graus de liberdade do numerador (4) e do denominador (15).

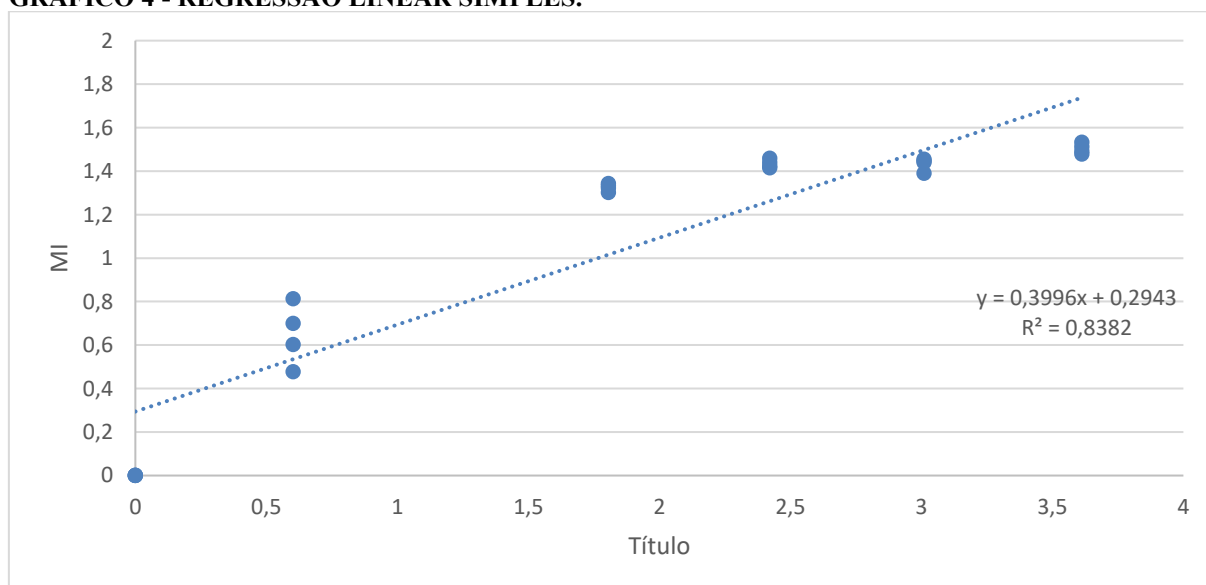
Com os resultados aprovados nos testes anteriores, prosseguiu-se a regressão linear conforme ilustrados na tabela 4 e gráfico 4.

TABELA 4 - RESULTADOS DA REGRESSÃO LINEAR SIMPLES.

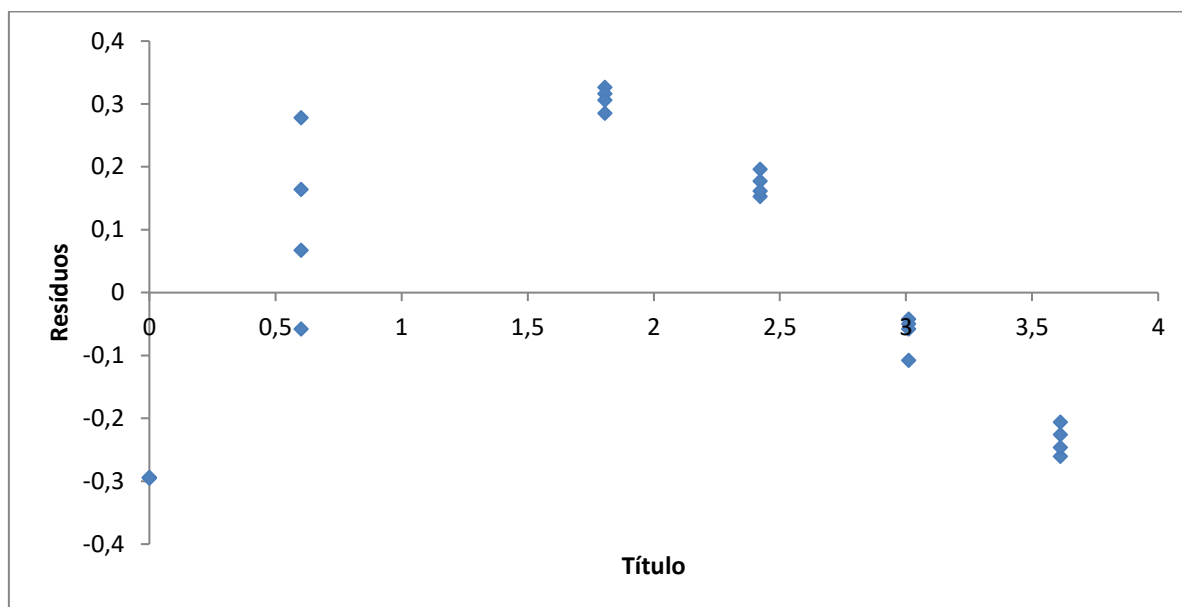
<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,92
R-Quadrado	0,84
R-quadrado ajustado	0,83
Erro padrão	0,23
Observações	24

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	6,22	6,22	113,93	3,6E-10
Resíduo	22	1,20	0,05		
Total	23	7,42			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inf.</i>	<i>95% sup.</i>	<i>Inf. 95,0%</i>	<i>Sup. 95,0%</i>
Interseção	0,29	0,09	3,43	0,00	0,12	0,47	0,12	0,47
	0,40	0,04	10,67	0,00	0,32	0,48	0,32	0,48

GRÁFICO 4 - REGRESSÃO LINEAR SIMPLES.

A regressão linear simples mostrou que o Título dos aloanticorpos prevê aproximadamente 83% (coeficiente de determinação = 0,83) dos resultados do MI. Onde, o F significação da ANOVA foi válido, pois o valor de F foi inferior a 0,05. Ainda, observou-se que os coeficientes de inclinação e intersecção apresentaram resultados adequados, uma vez que o valor de p foi inferior a 0,05, ou seja, valores estatisticamente significantes. Os resíduos da regressão estão apresentados no gráfico 5.

GRÁFICO 5 - RESÍDUOS DA REGRESSÃO LINEAR.

Visualmente os resultados não apresentaram tendência e o teste de Durbin-Watson foi empregado para averiguar autocorrelação dos resíduos para garantir que o comportamento foi realmente aleatório, ou seja, se há dependência sequencial entre os erros, conforme demonstrado na tabela 5.

TABELA 5 - RESULTADOS DO TESTE DE DURBIN WATSON.

DW	0,415
Rô	0,793
Dw final	1,776
DI Tabelado	1,26
Du Tabelado	1,44

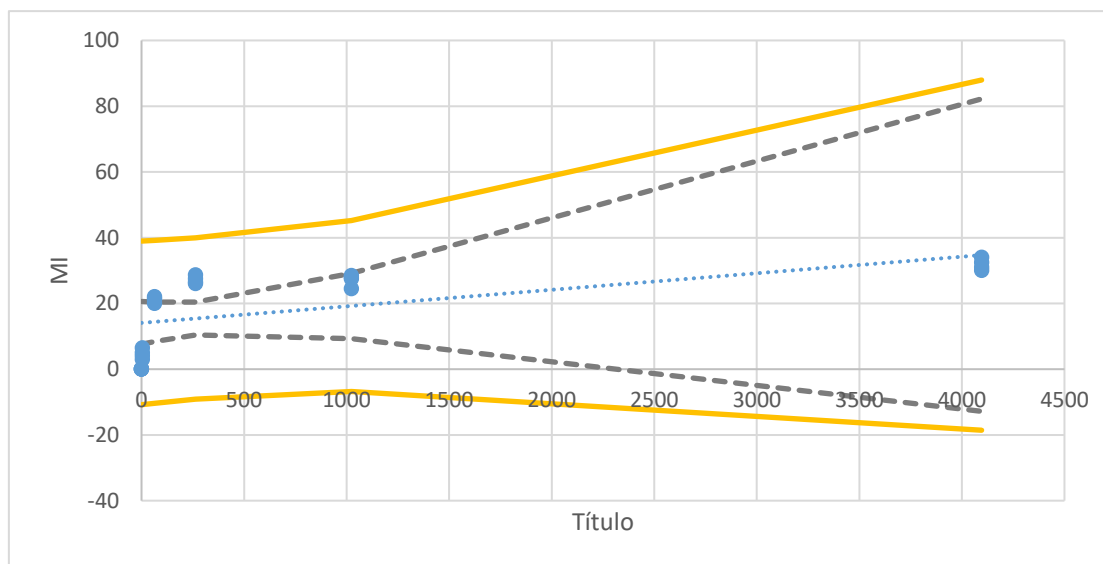
Uma vez que o valor de Dw final está entre 2 e o valor tabelado de Du, concluiu-se que realmente não há auto correlação entre os valores de resíduos.

Este conjunto de informações demonstra que o modelo proposto é relevante e que os dados se ajustaram de maneira linear. Dessa forma, há uma relação onde o aumento na concentração reflete em um aumento no valor de MI.

5.3 DETERMINAÇÃO DO INTERVALO

O intervalo foi de $[0,32 \leq \alpha \leq 0,48]$ e $[0,12 \leq \beta \leq 0,47]$ ao nível de confiança 95% e está representada no gráfico 6.

GRÁFICO 6 - INTERVALO DE CONFIANÇA 95%.



5.4 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O LD estimado através do desvio padrão do branco da amostra, foi de um título de 0,28. A partir do LD obteve-se o LQ, que foi 0,84.

5.5 AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

Para avaliar este parâmetro, foram obtidos os seguintes resultados: teste F de Levene, com $p = 0,86$ e o teste t (Student), com $p = 0,41$.

O teste F foi empregado com o intuito de avaliar se as variâncias eram homogêneas e o teste t, de verificar se as médias dos resultados dos dois grupos poderiam ser consideradas estatisticamente iguais. Como valor de p foi superior a 0,05, aceitamos a hipótese de que as variâncias são homogêneas e de que os resultados obtidos pelos dois serviços podem ser considerados estatisticamente iguais.

Apesar dos resultados obtidos atenderem aos parâmetros avaliados, o número de amostras utilizadas nesta comparação realizada entre os dois serviços, foi pequeno, devido a

questões econômicas e logísticas. Apesar disso, foram utilizadas amostras que possuíam aloanticorpos dentro da faixa de concentração pretendida para o teste.

5.6 AVALIAÇÃO DA PRECISÃO

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos. Esta é analisada através do coeficiente de variação, que para atender aos critérios da RDC-27 de 17 de maio de 2012, não admite valores superiores a 15%. Os resultados obtidos estão representados na tabela 6.

TABELA 6 - RESULTADOS DA REPETITIBILIDADE.

Replicata	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
1	24	25	29,5	11	28,5
2	22	24,5	31	12	28
3	23	25	29	12,5	29,5
4	23	24	32	12	28
5	24	24,5	30	13	27,5
Média	23,2	24,6	30,3	12,1	28,3
Desvio Padrão	0,84	0,42	1,20	0,74	0,76
Coeficiente de variação (%)	3,61	1,70	3,97	6,13	2,68

Conforme ilustrado, os resultados do CV foram inferiores a 15%, dessa forma os resultados atenderam aos requisitos exigidos. O teste MMA apresentou capacidade de ser reprodutível, dentro das condições empregadas, uma vez que os valores encontrados apresentaram baixa variação, quando repetidos pelo mesmo operador sob as mesmas condições em curto período de tempo.

5.7 VALIDAÇÃO DA MICROSCOPIA

Foram realizadas leituras em triplicata de quatro amostras, por quatro avaliadores, independentemente, a fim de validar a leitura do operador do presente estudo e também de definir se a contagem de 200 monócitos bastava para uma leitura abrangente da lamínula. Assim foram avaliadas as leituras com 200 monócitos e com 500 monócitos no total. A reprodutibilidade das análises do MI foi avaliada por meio da regressão linear que levou em conta a repetição das medidas de cada microscopista (triplicatas). O desfecho era a leitura de

MI e as variáveis categóricas independentes foram a quantidade celular contada (200 vs. 500 células), avaliadores (4) e amostras (4) conforme ilustrado na tabela 7.

TABELA 7 - RESULTADOS EM MI (%) DA LEITURA EM MICROSCÓPIO DE QUATRO AVALIADORES

Microscopista	Amostra	200 células			500 células		
		Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3
A	1	61	61,5	64	60	62	63,6
A	2	57	59	60	59	60,2	57,6
A	3	52,5	55	56,5	53	54	53,6
A	4	24	27,5	26,5	19,6	22	23
B	1	49,5	48	50,5	47,4	46,6	48,8
B	2	58,6	56,5	59	57,6	56	57,6
B	3	43	49	51,5	41,6	48,4	49,2
B	4	27,5	25	28	31	26,6	27,6
C	1	81	80,5	75	78,4	79,2	72,4
C	2	81,5	69	83,5	75	76,6	83,2
C	3	63,5	68	63,5	61	70,6	67
C	4	27,5	21,5	21,5	24,6	26,4	23,8
D	1	55	57,5	49	67,5	55,4	53,6
D	2	68	66	68,5	72,8	66	60
D	3	49,5	44,5	46	44,2	47,4	47
D	4	31	33,5	34	30,8	30,2	25,8

O teste de Breusch-Pagan mostrou ausência de efeitos randômicos ($p < 0,01$). A quantidade celular avaliada nas contagens entre 200 e 500 células não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 9). A maior diferença entre os microscopistas foi de 11 células, com o B lendo o MI 22% maior que o A (61 vs. 50 células), indicando uma leitura sistematicamente mais alta do avaliador B ($p = 0,011$). A leitura do MI foi diminuindo nas amostras consecutivas, com diferença significativa entre a 3ª e a 1ª amostra ($p = 0,055$), ainda mais na comparação entre a 1ª e a 4ª amostra ($p = 0,011$), sendo a diferença percentual desta última de 43,5% (61,14 vs. 26,62 células) conforme apresentado na tabela 8.

TABELA 8 - REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA PARA LEITURA DO MI (%).

Variáveis independentes	Nível	Coef. ^a	IC 95% ^b	Valor p
Celularidade analisada	200	0,00 ^c		
	500	-0,50	-2,84 a 1,83	0,450
Microscopista ^c	A	0,00 ^c		
	B	11,29	6,07 a 16,51	0,011
	C	-4,96	-13,27 a 3,37	0,125
	D	-0,46	-9,20 a 8,27	0,841
Amostra	1	0,00 ^c		
	2	4,2	-1,38 a 9,78	0,083
	3	-7,83	-16,09 a 0,44	0,055
	4	-34,52	-37,33 a -31,71	0,001

^a Coeficiente de regressão ajustado.

^b Intervalo de confiança de 95%.

^c categoria de referência (A, B, C, D).

Essa diferença encontrada nas leituras realizadas entre os microscopistas era um evento já esperado, uma vez que o campo selecionado para a contagem e os padrões de visualização da imagem estão submetidos a interferência de cada avaliador naturalmente. Só o fato de serem realizadas contagens seguidas em triplicata, pode sim ter sido um fator que impactou na diminuição do MI, dado que a contagem é um exercício cansativo quando realizada repetidamente. Ainda, cabe ressaltar que os campos escolhidos para realizar a contagem no microscópio influenciam diretamente o MI final, já que quanto maior o número de células no campo, maior será a frequência de monócitos que fagocitaram hemácias. Vale ressaltar também que um campo de visão com celularidade alta pode confundir o avaliador. Além de numerosas, as células podem estar agrupadas, de forma a impedir a diferenciação entre as células gerando índices superestimados.

A reprodutibilidade das leituras do mesmo microscopista foi estimada como a correlação média entre as triplicatas, ajustada por outras fontes de variação, e resultou em 0,94. A correlação entre as leituras dos diferentes avaliadores, total celular e amostras foi de 0,42.

O ajuste do modelo foi bom, com residuais distribuídos próximo aos valores esperados pela curva normal (Gráfico 7) e com valores padronizados entre -2,5 e 1,8. O gráfico de Bland-Altman (Gráfico 8) e o teste de Pitman ($p=0,079$) não indicaram heteroscedasticidade dos residuais. Oitenta por cento dos residuais (erros de leitura) estavam na faixa de $\pm 8\%$ esta variação do ponto de vista prático não mudaria a interpretação clínica do teste, dada a magnitude dos resultados das amostras, uma vez que $MI > 5\%$ é associado a anticorpos clinicamente significantes, capazes de desencadear reação hemolítica.

GRÁFICO 7 -DISTRIBUIÇÃO DOS RESIDUAIS COM RELAÇÃO AOS VALORES ESPERADOS PELA CURVA NORMAL (LINHA DIAGONAL).

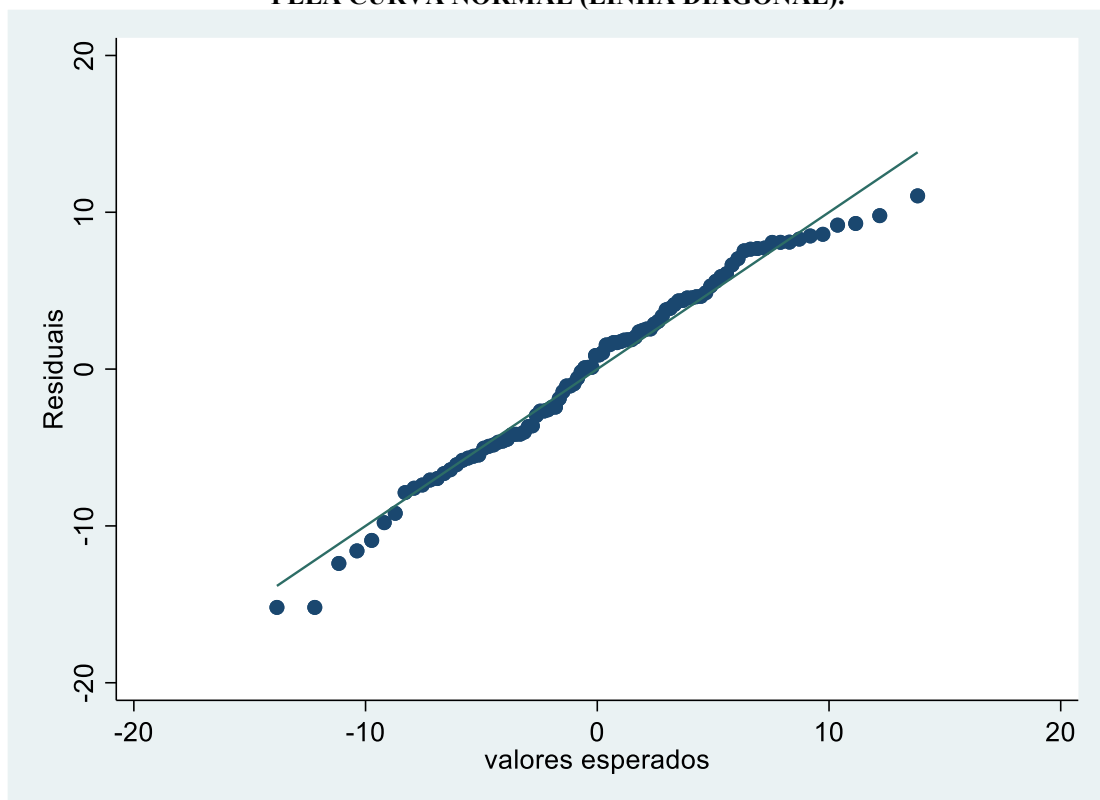
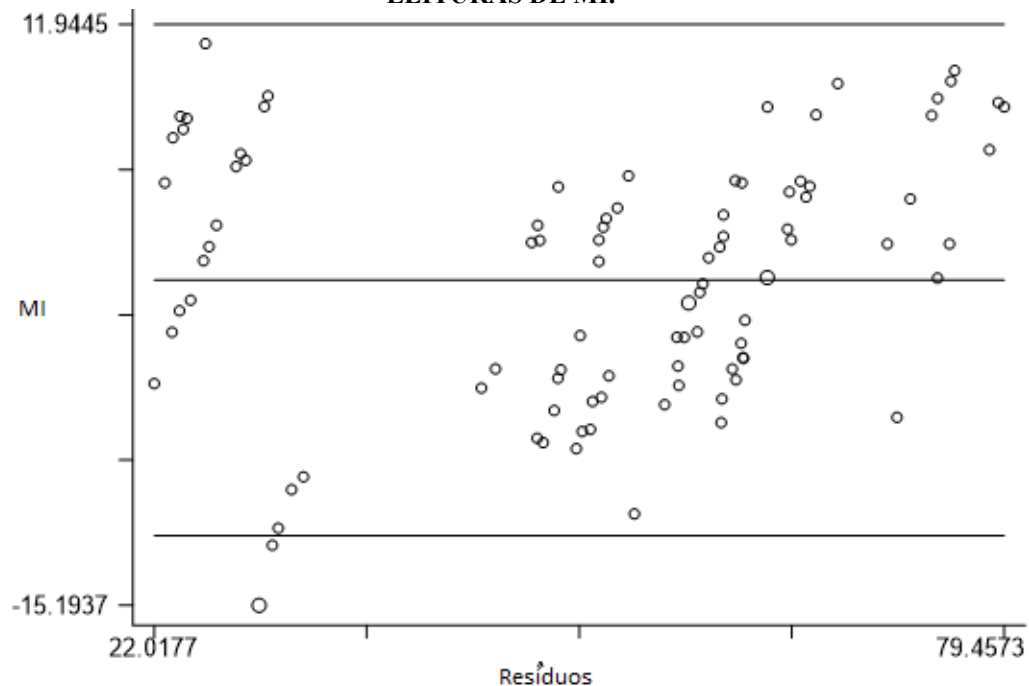


GRÁFICO 8 - GRÁFICO DE BLAND-ALTMAN: RESIDUAIS VERSUS VALOR OBSERVADO DAS LEITURAS DE MI.



5.8 MMA: ASPECTOS PRÁTICOS

O MMA está descrito há 40 anos na literatura. Visa estimar se os achados imunohematológicos refletem em resultados clinicamente significantes ou não, antes da transfusão acontecer. Pode servir como uma ferramenta de previsão de riscos e evitando assim, reações transfusionais (CROTTET, 2019). A incidência de Reações Transfusionais no Brasil, é estimada de 1:70.000 – 38.000 transfusões, sendo o número de mortes relacionadas a este tipo de reação de 1 por 1.000.000 unidades transfundidas (BRASIL, 2007). Em um estudo que ocorreu no período de maio de 2002 a dezembro de 2016 no Hospital São Paulo (HSP) foram notificadas um total de 1.548 reações transfusionais imediatas para a ANVISA, onde as reações TACO (Sobrecarga circulatória), TRALI (Lesão Pulmonar Aguda) e Reação Hemolítica Aguda Imunológica, apesar de menos frequentes, apresentaram gravidade moderada ou grave totalizando respectivamente 42,9%, 61,6%, 17,7% (GRANDI; GRELL; ARECO; BARBOSA, 2018). A TRALI é a maior causa de morbidade e mortalidade relacionada à transfusão sanguínea. Embora a real incidência de TRALI seja desconhecida, é provável que ocorra subdiagnóstico e sua incidência seja subestimada. Trata-se de uma complicação relativamente rara, com incidência variando entre 1/1.120 e 1/57.810. Alguns estudos mostram incidência de 1 (um) caso em 7.900 unidades de sangue total e de 1 (um caso) em 432 unidades de plasma

fresco congelado transfundidas (RODRIGUES; MARQUES; FARIA, 2017). Neste cenário o MMA apresenta-se como uma ferramenta complementar para evitar estes eventos adversos.

A validação deste método tem papel fundamental como aliado na segurança transfusional. Os resultados obtidos no presente estudo foram satisfatórios, conforme observado anteriormente. No entanto, para que essa etapa fosse concretizada, foi necessário levar em consideração alguns fatores que poderiam interferir nas análises.

Os monócitos utilizados nas corridas analíticas, foram extraídos de bolsa de sangue total (CPD) de doadores saudáveis, ou seja, os monócitos eram alogênicos. É possível também isolar estas células de maneira autóloga, ou seja, através de amostra de sangue total do próprio receptor. Há relatos que monócitos autólogos possuem maior capacidade de indução da fagocitose e assim tornam-se alternativa mais confiável na predição do significado clínico. Isso porque, ao usar monócitos do receptor, as condições *in vitro* seriam muito próximas das fisiológicas, uma vez que na reação os anticorpos do receptor estariam entrando em contato com seus próprios monócitos. Já o uso de monócitos obtidos de diferentes doadores sofreria com variações em sua atividade. Ambas as práticas são comumente descritas em estudos anteriores (FABRON; BALEOTTI; MELLO; CHIBA; KUWANO; FIGUEIREDO; BORDIN, 2004). O uso de monócitos autólogos torna-se inviável por questões logísticas, visto que para sua obtenção seria necessário grande volume de sangue total do receptor. Deve-se levar em conta que, devido as circunstâncias, este paciente não está em condições clínicas de fornecer sangue para realização de testes, já que ele está aguardando uma transfusão. Então, o uso de monócitos frescos alogênicos continua a ser uma prática comum, mesmo que contestada. O que foi observado na presente análise é que esta prática não afetou a capacidade do ensaio.

Quanto a estabilidade dos monócitos, a literatura traz que o sangue total heparinizado pode ser armazenado em temperatura ambiente por até 36 horas sem comprometer a viabilidade monocitária (BRANCH; GALLAHGER, 1986). Estudo posterior apoiou esta afirmação, entretanto, com pequena ressalva no que diz respeito ao anticoagulante utilizado. TONG et al. (2016) fez uso de anticoagulante ACD (Ácido cítrico, Citrato e Dextrose) e avaliou a estabilidade monocitária em manter sua função em até 36 horas e corroborou a alegação já descrita. Baseado nesta premissa, foi utilizado anticoagulante CPD (Citrato, Fosfato e Dextrose) nas bolsas de sangue total armazenadas em temperatura ambiente, e os monócitos foram isolados dentro de 24 horas após a coleta. Observou-se que neste intervalo de tempo o poder fagocitário das células não teve alterações, dado que normalmente as primeiras corridas tratavam-se de amostras testadas pela primeira vez, enquanto que as corridas posteriores eram

de replicatas das amostras com resultados positivos de MMA. Ainda, o anticoagulante diferia dos que foram apresentados pela literatura até agora citada, todavia, já havia sido empregado por outros estudos com sucesso (CONRADO et al., 2017; KIPKEU et al., 2018).

O anticoagulante ACD nada mais é que uma solução de citrato de sódio acidificada com ácido cítrico. O CPD é a solução de ACD com a adição de bifosfato de sódio. Ou seja, ambos anticoagulantes contêm citrato, que é responsável por quelar o cálcio no sangue, inibindo etapas cálcio-dependentes na cascata de coagulação. Ainda, ambos contêm dextrose que serve como substrato para formação de adenosina trifosfato (ATP) importante para produção de energia celular. A diferença entre o CPD e o ACD é a presença do fosfato, que além de ser substrato para formação do 2,3-DPG, atua como um tampão ligando-se aos íons H^+ produzidos durante a glicólise e impedindo a queda do pH. Durante o estudo pode-se observar que o uso de anticoagulante CPD não veio a causar interferência, pois se trata de uma versão melhorada do anticoagulante ACD. O CPD mantém o pH do meio, o que é de extrema relevância, porque qualquer modificação pode ocasionar ou a ativação ou a redução brusca da capacidade fagocitária dos monócitos (CRULL, 2011).

Devido a questão econômica, foram utilizadas placas de cultura de fundo chato, com área de crescimento de $9,5\text{ cm}^2$. Dentro dos poços, foram colocadas lamínulas circulares de 13 mm para que a reação ocorresse em um meio fácil de manipular e levar ao microscópio para leitura. No entanto, são existentes sistemas de câmaras comerciais que consistem em uma lâmina de vidro acoplada a uma câmara de poliestireno removível, utilizada por vários estudos (NOUMSI et al., 2015; FABRON; BALEOTTI; MELLO; CHIBA; KUWANO; FIGUEIREDO; BORDIN, 2004; TONG et al., 2018, ARNDT; GARRATTY, 2004). Em pesquisa recente, foi descrito o uso de placas de cultura com lamínulas tratadas previamente com solução de bromidrato de poly-L-lisina (KIPKEU et al., 2018). Ainda em publicação recente, o uso das placas de cultura foi apontado como adequado, todavia não foi considerado a primeira opção, por ser uma alternativa cara e de difícil manipulação (GIMENES, 2020). Na prática, o uso das placas de cultura, apresenta-se como a opção economicamente viável. A aquisição dos sistemas de câmara comerciais inviabilizaria a implementação do MMA no laboratório de imuno-hematologia. Talvez, em primeiro momento para fins experimentais, as câmaras seriam compradas, porém após a implementação do teste na rotina, haveria uma elevação no custo que seria impraticável. Outro aspecto a se levantar, é o de que as lamínulas utilizadas não receberam tratamento químico e isso simplesmente não interferiu na aderência dos monócitos e muito menos em sua função.

O MMA é um teste que objetiva simular reações que ocorrem *in vivo*, *in vitro*. Dessa forma, as condições da reação devem estar mais próximas das fisiológicas possível. Por conta disso, a temperatura de incubação é de 37°C, pois aproxima-se do valor corpóreo médio normal. Ainda há o pH, que deve simular o pH sanguíneo e estar por volta de 7,2 a 7,4. A manutenção do pH do meio é importante, pois reflete em resultados confiáveis de MMA, isso porque a capacidade fagocitária dos monócitos pode ser alterada quando mudanças no meio reacional ocorrem. A perda da funcionalidade destas células, mesmo que só em parte, resultaria em MMA falso negativo, impactando em risco para os receptores. Para evitar estes acontecimentos, equipamentos são empregados. O uso de incubadora de CO₂ (5% a 37°C) foi apontada como a responsável por manter o equilíbrio do pH da reação (GARRATTY, 1990). Estudo anterior testou esta afirmação anterior e confirmou que a incubadora de CO₂ é responsável pela manutenção do equilíbrio do meio, tornando os monócitos viáveis e indica que estudos posteriores devem fazer uso desta tecnologia (TONG et al. 2016). A partir destas informações e também por este recurso estar disponível na instituição que este estudo aconteceu, em todos os testes a incubadora de CO₂ foi utilizada e este pode ter sido um dos fatores delimitantes para a obtenção dos resultados apresentados.

Apesar de toda a versatilidade e utilidade, o MMA é uma técnica limitada em alguns aspectos. Por ser um método “*in house*”, seus resultados dependem em grande parte do operador, e este precisa ser um profissional especializado e treinado. A reprodutibilidade entre os operadores e laboratórios pode variar; manter um padrão de qualidade pode ser um grande desafio. Além disso, trata-se de um exame laborioso e demorado, leva cerca de 8 horas para obtenção dos resultados. O motivo da corrida analítica ter um tempo tão estendido, pode estar relacionado a etapa de separação de monócitos. Estas células precisam estar viáveis para que a reação ocorra regularmente. Por conta disso, elas são isoladas previamente ao momento da coleta, contudo o ideal seria que elas estivessem prontas para uso, já separadas, para então realizar a etapa fagocitária. Dessa forma, o tempo de reação cairia em torno de 3 horas, aumentando a agilidade do processo. Pesquisa anterior evidenciou que monócitos em pool criopreservados, não são afetados significativamente em sua capacidade fagocitária e que esta prática pode reduzir o tempo total do exame (KIPKEU et al., 2018). Isso mostra que é possível e necessária a realização de adaptações para responder as limitações encontradas e otimizar o processo. Estudos futuros são necessários para que estas melhorias técnicas possam ser adaptadas.

5.9 CUSTO POR TESTE MMA

O valor do custo dos insumos por teste e o valor total estão descritos na tabela 9.

TABELA 9 - CUSTOS DO TESTE MMA.

Produto	Volume/ quantidade	Valor total (R\$)	Quantidade por teste	Valor por teste (R\$)
Lâmina	50 unidades	6,01	1/2 unidade	0,06
Lamínula circular	100 unidades	87	1 unidade	0,87
Placa de cultura (12 poços)	100 unidades	766	1 poço	0,64
Corante Leishman	1000 mL	58,73	1 mL	0,06
Histopaque	500 mL	682	5 mL	6,82
RPMI	500 mL	145	7,5 mL	2,18
PBS	1000 mL	7,1	51 mL	0,36
Profissional operante	200 horas	3421	1:30 horas	25,66
TOTAL em insumos				10,98
TOTAL				36,64

Fonte: Adaptado de HEMOSC (2020).

Por não haverem kits de reagentes comerciais específicos para o MMA disponíveis no mercado, esta metodologia é reproduzida *in house* pelos laboratórios. Contudo, novos avanços em tecnologia e insumos são desenvolvidos no intuito de tornar o MMA mais simples e reproduzível. Novas técnicas para o isolamento de monócitos com o uso de tubos de preparação de células (CPTs) ou tubos Sep Mate estão disponíveis atualmente, como alternativa a separação celular através de Histopaque. Outro campo de otimização é a substituição da quantificação manual da fagocitose, pelo rastreo automatizado através de plataformas que rastreiam e analisam fluorescência. Dessa forma existem outras metodologias que podem ser utilizadas para medir o significado clínico dos anticorpos, como o teste de quimioluminescência (CLT) e o teste de sobrevivência eritrocitária ADCC usando Cr^{51} . Infelizmente, o uso do teste ADCC apesar de apresentar resultados preditivos positivos, é um método invasivo aos pacientes por utilizar o elemento radioativo Cr^{51} (que é administrado na corrente sanguínea dos pacientes) o que torna a implementação desta metodologia não passível a maioria dos laboratórios de referência. Tanto o CLT, assim como MMA são ensaios não invasivos, o diferencial do teste CLT é a quantificação da fagocitose que se dá através de um equipamento automatizado denominado Luminômetro BIOOrbit 1251 (Turku, Finland) proporcionando detecção sensível da fagocitose de monócitos (TONG, 2018). O valor de um luminômetro é de aproximadamente R\$ 9000,00 (<https://www.laboreinkauf.de/>).

A implementação de uma técnica que avalia a capacidade hemolítica dos anticorpos no laboratório de imunohematologia do HEMOSC é realmente necessária. A demanda do teste MMA é aplicada a um pequeno número de casos, afinal este ensaio faz-se necessário principalmente para atender aos pacientes que necessitam de sangue raro, eles são a minoria em termos numéricos, entretanto há a necessidade de atendê-los também. Sendo assim, a aquisição de um equipamento, como o luminômetro, por exemplo, além de encarecer o valor final do teste (deve-se levar em consideração que não se trata apenas dos custos de aquisição, mas também há os de manutenção), não é justificada, pois trata-se de um exame que atualmente possui baixa demanda. Assim, o MMA torna-se uma alternativa acessível a instituição para atender o contingente de casos de receptores de sangue quando não há concentrado de hemácias compatível disponível.

O valor total por teste MMA calculado foi R\$ 36,64. O tempo operante utilizado pelo profissional para realizar o teste totalizou em média 1 hora e 30 minutos, o tempo total do teste está em torno da faixa de 6 a 8 horas devido aos longos períodos de incubação. O piso salarial de um analista clínico contratado pela instituição é de R\$ 3421,00 para trabalhar 200 horas mensais, isso equivale a um total de R\$ 17,10 por hora. Então para realizar o teste são gastos R\$ 25,66 em mão de obra. Cabe também salientar que, não serão necessárias novas contratações de operadores específicos, ou gastos com cursos para treinamento. Isso porque, para realizar este estudo a pesquisadora passou por capacitação em instituição especializada no assunto e os custos foram de sua própria responsabilidade. Assim, será necessário apenas realizar o treinamento da equipe de analistas do laboratório de imuno-hematologia, para que estejam aptos a empregar esta ferramenta no momento oportuno. O serviço de imuno-hematologia do hemocentro coordenador do HEMOSC de Florianópolis, hoje, atende 24 horas por dia, aos casos mais complexos vindos de todo o estado, por conta disso, todos os profissionais devem estar habilitados a realizar o ensaio MMA.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi realizada a validação do ensaio MMA através de testes previstos na resolução RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Verificou-se que este ensaio atendeu a todos os critérios descritos nesta resolução e assim é eficaz em avaliar o significado clínico dos anticorpos. Foi observado que a implantação do MMA no laboratório de imunohematologia se justifica tanto por ser uma técnica não

invasiva. Quanto, por se tratar de um teste acessível a instituição, por não demandar a aquisição de equipamentos específicos, não gerando gastos de manutenção e assim não demandando maiores investimentos a instituição, uma vez que se trata de um teste de baixa rotatividade.

REFERÊNCIAS

ALVES, Vitor Mendonça et al. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.206-211, 2012. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (RBHH). <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20120051>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-84842012000300012&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 16 ago. 2018.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H. **Imunologia celular & molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 536 p.ISBN: 978-85-352-8320-4.

AMERICAN ASSOCIATION BLOOD BANKING. Technical manual. 20th ed. Illus, 816 p, 2020.

ARNDT, Patricia A.; GARRATTY, George. A retrospective analysis of the value of monocyte monolayer assay results for predicting the clinical significance of blood group alloantibodies. **Transfusion**, [s.l.], v. 44, n. 9, p.1273-1281, set. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03427.x>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15318848>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

BONIFÁCIO, Silvia L.; NOVARETTI, Marcia C. Z.. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 104-111, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842009005000015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbhh/v31n2/aop1509.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BRANCH, D. R.; GALLAHGER, M. T.. CORRELATION OF IN VIVO ALLOANTIBODY SIGNIFICANCE OR INSIGNIFICANCE WITH AN IN VITRO MONOCYTE-MACROPHAGE PHAGOCYTOSIS ASSAY. **British Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 783-785, abr. 1986. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.1986.tb04106.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2141.1986.tb04106.x>. Acesso em: 20 maio 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Hemovigilância: manual técnico para investigação das reações transfusionais imediatas e tardias não infecciosas / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: ANVISA, 2007.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. Guia para uso de hemocomponentes. **Brasília: Ministério da Saúde, 2014.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. D.O.U. 22 de maio de 2012.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

CONRADO, Marina C. A. V. et al. Defining the clinical relevance of red blood cell autoantibodies by Monocyte Monolayer Assay. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [s.l.], v. 32, n. 2, p.1-5, 31 maio 2017. Wiley. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28568311>>. Acesso em: 27 jul. 2018.

CROTTET, Sofia Lejon. Le test de prédiction in vitro de l'intérêt clinique des anticorps « Monocyte Monolayer Assay ». **Transfusion Clinique Et Biologique**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 27-28, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tracli.2019.06.306>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1246782019303714?via%3Dihub>. Acesso em: 20 out. 2020.

CRULL, Kay. Blood components: preparing, storage and transport. In: QUINLEY, Eva D (org.). **Immunohematology: principles and practice**. 3. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011. Cap. 3. p. 1-398.

CRUZ, Roberto de Oliveira et al. Prevalence of erythrocyte alloimmunization in polytransfused patients. **Einstein (São Paulo)**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.173-178, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-45082011ao1777>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1679-45082011000200173&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 15 ago. 18.

DANIELS, Geoff. **Human Blood Groups**. 3. ed. Bristol: Wiley Blackwell, 2013.

FABRON, Antonio; BALEOTTI, Wilson; MELLO, Adriana B de; CHIBA, Akemi K; KUWANO, Sachie; FIGUEIREDO, Maria s; BORDIN, José O. Application of noninvasive phagocytic cellular assays using autologous monocytes to assess red cell alloantibodies in sickle cell patients. **Transfusion And Apheresis Science**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 29-35, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2004.02.009>.

FLEGEL, Willy A.. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. **Transfusion**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.1-12, jul. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.13147>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26174897>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

GARRATTY, George. Mechanisms of immune red cell destruction, and red cell compatibility testing. **Human Pathology**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.204-212, mar. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0046-8177\(83\)80018-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0046-8177(83)80018-5). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6601047>>. Acesso em: 25 nov. 2019.

GARRATTY, George. Predicting the Clinical Significance of Red Cell Antibodies With In Vitro Cellular Assays. **Transfusion Medicine Reviews**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 297-312, out. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0887-7963\(90\)70272-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0887-7963(90)70272-6). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0887796390702726>. Acesso em: 28 ago. 2020.

GIMENES, Francine Gabriel. Validação do ensaio dinâmico de fagocitose: monocyte monolayer assay (mma). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA E CELULAR, 42., 2020, Rio de Janeiro. **Trabalho científico**. Botucatu: Hematology, Transfusion And Cell Therapy, 2019. p. 406-407.

Disponível em: https://hemo.org.br/2019/doc/HTCT_HEMO_2019_final.pdf. Acesso em: 10 nov. 2020.

GIRELLO, Ana Lucia; KUHN, Tela Ingrid B. de Bellis. **Fundamentos da Imuno-hematologia eritrocitária**. 4. ed. São Paulo: Senac, p 16-19, 2016.

GRANDI, João Luiz; GRELL, Mariana Cabrera; ARECO, Kelsy Catherina Nema; BARBOSA, Dulce Aparecida. Hemovigilância: a experiência da notificação de reações transfusionais em hospital universitário. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, [S.L.], v. 52, p. 1-7, 28 jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1980-220x2017010603331>.

INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION (Amsterdam). Red cell immunogenetics and blood group terminology. Disponível em: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology>. Acesso em: 05 jan. 2021.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (Brasil). DOQ-CGCRE-008 Rev.05 – Orientação sobre validação de métodos analíticos – agosto/2016.

KIPKEU, Betty J.; SHYIAN, Melissa L.; CAVALCANTE, Luciana da Silveira; DUONG, Trang T.; YEUNG, Rae S.M.; BINNINGTON, Beth; BRANCH, Donald R.; ACKER, Jason P.; HOLOVATI, Jelena L.. Evaluation of the functional properties of cryopreserved buffy coat-derived monocytes for monocyte monolayer assay. *Transfusion*, [S.L.], v. 58, n. 8, p. 2027-2035, 9 maio 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.14650>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29744883/>. Acesso em: 15 abr. 2020.

KUKAR, Neetu; HANDA, Anjali; MAHARISHI, Ramn; SYAL, Neha; ARORA, Harkiran. Analysis of red cell alloimmunization in multi transfused patients at a Tertiary care teaching hospital. **Journal Of Family Medicine And Primary Care**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 2907-2911, 2020. Medknow. http://dx.doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_351_20. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/342526105_Analysis_of_red_cell_alloimmunization_in_multi_transfused_patients_at_a_Tertiary_care_teaching_hospital. Acesso em: 08 jan. 2021.

NOUMSI, G. T.; BILLINGSLEY, K. L.; MOULDS, J. M.. Successful transfusion of antigen positive blood to alloimmunised patients using a monocyte monolayer assay. **Transfusion Medicine**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.92-100, 31 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tme.12189>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25828731>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

MASSEY, Edwin; POOLE, Geoff. Haemolytic transfusion reactions. In: MURPHY, Michael F.. **Practical transfusion Medicine**. 3. ed. Oxford: Willey, 2009. Cap. 7. p. 72-82.

MURPHY, Kenneth. **Janeway's immunobiology**. 9. ed. New York: W.W Norton e Company, 2017. 924 p.

PESSONI, Livia Lara; FERREIRA, Marcos Antônio; SILVA, Julles Cristiane Rodrigues da; ALCÂNTARA, Keila Correia de. Red blood cell alloimmunization among hospitalized

patients: transfusion reactions and low alloantibody identification rate. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 326-331, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.htct.2018.04.001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30370410/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

REID, Marion E. et al. **The blood group antingen: facts book**. 3. ed. Oxford: Elsevier, 2012. 745 p.

RODRIGUES, Carolina Teixeira; MARQUES, Lorena Machado; FARIA, José Roberto. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): literature review. **Revista Médica de Minas Gerais**, [S.L.], v. 27, p. 58-62, 2017. GN1 Genesis Network.

ROITT, Ivan M et al. **Fundamentos de imunologia**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2013. 552 p.

SCHORNER, Everaldo Jose. **Guia nacional para implantação de banco de sangue de fenótipos raros: uma proposta para hemorrede publica brasileira**. 2015. 40 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17155/tde-27072015-053713/publico/dissertacao_Mestrado_Hemoterapia_Everaldo_Jose_Schorner.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2019.

TONG, Tik Nga et al. Optimal conditions for the performance of a monocyte monolayer assay. **Transfusion**, [s.l.], v. 56, n. 11, p.2680-2690, 21 ago. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.13766>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.13766>>. Acesso em: 13 jul. 18.

TONG, Tik Nga; CEN, Selena; BRANCH, Donald R.. The Monocyte Monolayer Assay: Past, Present and Future. **Transfusion Medicine Reviews**, [s.l.], p.1-5, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmr.2018.07.004>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887796318300397>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

WESTHOFF, Connie M.; STORRY, Jill R.; SHAZ, Beth H.. Human Blood Group Antigens and Antibodies. **Hematology**, [S.L.], p. 1687-1701, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-35762-3.00110-4>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/322172556_Human_Blood_Group_Antigens_and_Antibodies. Acesso em: 05 jan. 2021.

WHITLOCK, Sheryl A. **IMMUNOHEMATOLOGY FOR MEDICAL LABORATORY TECHNICIANS**. Nova York: Delmar, 2010.

YUNG, Gisella Puga; SEEBACH, Joerg D.; BAERENZUNG, Natasha; PENDERGRAST, Jacob; CSERTI-GAZDEWICH, Christine; BRANCH, Donald R.. Eluates from DAT-positive patients with or without hemolysis after high-dose IVIG yield predominantly IgG isoagglutinins of IgG 2 subclass. **Transfusion**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 1882-1883, maio 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.15229>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/trf.15229>. Acesso em: 30 mar. 2021.

ZIMRING, James C.. Principles of Red Blood Cell Allo- and Autoantibody Formation and Function. In: HILLYER, Christopher D. (Org.). **Blood banking and transfusion medicine: basic principles and practice**. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. Cap. 4. p. 43-50.

