

**Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Medicina Clínica**

# **INCIDÊNCIA DE ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA APÓS TRANSFUSÃO DE CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS**

**Francisco Wandemberg Rodrigues dos Santos**

**Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Mestrado em Medicina Clínica do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Clínica.**

**Fortaleza  
2002**

SE  
616.151  
5235i.  
2002

Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Medicina Clínica

# INCIDÊNCIA DE ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA APÓS TRANSFUSÃO DE CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS

Francisco Wandemberg Rodrigues dos Santos

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria da Silva Pitombeira

Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Mestrado em Medicina Clínica do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Clínica. Aprovação da Defesa de Tese em 20 de dezembro de 2002.

Fortaleza  
2002

S235i Santos, Francisco Wandemberg Rodrigues dos  
Incidência de aloimunização eritrocitária após transfusão de  
concentrados de hemácias.  
Francisco Wandemberg Rodrigues dos Santos. - Fortaleza, 2002.  
95 fs. : il.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria da Silva Pitombeira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina. Departamento de Medicina Clínica.  
1. Anticorpo-sangue. 2. Transfusão de eritrócitos. 3.  
Aloanticorpos. 4. Aloanticorpos-sangue.  
I. Pitombeira, Maria da Silva (Orient.). II. Título.

CDD: 615.39 – dc21

A realização deste trabalho contou com o apoio do Instituto Doutor José Frota - IJF e do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – HEMOCE.

“A mão do sucesso profissional tem cinco dedos: caráter, vocação, talento, esforço e disciplina”.

**Daher Elías Cutait** (1913-2001), médico

À minha esposa,  
Élia Rodrigues Barroso, minha fonte de tranqüilidade  
e amor.

À minha filha,  
Larissa Barroso dos Santos, a quem tanto amo.

Ao meu filho,  
Pedro Rodrigues Barroso, que nasceu no decorrer  
desse mestrado, e necessita do meu afeto.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria da Silva Pitombeira

À Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães

Ao Prof. Dr. Pedro Felipe Carvalhedo de Bruin

Ao Prof. Dr. José Milton de Castro Lima

Ao Prof. Dr. Aprígio Mendes Filho

À Profa. Rosa Maria Salani Mota

À Norma de Carvalho Linhares e demais funcionários da Biblioteca de Ciências da Saúde

À Glória Maria Sales Rocha Pinto

À Sandra Maria Pereira de Melo

À Eunice Bobô de Carvalho

À Ivone Mary Fontenele de Souza

Aos funcionários do Serviço Transfusional do Instituto Doutor José Frota

Aos meus companheiros de mestrado

# ÍNDICE

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Resumo	xii
Summary	xiii
Introdução	1
Objetivos	22
Pacientes e Métodos	24

Análise estatística	38
Resultados	40
Discussão	53
Conclusões	63
Anexos	65
Referência bibliográficas	69

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo da cartela utilizada nesse estudo \_\_\_\_\_ 18
- Figura 2 - Modelo de leitura e de quantificação de resultados nas cartelas \_\_\_\_\_ 20
- Figura 3 - Modelo de cartela após centrifugação e com os resultados registrados \_\_\_\_\_ 20
- Figura 4 - Desenho do estudo para detecção e identificação de aloanticorpos  
eritrocitários após transfusão de concentrados de hemácias \_\_\_\_\_ 66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistemas de grupos sanguíneos humanos conforme SITS	4
Tabela 2 -	Descrição dos materiais utilizados	29
Tabela 3 -	Distribuição do número de concentrados de hemácias transfundidos em função do sexo	42
Tabela 4 -	Distribuição dos receptores e concentrados de hemácias transfundidos em função do sistema ABO e antígeno D	43
Tabela 5 -	Distribuição dos receptores aloimunizados em função do sexo e das médias de idade	44
Tabela 6 -	Distribuição dos receptores aloimunizados em função do motivo de internamento e sexo	45

Tabela 7 -	Distribuição de receptores de concentrados de hemácias transfundidos em função da tipagem sanguínea do sistema ABO e antígeno D, e da aloimunização _____	46
Tabela 8 -	Distribuição dos receptores de concentrados de hemácias em função do antígeno D e da aloimunização _____	47
Tabela 9 -	Distribuição do número médio de concentrados de hemácias transfundidos em função do sexo e aloimunização _____	47
Tabela 10 -	Distribuição dos aloanticorpos eritrocitários detectados em função do tempo transcorrido após a primeira transfusão de concentrado de hemácias _____	49
Tabela 11 -	Risco de aloimunização em função do sexo _____	50
Tabela 12 -	Distribuição de receptores aloimunizados com mais de um aloanticorpo em função do sexo e da média de concentrados de hemácias transfundidos _____	50
Tabela 13 -	Distribuição de receptores aloimunizados em função do número de aloanticorpos e das médias de idade _____	51
Tabela 14 -	Distribuição das médias de idade em função do sexo e aloimunização _____	52

## RESUMO

A aloimunização eritrocitária após transfusão de concentrados de hemácias é uma complicação em pacientes com doenças crônicas que necessitam de transfusões de repetição. Esse estudo objetivou determinar a incidência de aloimunização, identificar os aloanticorpos detectados, estabelecer os fatores de risco envolvidos e quantificar o risco de aloimunização em pacientes com condições clínicas agudas submetidos à transfusão de concentrados de hemácias no Instituto Doutor José Frota, utilizando a técnica de gel centrifugação. Foram analisados 5.690 receptores transfundidos com 16.547 de concentrados de hemácias, sendo 4.025 do sexo masculino e 1.665 do sexo feminino. Foram excluídos 501 receptores com aloimunização prévia ou tempo de permanência hospitalar inferior a uma semana. Em 120 receptores (2,1%) foram detectados aloanticorpos eritrocitários, sendo 60 do sexo masculino (1,49%) e 60 do sexo feminino (3,60%). A aloimunização foi 2,4 vezes mais freqüente no sexo feminino, sendo que 93,33% das mulheres tinham história de gestação prévia. A média transfusional nos receptores aloimunizados foi de 4,68 bolsas, sendo 4,97 bolsas nos receptores do sexo masculino e 4,40 bolsas no sexo feminino. Nos não aloimunizados a média transfusional foi de 2,87 bolsas. O risco de aloimunização foi de 0,83%, sendo 0,59% no sexo masculino e 1,44% no sexo feminino. Os aloanticorpos detectados com maior freqüência foram anti-E (18,25%) e anti-D (16,06%) de um total de 137 aloanticorpos. O tempo médio de detecção dos aloanticorpos foi de 20,88 dias. O risco de aloimunização observado foi elevado para a média transfusional dos receptores. A média de idade dos pacientes e o aumento da expectativa de vida aumentam a probabilidade de que transfusões posteriores sejam necessárias, sinalizando a necessidade de modificar o atual suporte hemoterápico a esses pacientes.

## SUMMARY

The alloimmunisation following red cell transfusion is a complication in patients with chronic diseases requiring multiple transfusions. The aims of this study were to determine the frequency of alloimmunisation, to identify the detected alloantibodies, to establish the involved risk factors and to quantify the alloimmunisation risk in patients with acute disorders who received red cell transfusion at Instituto Dr. José Frota hospital, using the gel technique centrifugation. From the 5,690 recipients who received 16,547 units of red blood cell, 4,025 were male and 1,665 were female. Recipients with previous alloimmunisation or with time of permanence below one week were excluded ( $n = 501$ ). Red cells alloantibodies were detected in 120 recipients (2,1%): 60 males (1,49%) and 60 females (3,60%) The alloimmunisation was 2.4 fold more frequent in females, and 93,33% of the women had previous pregnancy. The average number of units transfused in the alloimmunised recipients was 4.68: 4.97 units in males and 4.40 units in females. In recipients non alloimmunised the average was 2.87 units the risk of alloimmunisation was 0,83%: 0,59% in males and 1,44% in females. The most frequent alloantibodies were: anti-E (18,25%) and anti-D (16,06%) from a total of 137 alloantibodies detected. The average time taken to detect alloantibodies was 20.88 days. The risk of alloimmunisation detected was high considering the average number of units transfused. The age of recipients and the longer life expectancy increase the probability of further transfusions in this group. Our findings point out to the necessity of modify the current medical transfusion support to this group of patients..

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

As hemácias possuem antígenos situados em sua membrana citoplasmática, correspondentes a proteínas, glicoproteínas, glicolípides, lipoproteínas, glicoesfingolípides, e sialoglicoproteínas. Esses antígenos estão agrupados em vinte e seis sistemas de grupos sanguíneos, cinco coleções de antígenos e duas séries de antígenos, conforme nomenclatura da Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (DANIELS, 1995).

Cada **sistema de grupo sanguíneo** é um conjunto de um ou mais antígenos codificados ou regulados por um único locus genômico, ou por dois ou mais genes homólogos interligados entre si de tal modo que a recombinação de material genético equivalente não ocorre, ou é muito rara (DANIELS, 1995).

As **coleções de antígenos** são conjuntos de antígenos que estão fenotipicamente, bioquimicamente e geneticamente relacionados, mas não reúnem condições para serem definidos como sistema (DANIELS, 1995).

As **séries de antígenos** englobam antígenos de alta prevalência ou públicos (presentes em mais de 90% da população), e de baixa prevalência ou privados (presentes em menos de 10% da população), que não reúnem condições para pertencerem aos sistemas ou às coleções conhecidas (DANIELS, 1987; DANIELS 1995).

Na Tabela 1 estão relacionados os sistemas de grupos sanguíneos quanto à nomenclatura, número de antígenos e composição.

A maioria dos antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos é sintetizada pelas próprias hemácias, mas alguns são absorvidos do plasma, como os antígenos do sistema sanguíneo Lewis (TILLEY, 1975). Os antígenos dos sistemas de grupos sanguíneos podem se restringir às hemácias, ou podem ocorrer em outros tipos celulares, como os antígenos do sistema de grupos sanguíneos ABO, que estão presentes na superfície de células do endotélio vascular, membranas epiteliais e plaquetas (RACHKEWICH, 1978; KELTON, 1982; ROUGER, 1982).

Esses antígenos eritrocitários estão envolvidos em diversas funções, como receptor de citocina, proteína de transporte, via do complemento, molécula de adesão, integridade estrutural, atividade enzimática e receptor microbiano.

Antígenos do sistema de grupo sanguíneo Duffy são receptores eritrocitários para interleucina-8, e as hemácias que não expressam os antígenos Duffy são resistentes à invasão pelo *Plasmodium vivax* (HORUK, 1993). Os antígenos do sistema Kidd provavelmente são partes da estrutura que atua como transportadora de uréia, por isso as hemácias que não têm os antígenos desse sistema são resistentes à lise produzida pela uréia. Os antígenos do sistema Knops fazem parte do receptor para fração C3b do complemento (RAO, 1991), e os antígenos do sistema Lutheran estão localizados nas moléculas de adesão CD44 de granulócitos e linfócitos (SPRING, 1988). As glicoforinas são proteínas estruturais na superfície das hemácias, os

**Tabela 1** – Sistemas de grupos sanguíneos humanos conforme SITS

Nº SITS	Nomenclatura	Nº de antígenos	Composição
001	ABO	4	Glicoproteína
002	MNS	43	Sialoglicoproteína
003	P	1	Glicoesfingolípide
004	Rh	46	Lipoproteína
005	Lutheran	18	Glicoproteína
006	Kell	23	Glicoproteína
007	Lewis	6	Glicoesfingolípide
008	Duffy	6	Glicoproteína
009	Kidd	3	-
010	Diego	21	Glicoproteína
011	Cartwright	2	Glicoproteína
012	XG	1	Sialoglicoproteína
013	Scianna	3	Glicoproteína
014	Dombrock	5	Glicoproteína
015	Colton	3	Glicoproteína
016	Landsteiner-Wiener	3	Glicoproteína
017	Chido/Rogers	9	Glicoproteína
018	Hh	1	Glicoproteína
019	Kx	1	-
020	Gerbich	7	Sialoglicoproteína
021	Cromer	10	Sialoglicoproteína
022	Knops	5	Glicoproteína
023	Indian	2	Glicoproteína
024	Ok	1	Glicoproteína
025	Raph	1	-
026	JMH	1	Proteína

SITS – Sociedade Internacional de Transfusão Sangüínea

antígenos MN fazem parte da glicoforina A, os antígenos Ss fazem parte da glicoforina B, e os antígenos do sistema Gerbich fazem parte das glicoforinas C e D (CHASIS, 1992). Os antígenos do sistema Cartwright produzem polimorfismo na acetilcolinesterase eritrocitária (SPRING, 1992). Algumas cepas uropatogênicas de *Escherichia coli* são mais virulentas quando expressam moléculas de adesão a glicoesfingolípides do sistema P, que também estão presentes na superfície de células do trato urinário (JOHNSON, 1991).

Os antígenos são substâncias que podem despertar uma resposta imunológica quando introduzidos em um receptor imunocompetente, e que podem reagir com anticorpos produzidos a partir da resposta imune (ABBAS, 1994b).

Anticorpos são proteínas secretadas por plasmócitos em resposta à interação específica com antígenos. São capazes de distinguir pequenas diferenças na estrutura primária dos antígenos e, dessa forma, combinam-se apenas com os determinantes antigênicos que provocaram a sua síntese. Sendo assim, para cada epítopo corresponde um anticorpo específico. Essa combinação específica entre anticorpo e antígeno estabelece uma interação muito estreita, reduzindo ao máximo as distâncias entre os sítios de ligação. A combinação entre anticorpos com seus determinantes antigênicos correspondentes ocorre através de reações imunológicas com diferentes mecanismos, variando de acordo com o tipo do anticorpo e/ou do antígeno, mas seguindo os mesmos princípios gerais de especificidade, reversibilidade, equilíbrio e termodinâmica. A presença de anticorpos na superfície de antígenos facilita a fagocitose e a ativação do sistema complemento (ABBAS, 1994a).

Existem dois tipos diferentes de respostas a antígenos não próprios. Resposta natural e adaptativa. A resposta natural tem componentes celular e molecular; o componente celular utiliza fagócitos (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios

(basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células *natural killer*; o componente molecular inclui: complemento, proteínas de fase aguda e citocinas, como interferons. A resposta adaptativa envolve a proliferação de linfócitos B e T antígeno específicos (DELVES, 2000a).

Os antígenos de membranas celulares são os mais imunogênicos de nossa espécie, como os de histocompatibilidade do sistema HLA, e os dos sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários, em particular os dos sistemas ABO, Rh, Kell, Duffy e Kidd (CHOW, 1994).

Os anticorpos que reconhecem os antígenos eritrocitários são geralmente aloanticorpos, mas podem ser auto-anticorpos.

Quando um indivíduo é exposto aos antígenos eritrocitários que não lhes são próprios, seu sistema imunológico é capaz de reagir contra esses antígenos (LÓPEZ, 1998). A produção de aloanticorpos eritrocitários é parte do processo de proteção imunológica, que pode ocorrer em consequência à transfusão de hemocomponentes com hemácias, à gravidez e ao transplante de medula óssea (CHING, 1991).

A transfusão de concentrados de hemácias tem mostrado ser uma terapia eficaz e amplamente utilizada no tratamento de diversas patologias (WALKER, 1989).

A formação de aloanticorpos em resposta a antígenos eritrocitários não próprios, as reações transfusionais imunológicas agudas ou tardias, e a possibilidade de adquirir doenças infecciosas através de transfusões sanguíneas, têm estimulado avaliações criteriosas da prática transfusional e maior interesse nos efeitos adversos dessa modalidade terapêutica (WALKER, 1989).

Receptores de transfusão de concentrados de hemácias podem desenvolver aloanticorpos contra inúmeros antígenos eritrocitários do doador, num período que varia entre 10 dias a quatro meses após as transfusões (RAMSEY, 1989; WALKER, 1989; CUMMINS, 1995). Podem ainda

apresentar manifestações de reações transfusionais hemolíticas agudas ou tardias, com destruição eritrocitária intravascular e extravascular, respectivamente, devido à presença de aloanticorpos eritrocitários não detectados em testes imunohematológicos pré-transfusionais.

A formação de aloanticorpos contra antígenos eritrocitários é um dos importantes efeitos imunológicos a ser detectado após a transfusão de hemácias e transplante de medula óssea (TING, 1987). A aloimunização eritrocitária resulta das diferenças genéticas entre o doador e o receptor (SCHONEWILLE, 1999). ZUMBERG e colaboradores (2001) estimaram que seja detectado um evento de aloimunização eritrocitária para cada 1.612 concentrados de hemácias transfundidos. Receptores de transfusão de concentrados de hemácias com idade inferior a quatro meses de vida falham em desenvolver aloanticorpos eritrocitários, quando submetidos a múltiplas transfusões (FLOSS, 1986).

A primeira exposição ao antígeno eritrocitário não próprio pode levar a uma aloimunização primária, com produção de baixos níveis de aloanticorpos, geralmente da classe IgM. A resposta primária é caracterizada pela detecção no soro do receptor, de crescentes quantidades de aloanticorpos específicos. A concentração de aloanticorpos logo atinge um valor máximo declinando gradualmente, para níveis basais no intervalo de 1 a 60 meses (HARRISON, 1985; CUMMINS, 1995), com média de 10 meses. Este declínio não mostra diferença significativa com relação ao sexo, diagnóstico ou presença de múltiplos aloanticorpos eritrocitários, exceto em receptores com idade inferior a 20 anos, que podem ter um declínio mais rápido (RAMSEY, 1988). Trinta e nove por cento dos aloanticorpos eritrocitários clinicamente significantes, não são detectados após 5 a 10 anos, contra antígenos dos sistemas de grupo sanguíneos Rh, Kell e Duffy, e após 10 anos esse percentual se eleva para 45% (RAMSEY,

1994). Em receptores portadores de anemia falciforme, 34% dos aloanticorpos eritrocitários, potencialmente hemolíticos, não são detectados após um ano (RAMSEY, 1994).

A segunda exposição ao mesmo antígeno induz uma resposta secundária ou anamnésica, com produção de altos níveis de anticorpos predominantemente IgG, detectáveis em 1 a 2 dias. A resposta secundária é dada por células de memória (linfócitos T e B), clonadas durante a resposta primária ao antígeno. Estas células de memória amplificam a resposta secundária. Os anticorpos que resultam da resposta secundária têm uma maior avidéz pelo antígeno e são produzidos a partir de quantidades significativamente inferiores de antígenos, quando comparados aos anticorpos produzidos durante a resposta primária (DELVES, 2000a).

Vários fatores afetam as respostas primária e secundária. Os mais importantes são: (1) a imunogenicidade do antígeno; (2) a sobrevivência do antígeno na circulação; e (3) a resposta imune do receptor.

Os aloanticorpos contra antígenos de sistemas de grupos sangüíneos podem ser de ocorrência natural ou adquirida. Os aloanticorpos eritrocitários de ocorrência natural são aqueles formados espontaneamente como resposta imune a substâncias encontradas no meio ambiente (por exemplo: bactérias, plantas e alimentos), que apresentam determinantes antigênicos semelhantes aos encontrados em antígenos de sistema de grupo sangüíneo (GUILBERT, 1982). A maioria é da classe IgM, que reagem em temperatura inferior a 25°C e não causam destruição celular *in vivo*, com exceção dos anticorpos a antígenos do sistema ABO que são ativos a 37°C, e altamente hemolíticos, pela capacidade de ativar o sistema complemento até C9. Aqueles de ocorrência adquirida são predominantemente de classe IgG, produzidos pela resposta imune a exposição de antígenos eritrocitários não próprios, reagem à temperatura de 37°C, e podem produzir hemólise numa segunda exposição aos antígenos (TAO, 1993).

A aloimunização eritrocitária pode ser influenciada pelo número de transfusões de concentrados de hemácias, como também pelo sexo, idade e doença subjacente do receptor (RAMSEY, 1989; SCHONEWILLE, 1999; ÂNGULO, 1999). Transfusões de concentrados de hemácias em crianças com idade inferior a três anos podem favorecer o desenvolvimento de tolerância, diminuindo a formação de aloanticorpos eritrocitários (SPANOS, 1990; SINGER, 2000).

Alguns aspectos são importantes na aloimunização por transfusão: (1) as mulheres se imunizam duas vezes mais que os homens caso tenham história prévia de gravidez (WALKER, 1989); (2) determinadas doenças predisõem maior aloimunização eritrocitária, como leucemias (16%), hemoglobinopatias (29%), anemia aplástica (11%), hemorragia digestiva alta (11%), e insuficiência renal (14%) (BLUMBERG, 1983); (3) a aloimunização eritrocitária múltipla pode impossibilitar transfusões posteriores de concentrados de hemácias; (4) os aloanticorpos eritrocitários podem ser detectados ou não, dependendo do número de transfusões; e (5) os antígenos eritrocitários dos sistemas de grupos sanguíneos mais imunogênicos em ordem decrescente são: D, Kell, E, c, Fy<sup>a</sup>, Jk<sup>a</sup>, S e s (GIBLETT, 1961; ISSITT, 1973; STERN, 1975).

A ocorrência de aloanticorpos eritrocitários em receptores politransfundidos tem estimulado a determinação da frequência de aloimunização em diferentes populações, levando em consideração que a distribuição dos antígenos varia de acordo com as diferentes etnias, variando entre 0,4 a 1% por unidade de concentrado de hemácias transfundida (GIBLETT, 1961; WALKER, 1989).

DE LA RUBIA e colaboradores (1990) demonstraram que um indivíduo pode produzir um ou mais aloanticorpos eritrocitários dependendo da exposição antigênica não própria.

Trinta e sete por cento dos receptores portadores de aloanticorpo eritrocitário anti-E também possuem anti-c, aumentando as dificuldades em disponibilizar sangue compatível, e os riscos de efeitos adversos relacionados à transfusão (SHIREY, 1994).

Os aloanticorpos eritrocitários apresentam prevalências distintas, pois as suas produções dependem da imunogenicidade e frequência dos determinantes antigênicos, além da eficiência imunológica de cada indivíduo, em uma determinada população.

A importância clínica dos aloanticorpos eritrocitários é determinada pela: (1) capacidade de destruição celular *in vivo* (intra ou extravascular); (2) possibilidade de atravessar a barreira placentária; (3) frequência e imunogenicidade do antígeno correspondente; (4) a especificidade do aloanticorpo; (5) a amplitude térmica; (6) a sub classe IgG; (7) constante de equilíbrio do aloanticorpo; e (8) capacidade de ativar o sistema complemento (HOLBURN, 1970; NANCE, 1990; MOLLISON, 1997).

Recomenda-se na prática transfusional atual a realização de transfusões de hemácias com fenótipos compatíveis com os antígenos eritrocitários mais imunogênicos, como prevenção da aloimunização, considerando os riscos associados às transfusões e gestações futuras, como hemólise pós-transfusional e doença hemolítica do recém-nascido, respectivamente. Em receptores portadores de aloanticorpos eritrocitários contra antígenos de alta frequência é necessário conduta transfusional especial, como transfusão autóloga, ou doações dirigidas de familiares, ou uso de hemácias criopreservadas de fenótipos raros (SOLVES, 1997).

A destruição imune se inicia quando os aloanticorpos se ligam aos seus antígenos correspondentes na superfície das hemácias. Os sistemas biológicos que podem ser ativados são: (1) sistema complemento; (2) o sistema de coagulação; (3) sistema fibrinolítico; e (4) os

mediadores vasoativos que, por sua vez, afetam os sistemas renal, circulatório, reticuloendotelial e o nervoso autônomo (DELVES, 2000a).

A maioria das reações hemolíticas agudas ou tardias *in vivo* provavelmente envolve o complemento em algum grau, uma vez que os aloanticorpos eritrocitários pertencem às classes IgM e IgG (subclasse IgG1 e IgG3, esta última, predominantemente), que são capazes de ativar a cascata de amplificação do complemento (WINKELSTEIN, 1997). Os de subclasses IgG2 e IgG4 têm menor potencial para ativar o sistema complemento, ou facilitar o acoplamento de macrófagos do sistema reticuloendotelial às hemácias portadoras de imunoglobulinas dessas subclasses nas superfícies de suas membranas.

O complemento consiste de uma série complexa de proteínas que complementam os efeitos específicos dos anticorpos. É um elemento essencial das defesas humorais, e seus diferentes constituintes são eficazes após ativação mútua, seguindo uma ordem bem estabelecida. Pode-se dizer que o complemento realiza as três seguintes atividades biológicas principais: (1) ativação do sistema imunológico (macrófagos); (2) lise de células alvo; e (3) facilitação da fagocitose do antígeno (opsonização pela adesão de componentes do complemento às células). Estes eventos estão baseados em uma cascata de amplificação enzimática ativada por uma de suas três vias: (1) a clássica, na presença do complexo antígeno-anticorpo; (2) alternativa na ausência do complexo antígeno-anticorpo, e (3) via da lecitina pela interação de carboidratos com proteínas plasmáticas ligadoras de manoses (DELVES, 2000a).

Anticorpos que fixam complemento afetam as hemácias *in vivo*, pela produção de lesão na membrana eritrocitária, que resulta em lise intravascular osmótica aguda (hemólise intravascular), e/ou pela indução de uma mudança na membrana, que resulta em seqüestro e destruição extravascular das hemácias alteradas, pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial

(hemólise extravascular). Este último mecanismo ocorre com maior frequência e, portanto, é considerado importante do ponto de vista clínico (THOMPSON, 1968).

Quando a via clássica do complemento é ativada, C3a e C5a são liberados no plasma e atuam como potentes anafilotoxinas (DELVES, 2000b). Conseqüentemente, aumentando a vasodilatação e permeabilidade do endotélio vascular. Através da liberação de aminas vasoativas, tais como: serotonina e histamina, que podem produzir febre, hipotensão arterial e choque.

Na seqüência de ativação do sistema complemento os pontos importantes são a ativação de C3, para produzir o complexo C4b2b3b (convertase de C5), e a fixação não enzimática da unidade de ataque da membrana, C8 e C9, sobre o complexo C5b67 fixado à membrana resulta em hemólise intravascular, manifesta laboratorialmente por hemoglobinúria, redução de haptoglobulina sérica e presença de hemoglobina livre no plasma. Se for produzido C5 convertase insuficiente, apenas o complexo contendo C3b permanece na membrana e a hemólise intravascular não ocorrerá. No entanto as hemácias revestidas de C3b sofrem hemólise extravascular, pela interação com receptores para C3b nas células fagocitadas. O componente C3b ligado à célula pode sofrer inativação pela proteína plasmática inibidora, denominada fator I, o que evita a progressão para a clivagem de C5. Desta forma, a lise não ocorre e a superfície celular permanece revestida com o fragmento C3d inerte (KNIGHT, 1995).

O sistema complemento ativado libera substâncias tromboplásticas, que ativam a cascata de coagulação podendo produzir um estado de coagulação intravascular disseminada. O fator XII ativado reage, adicionalmente, com outras proteínas plasmáticas, ativando a pré-caliceína que se torna uma enzima ativa capaz de catalisar a produção de caliceína. A caliceína, por sua vez, converte o cininogênio plasmático na proteína vasoativa bradicinina que apresenta numerosos efeitos fisiológicos. Entre tais efeitos fisiológicos estão: o relaxamento da musculatura lisa

arteriolar, e o aumento da permeabilidade capilar, o que pode resultar em vasodilatação periférica e hipotensão arterial. O efeito cumulativo é hipotensão arterial sistêmica, coagulação intravascular disseminada e vasoconstrição renal, levando ao choque, insuficiência renal e, ocasionalmente, morte.

Essas reações transfusionais hemolíticas podem ser divididas em imediatas ou tardias. As imediatas são aquelas que ocorrem dentro das primeiras 24 horas após a transfusão sangüínea caracterizadas por hemólise intravascular. As tardias são aquelas que ocorrem após as primeiras 24 horas da transfusão sangüínea caracterizada por hemólise extravascular.

A hemólise intravascular é caracterizada primariamente pela queda súbita e maciça no hematócrito e liberação de hemoglobina livre no plasma. A maioria destes casos está relacionada à incompatibilidade do sistema ABO, uma vez que anticorpos anti-A e anti-B estão presentes em altas concentrações no plasma e reagem com sítios antigênicos presentes em grande quantidade na superfície dos eritrócitos, formando complexo antígeno-anticorpo com as hemácias transfundidas. A incompatibilidade dos sistemas Rh e Kell também podem produzir hemólise intravascular (MOLTHAN, 1984).

Na hemólise extravascular a queda do hematócrito e a liberação de hemoglobina livre no plasma ocorrem de forma lenta, que é mediada diretamente por anticorpos IgG e/ou fração C3b do sistema complemento, situados na superfície da membrana citoplasmática das hemácias, que interagem com receptores específicos presentes em macrófagos do sistema reticuloendotelial (FABRON JR, 1998). Os macrófagos no baço e fígado têm receptores para C3b e para porção Fc da molécula IgG. Os macrófagos esplênicos são mais ricamente supridos de receptores para porção Fc da molécula de IgG, enquanto os macrófagos hepáticos são de receptores para C3b. Os macrófagos acoplam-se e imobilizam as hemácias revestidas com IgG e/ou C3b, produzindo

lesão celular através de um ataque mediado por enzimas à membrana eritrocitária. De modo que parte da membrana eritrocitária é fagocitada, e à medida que as hemácias perdem área de superfície em suas membranas, elas passam a assumir uma forma progressivamente mais esférica. Estes esferócitos perdem sua capacidade de atravessar a microcirculação e de suportar alterações osmóticas, químicas ou físicas, e assim, sua sobrevivência fica reduzida. Com frequência, os microesferócitos podem ser observados em esfregaços corados de sangue periférico, nos receptores que apresentam hemólise extravascular.

Um fenômeno que pode poupar a destruição das hemácias com C3b na superfície de suas membranas, é a conversão do C3b em C3d (KNIGHT, 1995). Como os macrófagos não têm receptores para C3d, as hemácias que escapam da interação inicial com os macrófagos do sistema reticuloendotelial podem persistir na circulação por períodos prolongados, apesar de sensibilizadas com C3d. Isto provoca uma reação positiva com o soro antiglobulina poliespecífico, mas sem fenômeno hemolítico *in vivo* (GORST, 1980).

As reações transfusionais hemolíticas tardias ocorrem com a frequência de 1 para cada 1.300 a 6.715 transfusões de concentrados de hemácias, sendo que em 20% dos receptores apresentaram hemólise moderada a severa, podendo contribuir com a mortalidade do receptor (MARSHALL, 1999; PINEDA, 1999; RAMSEY, 1994). A incidência de reações transfusionais hemolíticas tardias tem demonstrado uma curva descendente (PINEDA, 1999), devido os avanços nas técnicas de detecção de aloanticorpos eritrocitários, e programas de transfusões de hemácias imunofenotipadas. Podendo ocorrer entre 5 a 10 dias após transfusões de eritrócitos incompatíveis, com quadro de febre baixa, icterícia e queda da hemoglobina (WINKELSTEIN, 1997). O diagnóstico torna-se mais difícil de se realizar nos receptores portadores de anemia

falciforme, quando ocorre simultaneamente a hemólise não imunológica durante as crises de falcização (KING, 1997).

Os aloanticorpos mais implicados na reação transfusional hemolítica tardia são os dirigidos contra antígenos dos sistemas Rh (34%), Kidd (30%), Duffy (14%), Kell (13%) e MNS (4%) (WINKELSTEIN, 1997). Os aloanticorpos anti-Kidd são de difícil detecção com as técnicas imunohematológicas rotineiras, e geralmente são os aloanticorpos mais fracamente reativos quando associado a outros no soro do receptor.

Os concentrados de hemácias não deleucocitados apresentam células apresentadoras de antígenos viáveis, favorecendo a aloimunização, ao contrário de concentrados de hemácias deleucocitados que apresentam perda da atividade co-estimuladora de leucócitos do doador, diminuindo o risco de aloimunização (MINCHEFF, 1995).

As reações entre antígenos e anticorpos produzem imunocomplexos que não são visíveis. A necessidade de se investigar as reações imunológicas *in vitro* estimulou o desenvolvimento de uma variedade de técnicas imunológicas com o objetivo de detectar e quantificar as reações antígeno-anticorpo, que podem ser: aglutinação, precipitação, inibição de aglutinação, hemólise, radioimunoensaio e imunofluorescência. A técnica de aglutinação visível que consiste em formar grumos de hemácias é o método mais utilizado em bancos de sangue, representando o fenômeno de interação entre antígenos e anticorpos (KNIGHT, 1995).

As hemácias mantêm uma certa distância entre si ao se repelirem por apresentarem cargas elétricas iguais. A diferença de potencial gerada pelas cargas elétricas negativas das membranas eritrocitárias e pela nuvem de cátions entre as hemácias é denominada de Potencial Zeta. Esta estabilidade pode ser alterada pela introdução de anticorpos específicos que se fixam aos antígenos da membrana eritrocitária, provocando aglutinação das hemácias. A aglutinação ocorre

quando a distância média entre elas se reduz a um valor mínimo. Esta distância depende dos valores de duas forças antagônicas: (1) a força de coesão que tende a agregar as hemácias; e (2) a força de repulsão, devido a eletronegatividade das hemácias. A noção de Potencial Zeta Crítico mostra que, para valores elevados do Potencial Zeta, as hemácias não se aglutinam mesmo na presença de anticorpos específicos. Diminuindo-se, lentamente, o Potencial Zeta do sistema, constata-se que a aglutinação ocorre em um determinado valor, que é o do Potencial Zeta Crítico (LOW, 1974).

Podemos alterar o Potencial Zeta modificando as forças iônicas, por exemplo, utilizando-se *LISS – Low-ionic-strength-salt-solution* (LÖW, 1974), ou da constante dielétrica, por exemplo, utilizando-se albumina bovina ou PEG - Polietilenoglicol (NANCE, 1987). A aglutinabilidade de um sistema é tanto maior quanto mais baixo for o valor do Potencial Zeta. A utilização de substâncias que alteram o Potencial Zeta pode reduzir o período de incubação das amostras com os reagentes de 60 a 90 minutos para 15 a 20 minutos, viabilizando o estudo imunohematológico *in vitro*, embora possa ocorrer perda de sensibilidade na detecção de aloanticorpo anti-K (KNIGHT, 1995). A potencialização com o uso de PEG é mais sensível e mais específica que albumina, *LISS* ou métodos enzimáticos, mas inferior a testes em fase sólida (BUNKER, 2001). Teste antiglobulina utilizando PEG detecta mais anticorpos sem significado clínico que *GEL-LISS*, o que não é adequado para a rotina; além do *GEL-LISS* ser mais sensível em pacientes, gestantes e doadores de sangue (DE CASTILHO, 1996).

Em imunohematologia a alteração da força iônica do meio é essencial para detecção e identificação de aloanticorpos em receptores de transfusão de concentrados de hemácias. Quando sensibilizamos as hemácias em meio isotônico de baixa força iônica, a velocidade de fixação e a

quantidade de anticorpos fixados são consideravelmente aumentadas. Esse fato nos permite aumentar a eficácia e diminuir o tempo de incubação do teste (ODELL, 1983).

Deteção e identificação apropriada de aloanticorpos eritrocitários é importante para a seleção de concentrados de hemácias para transfusão, na investigação de doença hemolítica do recém-nascido, e das reações transfusionais hemolíticas imediatas e tardias.

Os testes de triagem, para detectar aloanticorpos eritrocitários no receptor, utilizam duas ou três amostras de hemácias identificadas, denominadas hemácias de triagem. As hemácias de triagem são comercializadas em suspensões de hemácias, preparadas a partir de doações voluntárias de doadores do grupo O. São fenotipadas para a maioria dos antígenos eritrocitários que têm importância clínica, que são: D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, e Jk<sup>b</sup>.

Os testes de triagem para detectar aloanticorpos eritrocitários apresentam limitações, como: (1) não detectar alguns antígenos com frequência menor que 10%, que não estejam presentes nas hemácias de triagem, e (2) podem apresentar resultados falso negativos quando a titulação ou concentração do anticorpo estiver abaixo do nível de detecção (BORAL, 1977; GIBLETT, 1977).

O tratamento de hemácias com enzimas (tripsina, bromelina, ou papaína) aumenta a reatividade de alguns anticorpos específicos, enquanto elimina a reatividade de outros. Anti-Fy<sup>a</sup>, anti-Fy<sup>b</sup>, anti-M, anti-N, e anti-S não reagem com hemácias tratadas com enzimas proteolíticas que clivam a glicoforina A, porque seus antígenos correspondentes são removidos ou desnaturados no tratamento enzimático (REISNER, 1996). Outros por sua vez, aumentam a reatividade, como: anti-Rh, anti-Kidd, anti-P1 e anti-I (KNIGHT, 1995). O uso rotineiro de

hemácias tratadas com enzimas proteolíticas produziria mais testes imunohematológicos pré-transfusionais, do que benefícios na acurácia (ISSITT, 1993).

Uma das importantes responsabilidades de diretores de serviços transfusionais é desenvolver estratégias que otimizem a segurança do receptor, principalmente na detecção e identificação de aloanticorpos eritrocitários, utilizando métodos sensíveis, específicos e de baixo custo (BUNKER, 2001).

Os testes de triagem de aloanticorpos eritrocitários podem ser realizados utilizando vários métodos, como tubos de ensaio, cartelas com microtubos preenchidos com gel Sephadex® (Figura 1), colunas de aglutinação, microplacas (KNIGHT, 1995; LLOPIS, 1996; REIS, 1993; UTHEMANN, 1990).

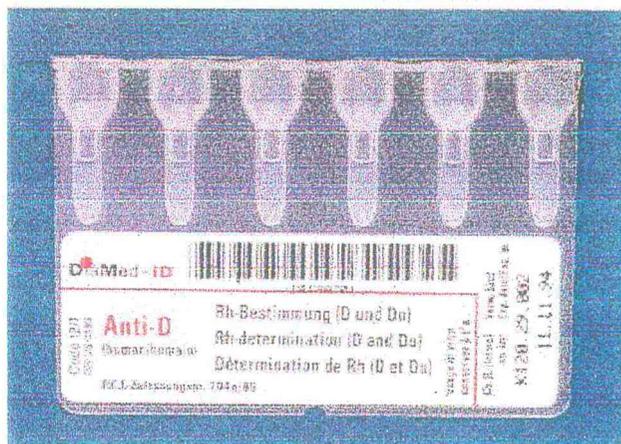


Figura 1 – Modelo da cartela utilizada nesse estudo.

Os testes em cartela com microtubos com gel Sephadex<sup>®</sup> são de fácil realização e leitura, sensíveis e reprodutíveis. As vantagens são: (1) a pesquisa de aloanticorpos eritrocitários pode ser realizada sem a necessidade de lavar as hemácias, reduzindo o risco biológico (LAPIERRE, 1990), (2) necessita de pequenas quantidades de reagentes, (3) as cartelas podem ser armazenadas por um período de 7 dias, (4) possibilita a realização de outras leituras, e (5) os resultados nos microtubos podem ser fotocopiados ou digitalizados (KNIGHT, 1995; LAPIERRE, 1990; SALAMA, 1992; WEISBACH, 1999; SCHONEWILLE, 1999).

Estudos recentes utilizando teste em gel têm demonstrado maior sensibilidade que os testes tradicionais na detecção e identificação de aloanticorpos eritrocitários, e na Europa esta técnica está sendo utilizada com maior frequência (CATE, 1999; BROMILOW, 1991; TITLESTAD, 1997; WEISBACH, 1999).

Um dos principais fatores que afetam a acurácia dos testes é a leitura dos resultados, especialmente quando estes apresentam uma aglutinação muito fraca (Figuras 2 e 3). Para obter maior segurança, a reação deve ser examinada por um profissional qualificado, dentro de um espaço de tempo útil, e ainda assim, a interpretação pode ser difícil (LAPIERRE, 1990).

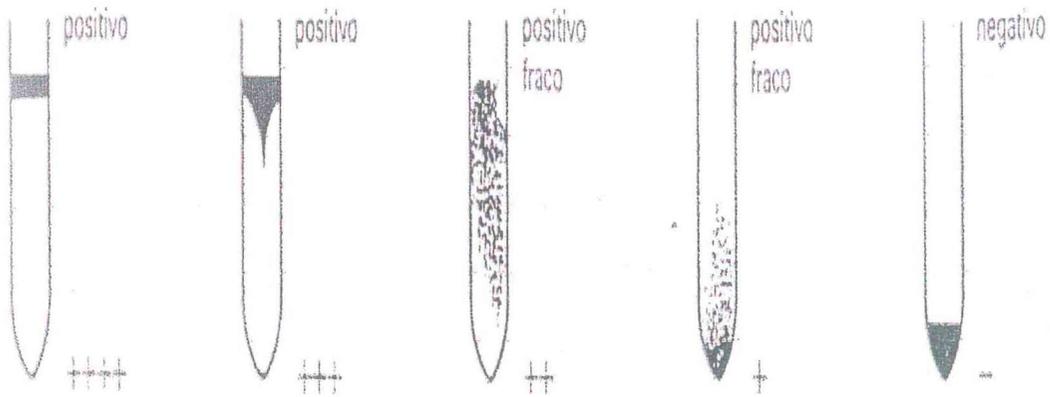


Figura 2 – Modelo de leitura e de quantificação de resultados nas cartelas.

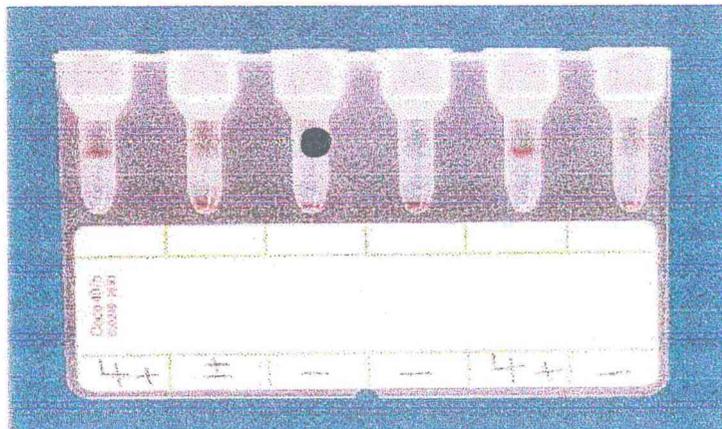
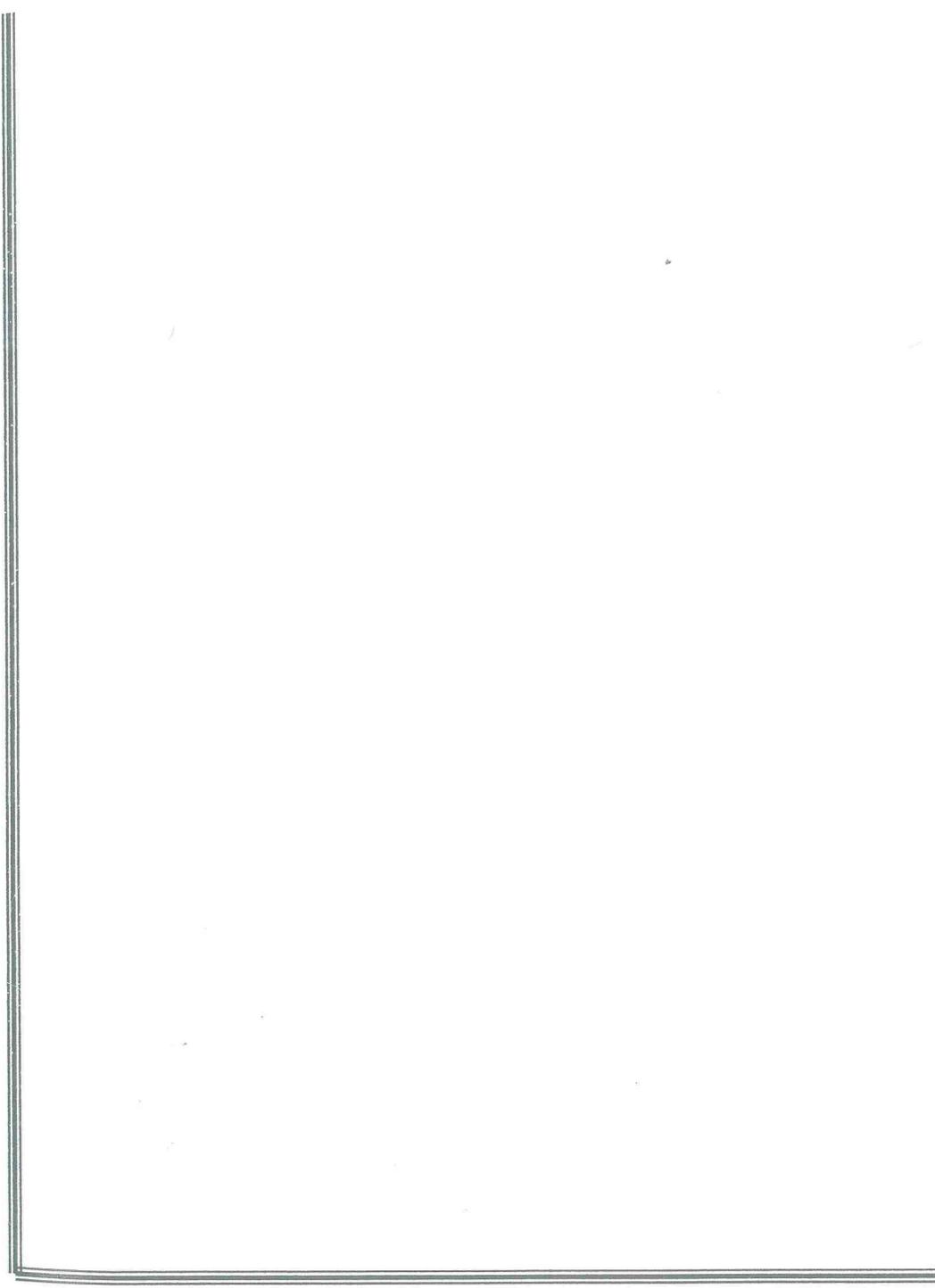


Figura 3 – Modelo da cartela após centrifugação e com os resultados registrados.

A aloimunização eritrocitária após transfusão de concentrados de hemácias é um evento freqüente com importantes repercussões clínicas. Os dados disponíveis na literatura médica foram obtidos em populações portadoras de doenças crônicas, submetidas a transfusões de

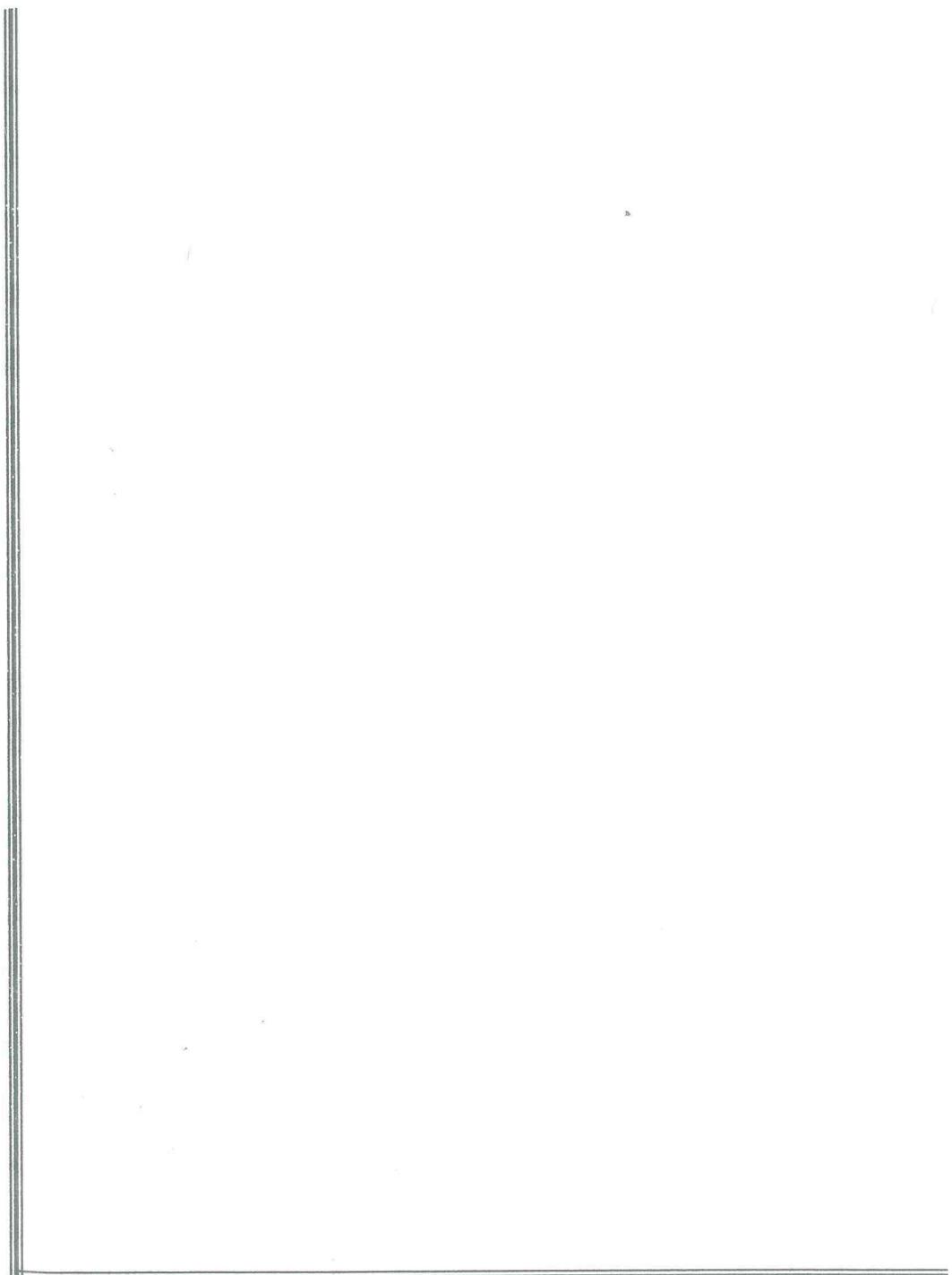
repetição. Faz-se necessário a obtenção de dados sobre aloimunização eritrocitária após transfusão de concentrados de hemácias em receptores portadores de condições agudas; a identificação dessa frequência servirá de base para estimular os médicos a refletirem na otimização do uso de transfusão de concentrados de hemácias, e os diretores de bancos de sangue a implementarem estratégias mais eficazes na detecção e identificação de aloanticorpos eritrocitários, possibilitando a prevenção de efeitos adversos relacionados à transfusão de concentrados de hemácias, em situações emergenciais.



## **OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

1. Determinar a incidência de aloimunização eritrocitária após transfusão de concentrados de hemácias em receptores com condições clínicas agudas, internados no Instituto Doutor José Frota;
2. Identificar os aloanticorpos detectados;
3. Determinar os aloanticorpos eritrocitários mais freqüentes;
4. Identificar fatores de risco envolvidos na aloimunização eritrocitária;
5. Determinar o risco de aloimunização eritrocitária;
6. Determinar o tempo médio para detecção de aloanticorpos.



## **PACIENTES E MÉTODOS**



e solicitado autorização para a participação dos receptores com idade inferior a 18 anos ou que não conseguiam expressar a vontade (Termo de consentimento pós-esclarecido - Anexos).

Os receptores incluídos no estudo foram submetidos à coleta de amostra de sangue para pesquisa de aloanticorpos eritrocitários antes de cada transfusão subsequente de concentrado de hemácias. Quando o intervalo entre as transfusões de concentrados de hemácias foi superior a sete dias, foi realizada uma coleta extra de amostra de sangue para pesquisa de aloanticorpo, nos dias múltiplos de sete a partir da data da última transfusão. Foi aleatória a escolha do intervalo de sete dias entre as pesquisas de aloanticorpos.

Nos casos positivos na pesquisa de aloanticorpos, foram realizados testes de identificação do(s) aloanticorpo(s). Um protocolo com dados de interesse relativos ao receptor foi preenchido, que incluía: identificação, sistema sanguíneo ABO e antígeno D, número de concentrados de hemácias transfundidas, e história gestacional (Protocolo - Anexos).

Os receptores portadores de aloanticorpos eritrocitários identificados passaram a receber transfusões de concentrados de hemácias imunofenotipadas, garantindo a ausência do antígeno específico ao aloanticorpo conhecido, prevenindo reação transfusional hemolítica imediata ou tardia.

Após o teste de identificação do aloanticorpo, o procedimento de pesquisa de novos aloanticorpos continuou para detectar novos aloanticorpos.

A suspeição da presença de um novo aloanticorpo eritrocitário nos receptores portadores de um ou mais aloanticorpos previamente detectados, ocorreu quando a pesquisa de aloanticorpo posterior apresentou resultados diferentes do anterior, ou ainda a prova cruzada entre as hemácias imunofenotipadas do doador com o soro do receptor foi incompatível. Nessas circunstâncias foram realizados novos testes de identificação.

O limite de análise de pesquisa e identificação de aloanticorpos eritrocitários dependeu do tempo que o receptor permaneceu internado.

## **Métodos**

### **Coleta de amostras de sangue do receptor**

As amostras de sangue dos receptores foram obtidas através de técnica de flebotomia utilizando sistema a vácuo, coletando dois tubos de 5mL cada, um com anticoagulante EDTA e outro sem anticoagulante (*BD Vacutainer<sup>TM</sup>*, *Becton & Dickinson*, Estados Unidos da América).

Os tubos de coleta das amostras foram centrifugados a 3.400 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, com o objetivo de se obter no tubo com anticoagulante as hemácias sedimentadas para preparar a suspensão de hemácias a 1%, e soro no tubo sem anticoagulante.

### **Deteção de aloanticorpo no receptor**

Foi utilizada a técnica de gel centrifugação para deteção de aloanticorpos eritrocitários, utilizando a modalidade de cartela com coluna de gel do tipo *ID-card/NaCl* e amostras de hemácias imunofenotipadas do tipo *ID-DiaCell I-II* (*DiaMed diagnostic and medical products*, Suíça).

As cartelas utilizadas possuem seis microtubos contendo suspensão de gel neutro. Cada cartela poderia ser utilizada para detecção de aloanticorpos em dois receptores distintos. A cartela foi identificada para um receptor nos três primeiros microtubos, e outro receptor nos três últimos microtubos, da esquerda para direita. Os microtubos de cada receptor foram identificados para hemácia I, hemácia II e autocontrole.

Para a realização do teste de autocontrole foi preparada uma suspensão de hemácias a 1% do receptor, utilizando 1mL de *ID-Diluent 2* (solução de LISS) e 10 $\mu$ L de hemácias sedimentadas do receptor. A sedimentação das hemácias do receptor consistia em centrifugar o tubo de coleta de amostra de sangue com anticoagulante (EDTA) a 3.400rpm durante 10 minutos.

O soro do receptor foi obtido do sobrenadante da amostra de sangue do tubo de coleta sem anticoagulante, após centrifugação a 3.400rpm durante 10 minutos.

O espaço superior dos dois primeiros microtubos com coluna de gel de cada receptor foi utilizado para incubar 50 $\mu$ L hemácias imunofenotipadas I e II com 25 $\mu$ L de soro do receptor, e no terceiro microtubo com coluna de gel de cada receptor foi utilizado para incubar 50 $\mu$ L suspensão de hemácias a 1% do receptor com 25 $\mu$ L de seu próprio soro, para o teste de autocontrole. As cartelas foram incubadas a temperatura de 37°C no *ID-Incubator* durante 15 minutos, e em seguida submetidas à centrifugação com 1.175rpm durante 10 minutos para separar as hemácias aglutinadas das não aglutinadas. As hemácias não aglutinadas atravessam a coluna de gel até a sua base, enquanto as hemácias aglutinadas pela formação do complexo antígeno anticorpo foram retidas na parte superior ou no transcorrer da coluna de gel.

O resultado é considerado negativo quando as hemácias em sua totalidade atingem a base do microtubo com coluna de gel, e positivo quando as hemácias não atingem em sua totalidade a

base da coluna de gel do microtubo, variando de um resultado positivo fraco até 4+, conforme a distribuição das mesmas no percurso através da coluna de gel (Figura 2).

Os equipamentos necessários foram: *ID-Dispenser*, *ID-Pipetor*, *ID-Working table*, *ID-Incubator*, *ID-Centrifuge*, todos produzidos pela *DiaMed diagnostic and medical products*, Suíça.

**Tabela 2** – Descrição dos materiais utilizados.

ID-DiaCell I-II	ID-Dispenser
ID-DiaPanel	ID-Pipetor
Suspensão de hemácias a 1%	ID-Working table
ID-Diluent 1	ID-Incubator
ID-Diluent 2	ID-Centrifuge
BD Vacutainer	ID-card/NaCl

### **Identificação de aloanticorpo no receptor**

Foi utilizada a técnica de gel centrifugação para identificação de aloanticorpos eritrocitários, utilizando a modalidade de cartela com coluna de gel do tipo *ID-card/NaCl* e painel de amostras de hemácias imunofenotipadas do tipo *ID-DiaPanel* com 11 células (*DiaMed diagnostic and medical products*, Suíça).

As cartelas utilizadas possuem seis microtubos contendo suspensão de gel neutro. Para cada receptor foram utilizadas duas cartelas para identificação de aloanticorpos. As cartelas foram identificadas de 1 a 11 em cada microtubo, correspondendo à mesma numeração das hemácias imunofenotipadas utilizadas. O décimo segundo microtubo foi identificado para o autocontrole.

Para a realização do teste de autocontrole foi preparada uma suspensão de hemácias a 1% do receptor, utilizando 1mL de *ID-Diluent 2* (solução de LISS) e 10 $\mu$ L de hemácias sedimentadas do receptor. A sedimentação das hemácias do receptor consistia em centrifugar o tubo de coleta de amostra de sangue com anticoagulante (EDTA) a 3.400rpm durante 10 minutos.

O soro do receptor foi obtido do sobrenadante da amostra de sangue do tubo de coleta sem anticoagulante, após centrifugação a 3.400rpm durante 10 minutos.

No espaço superior dos onze primeiros microtubos com coluna de gel identificados com os dados do receptor foi adicionado 50 $\mu$ L da suspensão de hemácias imunofenotipadas numeradas de 1 a 11 (*ID-DiaPanel*) e 25 $\mu$ L de soro do receptor, e no décimo segundo microtubo com coluna de gel com os dados do receptor adicionamos 50 $\mu$ L de suspensão de hemácias a 1% do receptor com 25 $\mu$ L de soro do próprio receptor, para a realização do teste de autocontrole. As cartelas foram incubadas à temperatura de 37°C no *ID-Incubator* durante 15 minutos, e em seguida submetidas à centrifugação com 1.175rpm durante 10 minutos para separar as hemácias aglutinadas das não aglutinadas. As hemácias não aglutinadas atravessaram a coluna de gel até a sua base, enquanto as hemácias aglutinadas pela formação do complexo antígeno anticorpo foram retidas na parte superior ou no transcorrer da coluna de gel.

O resultado foi considerado negativo quando as hemácias em sua totalidade atingiram a base do microtubo com coluna de gel, e positivo quando as hemácias não atingiram em sua

totalidade a base da coluna de gel do microtubo, variando de um resultado positivo fraco até 4+, conforme a distribuição das mesmas no percurso através da coluna de gel (Figura 2).

Durante a realização da identificação de aloanticorpo com tratamento enzimático, foi utilizado *ID-Diluent 1* (Bromelina), adicionando 25µL de *ID-Diluent 1* nos doze microtubos utilizados no teste.

Os equipamentos necessários foram: *ID-Dispenser*, *ID-Pipetor*, *ID-Working table*, *ID-Incubator*, *ID-Centrifuge*, todos produzidos pela *DiaMed diagnostic and medical products*, Suíça.

## **Descrições das técnicas e testes utilizados**

### **Técnica de obtenção de soro do receptor**

1. Deixar o tubo de coleta de amostra de sangue sem anticoagulante em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente;
2. Centrifugar o tubo de coleta de amostra de sangue sem anticoagulante por 10 minutos a 3.400rpm;
3. Transferir apenas o sobrenadante para outro tubo de hemólise identificado previamente.

### **Técnica de preparo de suspensão de hemácias do doador a 1%**

1. Deixar o tubo de coleta de amostra de sangue com anticoagulante em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente;
2. Centrifugar o tubo de coleta de amostra de sangue com anticoagulante por 10 minutos a 3.400rpm;
3. Identificar um tubo de hemólise para suspensão de hemácias a 1%;
4. Adicionar, ao tubo de hemólise identificado, 1mL de *ID-Diluent 2* e 10µL de hemácias sedimentadas após a centrifugação;
5. Homogeneizar a suspensão.

#### **Teste de detecção de aloanticorpos eritrocitários**

1. Identificar a cartela *ID-NaCl*, escrevendo o nome do receptor, data da realização do teste, e um microtubo para as hemácias teste I, e outro microtubo para hemácias teste II, e outro microtubo para autocontrole (Ac);
2. Homogeneizar as hemácias teste I e II (*ID-DiaCell I-II*);
3. Remover a película de alumínio que recobre os microtubos;
4. Pipetar e adicionar 50µL de cada hemácia teste I e II (*ID-DiaCell I-II*) no microtubo correspondente à identificação;
5. Pipetar e adicionar 50µL da suspensão de hemácias a 1% do receptor no microtubo identificado para realização do teste de autocontrole;
6. Adicionar 25µL de soro do receptor nos três microtubos identificados;
7. Incubar a cartela *ID-NaCl* por 15 minutos a 37°C no *ID-Incubator*;
8. Centrifugar a cartela *ID-NaCl* por 10 minutos no *ID-Centrifuge* a 1.175rpm;
9. Ler e anotar os resultados.

### **Teste de identificação de aloanticorpos eritrocitários a 37°C**

1. Identificar duas cartelas *ID-NaCl*, escrevendo o nome do receptor, data da realização do teste, e os microtubos de 1 a 11 e autocontrole (Ac);
2. Homogeneizar as hemácias teste 1 a 11 do *ID-DiaPanel*;
3. Remover a película de alumínio que recobre os microtubos;
4. Pipetar e adicionar 50µL de cada hemácia teste 1 a 11 (*ID-DiaPanel*) nos respectivos microtubos identificados;
5. Pipetar e adicionar 50µL da suspensão de hemácias a 1% do receptor no microtubo identificado para realização do teste de autocontrole;
6. Adicionar 25µL de soro do receptor nos doze microtubos identificados;
7. Incubar as cartelas *ID-NaCl* por 15 minutos a 37°C no *ID-Incubator*;
8. Centrifugar as cartelas *ID-NaCl* por 10 minutos no *ID-Centrifuge* a 1.175rpm;
9. Ler e anotar os resultados.

### **Teste de identificação de aloanticorpos eritrocitários a temperatura ambiente**

1. Identificar duas cartelas *ID-NaCl*, escrevendo o nome do receptor, data da realização do teste, e os microtubos de 1 a 11 e autocontrole (Ac);
2. Homogeneizar as hemácias teste 1 a 11 do *ID-DiaPanel*;
3. Remover a película de alumínio que recobre os microtubos;
4. Pipetar e adicionar 50µL de cada hemácia teste 1 a 11 (*ID-DiaPanel*) nos respectivos microtubos identificados;

5. Pipetar e adicionar 50 $\mu$ L da suspensão de hemácias a 1% do receptor no microtubo identificado para realização do teste de autocontrole;
6. Adicionar 25 $\mu$ L de soro do receptor nos doze microtubos identificados;
7. Incubar as cartelas *ID-NaCl* por 15 minutos a temperatura ambiente;
8. Centrifugar as cartelas *ID-NaCl* por 10 minutos no *ID-Centrifuge* a 1.175rpm;
9. Ler e anotar os resultados.

#### **Teste de identificação de aloanticorpos eritrocitários a 4°C**

1. Colocar duas cartelas *ID-NaCl* à temperatura de 4°C por 30 minutos;
2. Identificar as duas cartelas *ID-NaCl* resfriadas, escrevendo o nome do receptor, data da realização do teste, e os microtubos de 1 a 11 e Ac (autocontrole);
3. Homogeneizar as hemácias teste 1 a 11 do *ID-DiaPanel*;
4. Remover a película de alumínio que recobre os microtubos;
5. Pipetar e adicionar 50 $\mu$ L de cada hemácia teste 1 a 11 (*ID-DiaPanel*) nos respectivos microtubos identificados;
6. Pipetar e adicionar 50 $\mu$ L da suspensão de hemácias a 1% do receptor no microtubo identificado para realização do teste de autocontrole;
7. Adicionar 25 $\mu$ L de soro do receptor nos doze microtubos identificados;
8. Incubar as cartelas *ID-NaCl* por 60 minutos a 4°C;
9. Centrifugar as cartelas *ID-NaCl* por 10 minutos no *ID-Centrifuge* a 1.175rpm;
10. Ler e anotar os resultados.

## Teste de identificação de aloanticorpos eritrocitários a 37°C tratados com enzima (Bromelina)

1. Identificar duas cartelas *ID-NaCl*, escrevendo o nome do receptor, data da realização do teste, e os microtubos de 1 a 11 e autocontrole (Ac);
2. Homogeneizar as hemácias teste 1 a 11 do *ID-DiaPanel*;
3. Remover a película de alumínio que recobre os microtubos;
4. Pipetar e adicionar 50µL de cada hemácia teste 1 a 11 (*ID-DiaPanel*) nos respectivos microtubos identificados;
5. Pipetar e adicionar 50µL da suspensão de hemácias a 1% do receptor no microtubo identificado para realização do teste de autocontrole;
6. Adicionar 25µL de soro do receptor nos doze microtubos identificados;
7. Adicionar 25µL de *ID-Diluent 1* nos doze microtubos identificados;
8. Incubar as cartelas *ID-NaCl* por 15 minutos a 37°C no *ID-Incubator*;
9. Centrifugar as cartelas *ID-NaCl* por 10 minutos no *ID-Centrifuge* a 1.175rpm;
10. Ler e anotar os resultados.

## Interpretação de resultados

O resultado foi considerado negativo quando as hemácias em sua totalidade atingiram a base do microtubo com coluna de gel.

O resultado foi considerado positivo quando as hemácias não atingiram em sua totalidade a base da coluna de gel do microtubo, variando de um resultado positivo fraco até 4+, conforme a distribuição das mesmas no percurso através da coluna de gel (Figuras 2 e 3).

### **Análise da fase de detecção**

Reação negativa indicou a ausência de aloanticorpo eritrocitário detectável no soro do receptor.

Reação positiva com uma ou duas amostras de hemácias testes imunofenotipadas e autocontrole negativo, indicou a presença de aloanticorpo eritrocitário no soro do receptor.

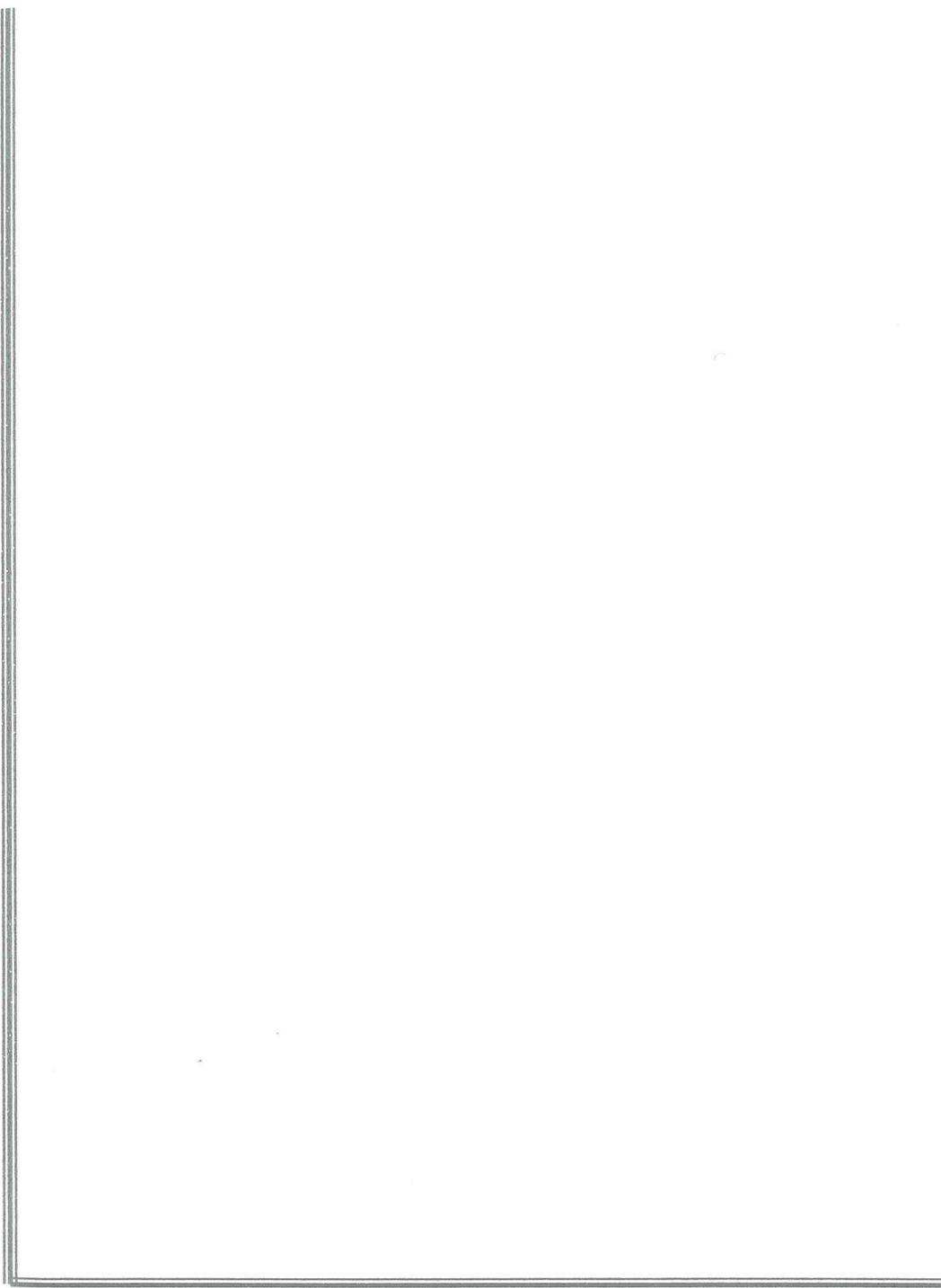
Reação positiva com as duas amostras de hemácias teste imunofenotipadas e autocontrole positivo, provavelmente foi devida à reação não específica, ou presença de auto-anticorpo eritrocitário no soro do receptor.

O microtubo para os testes de auto-controle deve apresentar resultado negativo. O resultado positivo invalidou os resultados dos testes.

### **Análise da fase de identificação**

Os resultados observados em cada hemácia teste imunofenotipada do painel foram anotados e comparados com as informações fornecidas pela *DiaMed* através de uma tabela, com o cruzamento dessas informações possibilitou a possível identificação do aloanticorpo eritrocitário. O autocontrole com resultado positivo invalidou os resultados. Resultados positivos em todas as hemácias testes do painel, e com o teste de autocontrole apresentando resultado

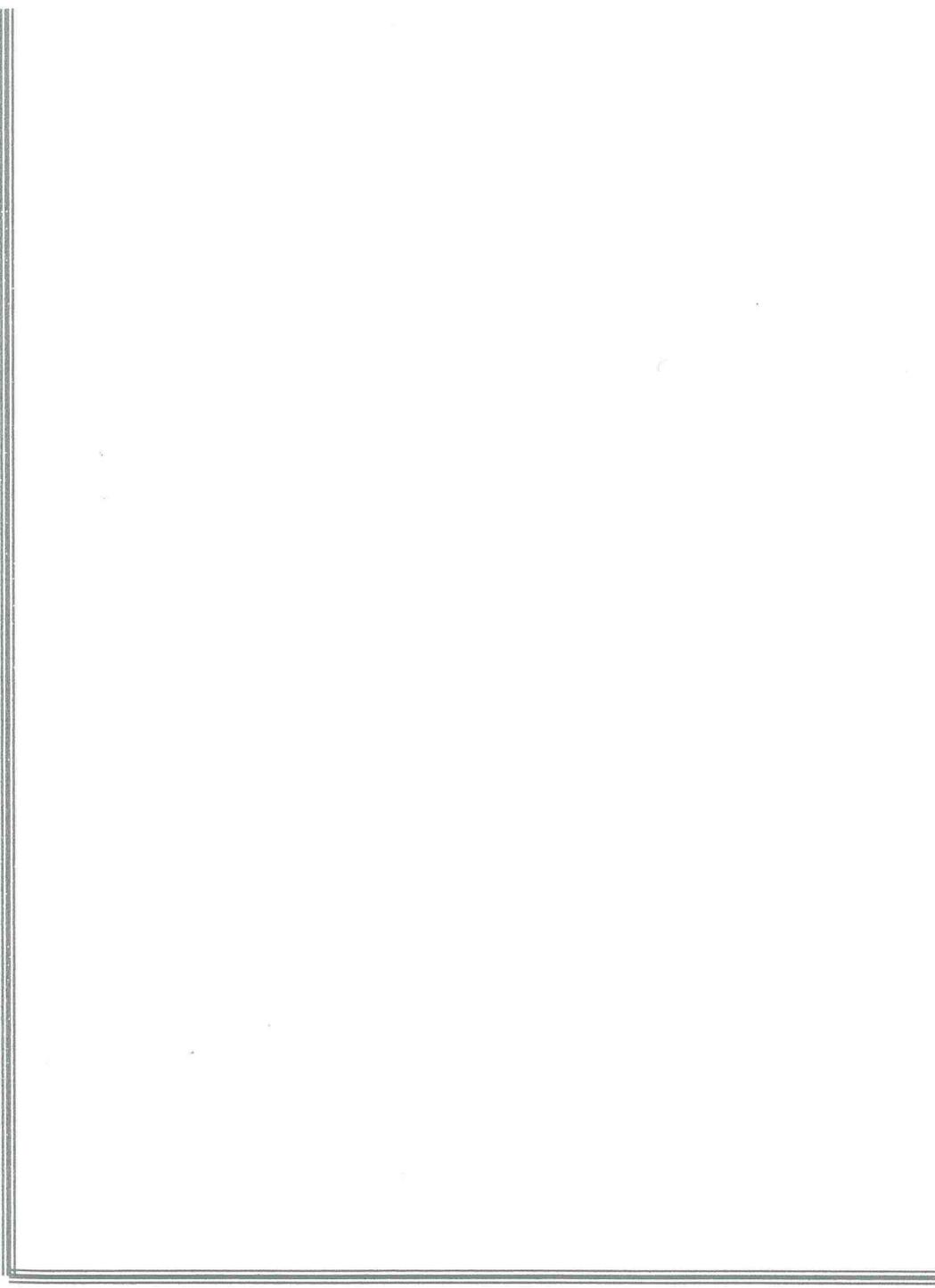
negativo foram provavelmente devido à reação não específica, ou poderia indicar a presença de aloanticorpo eritrocitário dirigido contra um antígeno de alta frequência.



# ANÁLISE ESTATÍSTICA

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística, realizada no laboratório de Estatística do Departamento de Matemática e Estatística da Universidade Federal do Ceará, utilizou a avaliação descritiva dos dados, o teste exato de Fisher, o teste qui-quadrado, o teste t de Student, para avaliar a significância de associações entre as variáveis estudadas. O nível de significância máximo de 5% foi considerado para definir associações significativas. O teste de regressão logística foi utilizado para modelar o efeito de variáveis de desfecho dicotômico. Foi utilizado o programa *SPSS for Windows*.



## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

No período de janeiro de 1999 a janeiro de 2001, 6.191 pacientes foram transfundidos com concentrados de hemácias, no Instituto Doutor José Frota (IJF), o que representa 1,5% dos pacientes atendidos nesse período. Desses, foram excluídos 501 (8,09%) receptores; sendo que 06 (0,1%) apresentaram aloanticorpos eritrocitários detectados antes de ser transfundidos no IJF, e 495 (7,99%) permaneceram internados no IJF por um período inferior a uma semana por alta hospitalar ou óbito. A população incluída foi constituída de 5.690 (91,91%) receptores.

Dos 5.690 receptores, 4.025 (70,74%) eram do sexo masculino, com a idade variando entre 1 a 88 anos, e 1.665 (29,26%) do sexo feminino, com a idade variando entre 1 a 85 anos. Foram transfundidas 16.547 unidades de concentrados de hemácias, sendo 11.967 (72,32%) nos receptores do sexo masculino, e 4.580 (27,68%) nos receptores do sexo feminino. A média de unidades transfundidas foi de 2.97 unidades por receptor masculino (1 a 22 unidades) com desvio padrão de 2.60, e 2.75 unidades por receptor feminino (1 a 21 unidades) com desvio padrão de 2.75 (Tabela 2).

**Tabela 3** – Distribuição do número de concentrados de hemácias transfundidos em função do sexo.

SEXO	CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS TRANSFUNDIDOS n(%)	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Masculino n = 4.025	11.967 (72,32)	2,97	2.60
Feminino n = 1.665	4.580 (27,68)	2,75	2.75
Total n = 5.690	16.547 (100)	2,91	2.40

A distribuição dos receptores em função do sistema de grupo sanguíneo ABO e antígeno D, foi a seguinte: O positivo 2.784 (48,93%) receptores, A positivo 1.807 (31,76%) receptores, B positivo 473 (8,32%) receptores, O negativo 246 (4,32%) receptores, A negativo 176 (3,09%) receptores, AB positivo 131 (2,3%) receptores, B negativo 49 (0,86%) receptores, e AB negativo 24 (0,42%) receptores (Tabela 3).

A distribuição dos concentrados de hemácias em função do sistema ABO e antígeno D, foi a seguinte: O positivo 8.142 (49,21%) unidades, A positivo 5.273 (31,87%) unidades, B positivo 1.387 (8,38%) unidades, O negativo 674 (4,07%) unidades, A negativo 503 (3,04%)

unidades, AB positivo 380 (2,3%) unidades, B negativo 136 (0,83%) unidades, e AB negativo 52 (0,3%) unidades (Tabela 3).

**Tabela 4** – Distribuição dos receptores e concentrados de hemácias transfundidos em função do sistema ABO e antígeno D.

SISTEMA ABO ANTÍGENO D	RECEPTORES (n)	%	CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS (n)	%
O positivo	2.784	48,93	8.142	49,21
A positivo	1.807	31,76	5.273	31,87
B positivo	473	8,32	1.387	8,38
O negativo	246	4,32	674	4,07
A negativo	176	3,09	503	3,04
AB positivo	131	2,30	380	2,30
B negativo	49	0,86	136	0,83
AB negativo	24	0,42	52	0,30
Total	5.690	100	16.547	100

Em 120 receptores (2,1%) foram detectados aloanticorpos eritrocitários, sendo 60 (50%) do sexo masculino, e 60 (50%) do sexo feminino. O percentual de aloimunização na população masculina foi de 1,49 e 3,6 na população feminina. Esses receptores apresentaram idade média de 40,91 anos, sendo 35,7 anos para o sexo masculino com desvio padrão de 19,60, e 46,13 anos

para o sexo feminino com desvio padrão de 18.30 (Tabela 4). O risco de ocorrência foi 2.42 maior na população feminina, variando entre 1.7 a 3.4 vezes ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 5** – Distribuição dos receptores aloimunizados em função do sexo e das médias de idade.

SEXO	n (%)	IDADE MÉDIA (anos)
Masculino	60 (1,49)	35,70
Feminino	60 (3,60)	46,13
Total	120 (2,10)	40,91

n(%)  $p < 0,0001$   
idade média  $p = 0,003$

Nos 60 casos do sexo feminino, 56 receptoras (93,33%) tinham história de gestação prévia e média transfusional de 4.46 unidades, e 4 receptoras (6,67%) não tinham história de gestação prévia e média transfusional de 3.50 unidades.

Os internamentos dos receptores aloimunizados foram motivados por situações emergenciais, em que predominou o trauma, com 85 receptores (70,83%), sendo 48 do sexo masculino (80%), e 37 do sexo feminino (61,67%); outros 30 receptores (25%) foram internados devido a motivos clínicos, e 5 receptores (4,17%) devido a motivos cirúrgicos (Tabela 5).

**Tabela 6** – Distribuição dos receptores aloimunizados em função do motivo do internamento e sexo.

MOTIVO DO INTERNAMENTO	ALOIMUNIZADOS		TOTAL n (%)
	Masculino – n (%)	Feminino – n (%)	
Trauma	48 (80,00)	37 (61,67)	85 (70,83)
Clínico	12 (20,00)	18 (30,00)	30 (25,00)
Cirúrgico	0 (0,00)	5 (8,33)	5 (4,17)
Total	60 (100)	60 (100)	120 (100)

$p = 0,2765$

A distribuição do sistema de grupo sanguíneo ABO e antígeno D nos receptores aloimunizados, foi a seguinte: O positivo 44 (36,67%) receptores, A positivo 36 (30%) receptores, O negativo 18 (15%) receptores, A negativo 07 (5,83) receptores, B positivo 06 (5%) receptores, AB positivo 04 (3,33%) receptores, B negativo 03 (2,5%) receptores, e AB negativo 02 (1,67%) receptores. (Tabela 6). A distribuição em função do antígeno D nos receptores aloimunizados foi a seguinte: 90 (75%) receptores com presença do antígeno D, e 30 (25%) receptores com ausência do antígeno D (Tabela 7).

Foram transfundidas nos receptores aloimunizados 562 unidades, sendo 298 (53,02%) unidades em receptores do sexo masculino, e 264 (46,98%) unidades nos receptores de sexo feminino, produzindo a média de 4.68 unidades por receptor com desvio padrão de 4.25, sendo a média de 4.97 unidades por receptor do sexo masculino com desvio padrão de 4.50, e 4,40 unidades por receptor do sexo feminino com desvio padrão de 3.99 (Tabela 8).

**Tabela 7** – Distribuição de receptores de concentrados de hemácias transfundidos em função da tipagem sangüínea do sistema ABO e antígeno D, e da aloimunização.

TIPAGEM SANGÜÍNEA	ALOIMUNIZAÇÃO		TOTAL
	Sim – n (%)	Não – n (%)	n (%)
O positivo	44 (36,67)	2.740 (49,19)	2.784 (48,93)
A positivo	36 (30,00)	1.771 (31,80)	1.807 (31,76)
B positivo	6 (5,00)	467 (8,38)	473 (8,32)
O negativo	18 (15,00)	228 (4,09)	246 (4,32)
A negativo	7 (5,83)	169 (3,03)	176 (3,09)
AB positivo	4 (3,33)	127 (2,28)	131 (2,30)
B negativo	3 (2,50)	46 (0,83)	49 (0,86)
AB negativo	2 (1,67)	22 (0,40)	24 (0,42)
Total	120 (100)	5.570 (100)	5.690 (100)

**Tabela 8** – Distribuição dos receptores de concentrados de hemácias em função do antígeno D e da aloimunização.

ANTÍGENO D	ALOIMUNIZAÇÃO		TOTAL n (%)
	Sim – n (%)	Não – n (%)	
Positivo	90 (75,00)	5.105 (91,65)	5.195 (91,30)
Negativo	30 (25,00)	465 (8,35)	495 (8,70)
Total	120 (100)	5.570 (100)	5.690 (100)

$p < 0,0001$

**Tabela 9** – Distribuição do número médio de concentrados de hemácias transfundidos em função do sexo e aloimunização.

SEXO	ALOIMUNIZAÇÃO		<i>P</i>
	Sim	Não	
	Média de CHT	Média de CHT	
Masculino	4,97	2,94	0,001
Feminino	4,40	2,69	0,002
Total	4,68	2,87	
<i>P</i>	0,468	<0,0001	

CHT – concentrados de hemácias transfundidos

Nos 120 receptores aloimunizados foram detectados 137 aloanticorpos, 71 (51,82%) aloanticorpos eritrocitários na população masculina, e 66 (48,18%) na população feminina. Desses foram identificados 130 aloanticorpos, que correspondem a 94,89%, e 7 aloanticorpos (5,11%) não foi possível identificar.

Os aloanticorpos eritrocitários mais frequentes foram: anti-E 25 (18,25%), anti-D 22 (16,06%), anti-M 16 (11,68%), anti-Kell 12 (8,76%), e anti-Jk<sup>a</sup> 8 (5,84%) (Tabela 9).

O intervalo de tempo para a detecção de aloanticorpos eritrocitários variou entre 03 e 97 dias, com a média global de 20.88 dias (Tabela 9). Os aloanticorpos eritrocitários mais frequentes apresentaram as seguintes médias: anti-E 24.48 dias, anti-D 19.73 dias, anti-M 23.62 dias, anti-Kell 21.75 dias, anti-Jk<sup>a</sup> 23.25 dias.

Os riscos de aloimunização, ou seja, a razão entre o número de aloanticorpos eritrocitários detectados e o número de concentrados de hemácias transfundidos, foram: risco global 0,83%, no sexo masculino 0,59%, e no sexo feminino 1,44% (Tabela 10).

Em 13 (10,83%) receptores aloimunizados foram detectados mais de um aloanticorpo eritrocitário, sendo 7 (53,85%) receptores do sexo masculino e 6 (46,15%) do sexo feminino. Nestes, foram identificados 30 (21,89%) aloanticorpos eritrocitários, sendo 18 (60%) nos receptores do sexo masculino, e 12 (40%) no de sexo feminino.

A média de concentrados de hemácias transfundidos nestes receptores foi de 5 unidades com desvio padrão de 5.34, nos do sexo masculino foi de 4.43 unidades com desvio padrão de 2.88, e nos do sexo feminino 5.67 unidades com desvio padrão de 7.58 (Tabela 11). A idade média nos receptores do sexo masculino foi de 30,14 anos com desvio padrão de 5.21, e no sexo feminino 51.5 anos com desvio padrão de 15.19 (Tabela 12).

**Tabela 10** – Distribuição dos aloanticorpos eritrocitários detectados em função do tempo transcorrido após a primeira transfusão de concentrado de hemácias.

ALOANTICORPO	n (%)	INTERVALO (dias)	MÉDIA (dias)
Anti-E	25 (18,25)	3 – 97	24,48
Anti-D	22 (16,06)	5 – 91	19,73
Anti-M	16 (11,68)	7 – 85	23,62
Anti-Kell	12 (8,75)	9 – 43	21,75
Anti-Jk <sup>a</sup>	8 (5,84)	10 – 38	23,25
Anti-C	7 (5,11)	7 – 36	15,29
Anti-Le <sup>a</sup>	7 (5,11)	11 – 97	30,43
Anti-c	7 (5,11)	5 – 97	26,57
Indeterminado	7 (5,11)	5 – 65	17,00
Anti-e	5 (3,65)	15 – 31	21,80
Outros	21 (15,33)	6 – 85	23,4
Total	137 (100)	3 – 97	20,88

**Tabela 11** – Risco de aloimunização em função do sexo.

SEXO	CHT (n)	ALOANTICORPOS (n)	RISCO (%)
Masculino	11.967	71	0,59
Feminino	4.580	66	1,44
Total	16.547	137	0,83

CHT – concentrados de hemácias transfundidos

**Tabela 12** – Distribuição de receptores aloimunizados com mais de um aloanticorpo em função do sexo e da média de concentrados de hemácias transfundidos.

SEXO	RECEPTORES (n)	ALOANTICORPOS (n)	MÉDIA de CHT	<i>p</i>
Masculino	53	01	5,04	0,528
	7	> 01	4,43	
Feminino	54	01	4,26	0,032
	6	> 01	5,67	

CHT – concentrados de hemácias transfundidos.

**Tabela 13** – Distribuição de receptores aloimunizados em função do número de aloanticorpos e das médias de idade.

SEXO	RECEPTORES (n)	ALOANTICORPOS (n)	IDADE MÉDIA (anos)	<i>p</i>
Masculino	53	01	36,43	0,020
	7	> 01	30,14	
Feminino	54	01	45,54	0,685
	6	> 01	51,50	

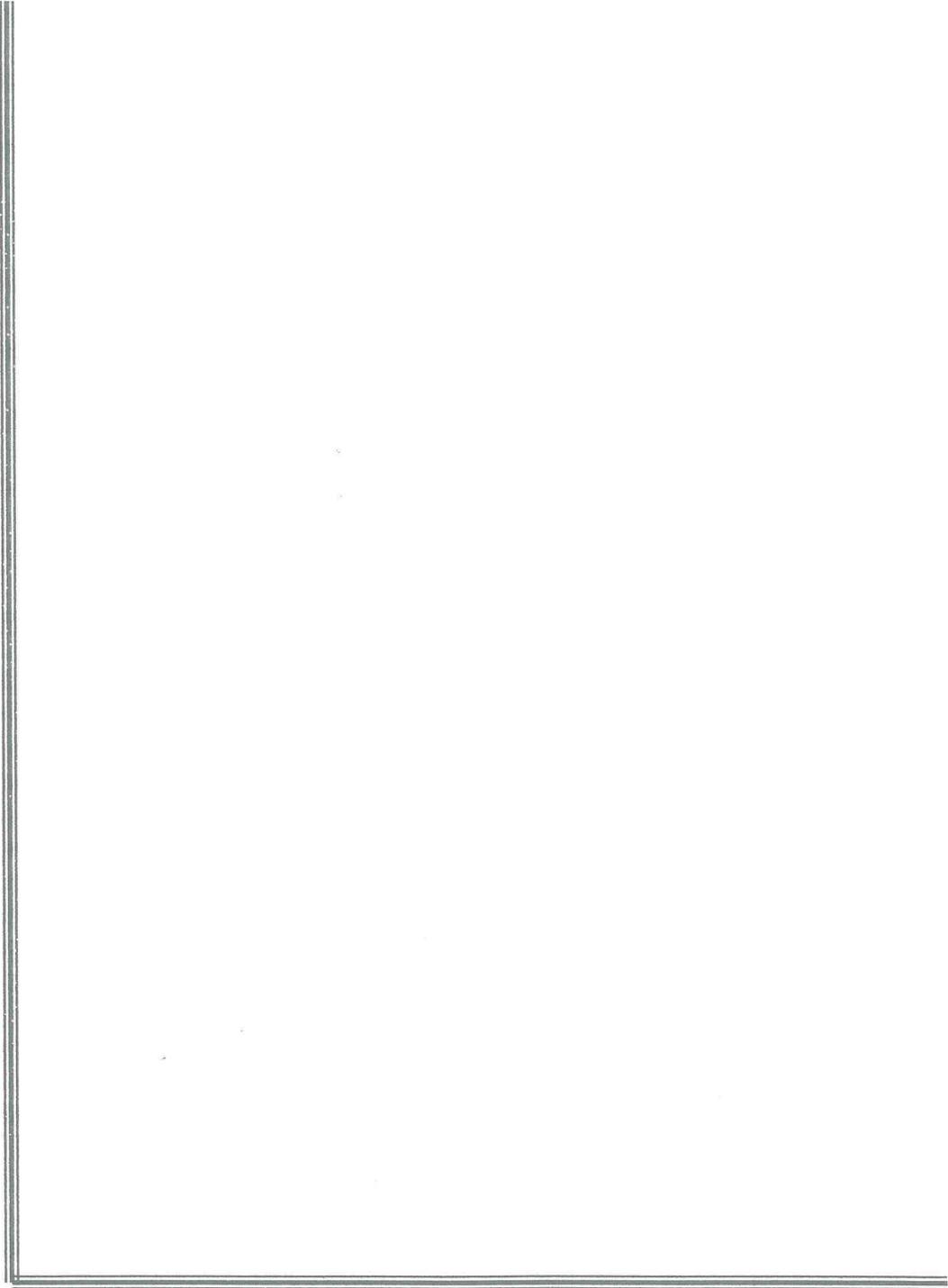
Em 5.570 receptores não foram detectados aloanticorpos eritrocitários: 3.965 (71,18%) eram do sexo masculino e 1.605 (28,82%) do sexo feminino. A faixa etária média dos receptores não aloimunizados foi de 35,62 anos, sendo de 30,3 nos do sexo masculino, e 40,94 anos nos do sexo feminino (Tabela 13).

A distribuição do sistema ABO e antígeno D nos receptores não aloimunizados, mostrou: O positivo 2.740 (49,19%), A positivo 1.771 (31,80%), B positivo 467 (8,38%), O negativo 228 (4,09%), A negativo 169 (3,03%), AB positivo 127 s (2,28%), B negativo 46 (0,83%), e AB negativo 22 (0,40%) (Tabela 6). A distribuição em função do antígeno D nos receptores não aloimunizados foi de 5.105 (91,65%) com presença do antígeno D, e 465 (8,35%) com ausência do antígeno D (Tabela 7).

**Tabela 14** – Distribuição das médias de idade em função do sexo e aloimunização.

SEXO	IDADE MÉDIA (anos)	
	ALOIMUNIZAÇÃO	
	Sim	Não
Masculino	35,70	30,3
Feminino	46,13	40,94
Total	40,91	35,62

A média de concentrados de hemácias transfundidas nos receptores não aloimunizados foi de 2.87 unidades por receptor com desvio padrão de 2.45, sendo 2.94 unidades para o sexo masculino com desvio padrão de 2.50, e 2.69 unidades para o sexo feminino com desvio padrão de 2.27(Tabela 8).



## DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

A aloimunização eritrocitária pós-transfusional depende da imunogenicidade do antígeno e da capacidade do sistema imune do receptor em responder à estimulação antigênica e produzir anticorpos. A presença de aloanticorpos eritrocitários pode resultar em dificuldade na obtenção de sangue compatível em transfusões posteriores, reações transfusionais hemolíticas imediatas ou tardias, e doença hemolítica do recém nascido.

A distribuição do sistema de grupo sanguíneo ABO e antígeno D dos participantes desse estudo é semelhante à da nossa população (Tabela 3) (NEVES, 1987; SANTOS, 1990).

A incidência da aloimunização eritrocitária varia conforme a população estudada, as patologias dos receptores, e as suas necessidades transfusionais. Em portadores de anemias hemolíticas constitucionais, a incidência varia entre 2,6 e 76% na doença falciforme, e entre 5 e 22% nos talassêmicos (WALLHERMFECHTAL, 1984; DAVIES, 1985; MICHAIL-MERIANOU, 1987; FONGSATIKUL, 1988; TARDTONG, 1988; LUBAN, 1989; VICHINSKY, 1990; SPANOS, 1990; HMIDA, 1994; SINGER, 2000; OLUJOHUNGBE, 2001).

Na anemia hemolítica auto-imune a incidência varia entre 16,4 e 20,4% (WALLHERMFECTEL, 1984; SO, 2000), e nas outras doenças auto-imunes entre 28 e 30% (RAMSEY, 1995). Nos receptores com síndrome mielodisplásica a incidência relatada é de 21%, enquanto que em outras patologias hematológicas neoplásicas é 10,7% (STIEGLER, 2001), e nas doenças oncológicas em geral é 9% (SCHONEWILLE, 1999). Na insuficiência renal crônica, a incidência varia entre 1,73 e 10%. Essa variação depende da disponibilidade de eritropoetina para uso farmacológico reduzindo assim a necessidade transfusional desses pacientes (DOMEN, 1988; BRANTLEY, 1988; RAMSEY, 1989; ÂNGULO, 1999). Nos transplantados renais a variação é de 8,6 e 9% (BRANTLEY, 1988; ÂNGULO, 1999). Nos portadores de hepatopatia crônica com hemorragia digestiva alta e politransfundidos, a incidência alcança 8%, e nos transplantados hepáticos varia entre 6,3 e 9,5% (BRANTLEY, 1988; RAMSEY, 1989). Nos transplantes de pulmão e coração é de 2,1% (CUMMINS, 1995).

Em receptores transfundidos em cirurgias gerais a incidência é de 8% (CUMMINS, 1995), nas cirurgias cardíacas entre 2,4 e 14% (WALLHERMFECHETEL, 1984; CUMMINS, 1995). Em receptores submetidos a múltiplas transfusões, independente da patologia de base, a incidência varia entre 3,7 e 11,8% (BRANTLEY, 1988; FLUIT, 1990).

Em mulheres transfundidas durante a gravidez a incidência é inferior a 1% (HEDDLE, 1993), e sobe para 26%, quando é realizada transfusão intra-uterina (VIËTOR, 1994), provavelmente devido à perda de continuidade da membrana amniótica durante o procedimento, já que a indicação transfusional se deve à incompatibilidade sangüínea entre a mãe e o feto.

Foi observada uma incidência de aloimunização eritrocitária em doadores de sangue de 0,25% (CUMMINS, 1995), enquanto que em pacientes hospitalizados que necessitam de transfusão de hemácias alcança 3,7% (SO, 2000).

No presente estudo, a incidência de pacientes previamente aloimunizados foi de 0,1%, número bastante inferior ao descrito por SO e colaboradores (SO, 2000), e ainda inferior àquele relatado em doadores de sangue por CUMMINS e colaboradores (CUMMINS, 1995). Provavelmente a menor incidência nesse estudo ocorreu devido às diferenças de etnias entre as populações, ou a seleção imposta pelas características no atendimento do Instituto Doutor José Frota, com pacientes constituídos principalmente de jovens, vítimas de trauma ou condições clínicas agudas, sem co-morbidades crônicas.

A incidência de 2,1% de aloimunização encontrada no presente estudo pode estar subestimada, devido à possibilidade de alguns receptores aloimunizados não terem sido detectados porque a permanência no hospital foi insuficiente para a expressão sorológica do aloanticorpo.

Existe controvérsia quanto ao risco de aloimunização eritrocitária em função do sexo. WALKER e colaboradores demonstraram maior incidência no sexo feminino (WALKER, 1989) e FLUIT e colaboradores não reproduziram esse achado (FLUIT, 1990). O risco é duas vezes maior na população feminina, quando há história de gestação prévia, no entanto, se equipara entre os sexos quando afastado esse fator (WALKER, 1989). Ressalta-se que a gravidez constitui um estímulo menor para o desenvolvimento de aloanticorpo eritrocitário do que a transfusão sanguínea, pois a variedade de antígenos está limitada aos do pai do feto, e a quantidade de hemácias do feto que entra na circulação materna é bastante pequena, embora algumas mulheres tenham história de gravidez de companheiros distintos.

Nesse estudo, a população foi constituída de pessoas vitimadas por trauma, e condições agudas atendidas em hospital de emergência. A predominância entre os receptores foi do sexo

masculino com 70,74% e 29,26% do sexo feminino. A distribuição dos concentrados de hemácias transfundidos foi de 72,32% das bolsas para os receptores masculinos, e 27,68% para os receptores femininos, resultando em médias transfusionais estatisticamente semelhantes: 2.97 bolsas de concentrados de hemácias para cada receptor masculino, e 2.75 bolsas para cada receptor feminino. Apesar dos valores descritos acima, a incidência de aloimunização entre os sexos foi distinta e de significado estatístico, sendo 1,49% no sexo masculino e 3,6% no sexo feminino ( $p < 0,0001$ ), produzindo um risco de 2.4 vezes maior na população feminina, com uma variação entre 1.7 a 3.4 vezes.

Na população feminina 93,3% (56 receptoras) tinham história de gestação prévia, ressaltando que a média de concentrados de hemácias transfundidos entre as mulheres com ou sem história gestacional não apresentaram diferença estatística significativa, afastando a possibilidade de viés pelo número de bolsas transfundidas. Esses dados reproduzem os achados de WALKER e colaboradores (WALKER, 1989), nos quais a sub-população feminina com gestações prévias apresentam um risco duas vezes maior de aloimunização que a população feminina sem história gestacional prévia e a população masculina.

O risco de aloimunização, definido como a razão entre o número de aloanticorpos eritrocitários detectados e o número total de concentrados de hemácias transfundidos, varia entre 0,5 e 5,9% (SCHONEWILLE, 1999). A probabilidade de um indivíduo produzir um aloanticorpo é de aproximadamente 0,4 a 1% por unidade de hemácias transfundida (WALKER, 1989). Nesse estudo, o risco de aloimunização foi de 0,83%, semelhante ao acima descrito.

A média de concentrados de hemácias transfundidos nos receptores politransfundidos que desenvolveram aloimunização eritrocitária varia entre 16 e 25 bolsas (RAMSEY, 1989; FLUIT, 1990; SCHONEWILLE, 1999). Nós encontramos a média de 4.68 concentrados de hemácias por

receptor aloimunizado, o que está muito abaixo da descrita na literatura. Essa diferença pode ser explicada pelas características dessa população estudada, por ser constituída de receptores previamente hígidos e com condições mórbidas agudas, e sem necessidade de transfusões de concentrados de hemácias de repetição. É provável que esses resultados, risco transfusional de 0,83% com uma média transfusional de 4.68 bolsas por receptor, seja decorrente da realização de tipagens sanguíneas dos receptores apenas para o sistema ABO, e antígeno D, uso rotineiro de transfusões de concentrados de hemácias não desleucotizados, deficiência na disponibilidade de concentrados de hemácias Rh negativos, e a população estudada ser constituída de indivíduos previamente hígidos sem evidência de imunodepressão.

Existe relato de maior incidência de aloimunização eritrocitária em receptores que se expõem a transfusões de concentrados de hemácias não leucodepletados (SINGER, 2000). No presente estudo nenhuma transfusão de concentrado de hemácias realizada foi desleucocitadas.

A diferença entre a média de concentrados de hemácias transfundidos e os receptores que desenvolveram ou não aloanticorpos apresentou significância estatística para ambos os sexos: masculino ( $p = 0,001$ ) e feminino ( $p = 0,002$ ). Determinando a associação de risco de aloimunização eritrocitária com a maior exposição de antígenos eritrocitários não próprios.

A tentativa de detecção de um novo aloanticorpo eritrocitário em receptores aloimunizados deve ser uma preocupação constante, devido às dificuldades e os riscos transfusionais em portadores de múltiplos aloanticorpos eritrocitários. Receptores aloimunizados apresentam uma probabilidade maior de 2.7 a 3.3 vezes de desenvolver outro aloanticorpo, que a população não aloimunizada, em desenvolver o primeiro (FLUIT, 1990; SCHONEWILLE, 1999). STRUPP e colaboradores (1998) relataram as dificuldades de identificar aloanticorpos do sistema Dombrock quando da presença de outros aloanticorpos ou autoanticorpos. Identificamos

em 13 (10,83%) dos 120 receptores aloimunizados mais de um aloanticorpo eritrocitário, representando um risco de 3.1 vezes maior de desenvolver um outro aloanticorpo, que os receptores não aloimunizados de desenvolver o primeiro aloanticorpo, dado semelhante ao descrito na literatura.

A média de concentrados de hemácias transfundidos em receptores aloimunizados com apenas um aloanticorpo identificado foi de 4,64 bolsas, e nos portadores de mais de um aloanticorpo foi de 5 concentrados de hemácias. Apesar desse achado reforçar que o número de concentrados de hemácias transfundidos é um fator de risco, pois aumenta a variabilidade de antígenos não próprios expostos ao sistema imune do receptor, encontramos significado estatístico apenas no sexo feminino ( $p = 0,032$ ). Uma possibilidade para a não significância estatística no sexo masculino, seja talvez pela diferença estatisticamente significativa entre a idade média dos receptores masculinos ( $p = 0,020$ ), o que não ocorreu com os receptores do sexo feminino que apresentavam idade média semelhante (Tabelas 11 e 12). Os receptores do sexo masculino mais jovens apresentaram maior risco de desenvolver um segundo aloanticorpo eritrocitário, apesar da média de transfusão de concentrados de hemácias ser semelhante.

Os relatos de aloanticorpos eritrocitários detectados com maior frequência foram: anti-E e anti-Kell (DOMEN, 1988; RAMSEY, 1989; FLUIT, 1990; VICHINSKY, 1990; HEDDLE, 1993; GALA, 1994; REDMAN, 1996; SCHONEWILLE, 1999; OLUJOHUNGBE, 2001), anti-C e anti-Kell (ÂNGULO, 1999), anti-E e anti-C (LUBAN, 1989) e anti-E (FONGSATIKUL, 1988). No nosso estudo, os mais frequentes, em ordem decrescente, foram: anti-E, anti-D, anti-M, e anti-Kell. Essa diferença demonstra a dificuldade, nesse hospital, de disponibilização de concentrados de hemácias com antígeno D negativo para receptores isogrupo, que pode ter resultado nessa elevada frequência na aloimunização por anti-D, produzindo um importante problema de saúde

pública, principalmente na população feminina. No estudo de CASANUEVA e colaboradores (CASANUEVA, 1994) a aloimunização por anti-D em receptores portadores de neoplasias variou entre 7,8 a 12,3%, devido às mesmas dificuldades aqui apresentadas. A incidência de aloanticorpos dos sistemas de grupos sanguíneos Rh e Kell no estudo de SCHONEWILLE e colaboradores (SCHONEWILLE, 1999) foi de 73%, e nesse estudo foi de 59,85%.

Na associação de múltiplos aloanticorpos observa-se que a maior frequência é entre anti-E com anti-c (SHIREY, 1994; SCHONEWILLE, 1999). Nesse estudo a maior frequência de associação foi entre anti-C com anti-D, e a segunda maior frequência foi entre anti-E com anti-c, demonstrando mais uma vez a alta incidência de aloimunização eritrocitária com anti-D, possivelmente pela não disponibilização de hemácias Rh negativas suficientes para a demanda.

Não observamos significância estatística entre as variáveis sexo e motivos de atendimentos no Instituto Doutor José Frota, devido a missão do hospital estar focada no atendimento ao trauma.

É importante salientar que nem sempre é possível identificar os aloanticorpos eritrocitários, devido a limitações das técnicas e hemácias teste imunofenotipadas disponíveis. SCHONEWILLE e colaboradores (SCHONEWILLE, 1999) relataram a não identificação em até 22,5% dos casos. Nesse estudo em apenas 5,11% dos casos não foi possível identificar os aloanticorpos, utilizando o mesmo método de gel centrifugação. O maior índice de identificação de aloanticorpos em nossa população provavelmente se deve à ausência de auto-anticorpos eritrocitários, e às peculiaridades dos receptores que apresentaram condições clínicas agudas e não eram portadores de co-morbidades ou doenças crônicas.

A presença de um aloanticorpo eritrocitário não implica necessariamente em efeitos deletérios ao portador, como reação transfusional hemolítica. Para RAMSEY e colaboradores

(RAMSEY, 1989) a incidência de aloanticorpos eritrocitários com significado clínico está entre 14 e 44%. Nesse estudo não foi quantificada a incidência de aloanticorpos eritrocitários com significado clínico, porque não foram realizados testes preditivos.

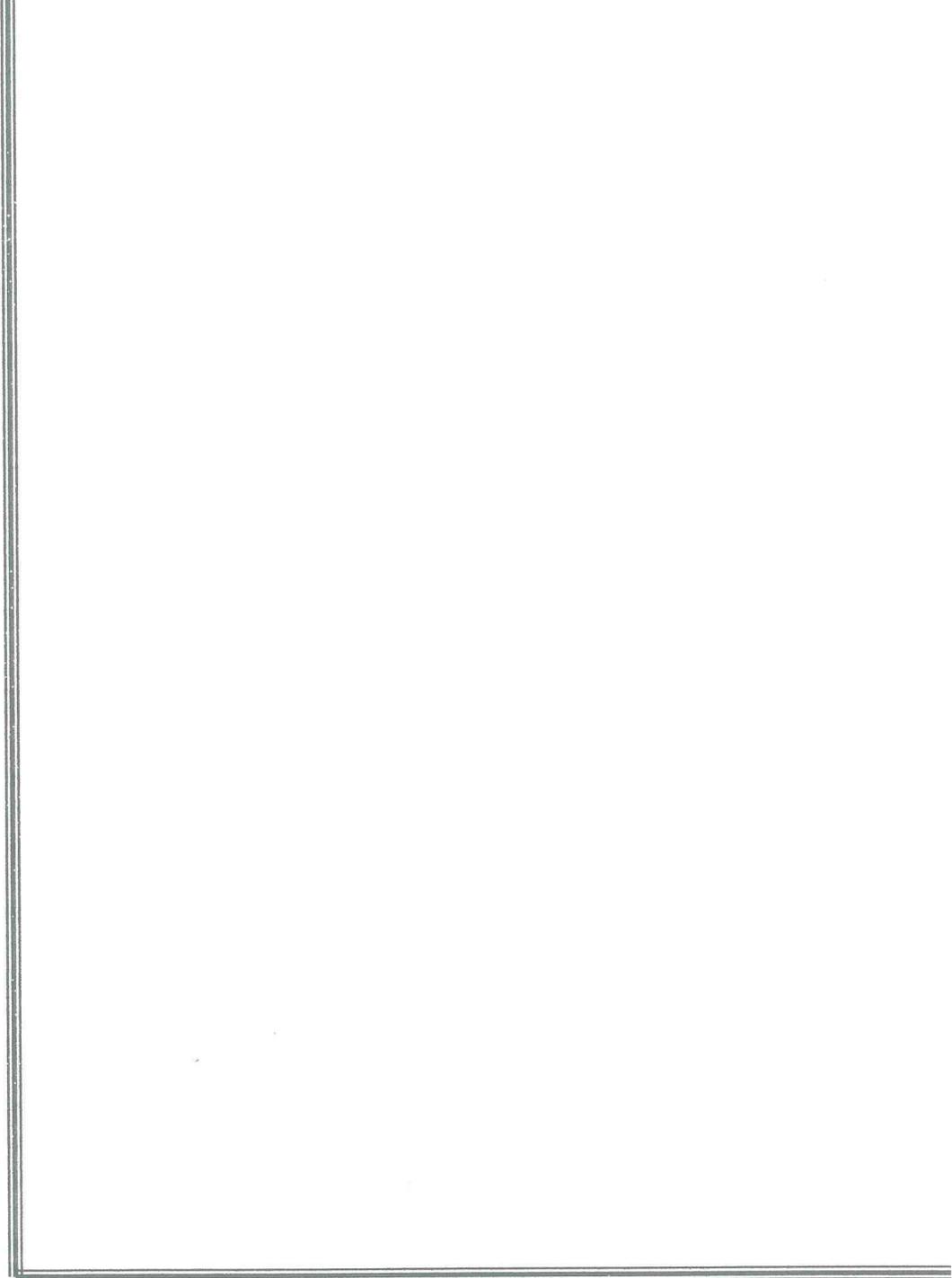
Os testes preditivos dos significado clínico de aloanticorpo eritrocitário têm sido descritos, como: teste da monocamada de monócitos, teste de quimiluminescência, e teste de citotoxicidade celular dependente de anticorpo. Esses testes nem sempre predizem a importância clínica *n vivo* em sua totalidade, a severidade da doença hemolítica, e não demonstram a certeza que ocorrerá sobrevida das hemácias após a transfusão, devido a essas limitações, os testes funcionais necessitam melhorar em sensibilidade e especificidade (NANCE, 1987; ZUPANSKA, 1993; FABRON JR, 1998).

A presença de reações transfusionais hemolíticas imediatas ou tardias em receptores aloimunizados foi descrita em 11% dos casos (VICHINSKY, 1990). Não conseguimos detectar e não foram notificados casos de reações transfusionais hemolíticas imediatas ou tardias. Muitas reações transfusionais hemolíticas tardias são assintomáticas ou mascaradas pela severidade da condição clínica subjacente e limitações laboratoriais das investigações de possíveis reações transfusionais hemolíticas tardias.

Os achados nesse estudo revelam a necessidade de melhor suporte hemoterápico em nosso meio, para reduzir o risco de aloimunização eritrocitária pós-transfusional. Algumas modificações no atual suporte hemoterápico, provavelmente resultariam em: introdução e associação de técnica que utilize PEG para detectar aloanticorpos, transfundir hemácias imunofenotipadas em mulheres com história gestacional prévia, utilizar concentrados de hemácias desleucocitados, estimular e treinar os médicos a utilizar métodos alternativos à transfusão de concentrados de hemácias. Essas medidas implicam na necessidade de

investimentos em recursos tecnológicos, criação de comitês transfusionais intra-hospitalares, e o desenvolvimento de protocolos para indicação de transfusão sanguínea. Há ainda a necessidade de aprimorar a metodologia na captação de doadores de sangue antígeno D negativo, e de criar ou aumentar o banco de dados com doadores especiais de fenótipos raros.

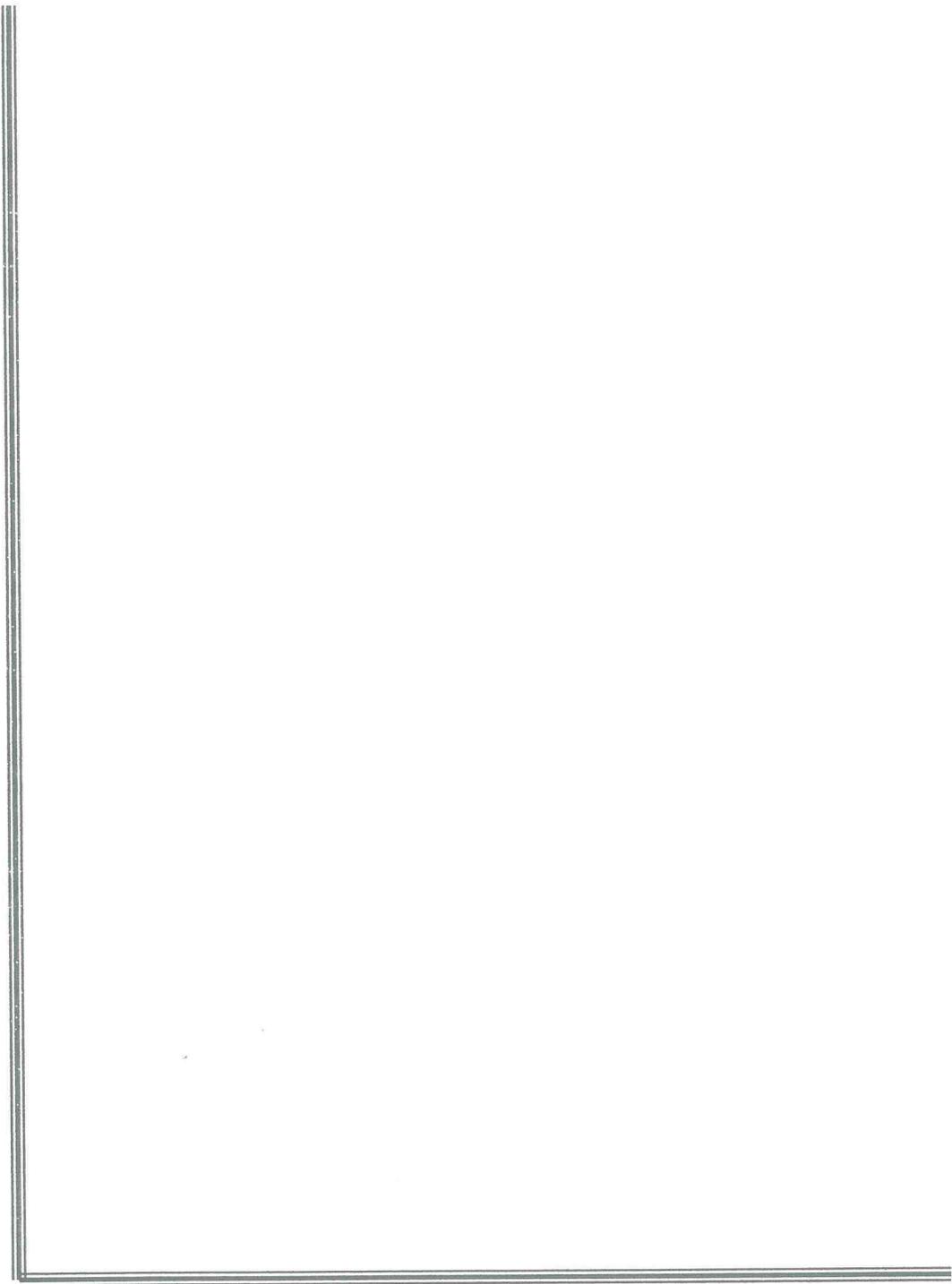
O caráter agudo das condições tratadas nesse estudo sugere que os receptores envolvidos não teriam indicações de transfusões posteriores. Contudo, as mudanças no panorama médico e social têm resultado no aumento da expectativa de vida da população, na maior probabilidade de cirurgias de repetição, na introdução de novas modalidades terapêuticas, e implantação rotineira dos transplantes de órgãos, aumentando significativamente a possibilidade de suporte hemoterápico posterior para esses receptores.



## CONCLUSÕES

## CONCLUSÕES

1. A incidência de aloimunização eritrocitária após transfusão de concentrados de hemácias em receptores com condições clínicas agudas foi de 2,1%, no Instituto Doutor José Frota;
2. Em 94,2% dos casos foi possível identificar os aloanticorpos eritrocitários detectados;
3. Os aloanticorpos eritrocitários identificados com maior frequência foram: anti-E (25 casos – 18,25%) e anti-D (22 casos – 16,06%);
4. Encontramos como principais fatores de risco para aloimunização eritrocitária a história de gravidez prévia e o número de concentrados de hemácias transfundidos;
5. O risco de aloimunização eritrocitária foi de 0,83%;
6. O tempo médio para detecção de aloanticorpos foi de 20.88 dias.



**ANEXOS**



## TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Tema da pesquisa – Incidência de aloimunização eritrocitária após transfusão de concentrados de hemácias

Objetivos da pesquisa – Avaliar e identificar risco associado à transfusão de sangue (aloimunização), para que possamos reduzi-lo, aumentando a segurança na transfusão de sangue.

Informo ao sujeito da pesquisa ou ao seu representante legal que a participação no estudo não trará riscos adicionais, pelo contrário poderá ser benéfico, pois a detecção e identificação de anticorpos irregulares (substâncias que podem destruir os glóbulos vermelhos do sangue) implicarão em transfusão de sangue compatível com a presença do anticorpo irregular identificado, prevenindo o risco de reações adversas relacionadas à transfusão de sangue.

Informo ao sujeito da pesquisa ou ao seu representante legal que a participação no estudo implicará em coletas adicionais de amostras de sangue, para garantia de detecção e identificação de anticorpos irregulares o mais precocemente possível. O volume de sangue coletado em cada oportunidade será de 10mL, o que não acarretará qualquer repercussão na suas funções vitais ou alteração do quadro clínico.

Esclareço ao sujeito da pesquisa ou ao seu representante legal as seguintes garantias:

1. Acesso a qualquer tempo às informações sobre procedimentos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas;
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência;
3. Salvaguarda de confidência, sigilo e privacidade.

Declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Em caso de menor de idade, declaro que o mesmo foi devidamente esclarecido e aceita participar do presente Protocolo de Pesquisa, sendo eu o responsável legal.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal (e de menor quando possível)

---

Pesquisador – Francisco Wandemberg Rodrigues dos Santos  
Médico – CREMEC nº 5103  
Telefones – (85) 2240857 – (85) 2555015 – (85) 88065103

# PROTOCOLO

## DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALOANTICORPOS ERITROCITÁRIOS

Número - \_\_\_\_\_

Nome do receptor - \_\_\_\_\_

Sexo – M ( ) F ( ) Data de nascimento - \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ Idade - \_\_\_ anos

Endereço - \_\_\_\_\_

Número do prontuário - \_\_\_\_\_ Data da admissão - \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

Diagnóstico - \_\_\_\_\_

Grupo sanguíneo – A ( ) B ( ) O ( ) AB ( ) Fator Rh – positivo ( ) negativo ( )

Data e número de concentrados de hemácias transfundidos - \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Aloanticorpo detectado? Sim ( ) Não ( )

História gestacional prévia? Sim ( ) Não ( )

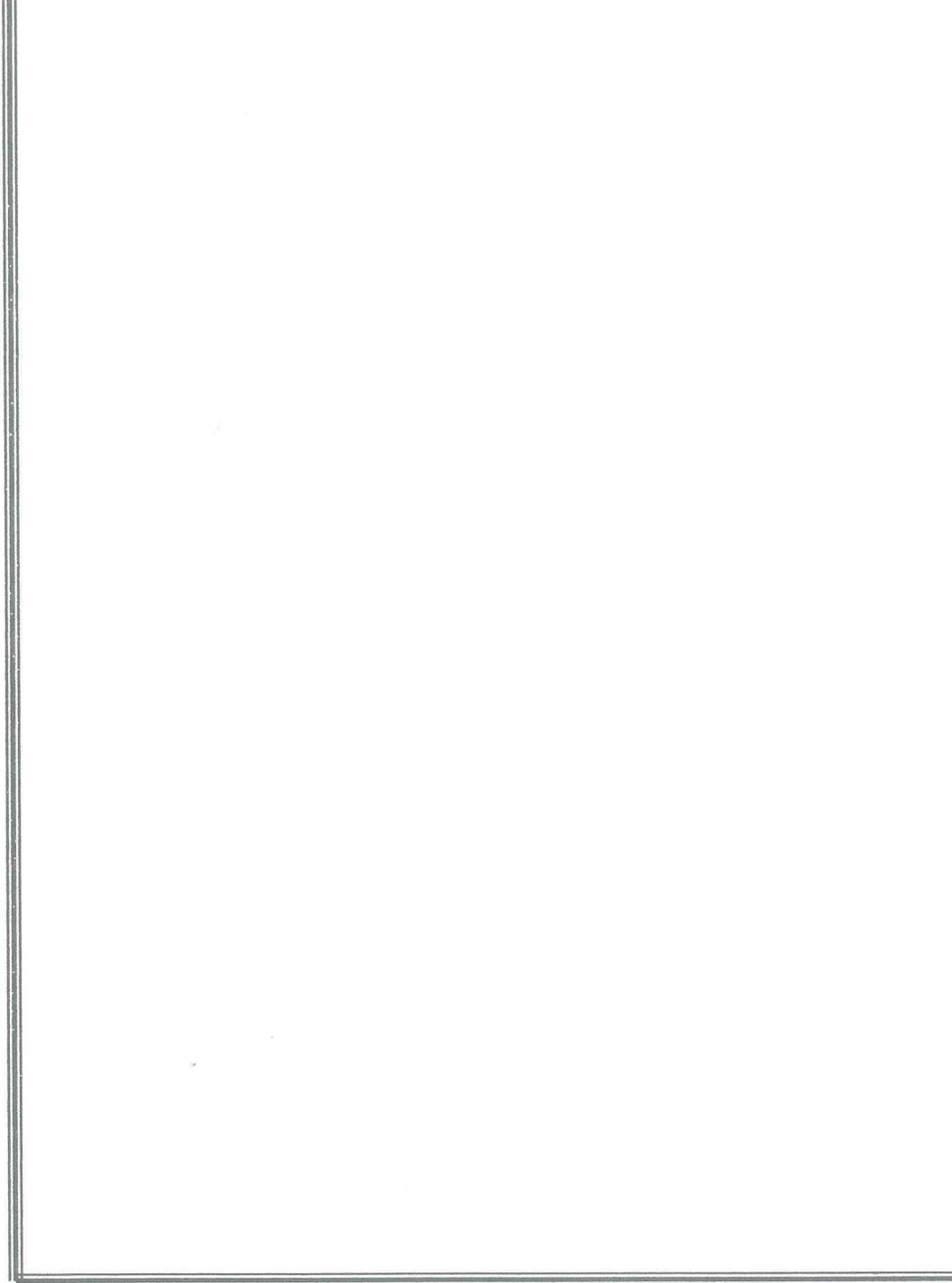
Aloanticorpo(s) eritrocitário(s) identificado(s) - \_\_\_\_\_

Data(s) da identificação do alo-anticorpo(s) eritrocitário(s) - \_\_\_\_\_

Intervalo entre a primeira transfusão de concentrados de hemácias e a identificação do alo-anticorpo eritrocitário - \_\_\_\_\_ dias

Data da alta hospitalar - \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ Permanência hospitalar - \_\_\_\_\_ dias

Condições da alta hospitalar – melhorado ( ) óbito ( )



## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. In: **Celular and Molecular Immunology**. 2<sup>nd</sup> Ed, Philadelphia: W.B.Saunders, 1994a, capítulo 2, p. 14-30.
2. ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. In: **Celular and Molecular Immunology**. 2<sup>nd</sup> Ed, Philadelphia: W.B.Saunders, 1994b, capítulo 3, p. 33-64.
3. ANGULO, I.L., LIMA, E.G. Antierythrocyte antibodies in hemodialysis and kidney transplant patients. **Renal Failure**, v. 21, p. 483-486, 1999.
4. BLUMBERG, N., PECK, K., ROSS, K., AVILA, E. Immune response to chronic red blood cell transfusion. **Vox Sang.**, v. 44, p. 212-217, 1983.
5. BORAL, L.I.; HENRY, J.B. The type and screen: a safe alternative and supplement in selected surgical procedures. **Transfusion**, v. 17, p. 163-168, 1977.
6. BRANTLEY, S.G., RAMSEY, G. Red cell alloimmunization in multitransfused HLA-typed patients. **Transfusion**, v. 28, p. 463-466, 1988.

7. BROMILOW, M., ADAMS, K.E., HOPE, J., EGGINGTON, J.A., DUGUID, J.K.M. Evaluation of the ID-gel test for antibody screening and identification. **Transfusion Med.**, v. 1, p. 159-161, 1991.
8. BUNKER, M.L., THOMAS, C.L., GEYER, S.J. Optimizing pretransfusion antibody detection and identification: a parallel, blinded comparison of tube PEG, solid-phase, and automated methods. **Transfusion**, v. 41, p. 621-626, 2001.
9. CASANUEVA, M., VALDES, M.D., RIBERA, M.C. Lack of alloimmunization to D antigen in D-negative immunosuppressed liver transplant recipients. **Transfusion**, v. 34, p. 570-572, 1994.
10. CATE, J.C., REILLY, N. Evaluation and implementation of the gel test for indirect antiglobulin testing in a community hospital laboratory. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 132, p. 693-697, 1999.
11. CHASIS, J.A., MOHANDAS, N. Red blood cell glycoporphins. **Blood**, v. 80, p. 1869-1879, 1992.
12. CHING, E.P., POON, M.C., NEURATH, D., RUETHER, B.A. Red blood cell alloimmunization complicating plasma transfusion. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 96, p. 201-202, 1991.
13. CHOW, M.P., HU, H.Y., LYOU, J.Y., LIN, J.S., YUNG, C.H., LEE, A., LEE, T.D. Red cells, HLA and platelet antibody formation in patients with multiple transfusions. **Acta Haematol.**, v. 92, p. 57-60, 1994.
14. CUMMINS, D., CONTRERAS, M., AMIN, S., HALIL, O., DOWNHAM, B., YACOUB, M.H. Red cell alloantibody development associated with heart and lung transplantation. **Transplantation**, v. 59, p. 1432-1435, 1995.

15. DANIELS, G.L., ANSTEE, D.J., CARTRON, J.P., DAHR, W., ISSITT, P.D., JØRGENSEN, J., KORNSTAD, L., LEVENE, C., LOMAS-FRANCIS, C., LUBENKO, A. Blood group terminology 1995. ISBT Working Party on terminology for red cell surface antigens. **Vox Sang.**, v. 69, p. 265-279, 1995.
16. DANIELS, G.L., TALIANO, V., KLEIN, M.T., McCREARY, J. Emm. A red cell antigen of very high frequency. **Transfusion**, v. 27, p. 319-321, 1987.
17. DAVIES, S.C., McWILLIAM, A.C., HEWITT, P.E., DEVENISH, A., BROZOVIC, M. Red cell alloimmunization in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 63, p. 241-245, 1986.
18. DE CASTILHO, L.M.; PELLEGRINO, J.; BECHELLI, A.P.P.; LE PENNEC, P.Y.; MENDES, N.F. Evaluation of recent techniques for detection of red blood cell antibodies in sera of reference samples, patients, pregnant women, and blood donors. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 10, p. 250-256, 1996.
19. DE LA RUBIA, J., GARCÍA, M., PÉREZ CASTELLANOS, T., ARRIAGA, F., SENENT, M.L., MIRAVALLS, M.C., MARTY, M.L. Manejo transfusional de un paciente con múltiples anticuerpos antieritrocitarios (anti-c + anti-K + anti-Fyb + anti-Jkb) sometido a reintervención valvular bajo cirugía extracorpórea (CEC). **Sangre**, vol. 35, p. 78-81, 1990.
20. DELVES, P.J., ROITT, I.M. The immune system (First of two parts). **New England J. Med.**, v. 343, p. 37-49, 2000a.
21. DELVES, P.J., ROITT, I.M. The immune system (Second of two parts). **New England J. Med.**, v. 343, p. 108-117, 2000b.

22. DOMEN, R.E., RAMIREZ, G. Red cell alloimmunization in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis. **Nephron**, v. 48, p. 284-285, 1988.
23. FABRON JR, A. Importancia clínica de auto e aloanticorpos eritrocitários. **Série de Monografias**, v. 5, p. 34-38, 1998.
24. FLOSS, A.M., STRAUSS, R.G., GOEKEN, N., KNOX, L. Multiple transfusions fail to provoke antibodies against in human infants. **Transfusion**, v. 26, p. 419-422, 1986.
25. FLUIT, C.R.M.G., KUNST, V.A.J.M., DRENTHE-SCHONK, A.M. Incidence of red cell antibodies after multiple blood transfusion. **Transfusion**, v. 30, p. 532-535, 1990.
26. FONGSATITKUL, L., BANNAWAT, U., SANGUANSEMSRI, T., KULAPONGS, P. Unexpected red cell antibodies in thalassemic children. **Birth Defects**, v. 23, p. 291-293, 1988.
27. GALA, J.M.G., PABON, M.V., VICENTE, P.R., PAYER, A.R., PORTO, C.R., BUELGA, J.R.C. Aloimmunización en pacientes politransfundidos. Utilidad de seleccionar hematíes compatibles para antígenos diferentes al ABO y D. **Sangre**, v. 39, p. 417-421, 1994.
28. GIBLETT, E.R. A critique of the theoretical hazard of inter-vs.-intra-racial transfusion. **Transfusion**, v. 1, p. 233-238, 1961.
29. GIBLETT, E.R. Blood group alloantibodies: na assessment of same laboratory practices. **Transfusion**, v. 17, p. 299-308, 1977.
30. GORST, D.W., RAWLINSON, V.I., MERRY, A.H., STRATTON, F. Positive direct antiglobulin test in normal individuals. **Vox Sang.**, v. 38, p. 99-105, 1980.

31. GUILBERT, B., DIGHIERO, G., AVRAMEAS, S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. **J. Immunol.**, v. 128, p. 2779-2787, 1982.
32. HARRISON, C.R., EVANS, C. Transient presence of an anti-D alloantibody. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 109, p. 1042-1043, 1985.
33. HEDDLE, N.M., KLAMA, L., FRASSETTO, R., O'HOSKI, P., LEAMAN, B. A retrospective study to determine the risk of red cell alloimmunization and transfusion during pregnancy. **Transfusion**, v. 33, p. 217-220, 1993.
34. HMIDA, S., MOJAAT, N., MAAMAR, M., MEDIOUNI, M., BOUKEF, K. Red cell alloantibodies in patients with haemoglobinopathies. **Nouv. Rev. Fr. Hematol.**, v. 36, p. 363-366, 1994.
35. HOLBURN, A.M.; CLEGHORN, T.E.; HUGHES-JONES, N.C. Re-stimulation of anti-D in donors. **Vox Sang.**, v. 19, p. 162-167, 1970.
36. HORUK, R, CHITNIS, C.E., DARBONNE, W.C. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte cytokine receptor. **Science**, v. 261, p. 1182-1184, 1993.
37. ISSITT, P.D. Antibody mediated red cell destruction following the transfusion of incompatible blood: a review. **Med. Lab. Technol.**, v. 30, p. 95-103, 1973.
38. ISSITT, P.D., COMBS, M.R., BREDEHOEFT, S.J., CAMPBELL, M.L., HEIMER, M., JOYNER, L., LORENTSEN, L., REMLEY, C., BULLOCK, S., BUMGARNER, J., ZAKERINIASAR, KIRKLAND, A., MELROY, H., MILLIKIN, D. Lack of clinical significance of "enzyme-only" red cell alloantibodies. **Transfusion**, v. 33, p. 284-293, 1993.

39. JOHNSON, J.R. Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4. p. 80-128, 1991.
40. KELTON, J.G.; HAMID, C., AKER, S., BLAJCHMAN, M.A. The amount of blood group A substance on platelets is proportional to the amount in the plasma. **Blood**, v. 59, p. 980-985, 1982.
41. KING, K.E., SHIREY, R.S., LANKIEWICZ, M.W., YOUNG-RAMSARAN, J., NESS, P.M. Delayed hemolytic transfusion reactions in sickle cell disease: simultaneous destruction of recipients' red cells. **Transfusion**, v. 37, p. 376-381, 1997.
42. KNIGHT, R.C., POOLE, G.D. Detection of red cell antibodies: current and future techniques. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 52, p. 297-305, 1995.
43. LAPIERRE, Y., RIGAL, D., ADAM, J., JOSEF, D., MEYER, F., GREBER, S., DROT, C. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. **Transfusion**, v. 30, p. 109-113, 1990.
44. LLOPIS, F., CARBONELL-UBEROS, F., PLANELLES, M.D., MONTERO, M., PLASENCIA, I., CARRILLO, C. A new microplate red blood cell monolayer technique for screening and identifying red blood cell antibodies. **Vox Sang.**, v. 70, p. 152-156, 1996.
45. LÓPEZ, A., DE LA RUBIA, J., ARRIAGA, F., JIMÉNEZ, C., SANZ, G.F., CARPIO, N., MARTY, M.L. Severe hemolytic anemia due to multiple red cell alloantibodies after an ABO-incompatible allogenic bone marrow transplant. **Transfusion**, v. 38, p. 247-251, 1998.
46. LÖW, B.; MESSETER, L. Antiglobulin test in low-ionic strength salt solution for rapid antibody screening and cross-matching. **Vox Sang.**, v. 26, p. 53-61, 1974.

47. LUBAN, N.L.C. Variability in rates of alloimmunization in different groups of children with sickle cell disease: effect of ethnic background. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 11, p. 314-319, 1989.
48. MARSHALL, C.S., DWYRE, D., ECKERT, R., RUSSELL, L. Severe hemolytic reaction due to anti-Jk3. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 123, p. 949-951, 1999.
49. MICHAIL-MERIANOU, V., PAMPHILI-PANOUSOPOULOU, L., PIPERI-LOWES, L., PELEGRINIS, E., KARAKLIS, A. Alloimmunization to red cell antigens in thalassemia: comparative study of usual versus better-match transfusion programmes. **Vox Sang.**, v. 52, p. 95-98, 1987.
50. MINCHEFF, M.S., GETSOV, S.I., MERYMAN, H.T. Mechanisms of alloimmunization and immunosuppression by blood transfusions in an inbred rodent model. **Transplantation**, v. 60, p. 815-821, 1995.
51. MOLTHAN, L., MATULEWICZ, T.J., BANSAL-CARVER, B., BENZ, E.J. An immediate hemolytic transfusion reaction due to anti-C and a delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-Ce+e: hemoglobinemia, hemoglobinuria and transient impaired renal function. **Vox Sang.**, v. 47, p. 348-353, 1984.
52. NANCE, S.J., ARNDT, P., GARRATTY, G. Predicting the clinical significance of red cell alloantibodies using a monocyte monolayer assay. **Transfusion**, v. 27, p. 449-452, 1987.
53. NANCE, S.J., ARNDT, P.A., GARRATTY, G., NELSON, J.M. Correlation of IgG subclass with the severity of hemolytic disease of the newborn. **Transfusion**, v. 30, p. 381-382, 1990.

54. NANCE, S.J.; GARRATTY, G. A new potentiator of red blood cell antigen-antibody reactions. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 87, p. 633-635, 1987.
55. NEVES, M.L.J.; FUJITA, M. Grupos sangüíneos ABO e Rh – : estatística em 2354 doadores de sangue. 1987, 29 fls. **Monografia** (Especialização em Hematologia e Hemoterapia) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1987.
56. ODELL, W.R., ROXBY, D.J., RYALL, R.G., SESHADRI, R.S. A LISS spin enzyme method for the detection of red cell antibodies and its use in routine antibody screen procedures. **Transfusion**, v. 23, p. 373-376, 1983.
57. OLUJOHUNGBE, A., HAMBLETON, I., STEPHENS, L., SERJEANT, B., SERJEANT, G. Red cell antibodies in patients with homozygous sickle cell disease: a comparison of patients in Jamaica and the United Kingdom. **Br. J. Haematol.**, v. 113, p. 661-665, 2001.
58. PINEDA, A.A., VAMVAKAS, E.C., GORDEN, L.D., WINTERS, J.L., MOORE, S.B. Trends in the incidence of delayed hemolytic and delayed serologic transfusion reactions. **Transfusion**, v. 39, p. 1097-1103, 1999.
59. RACHKEWICH, R.A.; CROOKSTON, M.C.; TILLEY, C.A.; WHERRETT, J.R. Evidence that blood group A antigen on lymphocytes is derived from the plasma. **J. Immunogenet.**, v. 5, p. 25-29, 1978.
60. RAMSEY, G., CORNELL, F.W., HAHN, L.F., LARSON, P., ISSITT, L.B., STARZL, T.E. Red cell antibody problems in 1000 liver transplants. **Transfusion**, v. 29, p. 396-400, 1989.
61. RAMSEY, G., LARSON, P. Loss of red cell alloantibodies over time. **Transfusion**, v. 28, p. 162-165, 1988.

62. RAMSEY, G., SMIETANA, S.J. Long-term follow-up testing of red cell alloantibodies. **Transfusion**, v. 34, p. 122-124, 1994.
63. RAMSEY, G., SMIETANA, S.J. Multiple or uncommon red cell alloantibodies in women: association with autoimmune disease. **Transfusion**, v. 35, p. 582-586, 1995.
64. RAO, N., FERGUSON, D.J., LEE, S.F., TELEN, M.J. Identification of human erythrocyte blood group antigens on the C3b/C4b receptor. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3502-3507, 1991.
65. REDMAN, M., REGAN, F., CONTRERAS, M. A prospective study of the incidence of red cell allo-immunisation following transfusion. **Vox Sang.**, v. 71, p. 216-220, 1996.
66. REIS, K.J., CHACHOWSKI, R., CUPIDO, A., DAVIES, D., JAKWAY, J., SETCAVAGE, T.M. Column agglutination technology: the antiglobulin test. **Transfusion**, v. 33, p. 639-643, 1993.
67. REISNER, R.; BUTLER, G.; BUNDY, K.; MOORE, S.B. Comparison of the polyethylene glycol antiglobulin test and the use of enzymes in antibody detection and identification. **Transfusion**, v. 36, p. 487-489, 1996.
68. ROUGER P., SALMON C. Tissue distribution and development of blood group antigens. **Rev. Fr. Transfus. Immunohematol.**, v. 25, p. 643-656, 1982.
69. SALAMA, A., BERGHÖFER, H., MUELLER-ECKHARDT, C. Detection of cell-drug (hapten)-antibody complexes by the gel test. **Transfusion**, v. 32, p. 554-556, 1992.
70. SANTOS, G.L. Incidência dos sub-grupos sanguíneos A1 e A2 nos doadores de sangue do HEMOCE. 1990, 27 fls. **Monografia** (Especialização em Hematologia e Hemoterapia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1990.

71. SCHONEWILLE, H., HAAK, H.L., VAN ZIJL, A.M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. **Transfusion**, v. 39, p. 763-771, 1999.
72. SHIREY, R.S., EDWARDS, R.E., NESS, P.M. The risk of alloimmunization to c (Rh4) in R1R1 patients who present with anti-E. **Transfusion**, v. 34, p. 756-758, 1994.
73. SINGER, S.T., WU, V., MIGNACCA, R., KUYPERS, F.A., MOREL, P., VICHINSKY, E.P. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly Asian descent. **Blood**, v. 96, p. 3369-3373, 2000.
74. SO, C.C., WONG, K.F., YU, P.H., KWAN, A.M.Y., LEE, W.C. Alloimmunization in Chinese with warm autoimmune haemolytic anaemia – incidence and characteristics. **Transfusion Med.**, v. 10, p. 141-143, 2000.
75. SOLVES, P., DE LA RUBIA, J., ARRIAGA, F., CERVERA, J., ARNAO, M., CARPIO, N., MARTY, M.L. Estudio inmunohematológico y actitud transfusional en pacientes con anticuerpos públicos. **Sangre**, v. 42, p. 25-29, 1997.
76. SPANOS, Th., KARAGEORGA, M., LADIS, V., HATZILIAMI, A., KATTAMIS, Ch. Red cell alloantibodies in patients with thalassemia. **Vox Sang.**, v. 58, p. 50-55, 1990.
77. SPRING, F.A., DALCHAU, R., DANIELS, G.L., MALLINSON, G., JUDSON, P.A., PARSONS, S.F., FABRE, J.W., ANSTEE, D.J. The In<sup>a</sup> and In<sup>b</sup> blood group antigens are located on a glycoprotein of 80,000 MW (the CDw44 glycoprotein) whose expression is influenced by the In (Lu) gene. **Immunology**, v. 64, p. 37-43, 1988.
78. SPRING, F.A., GARDNER, B., ANSTEE, D.J. Evidence that the antigens of the YT blood group system are located on human erythrocyte acetylcholinesterase. **Blood**, v. 80, p. 2136-2141, 1992.

79. STERN, K. Multiple differences in red cell antigens and isoimmunization. **Transfusion**, v. 15, p. 179-194, 1975.
80. STIEGLER, G., SPERR, W., LORBER, C., FABRIZII, V., HÖCKER, P., PANZER, S. Red cell antibodies in frequently transfused patients with myelodysplastic syndrome. **Ann. Hematol.**, v. 80, p. 330-333, 2001.
81. STRUPP, A., CASH, K., UEHLINGER, J. Difficulties in identifying antibodies in the Dombrock blood group system in multiply alloimmunized patients. **Transfusion**, v. 38, p. 1022-1025, 1998.
82. TAO, M.H., SMITH, R.I., MORRISON, S.L. Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific difference in complement activation. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 661-667, 1993.
83. TARDTONG, P., RATANASIRIVANICH, P., CHIEWSILP, P. HATHIRAT, P. Red cell antibodies in thalassemia hemoglobinopathy patients. **Birth Defects**, v. 23, p. 287-289, 1988.
84. THOMPSON, R.A., ROWE, D.S. Reactive haemolysis—a distinctive form of red cell lysis. **Immunology**, v. 14, p. 745-762, 1968.
85. TILLEY, C.A.; CROOKSTON, M.C.; BROWN, B.L.; WHERRETT, J.R. A and B A1Leb substances in glycosphingolipid fractions of human serum. **Vox Sang.**, v. 28, p. 25-33, 1975.
86. TING, A., PUN, A., DODDS, A.J., ATKINSON, K., BIGGS, J.C. Red cell alloantibodies produced after bone marrow transplantation. **Transfusion**, v. 27, p. 145-147, 1987.

87. TITLESTAD, K., GEORGSSEN, J., ANDERSEN, H., KRISTENSEN, T. Detection of irregular red cell antibodies: more than 3 years of experience with a gel technique and pooled screening cells. *Vox Sang.*, v. 73, p. 246-251, 1997.
88. UTHEMANN, H., POSCHMANN, A. Solid-phase antiglobulin test for screening and identification of red cell antibodies. *Transfusion*, v. 30, p. 114-116, 1990.
89. VICHINSKY, E.P., EARLES, A., JOHNSON, R.A., HOAG, M.S., WILLIAMS, A., LUBIN, B. Alloimmunization in sickle cell anemia and transfusion of racially unmatched blood. *New England J. Med.*, v. 322, p. 1617-1621, 1990.
90. VIËTOR, H.E., KANHAI, H.H.H., BRAND, A. Induction of additional red cell alloantibodies after intrauterine transfusions. *Transfusion*, v. 34, p. 970-974, 1994.
91. WALKER, R.H., LIN, D.T., HARTRICK, M.B. Alloimmunization following blood transfusion. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 113, p. 254-261, 1989.
92. WALLHERMFECHTEL, M.A., POHL, B.A., CHAPLIN, H. Alloimmunization in patients with warm autoantibodies. A retrospective study employing three donor alloabsorptions to aid in antibody detection. *Transfusion*, v. 24, p. 482-485, 1984.
93. WINKELSTEIN, A., KISS, J.E. Immuno-hematologic disorders. *JAMA*, v. 278, p. 1982-1992, 1997.
94. WEISBACH, V., ZIENER, A., ZIMMERMANN, R., GLASER, A., ZINGSEM, J., ECKSTEIN, R. Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion*, v. 39, p. 1045-1050, 1999.

95. ZUMBERG, M.S., PROCTER, J.L., LOTTENBERG, R., KITCHENS, C.S., KLEIN, H.G. Autoantibody formation in the alloimmunized red blood cell recipient: clinical and laboratory implications. **Arch. Intern. Med.**, v. 161, p. 285-290, 2001.
96. ZUPANSKA, B. Clinical application of functional clinical application of functional, assays for assessing the red cell antibody activity. **Transfus. Sci.**, v. 14, p. 371-381, 1993.