



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

Julia Hermes

**Estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para tipagem  
sanguínea de receptores na técnica de tubo**

Florianópolis

2022

Julia Hermes

**Estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para tipagem  
sanguínea de receptores na técnica de tubo**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Flávia Martinello, Dra.

Florianópolis

2022

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

Hermes, Julia

Estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos  
utilizados para tipagem sanguínea de receptores na técnica  
de tubo / Julia Hermes ; orientador, Flávia Martinello,  
2022.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. estabilidade. 3. reagentes imuno  
hematológicos. 4. controle da qualidade. 5. fenotipagem ABO  
e RhD. I. Martinello, Flávia. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.  
Título.

Julia Hermes

**Estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para tipagem  
sanguínea de receptores na técnica de tubo**

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

\_\_\_\_\_  
Profa. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dra.  
UFSC (membro titular)

\_\_\_\_\_  
Profa. Daiane Cobiانchi da Costa, Dra.  
UNIVALI (membro titular)

\_\_\_\_\_  
Profa. Solange Blatt, Dra.  
UFSC (membro suplente)

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

\_\_\_\_\_  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

\_\_\_\_\_  
Profa. Flávia Martinello, Dra.  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e pela excelência dos programas de ensino e pesquisa, que contribuem para a formação e qualificação dos profissionais e para o avanço da ciência, trazendo inúmeros benefícios à comunidade.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, HEMOSC, e ao Centro de Estudos Mário Roberto Kazniakowski, CEMARK, agradeço o inabalável e inquestionável incentivo que recebi para realizar o estudo e me capacitar.

À minha orientadora, professora Flávia Martinello, pela dedicação, disponibilidade e conhecimento compartilhado. Igualmente, às professoras Ana Carolina de Moraes, Daiane Cobianchi e Solange Blatt, agradeço as contribuições e a generosidade na avaliação deste trabalho. A todas, agradeço também o exemplo e a inspiração.

Aos meus amigos e colegas de trabalho que, direta ou indiretamente, me apoiaram e auxiliaram. Sou extremamente grata por toda ajuda e carinho que recebi.

À toda minha família pelo amor e amparo que recebo. Aos meus pais, Hugo José e Solange, pela dádiva da vida, pelo constante otimismo e incentivo, pela fé, perseverança e determinação que sempre manifestaram. Ao meu irmão, Victor Hugo, pela amizade e cumplicidade e pelo elo de vida que um irmão representa. Ao meu noivo João Francisco, pela parceria, por ser um incentivador de pessoas, por despertar em mim a coragem e bons sentimentos e, por estar ao meu lado nessa nobre jornada da vida.

A todos, meu muito obrigada.

## RESUMO

A temperatura de armazenamento dos reagentes imuno-hematológicos, em geral, é de 2-8°C, sendo que a utilização dos mesmos deve ser em temperatura ambiente. A Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde estabelece os parâmetros mínimos de qualidade para a avaliação de cada lote e remessa de reagentes recebidos. Entretanto, não há parâmetros mínimos definidos para os testes da qualidade dos reagentes em uso, expostos com frequência à homogeneização e à temperatura ambiente, além do uso de controles positivos e negativos. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi analisar a estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para determinação de tipagem ABO e RhD na técnica em tubo. Foram avaliadas a potência, a especificidade e a integridade dos reagentes anti-A, anti-B, anti-D, controle RhD e hemácias A<sub>1</sub> e B após longos (oito horas) e curtos (quatro horas) períodos diários de exposição à temperatura ambiente (20-24°C). Os reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B também foram expostos diariamente por 11 horas e 30 minutos à temperatura ambiente e mais 30 minutos à temperatura ambiente com simultânea homogeneização em equipamento. Como controle negativo e positivo, uma alíquota dos reagentes foi armazenada permanentemente em temperatura de refrigeração e outra foi exposta diariamente por 12 horas à temperatura ambiente, respectivamente. As alíquotas dos reagentes foram submetidas a diferentes condições durante cinco dias por semana, por quatro semanas. Foram realizados testes de intensidade de reação, titulação e avides para os antissoros e de intensidade de reação, determinação de hemoglobina livre e condutividade elétrica para os reagentes de hemácias. A intensidade de reação dos antissoros foi de 4+ para todas as condições de exposição e nenhum deles apresentou diminuição da especificidade. Embora pequenas variações não significativas tenham sido observadas após os diferentes períodos de exposição, o título e a avides dos antissoros analisados atenderam aos requisitos mínimos definidos em legislação. Uma maior concentração de hemoglobina livre foi observada nos reagentes de hemácias expostos à temperatura ambiente com simultânea homogeneização, entretanto, sem causar alterações nos resultados dos testes de potência e especificidade. A condutividade elétrica média das alíquotas dos reagentes de hemácias foi similar em todas as condições. Os resultados apontam que os reagentes imuno-hematológicos analisados são estáveis nas condições de temperatura e manipulação às quais foram submetidos, assegurando a qualidade dos resultados durante o uso dos reagentes nestas circunstâncias.

**Palavras-chave:** estabilidade; reagentes imuno-hematológicos; controle da qualidade; fenotipagem ABO e RhD.

## **STABILITY OF IMMUNOHEMATOLOGICAL REAGENTS USED FOR BLOOD TYPING OF RECIPIENTS IN THE TUBE TECHNIQUE**

The storage temperature of immunohematological reagents is, in general, 2-8°C, and it's used at room temperature. The Consolidation Ordinance n° 5 of the Ministry of Health establishes the minimum quality parameters for the evaluation of each batch and consignment of reagents received. However, there are no minimum specifications defined for the quality testing of reagents while in use, which are frequently exposed to homogenization and room temperature, besides the use of positive and negative controls. In this context, this study aimed to analyze the stability of immunohematological reagents used to determine ABO and RhD typing in the tube technique. The potency, specificity and integrity of anti-A, anti-B, anti-D, RhD control and A<sub>1</sub> and B red blood cells reagents were evaluated after long (eight hours) and short (four hours) daily periods of exposure at room temperature (20-24°C). The red blood cell reagents A<sub>1</sub> and B were also daily exposed for 11 hours and 30 minutes at room temperature and also 30 minutes at room temperature with simultaneous homogenization in equipment. As negative and positive controls, an aliquot of the reagents was permanently stored at refrigeration temperature and another was exposed daily for 12 hours at room temperature, respectively. The reagent aliquots were submitted to different conditions five days a week for four weeks. Reaction intensity, titration and avidity tests were performed for the antisera and reaction intensity, determination of free hemoglobin and electrical conductivity for the red blood cells reagents. The antisera reaction intensity was 4+ for all exposure conditions and none of them showed a decrease in specificity. Although non-significant small variations were observed after the different exposure periods, the titer and avidity of the analyzed antisera met the minimum requirements defined in legislation. A higher concentration of free hemoglobin was observed in red blood cell reagents exposed to room temperature with simultaneous homogenization, however, without causing changes in the potency and specificity of test results. The electrical conductivity average of the red blood cell reagents aliquots was similar under all exposure conditions. The results indicate that the immunohematological reagents analyzed are stable under the temperature and on-use conditions to which they were submitted, ensuring the quality of the results during the use of the reagents in these circumstances.

**Keywords:** stability; immunohematological reagents; quality control; ABO and RhD phenotyping.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1	SISTEMA ABO	10
1.2	SISTEMA Rh	14
1.3	GARANTIA DA QUALIDADE	18
1.4	INTRODUÇÃO AOS REAGENTES MONOCLONAIS PARA DETERMINAÇÃO DE TIPAGEM SANGUÍNEA	26
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1	REAGENTES, EQUIPAMENTOS E AMOSTRAS	33
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE AMOSTRAS E REAGENTES	33
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE AMOSTRAS E REAGENTES	34
4.4	ASPECTOS ÉTICOS	34
4.5	DESENHO EXPERIMENTAL	34
4.6	METODOLOGIA DOS TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE	38
4.7	ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE PARA OS REAGENTES DE TIPAGEM SANGUÍNEA ABO E RhD	40
4.8	ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA DE LEITURA DAS REAÇÕES IMUNO-HEMATOLÓGICAS ENTRE OS PROFISSIONAIS	41
4.9	TEMPERATURA DA CÂMARA DE CONSERVAÇÃO E AMBIENTE DE EXPOSIÇÃO	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>44</b>
5.1	INTENSIDADE DE REAÇÃO E ESPECIFICIDADE DOS SOROS ANTI-A, ANTI-B, ANTI-D E CONTROLE RhD	44
5.2	AVIDEZ DOS SOROS ANTI-A, ANTI-B E ANTI-D	46
5.3	TÍTULO DOS SOROS ANTI-A, ANTI-B E ANTI-D	48
5.4	POTÊNCIA E ESPECIFICIDADE DOS REAGENTES DE HEMÁCIAS A1 E B	54
5.5	HEMOGLOBINA LIVRE NOS REAGENTES DE HEMÁCIAS A1 E B	55
5.6	CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS REAGENTES DE HEMÁCIAS A1 E B	58

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>66</b>
	<b>APÊNDICES</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No início do século XX, quando Landsteiner notou que o plasma de alguns indivíduos aglutinava as hemácias de outros, o primeiro sistema, o ABO, foi identificado. Depois disso, nenhum novo sistema de grupo sanguíneo foi descoberto por 25 anos. Em 1945, com o desenvolvimento do teste de antiglobulina por Coombs, Mourant e Race, a ciência da sorologia de grupo sanguíneo avançou, pois anticorpos que não aglutinavam diretamente as hemácias puderam ser detectados e estudados (DANIELS, 2013; KLEIN; ANSTEE, 2014).

O termo sistema de grupo sanguíneo refere-se a um ou mais antígenos expressos na membrana das hemácias, controlados por um único gene ou por um complexo de dois ou mais genes homólogos intimamente ligados com pouca recombinação ocorrendo entre eles. Para que um sistema de grupo sanguíneo e seus antígenos sejam reconhecidos, a variação genética deve ser identificada, sequenciada e confirmada (DANIELS, 2013; ISBT, 2021).

O Quadro 1 apresenta os primeiros 10 sistemas de grupo sanguíneo descritos.

Quadro 1 - Primeiros 10 sistemas de grupos sanguíneos descritos.

Sistema de grupo sanguíneo	Ano de descoberta	Anticorpo que define o sistema encontrado pela primeira vez em:
ABO	1901	Sujeitos normais
Le	1946	
MN*	1927	Coelhos injetados com hemácias humanas
P	1927	
LW	1930s	Coelhos injetados com hemácias de macaco Rhesus
Rh	1939	Mãe de bebê natimorto
	1940	Pacientes transfundidos
Lu	1945	Pacientes transfundidos ou mães de bebês com DHRN
K	1946	
Fy	1950	
Jk	1951	
* Os antígenos S e s foram descobertos posteriormente e fazem parte do mesmo sistema (MNSs). DHRN: Doença hemolítica do recém-nascido.		

Fonte: Adaptado de Klein, Anstee (2014).

A maioria dos antígenos de hemácias é sintetizada e diretamente expressa nas hemácias, porém, alguns são adsorvidos do plasma para a membrana, como os antígenos do sistema Lewis e Chido/Rodgers. Determinados antígenos são detectados somente nas hemácias e outros são encontrados em outros órgãos, sendo também chamados de antígenos de histo-compatibilidade (DANIELS, 2013; RAHFELD; WITHERS, 2020).

Análises bioquímicas mostram que existem dois principais tipos de antígenos sanguíneos: os determinantes protéicos, os quais representam o produto primário do gene do grupo sanguíneo (antígenos Rh, Kell e Duffy), e os determinantes carboidratos em glicoproteínas e glicolipídios, cujos produtos dos genes que controlam a expressão do antígeno são enzimas glicosiltransferases (antígenos ABO) (DANIELS, 2013; RAHFELD; WITHERS, 2020).

A importância clínica dos antígenos de grupos sanguíneos depende principalmente da frequência com que os aloanticorpos ocorrem e suas características: classe do anticorpo, amplitude térmica e capacidade de ativar o complemento. Essas características, por sua vez, determinam a capacidade do anticorpo causar a destruição das hemácias e de atravessar a barreira placentária e causar doença hemolítica do recém-nascido (KLEIN; ANSTEE, 2014).

A Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea descreve atualmente 43 sistemas de grupos sanguíneos, determinados geneticamente por 48 genes, contendo um total de 345 antígenos (ISBT, 2021). Destes, apenas os antígenos do sistema ABO e um único antígeno (RhD) dentro do sistema Rhesus (Rh) são rotineiramente avaliados na prática transfusional. Os antígenos de outros sistemas de grupo sanguíneo são avaliados e pesquisados apenas em certas circunstâncias, a exemplo os receptores em esquema de transfusão crônica (BRASIL 2017).

## 1.1 SISTEMA ABO

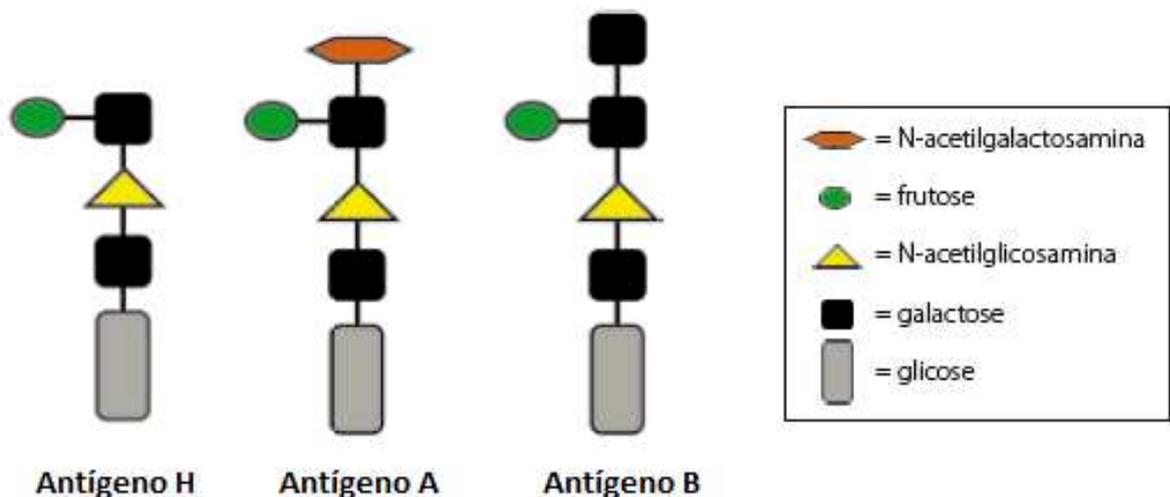
O sistema de grupo sanguíneo ABO é considerado o mais importante na prática transfusional devido a ocorrência previsível dos anticorpos anti-A e anti-B em indivíduos que não possuem o correspondente antígeno. Esses anticorpos têm a capacidade de ativar o sistema complemento e frequentemente causar hemólise

intravascular aguda quando hemácias incompatíveis são transfundidos (HARMENING, 2005; KLEIN; ANSTEE, 2014).

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo ABO são determinados por genes localizados no braço longo do cromossomo 9 (posição 9q34.1-q34.2). Esses genes codificam glicosiltransferases que catalisam a transferência de um açúcar terminal imunodominante a um substrato receptor presente na membrana das hemácias, o antígeno H, o qual é convertido em antígeno A ou B. No grupo sanguíneo A, o açúcar terminal é a  $\alpha$ -N-acetilgalactosamina, adicionado por meio da enzima  $\alpha(1,3)$ N-acetilgalactosaminiltransferase. No grupo sanguíneo B, o açúcar terminal é uma galactose, adicionado por meio de uma galactosiltransferase. Indivíduos do grupo AB contêm antígenos A e B em suas hemácias. Indivíduos do grupo O carecem de uma transferase funcional e, portanto, não transferem nenhum tipo de açúcar ao antígeno H (DANIELS, 2013; OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013; RAHFELD; WITHERS, 2020).

A estrutura dos antígenos H, A e B é apresentada na Figura 1.

Figura 1 - Estrutura dos antígenos H, A e B.



Fonte: Oliveira, Ribeiro e Vizzoni (2013).

A remoção destes açúcares terminais através de glicosidasases apropriadas tem sido estudada objetivando a conversão de hemácias de fenotipagem “A” e “B” em “O”, as quais são essenciais para os atendimentos de emergência. Entretanto, esta tecnologia ainda não está disponível na prática clínica, pois alguns obstáculos precisam ser superados, como a eficácia e a eficiência das enzimas e os baixos níveis de expressão dos antígenos A e B devido a clivagem incompleta destes (RAHFELD; WITHERS, 2020).

Pode-se observar diferentes níveis de expressão dos antígenos do sistema ABO, sendo chamados de subgrupos de A ou de B (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). A existência de subgrupos de A foi reconhecida pela primeira vez por Von Dungern e Hirszfeld (1911), os quais foram posteriormente nomeados subgrupos  $A_1$  e  $A_2$ . O número de sítios antigênicos A por hemácia, estimado por uma variedade de técnicas, pode assim ser resumido:  $A_1 > A_1B > A_2 > A_2B$ . Numerosos outros fenótipos com expressão fraca do antígeno A nas hemácias são conhecidos, entretanto, os fenótipos  $A_1$  e  $A_2$  são os mais comuns. Já os fenótipos variantes fracos de B são raros. Isso pode ser um reflexo da frequência relativamente baixa do gene B em muitas populações (DANIELS, 2013; OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013).

Os antígenos ABO não estão restritos apenas à membrana das hemácias, podendo ser encontrados também em uma grande variedade de células, como linfócitos, plaquetas, endotélio capilar venular e arterial, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, além de secreções e outros fluídos como saliva, urina e leite (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003).

Os anticorpos do sistema ABO são formados naturalmente, sem qualquer exposição a hemácias ou gravidez prévia e são predominantemente de classe IgM, embora pequenas quantidades de IgG possam estar presentes. Uma das explicações para o seu aparecimento é a ampla distribuição de estruturas semelhantes aos antígenos A e B na natureza, principalmente nas bactérias presentes no trato intestinal, as quais promovem uma exposição constante de todos os indivíduos a essas estruturas, estimulando assim a produção dos anticorpos ABO em indivíduos que carecem dos respectivos antígenos (HARMENING, 2005; OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013; QURASHY; SAPATNEKAR, 2016).

A maioria dos outros sistemas de grupos sanguíneos não têm a ocorrência natural de anticorpos para antígenos ausentes nas hemácias. Nestes casos, a produção dos anticorpos é resultado de imunização ativa contra antígenos não próprios após exposição a hemácias de outro indivíduo (HARMENING, 2005; OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013; QURASHY; SAPATNEKAR, 2016; GANDHI *et al.*; 2018; ISBT, 2021).

A determinação do fenótipo ABO pode ser realizada pela detecção sorológica com o uso de reagentes imuno-hematológicos que irão indicar a presença ou ausência de antígenos (tipagem direta) e de anticorpos (tipagem reversa) através de reações de aglutinação (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; MENY, 2017). Há uma ampla gama de testes analíticos disponíveis. Entre os mais conhecidos estão as técnicas em lâmina, tubo, microplaca e gel-centrifugação. Ferramentas de biologia molecular também podem ser empregadas quando as sorológicas não são suficientes (MUJAHID; DICKERT, 2015; QURASHY; SAPATNEKAR, 2016).

A tipagem direta é rotineiramente realizada com o uso de antissoros comerciais (anti-A, anti-B e anti-AB) e tem finalidade de detectar antígenos nas hemácias de um indivíduo. O uso do soro anti-AB é facultativo caso os soros anti-A e anti-B forem de origem monoclonal. A tipagem reversa visa a detecção de anticorpos ABO no soro ou plasma do indivíduo, e é realizada através do uso de reagentes de hemácias conhecidas A<sub>1</sub> e B. O uso de outros reagentes de hemácias como A<sub>2</sub> e O, tem caráter opcional e visa auxiliar casos de divergências entre as tipagens direta e reversa. As tipagens direta e reversa devem sempre apresentar resultados concordantes entre elas (BRASIL, 2017).

O Quadro 2 lista as características dos reagentes de rotina utilizados para a testagem ABO em bancos de sangue.

Quadro 2 - Características dos reagentes de rotina utilizados para a testagem ABO.

	Anti-A	Anti-B
<b>Tipagem Direta</b>	Anticorpo monoclonal*	Anticorpo monoclonal*
	Alta especificidade	Alta especificidade
	IgM	IgM
	Reagente de cor azul claro	Reagente de cor amarelo claro
	Reação mínima: 2 a 4+, conforme fenótipo da hemácia	Reação mínima: 3 a 4+
	Título: 64 a 256, conforme fenótipo da hemácia	Título: 256
	Avidéz: até 15 a 45", conforme fenótipo da hemácia	Avidéz: até 15"
<b>Reagente A1 e B</b>		
<b>Tipagem Reversa</b>	Fonte humana	
	Suspensão de hemácias de 3 a 5%	
	Reação mínima: 2 a 4+	
<b>*Regra geral: Sempre adicionar soluções claras primeiro e depois as hemácias, para assegurar que ambos foram adicionados – a fonte de anticorpo e a fonte de antígeno.</b>		

Fonte: Adaptado de Harmening (2005) e Brasil (2017).

Em algumas circunstâncias, pode existir discordância entre os antígenos presentes na superfície das hemácias e os respectivos anticorpos no soro. Isso é chamado de discrepância ABO. Entre as causas estão: problemas de natureza técnica, reatividade fraca ou indetectável dos antígenos ou anticorpos, reatividade extra ou inespecífica nas hemácias ou no soro/plasma da amostra, mistura de hemácias na amostra. Nestes casos, investigações adicionais por meio de técnicas complementares são necessárias, o que pode acarretar em atraso transfusional (BRASIL, 2017; MENY, 2017; MARACAJA *et al.*, 2020).

## 1.2 SISTEMA Rh

O sistema Rh, composto por 56 antígenos, é o segundo sistema de grupo sanguíneo em importância transfusional e considerado o mais complexo. Isso se deve ao fato de que seus antígenos, especialmente o RhD, são altamente

imunogênicos. Dois genes altamente homólogos, *RHD* e *RHCE* que estão localizados no cromossomo um, são responsáveis por codificar, respectivamente, as proteínas RhD e RhCE, as quais são expressas na membrana dos hemácias e carregam os antígenos RhD e os C, c, E, e, respectivamente, em várias combinações (PERSON *et al.*, 2020; ISBT, 2021).

As proteínas RHD e RHCE são hidrofóbicas e compostas de 417 aminoácidos, ambas apresentam 12 domínios transmembranosos, sete intracelulares e seis extracelulares, os quais são responsáveis diretos pela resposta imune. A imunogenicidade dos principais antígenos do sistema Rh segue a ordem: D > c > E > C > e (NARDOZZA *et al.*, 2010).

Os alelos são herdados como haplótipos denotados DCe, DcE, dce, etc. Neste caso, “d” representa a ausência do antígeno RhD por deleção ou inativação do gene *RHD*. A combinação dos haplótipos herdados de origem materna e paterna determina o genótipo que, por sua vez, dita o fenótipo de cada indivíduo (DANIELS, 2013).

Mutações pontuais e recombinações entre os genes homólogos *RHD* e *RHCE*, relacionados ao *locus RH*, geram novos epítomos nas proteínas Rh e novas configurações antigênicas, dando origem às variações qualitativas dos antígenos deste sistema, e pode dificultar as análises tanto por técnicas sorológicas quanto por biologia molecular, o que torna esse sistema tão complexo (VEGE; WESTHOFF, 2019).

Pesquisadores formularam nomenclaturas diversas para seus antígenos e anticorpos baseadas em diferentes hipóteses. O Quadro 3 apresenta os haplótipos e a correspondente nomenclatura proposta por Wiener para o sistema Rh.

Quadro 3 : Haplótipos e a correspondente nomenclatura proposta por Wiener para o sistema Rh.

Haplótipos	Nomenclatura Wiener
DCe	R <sub>1</sub>
dce	r
DcE	R <sub>2</sub>
Dce	R <sub>0</sub>
dcE	r''
dCe	r'
DCE	R <sub>z</sub>
dCE	r <sub>y</sub>

Fonte: Adaptado de Daniels (2013).

A quantidade do antígeno RhD pode variar entre 9.900 a 33.300 sítios antigênicos por hemácia, apresentando a seguinte ordem de expressão de acordo com o fenótipo: R<sub>2</sub>R<sub>2</sub> (DcE/DcE) > R<sub>1</sub>R<sub>2</sub> (DCe/DCe) > R<sub>1</sub>R<sub>1</sub> (DCe/DCe) > R<sub>2</sub>r (DcE/dce) > R<sub>0</sub>r (Dce/dce) > R<sub>1</sub>r (DCe/dce). Adicionalmente, algumas hemácias expressam o antígeno RhD intacto de forma mais fraca, com 70 a 5200 antígenos por célula. Este fenótipo, anteriormente denominado Du, é atualmente referido como RhD positivo fraco. Esse fenótipo é causado pela substituição de aminoácidos nas porções transmembrana e intracelular da proteína RhD. A presença do antígeno RhD na membrana das hemácias caracteriza os indivíduos como “RhD positivos”. Apenas 18% dos caucasianos são RhD negativos, ou seja, carecem da expressão dessa proteína. O fenótipo D fraco ocorre em 0,2% a 1% dos caucasianos (NARDOZZA *et al.*, 2010; DANIELS, 2013 KLEIN; ANSTEE, 2014; RAHFELD; WITHERS, 2020).

A análise da expressão do antígeno RhD em amostras de pacientes e doadores é preconizada na rotina transfusional e realizada, usualmente, com o emprego de antissoros que detectam a presença ou ausência deste antígeno (BRASIL, 2017). Os reagentes em meio salino, contendo anticorpos de classe IgM, foram os primeiros disponíveis. São reagentes em meio pobre de proteínas, o que

evita reações inespecíficas, porém não são adequados para a detecção dos fenótipos de expressão fraca. Como os anticorpos monoclonais tem uma especificidade estreita, reagentes monoclonais anti-D mais modernos são geralmente uma combinação de diferentes clones para garantir reatividade de amplo espectro, os chamados *blends*, de anticorpos anti-D IgM e IgG que maximizam a visualização de reações e garantem a detecção dos fenótipos fracos (HARMENING, 2005).

Os reagentes anti-D atualmente utilizados nas rotinas imuno-hematológicas são produzidos, geralmente, em meio protéico, com potencializadores que proporcionam maior sensibilidade para a detecção do RhD fraco por meio de testes indiretos e emprego da antiglobulina humana, porém, aumentam a possibilidade de resultados falsos positivos. Assim, paralelamente, os serviços devem utilizar um soro controle negativo, compatível e do mesmo fabricante, cujo resultado deve ser negativo para validar o teste (HARMENING, 2005; BRASIL, 2017).

No caso do fenótipo RhD fraco, a aglutinação direta com o soro anti-D é mais fraca, podendo inclusive apresentar-se negativa. Este fenótipo é, portanto, detectado por meio da pesquisa do antígeno RhD fraco, com o emprego de reagentes de anticorpos de classe IgG, após incubação a 37°C e uso do reagente antiglobulina humana, a qual permite a visualização de reações indiretas. Diante de reações negativas na determinação do RhD de amostras de doadores, a pesquisa do antígeno RhD fraco é compulsória. Já para amostras de receptores de sangue que apresentaram reação negativa com o soro anti-D, a pesquisa de antígeno RhD fraco é uma recomendação, podendo a amostra ser considerada negativa para fins transfusionais (BRASIL, 2017; VEGE; WESTHOFF, 2019).

Devido a alta imunogenicidade dos antígenos do sistema Rh, indivíduos RhD negativos podem, prontamente, formar anticorpos anti-D. Esses anticorpos são capazes de causar reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica do feto e do recém nascido e, por isso, de importância transfusional (KLEIN; ANSTEE, 2014; VEGE; WESTHOFF, 2019; RAHFELD; WITHERS, 2020).

### 1.3 GARANTIA DA QUALIDADE

Nos serviços de saúde, a obtenção de resultados precisos e confiáveis tem como objetivo garantir a segurança, eficácia e eficiência, além da satisfação dos clientes, sejam eles médicos ou pacientes (DIAS; BARQUETTE; BELLO, 2017; PASQUINI, 2018).

A terapia transfusional é indispensável no sistema de saúde e salva milhares de vidas anualmente. Estima-se aumento na demanda por essa terapia devido ao envelhecimento demográfico da população e consequente aumento nos procedimentos que requerem suporte transfusional. Embora estratégias de gerenciamento e revisão de políticas transfusionais tenham sido adotadas pelos serviços para equilibrar a oferta e procura, a compatibilização dos hemocomponentes pode ser desafiadora (RAHFELD; WITHERS, 2020).

Os serviços de saúde são responsáveis por organizar seus processos de forma a atender os requisitos legais e garantir a qualidade e segurança do sangue e hemocomponentes. A implementação e manutenção de um sistema de gestão da qualidade, a realização de controles da qualidade dos hemocomponentes, o monitoramento e gestão de riscos, a adoção de estratégias proativas e não reativas, o acompanhamento de indicadores de processos visando identificar áreas que necessitam de atenção e o monitoramento das mudanças ao longo do tempo são essenciais para o sucesso das atividades técnicas de uma instituição (VUK *et al.*, 2018).

Além disso, para obtenção de resultados confiáveis nos testes realizados e consequente garantia da segurança transfusional, é imprescindível a padronização e validação dos processos críticos, uso, manutenção, calibração e qualificação de equipamentos, treinamento inicial e periódico dos colaboradores e realização de controles da qualidade (NOVARETTI *et al.*, 2002; BRASIL, 2017).

O Conselho da Europa iniciou em 1962 o acordo nº 39 de intercâmbio de reagentes para grupos sanguíneos (COUNCIL OF EUROPE, 2020). Este acordo foi estabelecido e vinculado aos países que o homologaram considerando que muitas vezes os reagentes utilizados para determinação de grupos sanguíneos e detecção de incompatibilidades não estavam disponíveis em quantidade suficiente. Ficou

então definido um protocolo de especificações relacionadas a potência, especificidade, estabilidade, validade, conservação, coloração, distribuição, volume, rotulagem, instruções de uso e certificação para estes reagentes, sejam eles de origem humana, animal, vegetal ou outras. Desta forma, estes países ficaram sujeitos às mesmas regras, permitindo o intercâmbio destes reagentes entre eles (COUNCIL OF EUROPE, 1962a; COUNCIL OF EUROPE, 1962b).

O Conselho da Europa também estabeleceu recomendações sobre aspectos éticos, sociais e científicos. A recomendação nº R (95) 15 trata da preparação, uso e garantia da qualidade dos hemocomponentes, e contém um guia para preparação, uso e garantia da qualidade dos hemocomponentes como apêndice, atualizado regularmente, com diretrizes de boas práticas, cujo objetivo é fornecer aos estabelecimentos de transfusão de sangue um conjunto de normas e especificações para a garantia da qualidade em concordância com as normatizações vigentes (COUNCIL OF EUROPE, 2020).

No âmbito da livre circulação dos cidadãos da União Europeia, a vigente diretiva europeia do sangue 2002/98/CE, de 27 de janeiro de 2003, estabelece as normas de qualidade e segurança em relação à coleta, análise, processamento e distribuição do sangue humano e de seus componentes para os estados membros. A diretiva 2005/62/CE, de 30 de setembro de 2005, trata do sistema de qualidade dos serviços de sangue (EUROPEAN UNION, 2003; EUROPEAN UNION, 2005).

Assim como no Brasil, os reagentes imuno-hematológicos são considerados dispositivos de diagnóstico *in vitro* pela União Europeia e devem atender as diretivas 93/42/EEC do Conselho das Comunidades Europeias (EUROPEAN UNION, 1993), relativa aos dispositivos médicos e a 98/79/EC do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia (EUROPEAN UNION, 1998), a qual trata dos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*. Além disso, os reagentes para determinação de grupo sanguíneo estão incluídos na lista A do anexo II da diretiva 98/79/EC e, portanto, seus fabricantes devem enquadrar-se também à especificação técnica comum 2009/886/EC para dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro* (EUROPEAN UNION, 2009).

Esta especificação traz os critérios para a avaliação de desempenho dos reagentes e produtos para detecção dos antígenos dos sistemas ABO, Rh e Kell.

Essa avaliação deve ser realizada com amostras representativas da população europeia, as amostras positivas devem incluir aquelas com expressão fraca de antígenos e variantes, e os resultados devem ser comparados com metodologias de última geração já implementadas. Os efeitos de potenciais substâncias interferentes devem ser identificados como parte da análise de risco exigida de cada novo reagente (EUROPEAN UNION, 2009).

Também, na especificação técnica comum 2009/886/EC, são determinados os critérios dos testes de qualidade que devem ser realizados pelo fabricante para assegurar que cada novo lote produzido é suficientemente sensível e específico para identificar sistematicamente os antígenos, epítomos e anticorpos pertinentes. Dentre eles, está a testagem dos soros anti-A e anti-B com no mínimo duas hemácias dos fenótipos  $A_1$ ,  $A_2B$  e  $A_x$  e fenótipos B e  $A_1B$ , respectivamente. Para o soro anti-D, preconiza-se a testagem com no mínimo duas hemácias dos fenótipos  $R_{1r}$ ,  $R_{2r}$  e D fraco. Os resultados dos testes devem ser inequívocos para todas as técnicas recomendadas e concordantes com a avaliação de desempenho (EUROPEAN UNION, 2009).

Os serviços de hemoterapia europeus somente podem utilizar reagentes licenciados ou que foram avaliados e considerados adequados por uma autoridade nacional de saúde responsável e devem exigir dos fornecedores dados completos das validações de cada lote (COUNCIL OF EUROPE, 2020). Todos os procedimentos e testes laboratoriais que podem afetar a qualidade e segurança do sangue devem ser validados antes de serem utilizados e revalidados conforme periodicidade definida pelo estabelecimento. Todo equipamento deve ser validado, calibrado e mantido de acordo com a finalidade a que se destina (EUROPEAN UNION, 2005).

Controles internos e externos da qualidade de reagentes imuno-hematológicos são indicados na União Europeia. Cada novo lote de reagente imuno-hematológico deve ser testado para demonstrar a adequação à finalidade pretendida. Para testes de detecção de antígenos, os controles devem incluir controle positivo, de preferência com antígenos em heterozigose, e controles negativos. A frequência de realização de controle interno da qualidade depende da técnica empregada, devendo ser realizado pelo menos a cada bateria de testes nas

rotinas automatizadas ou pelo menos uma vez por dia, desde que os mesmos lotes sejam utilizados (COUNCIL OF EUROPE, 2020).

O Comitê Consultivo Profissional dos Serviços de Transplante de Tecido e de Transfusão Sanguínea do Reino Unido publicou em 2013 a 8ª edição das diretrizes para os serviços de transfusão de sangue do Reino Unido. Neste documento, são apresentadas as normas e as especificações para avaliação de desempenho e controle da qualidade de reagentes para determinação de grupos sanguíneos. Além do atendimento à diretiva a 98/79/EC e à especificação técnica comum europeia, este comitê prevê o atendimento de outros padrões internacionais importantes como, por exemplo, a avaliação da performance dos reagentes e da potência (titulação) e especificidade dos diferentes lotes de antissoros produzidos através de testes com hemácias de diferentes fenótipos. Adicionalmente, são apresentadas as diretrizes gerais para a fabricação de reagentes de hemácias utilizados nos testes imuno-hematológicos. Para os reagentes de hemácias, o fenótipo deve ser confirmado em duplicata, as hemácias devem estar suspensas em meio conservante que garanta a estabilidade dos antígenos, o teste de antiglobulina direto deve ser negativo e, em se tratando de hemácias para a prova reversa, devem ser pelo menos uma do fenótipo A<sub>1</sub> e uma do fenótipo B (JPAC, 2013).

A Sociedade de Transfusão Sanguínea da Austrália e Nova Zelândia igualmente estabelece suas diretrizes para transfusão e prática laboratorial imuno-hematológica. Os reagentes devem ser avaliados antes de serem introduzidos na rotina através de testes de aceitação, sendo recomendada a avaliação da força de reação dos reagentes de hemácias contra soros de concentração ou título conhecidos e a titulação dos antissoros com hemácias padrão. Além de garantir a qualidade inicial, os resultados dos testes de aceitação fornecem parâmetros importantes para a avaliação do desempenho contínuo dos reagentes. É permitido que os testes de aceitação sejam centralizados. A decisão de centralização deve ser baseada em riscos potenciais, entre eles o tempo de trânsito, a estabilidade do reagente a temperatura ambiente, os danos potenciais durante o transporte e o monitoramento das condições de transporte (ANZSBT, 2020).

A sociedade de transfusão sanguínea da Austrália e Nova Zelândia também preconiza a adesão a um programa de avaliação externa da qualidade para os

testes imuno-hematológicos realizados pelo laboratório e verificação recorrente dos reagentes durante o seu uso. Especificamente com relação aos reagentes para determinação da tipagem ABO e RhD, é preconizado o uso regular de controles positivos e negativos durante a realização dos testes, quando há alteração dos lotes e quando o analisador é inicializado, no caso de automação. A frequência na utilização dos controles depende dos padrões de trabalho, dos métodos utilizados e das instruções do fabricante, porém, recomenda-se no mínimo uma vez ao dia, ou todos os dias em que o laboratório realizar a testagem ABO/RhD (ANZSBT, 2020).

No Canadá, o Regulamento do Sangue preconiza a implementação de sistema de gestão da qualidade, incluindo programa de controle da qualidade e participação em ensaio de proficiência para avaliação da acurácia e confiabilidade dos resultados dos testes. O programa de controle da qualidade é responsável por determinar a aceitabilidade dos produtos, insumos e equipamentos críticos do serviço hemoterápico. Os insumos críticos incluem os reagentes para determinação de grupos sanguíneos, os quais devem ser validados e qualificados antes do uso e a liberação deve ser baseada nas especificações do serviço e pode incluir inspeção visual, liberação específica de lotes e revisão de certificados de análise (CANADA, 2015).

No Brasil, os produtos para diagnóstico *in vitro*, nacionais ou importados, devem ser registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e atender aos requisitos da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) ANVISA nº 36 de 26 de agosto de 2015, que dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de notificação e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências (BRASIL, 2015). Os reagentes e dispositivos destinados à tipagem de sangue ou de tecidos para garantir a compatibilidade imunológica do sangue, componentes sanguíneos, células, tecidos ou órgãos são, desta forma, classificados como classe III de risco, exceto os produtos para determinação dos sistemas ABO e Rh, os quais são classificados como classe IV. Produtos de classe de risco III e IV devem apresentar comprovante de Certificação em Boas Práticas de Fabricação e Controle e dossiê técnico contendo as informações exigidas para a classe de risco correspondente, que inclui dados relacionados ao desempenho e estabilidade do produto em uso e em condições de transporte (BRASIL, 2015).

Desde 2002, a ANVISA, por meio da RDC ANVISA nº 343 de 13 de dezembro de 2002 e posterior RDC ANVISA nº 153 de 24 de julho de 2004, estabelece a realização de controles da qualidade a cada lote de reagentes imuno-hematológicos recebidos, a verificação periódica destes reagentes durante manipulação e armazenamento, e a participação em ao menos um programa de controle externo da qualidade (BRASIL, 2002; NOVARETTI *et al.*, 2002; BRASIL, 2004; BRASIL, 2009).

Neste cenário, Novaretti *et al.* (2002) apresentaram diversos aspectos práticos que envolvem o controle da qualidade e parâmetros a serem avaliados relacionados a inspeção visual, análise das embalagens, análise de bula e testes laboratoriais de controle a serem executados.

Em 2010 e 2011, com a publicação das respectivas RDC ANVISA nº 57 e Portaria do Ministério da Saúde nº 1353, foram estabelecidos os parâmetros de avaliação dos reagentes imuno-hematológicos para cada lote e remessa recebidos, a fim de comprovar que os reagentes estão dentro dos padrões de qualidade e que não foram alterados durante o transporte (BRASIL, 2010; BRASIL 2011).

Entre as características dos reagentes que devem ser avaliadas no recebimento dos mesmos pelos serviços de hemoterapia estão: especificidade e potência. Testes de intensidade de reação, avidéz e titulação com hemácias e plasmas de diferentes fenótipos são preconizados para as análises destas características. Tais parâmetros permanecem presentes na vigente Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2017).

A potência configura a capacidade do reagente produzir a reação quando entra em contato com o respectivo antígeno/anticorpo. O teste de avidéz avalia a afinidade dos anticorpos pelos antígenos por meio da medida da velocidade de reação. Já a titulação é um método utilizado para determinar, através do processo de diluição seriada, a concentração dos anticorpos presentes no soro avaliado. Para a determinação da intensidade de reação, os reagentes são testados, conforme as recomendações do fabricante, com suspensões de hemácias/plasmas de diferentes fenótipos e a intensidade de reação é medida de acordo com o grau de aglutinação das hemácias (JUDD *et al.*, 2008; BRASIL, 2014).

A especificidade é a característica inerente do reagente (antissoro ou hemácia) que o torna capaz de reconhecer apenas o respectivo antígeno/anticorpo. Para essa avaliação, os reagentes são testados com hemácias e plasmas que não expressam o antígeno/anticorpo. Não deve ocorrer aglutinação visto que não há antígenos/anticorpos correspondentes para promovê-la (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

De forma complementar, existe a recomendação de verificação periódica durante manipulação e armazenamento dos reagentes. Porém, não há padrões específicos de qualidade estabelecidos para estas verificações. São preconizados controles de todas as técnicas empregadas, utilizando sistematicamente padrões positivos e negativos durante os procedimentos (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Segundo os fabricantes, a temperatura de armazenamento dos reagentes imuno-hematológicos, em geral, é entre 2 e 8°C, sendo que a utilização desses deve ser em temperatura ambiente. Adicionalmente, a legislação preconiza que os reagentes fiquem o menor tempo possível fora da sua temperatura de armazenamento (BRASIL, 2017). A temperatura é um fator importante nos processos laboratoriais, podendo afetar a estabilidade de amostras, reagentes e fármacos (KEMKES-MATTHES; FISCHER; PEETZ, 2011; LINSKENS; DEVREESE, 2018; ABE *et al.*, 2020).

Os anticorpos monoclonais são amplamente utilizados como reagentes críticos em ensaios analíticos, não somente na imuno-hematologia. Fink *et al.* (2020) analisaram 16 diferentes anticorpos que foram diluídos conforme recomendações, aliquotados e estocados em diferentes temperaturas por diferentes tempos, de 0,5 a 24 semanas, representando o armazenamento a longo prazo e de curto prazo após descongelamento e diferentes graus de estresse térmico. Todos os anticorpos estudados apresentaram alterações nas análises bioquímicas tradicionais (agregação, fragmentação e desamidação) na condição acelerada de 45°C a qual foi investigada com mais detalhes em testes funcionais de ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) e cultura de células. Nos testes funcionais, apenas três dos anticorpos estudados apresentaram resultados fora do limite de aceitação após 12 semanas a 45°C. Neste estudo, os autores propõem o monitoramento da estabilidade de anticorpos através dos ensaios funcionais para indicar possíveis

alterações na performance do ensaio relacionadas à degradação do anticorpo. Os autores justificam que os ensaios bioquímicos detectam mudanças na molécula mas não avaliam o impacto funcional. Os ensaios funcionais detectam as alterações que afetam a interação antígeno-anticorpo, as quais comprometem diretamente o desempenho no ensaio analítico. Nesse contexto, a combinação de dados de estudos de estabilidade e modelos matemáticos pode fornecer uma abordagem equilibrada para a avaliação da estabilidade dos reagentes de anticorpos (FINK *et al.*, 2020).

Em se tratando de anticorpos monoclonais utilizados para a técnica de citometria de fluxo, os mesmos também devem ser avaliados antes do uso na rotina e essa avaliação deve ser realizada de acordo com a data e lote de recebimento dos produtos. Essa estratégia é necessária uma vez que as condições de acondicionamento e transporte podem afetar a qualidade dos reagentes de anticorpos, mesmo que sejam produtos do mesmo lote. Dentre os parâmetros avaliados, a titulação é o mais importante (CORREIA *et al.*, 2015).

Com relação às hemácias, quando armazenadas em estado líquido e resfriadas, elas têm seu metabolismo celular reduzido em torno de 40 vezes, conseqüentemente, o envelhecimento normal dessas células é diminuído nestas condições (HÖGMAN, 1998). Ruddell *et al.* (1998) demonstraram que os concentrados de hemácias armazenados em temperaturas de 25°C por 24 horas apresentam metabolismo acelerado, com catabolismo de glicose dez vezes mais rápido do que as hemácias de unidades armazenadas em refrigeração (1 a 6°C).

As hemácias comportam-se como partículas eletronegativas devido aos grupos carboxílicos (COOH-) das sialoglicoproteínas da membrana e, em meio salino, são envolvidos por uma nuvem de íons positivos. A diferença de potencial entre a nuvem de íons positivos e a carga elétrica negativa da membrana das hemácias é chamada de potencial zeta. Quanto maior o potencial zeta, mais estável é o sistema, pois as partículas se repelem, superando a tendência à agregação. O potencial zeta de um sistema pode ser alterado devido a redução da carga elétrica das hemácias, a variação da composição do meio ou modificação da força iônica. Outros fatores podem também modificar o valor do potencial zeta, entre eles, a temperatura (OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013).

Dessa forma, é possível observar que a temperatura influencia no metabolismo e conservação das hemácias de hemocomponentes, podendo, então, ser um fator importante na manutenção da qualidade dos reagentes imuno-hematológicos de hemácias, mesmo com o uso de solução conservante.

Sutter *et al.* (2017) avaliaram a estabilidade dos antígenos de hemácias do sistema ABO, Rh e antígeno Kell, para uso em testes de controle interno da qualidade, ao longo de 77 dias após a coleta das amostras sanguíneas, armazenadas de 4 a 6°C, a fim de estabelecer a temporalidade de armazenamento *in natura* e sem conservantes. Os autores observaram que as reações dos antígenos A e B com seus respectivos antissoros foram de 4+ e permaneceram constantes até o 77º dia de armazenamento. Por outro lado, para o antígeno RhD, uma das amostras testadas apresentou diminuição da intensidade de hemaglutinação a partir do 50º dia e as demais apresentaram variação de 4+ e 3+ entre o 1º e o 77º dia.

Contudo, há carência de informações científicas atualizadas sobre os possíveis impactos na estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos quando expostos, durante o uso, a temperaturas diferentes das de armazenamento.

Estas informações poderiam aumentar a segurança e evitar adversidades em qualquer etapa da realização de testes imuno-hematológicos, de doadores ou de pacientes, que podem levar à transfusão de sangue incompatível com efeitos adversos significativos à saúde dos pacientes (COUNCIL OF EUROPE, 2020; RAHFELD; WITHERS, 2020).

#### 1.4 INTRODUÇÃO AOS REAGENTES MONOCLONAIS PARA DETERMINAÇÃO DE TIPAGEM SANGUÍNEA

O desenvolvimento da tecnologia de anticorpos monoclonais foi inicialmente relatado por Köhler e Milstein (1975), e rapidamente direcionado à pesquisa e produção de reagentes para determinação de tipagem sanguínea, tanto para uso na pesquisa quanto na rotina (VOAK, 1990).

Diversas tentativas realizadas entre 1979 e 1983 para produzir anticorpos monoclonais para detecção de grupo sanguíneo ABO seguiram diferentes protocolos de produção (MAJDIC *et al.*, 1979; VOAK *et al.*, 1980; EDELMANN *et al.*, 1981; SACKS; LENNOX, 1981; BUNDLE *et al.*, 1982; BARRIE *et al.*, 198; ROUGER *et al.*, 1983). Alguns anticorpos apresentaram resultados promissores para uso clínico (VOAK *et al.*, 1982), porém, conforme Messeter *et al.* (1984), na maioria dos casos, os títulos ainda eram baixos e as reações fracas com subgrupos os tornavam inadequados para tal finalidade.

Fletcher, Harbour e Zwart (1984) relataram a produção de anticorpos anti-A e anti-B após imunização de camundongos com hemácias A e B e substância B como imunógenos. Os anticorpos produzidos foram testados em técnicas manuais e automatizadas e comparados com reagentes policlonais. O anti-A produzido apresentou baixo título e avidéz menor que o soro policlonal, entretanto, nos testes automatizados, o anti-A apresentou um desempenho tão bom quanto o reagente de origem humana policlonal. O fato foi justificado pelas diferenças nas condições em que as reações ocorreram. Já o anti-B produzido apresentou título mais baixo quando comparado com anticorpos monoclonais produzidos anteriormente, porém mostrou boa performance nos testes de avidéz.

Messeter *et al.* (1984) obtiveram sete anticorpos aglutinantes contra antígenos do sistema ABO (três anti-A, dois anti-B e dois anti-AB) por meio da imunização de camundongos com substâncias solúveis de grupo sanguíneo, hemácias inteiras ou membrana de hemácias de diferentes tipagens. Estes anticorpos foram extensivamente estudados em testes manuais e automatizados, e apresentaram resultados mais promissores, sendo que seis deles foram considerados tão bons ou melhores que os soros comerciais policlonais disponíveis na época. A exemplo, os anticorpos monoclonais anti-A e anti-B apresentaram claramente reações melhores quando testados com hemácias A<sub>2</sub>B e comparados com os correspondentes policlonais.

Já os reagentes anti-D convencionais disponíveis eram policlonais, de origem humana, principalmente do tipo IgG e só causavam aglutinação quando potencializados (VOAK, 1990). A produção dos primeiros poucos anti-D IgG

monoclonais foi relatada por Crawford *et al.* (1983), Doyle *et al.* (1984) e Thomposon *et al.* (1986).

Dentre os diversos estudos publicados na época, McGowan *et al.* (1989) apresentaram, até então, a maior avaliação de reagentes monoclonais para determinação de tipagem ABO. Trata-se de um estudo multicêntrico, usando técnicas manuais e automatizadas para testar diferentes anticorpos (dois anti-A, um anti-B e um anti-AB e mais dois *blends* de anti-A e anti-AB) produzidos pelo Serviço Nacional Escocês de Transfusão de Sangue e os compararam com outros reagentes policlonais e monoclonais, produzidos por fabricantes europeus e dos Estados Unidos da América, de serviços públicos e privados. A avidéz dos reagentes foi determinada após armazenamento de um ano a 4°C, -20°C e em nitrogênio líquido. Além disso, os reagentes passaram por teste de degradação acelerada. Neste teste, uma alíquota de cada reagente foi estocada a 37°C por um mês e outra alíquota passou por seis ciclos de temperatura entre os limites de -20°C e +20°C. Para as alíquotas que passaram pelo teste de degradação acelerada, foram realizados testes de titulação e escore total de reação conforme Marsh (1972), e os resultados foram comparados com os resultados iniciais. No teste de avidéz, os reagentes escoceses se mostraram tão bons quanto os demais e foram ligeiramente menos ávidos que os reagentes policlonais. No teste de degradação acelerada, de forma geral, os anticorpos monoclonais anti-A se mostraram mais potentes e estáveis nos experimentos de ciclos de temperatura que os policlonais. Por outro lado, após o armazenamento a 37°C por um mês, todos os reagentes exibiram sinais de degradação, particularmente quando testado com hemácias A<sub>2</sub>B. Nestas condições, os reagentes anti-A escoceses estavam entre os mais estáveis. Já o anti-B escocês foi considerado um pouco menos potente nos testes iniciais de qualidade, apresentando título de 32 no teste com hemácias B, comparado com os outros produtos mono e policlonais testados que apresentaram títulos iniciais de 64 e 128. Porém este reagente foi mais estável que outros três reagentes monoclonais testados quanto ao título após ser submetido a tais condições (MCGOWAN *et al.*, 1989).

Neste mesmo estudo, McGowan *et al.* (1989) também realizaram um teste longitudinal de estabilidade, no qual alíquotas de cada reagente foram estocadas a 4°C e -150°C por até 12 meses e foram testadas após um, seis, 10 e 12 meses. Os

reagentes escoceses se mostraram tão estáveis e potentes quanto os demais. Entretanto, após o armazenamento, uma queda na potência foi observada em todos os reagentes anti-A monoclonais quando testados com hemácias A<sub>2</sub>B. Nesta situação, o reagente monoclonal que apresentou a maior diferença de título tinha valor inicial de 128 e, após 10-12 meses na condição de estocagem de 4°C, apresentou título de 16.

Depois disso, diversos outros estudos investigando o uso, a reatividade e a estabilidade de reagentes monoclonais para determinação de grupos sanguíneos foram publicados e as metodologias de produção aprimoradas (VOAK, 1989; ODEGAH, 1989; SONNEBORN *et al.*, 1993; OKUBO, 1997; STROBEL, 2001). Em se tratando de reagentes anti-D, os estudos são voltados também para a capacidade de detecção de fenótipos variantes e fracos, além da estabilidade (BARROS *et al.*, 2006; KULKARNI, 2007).

As principais vantagens do uso de reagentes de anticorpos monoclonais para determinação de grupo sanguíneo, em comparação com os anticorpos policlonais, são: a tecnologia de produção de anticorpos monoclonais é bem estabelecida e fornece produtos de alta qualidade, potentes e específicos, e em grandes quantidades; a composição é conhecida e constante lote a lote, os reagentes monoclonais são livres de anticorpos concomitantes e não dependem de plasmas de doadores; o custo pode ser considerado relativamente baixo quando é eliminado o trabalho de avaliar grande número de pequenas doações individuais necessárias para a produção de reagentes policlonais (VOAK, 1990).

Apesar de todas as vantagens proporcionadas com o uso de anticorpos monoclonais na imuno-hematologia, a realização de controle da qualidade nas rotinas é imprescindível para a segurança transfusional.

## 2 JUSTIFICATIVA

Para garantir que o transporte não tenha causado alterações na qualidade dos insumos, a Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde orienta aos serviços de hemoterapia a avaliação dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para tipagem sanguínea na técnica de tubo, antes do uso, através seguintes parâmetros: avidéz, titulação e intensidade de reação para determinar a potência e especificidade dos antissoros e/ou hemácias (BRASIL, 2017).

Estes reagentes devem ser armazenados em câmara de conservação em temperatura de 2-8°C (BRASIL, 2017). Porém, o fabricante orienta o uso em temperatura ambiente, sendo comum os reagentes permanecerem fora da câmara de conservação até a finalização de todos os testes. Ou seja, durante o uso, os reagentes são expostos a diferentes temperaturas por períodos que podem chegar a horas.

Para o período de manipulação e armazenamento, a Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde também preconiza avaliações periódicas dos reagentes e controle das técnicas empregadas através de protocolos estabelecidos pelo próprio serviço. Neste caso, observa-se a utilização de amostras com resultados conhecidos e uso de padrões positivos e negativos, através dos quais os reagentes e processos são avaliados qualitativamente quanto à capacidade de reproduzir um resultado esperado, sem testes aprofundados (BRASIL, 2017).

Considerando que os sistemas ABO e RhD são os mais importantes na prática transfusional, que a temperatura de armazenamento é um fator essencial para a garantia da qualidade dos reagentes e que durante o uso os reagentes são expostos a diferentes temperaturas, propõe-se por meio deste estudo, simular, por quatro semanas, as adversidades que esses reagentes sofrem durante uso em grandes e pequenas rotinas.

O período de quatro semanas de exposição foi definido considerando a validade dos reagentes de hemácias que é de 28 dias e a suposta duração dos frascos dos reagentes na rotina dos serviços. O tempo de exposição diária dos reagentes à temperatura ambiente foi definido tendo em vista o tempo aproximado de uma a duas horas para realização dos testes imuno-hematológicos

pré-transfusionais, podendo variar a depender do fluxo de trabalho, métodos e potencializadores empregados em cada serviço. Desta forma, foram definidos os tempos de quatro e oito horas de exposição diária dos reagentes, cinco dias por semana, por quatro semanas a fim de simular, experimentalmente, as exposições que os reagentes sofrem durante o uso em pequenas (exposição curta) e grandes (exposição longa) rotinas, respectivamente.

Adicionalmente, para simular a homogeneização dos reagentes de hemácias que é realizada a cada uso, a fim de ressuspender as hemácias que se depositam no fundo do frasco, uma alíquota do reagente, além de sofrer a exposição diária à temperatura ambiente por 11 horas e 30 minutos, também foi submetida à 30 minutos diários de exposição à temperatura ambiente com simultânea homogeneização na frequência de sete inversões/minuto. Na prática, a quantidade de inversões para homogeneização eficaz varia de acordo com a demanda dos serviços, a quantidade de reagente no frasco e a quantidade de hemácias depositadas.

O reagente de controle negativo permaneceu permanentemente sob refrigeração e o controle positivo foi exposto por 12 horas diárias a temperatura ambiente de forma a caracterizar uma rotina ininterrupta.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos (soros anti-A, anti-B, anti-D, controle RhD e hemácias A<sub>1</sub> e B) utilizados em exames de tipagem sanguínea de receptores de sangue após diferentes períodos de exposição à temperatura ambiente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a potência dos reagentes anti-A, anti-B e anti-D após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Avaliar a especificidade dos reagentes anti-A, anti-B, anti-D e controle RhD após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Avaliar a potência, a especificidade e a integridade das hemácias A<sub>1</sub> e B após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente e após exposições diárias à temperatura ambiente com simultânea homogeneização.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES, EQUIPAMENTOS E AMOSTRAS

Os reagentes objeto de análise deste estudo foram: soros anti-A clone BIRMA-1, anti-B clone LB-2, anti-D clone MS 26 + MS 201, soro controle Rh, Hemácias A<sub>1</sub>, Hemácias B da Fresenius Kabi<sup>®</sup> (Brasil).

Para os testes de controle da qualidade foram utilizados os reagentes de soro de Coombs da Fresenius Kabi<sup>®</sup> (Brasil), hemácias controle de Coombs da Fresenius Kabi<sup>®</sup> (Brasil), solução isotônica de NaCl 0,9% da Bbraun<sup>®</sup> (Alemanha) e hemácias e plasmas provenientes de amostras de doadores de sangue anticoaguladas em EDTA estocadas em câmara de conservação em temperatura controlada de 2-8°C. As hemácias eram dos seguintes fenótipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>B, A<sub>2</sub>B, B, "O" R<sub>0</sub>r, "O" R<sub>1</sub>r, "O" R<sub>2</sub>r, "O" RhD negativo e os plasmas de tipagem A, B e AB.

Os equipamentos utilizados foram: câmaras de conservação de amostras e reagentes Fanem<sup>®</sup> (Brasil), centrifugas de amostras Eppendorf<sup>®</sup> (Alemanha), visor de aglutinação Phoenix<sup>®</sup> (Brasil), centrífuga de tubos Biorad<sup>®</sup> (Suíça), centrífugas e lavadoras de reações Diamed<sup>®</sup> (Suíça) e Thermo Scientific<sup>®</sup> (Finlândia), termobloco incubador Bioplus<sup>®</sup> (Brasil), pipetas automáticas HTL<sup>®</sup> (Polônia) e Finnpiquette<sup>®</sup> (Finlândia), homogeneizador hematológico Inbras<sup>®</sup> (Brasil), espectrofotômetro Thermo Scientific<sup>®</sup> (Finlândia), cronômetro Herweg<sup>®</sup> (Brasil) e condutivímetro Bante instruments<sup>®</sup> (China).

### 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE AMOSTRAS E REAGENTES

Foram incluídas nas análises as amostras provenientes de doadores de sangue de acordo com os fenótipos acima citados, coletadas há menos de seis dias, armazenadas de 2-8°C, sem sinais visíveis de hemólise e reagentes imuno-hematológicos cujos testes iniciais (tempo zero) de potência (intensidade de reação, título e avidéz) e de especificidade (intensidade de reação) atenderam os critérios mínimos de qualidade previstos em legislação.

### 4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DE AMOSTRAS E REAGENTES

Foram excluídas das análises as amostras que apresentaram resultado de Coombs direto ou indireto positivo que poderiam interferir nas análises.

### 4.4 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) do HEMOSC e da UFSC com número CAAE 24255019.8.0000.0121, observando as recomendações da resolução CONEP 466/12 e 510/16. Os pareceres dos respectivos comitês de ética encontram-se nos anexos A e B.

### 4.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados três vezes, em meses alternados, em parceria com o Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina – HEMOSC. Foram utilizados reagentes de um único lote para cada experimento.

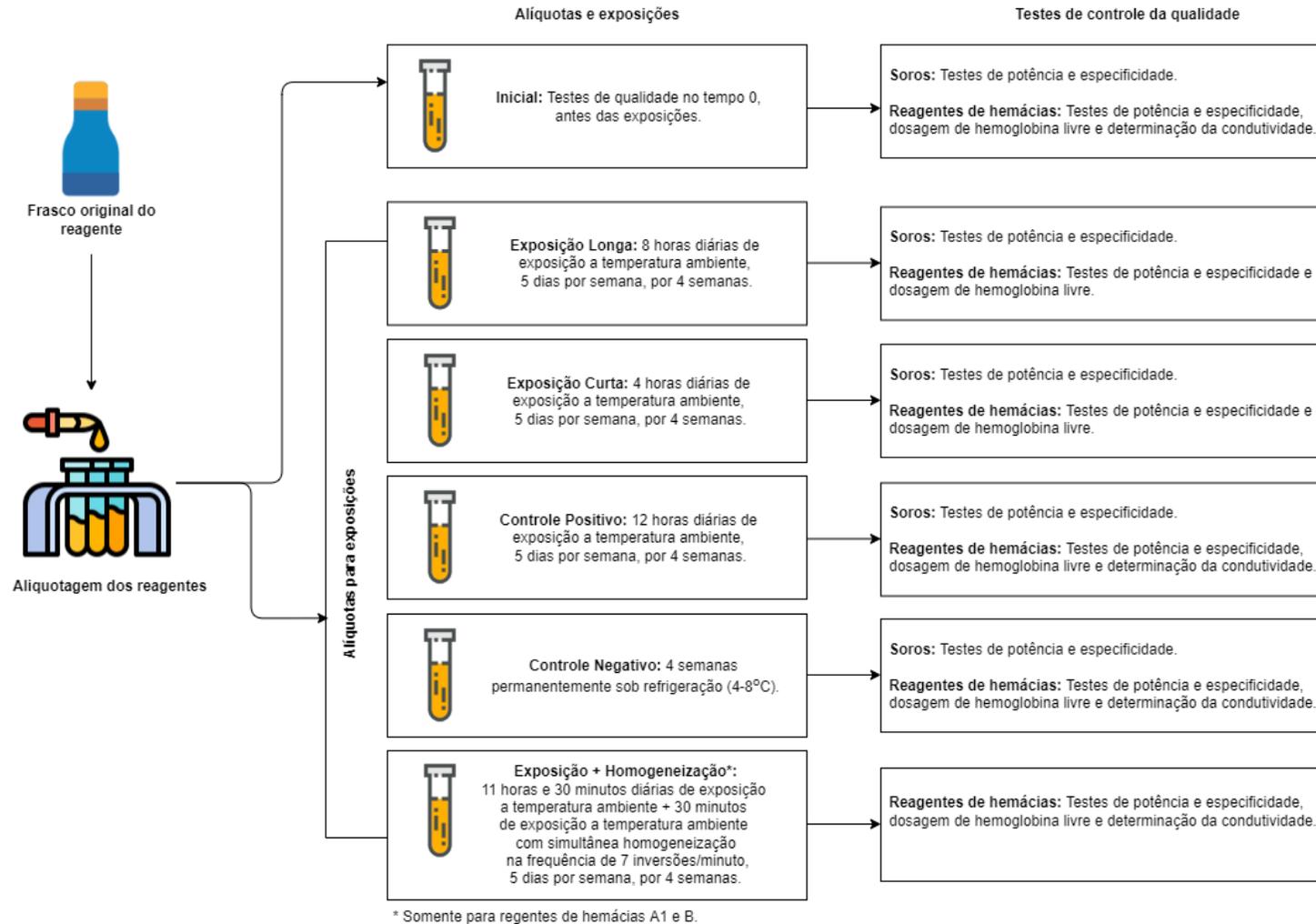
As variáveis analisadas no estudo foram temperatura e tempo de armazenamento dos reagentes e também a homogeneização dos reagentes de hemácias.

Os reagentes imuno-hematológicos, soros anti-A, anti-B, anti-D, controle RhD utilizados em testes de tipagem sanguínea de receptores de sangue pela técnica de tubo, foram aliquotados em cinco tubos de ensaio de vidro esterilizados e vedados. Os reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B foram aliquotados em seis tubos de ensaio, também de vidro esterilizados e vedados. Antes do início dos experimentos, foram realizados testes iniciais da qualidade em uma das alíquotas de cada reagente conforme apresentado na Figura 2 e Quadro 4. Todos os reagentes utilizados para os experimentos atenderam aos parâmetros de qualidade preconizados pela Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde.

Em seguida, as alíquotas foram expostas à temperatura ambiente por diferentes períodos, cinco dias por semana, durante quatro semanas. Por fim, após

os ciclos de exposição, os testes de controle da qualidade das diferentes alíquotas foram realizados novamente conforme esquema apresentado na Figura 2 e Quadro 4.

Figura 2 - Desenho experimental com diferentes exposições dos reagentes imuno-hematológicos à temperatura ambiente e testes de controle da qualidade.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os testes imuno-hematológicos de potência e de especificidade realizados nas diferentes alíquotas dos reagentes analisados e os fenótipos das amostras utilizadas são exibidos no Quadro 4.

Quadro 4 - Testes imunológicos de potência e de especificidade realizados nos reagentes analisados e fenótipo das amostras utilizadas nos testes.

Reagentes	Testes de potência			Testes de especificidade
	Intensidade de reação	Avidéz	Título	Intensidade de reação
Soro Anti-A	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "A <sub>1</sub> ", "A <sub>2</sub> ", "A <sub>1</sub> B" e "A <sub>2</sub> B"	Suspensões à 20% de hemácias de fenótipo "A <sub>1</sub> ", "A <sub>2</sub> ", "A <sub>1</sub> B" e "A <sub>2</sub> B"	Suspensões à 3% de hemácias de fenótipo "A <sub>1</sub> ", "A <sub>2</sub> ", "A <sub>1</sub> B" e "A <sub>2</sub> B"	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "O" RhD negativo "rr"
Soro Anti-B	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "B" e "A <sub>1</sub> B"	Suspensões à 20% de hemácias de fenótipo "B" e "A <sub>1</sub> B"	Suspensões à 3% de hemácias de fenótipo "B" e "A <sub>1</sub> B"	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "O" RhD negativo "rr"
Soro anti-D	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "O" R <sub>0</sub> r, "O" R <sub>1</sub> r, "O" R <sub>2</sub> r	Suspensões à 40% de hemácias de fenótipo "O" R <sub>0</sub> r, "O" R <sub>1</sub> r, "O" R <sub>2</sub> r	Suspensões à 3% de hemácias de fenótipo "O" R <sub>0</sub> r, "O" R <sub>1</sub> r, "O" R <sub>2</sub> r	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "O" RhD negativo "rr"
Soro Controle RhD	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "O" R <sub>0</sub> r, "O" R <sub>1</sub> r, "O" R <sub>2</sub> r	–	–	Suspensões à 5% de hemácias de fenótipo "O" RhD negativo "rr"
Hemácias A <sub>1</sub>	Plasmas de fenótipo "B"	–	–	Plasmas de fenótipo "AB"
Hemácias B	Plasmas de fenótipo "A"	–	–	Plasmas de fenótipo "AB"

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.6 METODOLOGIA DOS TESTES DE CONTROLE DA QUALIDADE

As amostras de sangue total utilizadas para os testes imuno-hematológicos de potência e de especificidade foram centrifugadas à 1.800 g por cinco minutos para separação das hemácias. As hemácias foram lavadas três vezes e suspensas em solução isotônica de NaCl 0,9% conforme concentração necessária para cada teste.

Os testes de avidéz, de titulação e de intensidade de reação foram realizados conforme as especificações do Ministério da Saúde e de acordo com as instruções do fabricante de reagentes (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

Resumidamente, para a determinação da avidéz lâmina de microscopia, foram adicionados 50 µL do reagente de soro avaliado e ao lado 50 µL da suspensão de hemácias. Em seguida, o reagente foi misturado com as hemácias, formando um halo de cerca de 2,5 cm. A avidéz do reagente corresponde ao intervalo de tempo entre a mistura e o início macroscópico da aglutinação, medido em segundos com auxílio de cronômetro.

No teste de titulação, o reagente de soro avaliado foi diluído sucessivamente em tubos de vidro, iniciando na proporção de 1/2 até 1/4096, com volumes de 100 µL do soro e 100 µL de solução isotônica de NaCl 0,9%, a qual foi utilizada com diluente. A seguir, foi adicionado 100 µL de suspensão de hemácias em cada tubo da titulação. Os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 15 segundos a 1.000 g para, então, proceder a leitura e interpretação das intensidades de reação e determinação do título (leitura imediata). O título corresponde à última diluição de cada soro onde houve aglutinação de 1+. Além disso, as titulações do soro anti-D foram, conforme especificações do fabricante, também incubadas por 15 minutos a 37°C. Em seguida, foram lavadas três vezes com solução isotônica de NaCl 0,9%. A cada tubo foi acrescentado 100 µL de soro antiglobulina humana. Os tubos foram homogeneizados e, então, centrifugados por 15 segundos a 1.000g para proceder a leitura e interpretação das intensidades de reação e determinação do título (fase de antiglobulina).

No teste de intensidade de reação, os reagentes foram testados com hemácias/plasmas que expressam o respectivo antígeno/anticorpo para avaliação da potência e, para a análise da especificidade, os reagentes foram testados com

hemácias/plasmas que não expressam o respectivo antígeno/anticorpo, conforme descrito no Quadro 4. Neste teste, em um tubo de vidro, foram adicionados 50 µL do soro testado e 50 µL da suspensão de hemácias. No caso dos reagentes de hemácias, foram utilizados para a reação 50 µL do reagente e 100 µL de plasma. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e centrifugados por 15 segundos a 1.000 g para, então, proceder a leitura e interpretação das intensidades de reação (leitura imediata). O soro anti-D e seu respectivo soro controle foram avaliados tanto na leitura imediata quanto na fase de antiglobulina, seguindo o mesmo protocolo de incubação e lavagem das reações descrito no teste de titulação. As reações negativas na fase de antiglobulina foram validadas com o uso de hemácia controle de Coombs. A leitura das intensidades de reação seguiu os padrões de Judd e colaboradores (2008). As reações são expressas de forma semi-quantitativa, de zero a quatro cruces (0 a 4+), de acordo com o grau de aglutinação das hemácias: 4+ (reação completa), 3+ (reação forte), 2+ (reação moderada), 1+ (reação fraca), w (vestígio de reação), 0 (reação negativa), CM (campo misto - mistura de hemácias aglutinadas e não aglutinadas), HE (hemólise). A leitura e interpretação das intensidades foram realizadas por dois profissionais simultaneamente, de forma cega e independente. Caso houvesse divergência entre os profissionais quanto à intensidade da reação, um terceiro profissional atuou de forma decisiva. Os profissionais participantes que realizaram as leituras das reações têm mais de sete anos de experiência em imuno-hematologia.

Para a dosagem de hemoglobina livre no sobrenadante dos reagentes de hemácias, as alíquotas dos reagentes de hemácias foram centrifugadas por 10 minutos a 2500 g. A determinação de hemoglobina livre foi realizada através do método de Harboe. Trata-se de um método para a determinação de pequenas quantidades de hemoglobina livre por espectrofotometria direta, através da leitura da absorvância da amostra em três comprimentos de onda (380, 415 e 450 nm) (HARBOE, 1959).

A determinação da condutividade dos reagentes de hemácias foi realizada em condutivímetro de bancada calibrado com solução de KCl de 1413 uS/cm (microSiemens por centímetro). A condutividade é a corrente elétrica em uma solução, sendo que esse valor depende da força iônica do líquido. O condutivímetro é constituído por dois eletrodos polarizados dentro de uma sonda. Ao entrar em

contato com o líquido, o equipamento aplica uma tensão entre os dois eletrodos. Quanto maior a condutividade do líquido mais voltagem é lida pelo condutímetro que é convertida em uS/cm.

#### 4.7 ESPECIFICAÇÕES DA QUALIDADE PARA OS REAGENTES DE TIPAGEM SANGUÍNEA ABO E RhD

A Tabela 1 apresenta o desempenho mínimo nos resultados dos testes de potência (intensidade de reação, avides e título) para avaliação de cada lote/remessa de soros anti-A, anti-B e anti-D recebidos pelo serviço de hemoterapia, conforme Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde.

Tabela 1 - Desempenho mínimo nos resultados dos testes de potência para avaliação de cada lote/remessa de soros anti-A, anti-B e anti-D recebidos pelo serviço de hemoterapia.

Antissoro	Fenótipo das amostras de Hemácias	Intensidade mínima de reação*	Tempo de Avides**	Título mínimo
Anti-A	A <sub>1</sub>	3+	Até 15"	256
	A <sub>2</sub>	2+	Até 30"	128
	A <sub>1</sub> B	3+	Até 30"	128
	A <sub>2</sub> B	2+	Até 45"	64
Anti-B	B	3+	Até 15"	256
	A <sub>1</sub> B	3+	Até 15"	256
Anti-D	"O" R <sub>0</sub> r (Dccee)	3+	Até 30"	32
	"O" R <sub>1</sub> r (DCcee)	3+	Até 30"	32
	"O" R <sub>2</sub> r (DccEe)	3+	Até 30"	32

\* Em escala de zero a quatro cruces (0 a 4+).

\*\* Em segundos.

Fonte: Adaptado de Brasil (2017).

A Tabela 2 apresenta o desempenho mínimo nos resultados dos testes de potência (intensidade de reação) para avaliação de cada lote/remessa de reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B recebidos pelo serviço de hemoterapia, conforme Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde.

Tabela 2 - Desempenho mínimo nos resultados dos testes de potência para avaliação de cada lote/remessa de reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B recebidos pelo serviço de hemoterapia.

Reagente de Hemácias	Tipagem dos Plasmas	Intensidade mínima de aglutinação*
Hemácia A <sub>1</sub>	B	2+
Hemácia B	A	2+

\* Em escala de zero a quatro cruces (0 a 4+).

Fonte: Adaptado de Brasil (2017).

Para a avaliação da especificidade, os soros anti-A e anti-B são testados com hemácias de tipagem "O", o soro anti-D com hemácias "O" RhD negativo e as hemácias A<sub>1</sub> e B com plasma de tipagem AB. Não deve ocorrer aglutinação visto que não há antígenos/anticorpos correspondentes para promovê-la (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

#### 4.8 ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA DE LEITURA DAS REAÇÕES IMUNO-HEMATOLÓGICAS ENTRE OS PROFISSIONAIS

A concordância entre as duplas de profissionais na leitura dos testes foi determinada previamente por meio do teste estatístico Kappa de Cohen, o qual considera a proporção entre a concordância observada e a estimativa de concordância esperada pelo acaso (BRASIL, 2012).

Três profissionais participaram da análise de concordância da leitura de 54 diferentes reações imuno-hematológicas na técnica de tubo (apêndices A, B e C). Entre as reações estavam: soro de Coombs titulado + hemácia controle de Coombs, soro anti-D titulado + hemácia RhD positiva, soro anti-B titulado + hemácia B, soro anti-AB titulado + hemácia A. Um dos profissionais realizou a homogeneização da reação enquanto, simultaneamente, de forma cega e independente, os três profissionais analisaram a intensidade da reação. O valor de Kappa de Cohen (0-1) foi calculado para cada dupla de profissionais, considerando as rotinas imuno-hematológicas com leitura e segunda leitura.

Uma vez que o resultado de Kappa entre 0,80 e 1,0 indica uma concordância quase perfeita entre os leitores (LANDIS; KOCH, 1977), determinou-se como

aceitável uma concordância mínima de 0,8 na escala Kappa (0-1) entre os pesquisadores.

O valor de Kappa de Cohen para cada dupla de profissionais foi de 0,97 entre os profissionais um e dois, de 0,95 entre os profissionais um e três e de 0,97 entre os profissionais dois e três.

#### 4.9 TEMPERATURA DA CÂMARA DE CONSERVAÇÃO E AMBIENTE DE EXPOSIÇÃO

As temperaturas da câmara de conservação e do ambiente de exposição foram controladas através de software de monitoramento eletrônico de temperatura Endrixx<sup>®</sup>, v 4.8.3.2, da Sensorweb<sup>®</sup> (Brasil).

Durante os três experimentos, desde a alíquotagem até a finalização dos testes na quarta semana, foram realizados 25.940 registros de temperatura da câmara de conservação. A temperatura mínima registrada foi 3,4°C e a máxima foi de 5,6°C, apresentando uma temperatura média de 3,8°C.

Durante a realização dos testes de controle da qualidade dos reagentes, a temperatura ambiente do laboratório foi controlada e mantida entre 20-24°C. Durante a exposição das alíquotas, a temperatura mínima do ambiente foi de 20,2°C e a máxima de 23,5°C. A temperatura média do ambiente foi 21,7°C após 8.339 registros de temperatura.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados no software GraphPad Prism 8<sup>®</sup> (Califórnia). Os resultados dos testes de intensidade de reação dos soros e reagentes de hemácias avaliados e de titulação dos soros foram expressos de forma semi-quantitativa de zero a quatro cruces (0 a 4+) e título, respectivamente.

Os resultados dos testes de titulação, em função do grande número de categorias se tratados como variáveis qualitativas ordinais, foram tratados como variáveis quantitativas discretas e apresentados como valores individuais de cada

experimento. Desta forma, estes dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, para comparar as medianas.

Os resultados quantitativos dos testes de avidéz, dosagem de hemoglobina e condutividade foram avaliados quanto à distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ou mediana e valores máximo e mínimo para distribuições normais ou não, respectivamente.

Para resultados paramétricos, foi realizada a análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparar as médias. Para resultados com distribuição não-paramétrica foi realizada a análise de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparar as medianas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 INTENSIDADE DE REAÇÃO E ESPECIFICIDADE DOS SOROS ANTI-A, ANTI-B, ANTI-D E CONTROLE RhD

Para os soros anti-A e anti-B, a intensidade de reação para a avaliação da potência observada após as quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos foi de 4+ com as hemácias de diferentes fenótipos. Mesmo quando os reagentes foram testados com hemácias que expressam mais fracamente os antígenos, como as hemácias A<sub>2</sub> e A<sub>2</sub>B, as reações de intensidade de 4+ foram observadas em todas as condições de exposição, nos três experimentos.

Da mesma forma, a intensidade de reação de 4+ foi verificada após as quatro semanas de exposição do soro anti-D à temperatura ambiente por diferentes períodos, quando testado com hemácias RhD positivas, tanto nos testes em temperatura ambiente quanto em fase de antiglobulina nos três experimentos.

O soro controle negativo para a fenotipagem RhD foi testado com as hemácias R<sub>0</sub>r, R<sub>1</sub>r, R<sub>2</sub>r e rr e foram obtidas reações negativas, conforme esperado para este reagente.

Na Tabela 3, é possível observar as intensidades de reação dos reagentes após a exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos e a intensidade preconizada pela legislação.

Tabela 3 – Intensidade de reação dos soros com as hemácias de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.

Reagente	Fenótipo das amostras de hemácias	Após quatro semanas exposição				Intensidade exigida pela legislação*
		Controle Positivo	Exposição Longa	Exposição Curta	Controle Negativo	
Anti-A	A <sub>1</sub>	4+	4+	4+	4+	3+
	A <sub>2</sub>	4+	4+	4+	4+	2+
	A <sub>1</sub> B	4+	4+	4+	4+	3+
	A <sub>2</sub> B	4+	4+	4+	4+	2+
	O	0	0	0	0	0
Anti-B	B	4+	4+	4+	4+	3+
	A <sub>1</sub> B	4+	4+	4+	4+	3+
	O	0	0	0	0	0
Anti-D	O R <sub>0</sub> r	4+	4+	4+	4+	3+
	O R <sub>1</sub> r	4+	4+	4+	4+	3+
	O R <sub>2</sub> r	4+	4+	4+	4+	3+
	O rr	0	0	0	0	0
Controle RhD	O R <sub>0</sub> r	0	0	0	0	0
	O R <sub>1</sub> r	0	0	0	0	0
	O R <sub>2</sub> r	0	0	0	0	0
	O rr	0	0	0	0	0

Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.\* Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde.

Nota: Resultados individuais foram iguais nos três experimentos.

Fonte: Elaborado pela autora.

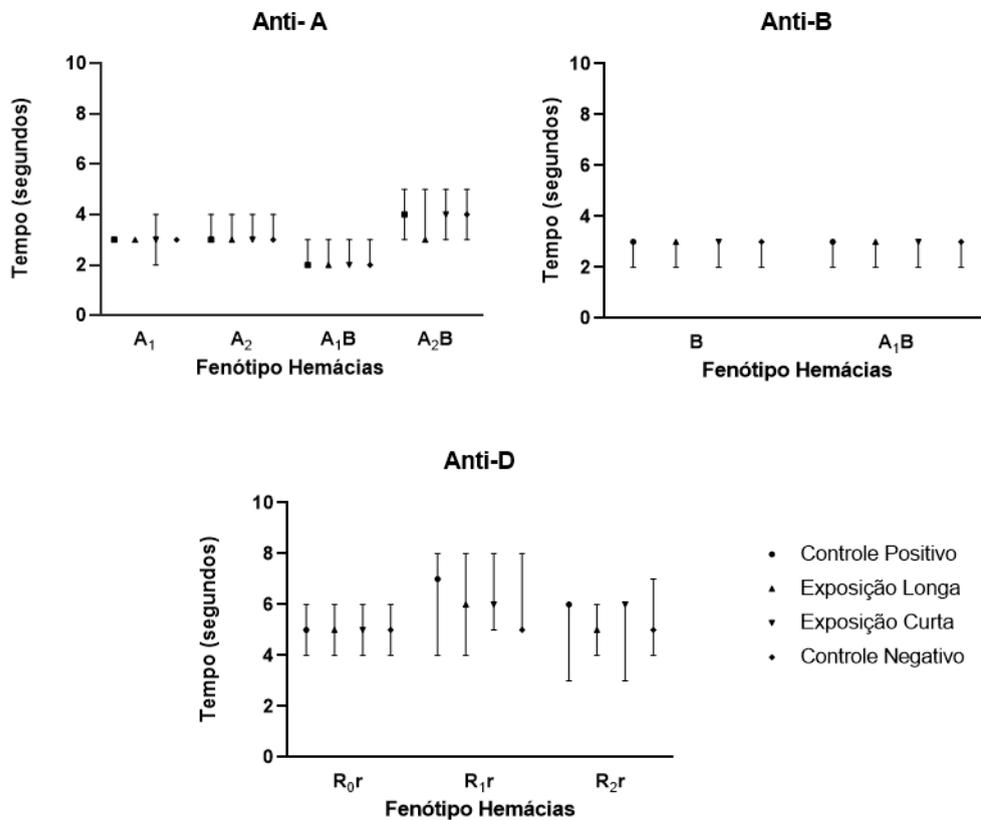
A especificidade dos reagentes anti-A, anti-B, anti-D e controle do RhD foi determinada por meio da intensidade de reação destes com hemácias de fenótipo “O” rr. Foram observadas reações negativas em todos os reagentes após exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos, demonstrando que esta variável não causou interferência que possa levar a perda da especificidade e resultados falso-positivos.

## 5.2 AVIDEZ DOS SOROS ANTI-A, ANTI-B E ANTI-D

Segundo a Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde, a avidéz dos testes com soro anti-A deve ser de até 15 segundos quando testado com hemácias  $A_1$ , até 30 segundos quando testado com hemácias  $A_2$  e  $A_1B$  e até 45 segundos quando testado com hemácias  $A_2B$ . Para o soro anti-B, é de até 15 segundos com hemácias B e  $A_1B$ . Para o soro anti-D, até 30 segundos quando testado com as hemácias dos fenótipos  $R_0r$ ,  $R_1r$  e  $R_2r$ .

Na Figura 3, é possível observar os resultados de avidéz dos reagentes de soros após serem expostos em diferentes condições quando testados com as hemácias de cada fenótipo. Os resultados apresentados são a mediana e valores máximo e mínimo de tempo dos três experimentos realizados.

Figura 3 - Aidez dos soro com as hemácias de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

Notas: Resultados apresentados como mediana e valores máximos e mínimos.  
Fonte: Elaborado pela autora.

A mediana dos tempos de aidez do soro anti-A, quando testado com hemácias A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, foi de três segundos para todas as alíquotas e, com hemácias de fenótipo A<sub>1</sub>B, foi de dois segundos, não havendo diferença entre as alíquotas. No teste com as hemácias A<sub>2</sub>B, a alíquota de exposição longa apresentou mediana de três segundos, enquanto nas demais alíquotas a mediana foi de quatro segundos.

No teste de aidez do soro anti-B, a mediana foi de três segundos para todas as alíquotas do reagente, tanto quando testado com hemácias de fenótipo B quanto hemácias de fenótipo A<sub>1</sub>B.

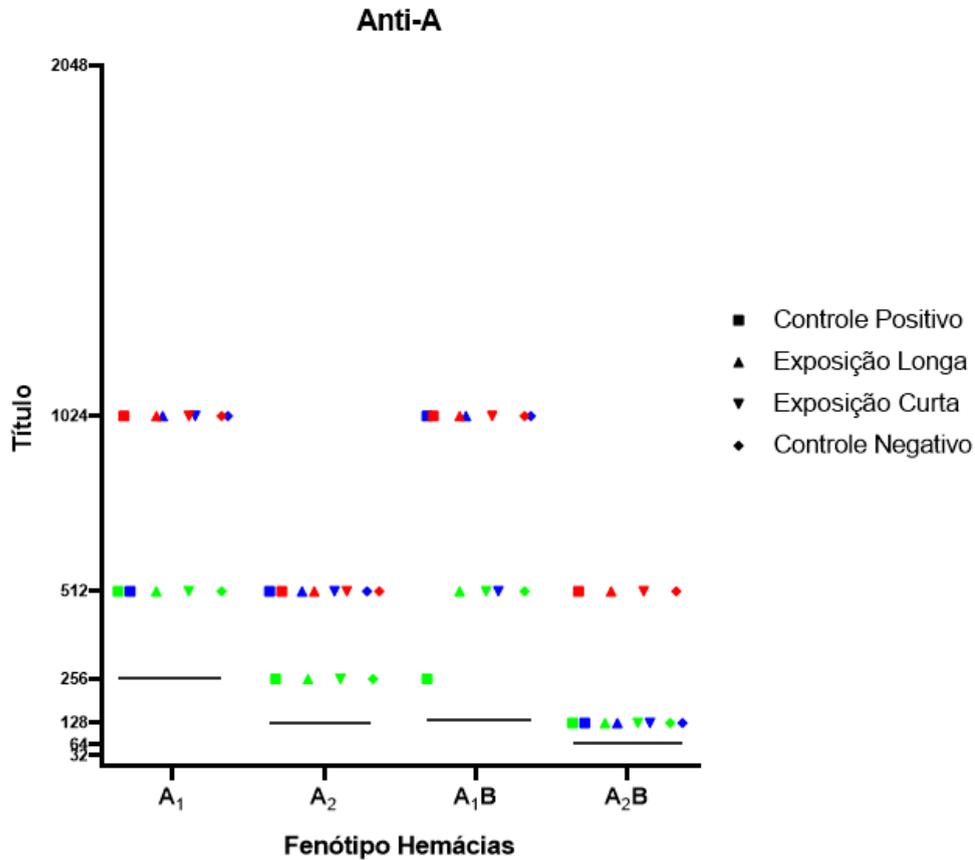
O soro Anti-D, quando testado com hemácias de fenótipo  $R_0r$ , apresentou mediana de cinco segundos em todas as alíquotas. Quando testado com hemácias de fenótipo  $R_1r$ , a alíquota controle positivo apresentou mediana de sete segundos, as alíquotas exposição longa e curta, de seis segundos e o controle negativo de cinco segundos. No teste com hemácias de fenótipo  $R_2r$ , as alíquotas controle positivo e exposição curta apresentaram medianas de seis segundos e as exposição longa e controle negativo, de cinco segundos.

Todos os reagentes de soros atenderam os requisitos de legislação, permanecendo, mesmo após os diferentes períodos de exposição, com a avidéz adequada para uso nos testes imuno-hematológicos, que deve ser entre 15-45 segundos para o soro anti-A, de até 15 segundos para o soro anti-B e até 30 segundos para o soro anti-D. O teste estatístico de Kruskal-Wallis não demonstrou diferença significativa entre as diferentes alíquotas em nenhum dos soros avaliados.

### 5.3 TÍTULO DOS SOROS ANTI-A, ANTI-B E ANTI-D

A Figura 4 apresenta os resultados de título dos três experimentos do soro anti-A em reação com hemácias de diferentes fenótipos após as quatro semanas de exposição à temperatura ambiente.

Figura 4 - Título do soro anti-A em reação com hemácias de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

Notas: Resultados individuais do primeiro experimento estão representados em azul, do segundo experimento em vermelho e do terceiro em verde. As linhas contínuas representam os títulos mínimos preconizados pela Portaria de Consolidação nº 5 para o soro avaliado frente ao respectivo fenótipo de hemácias.

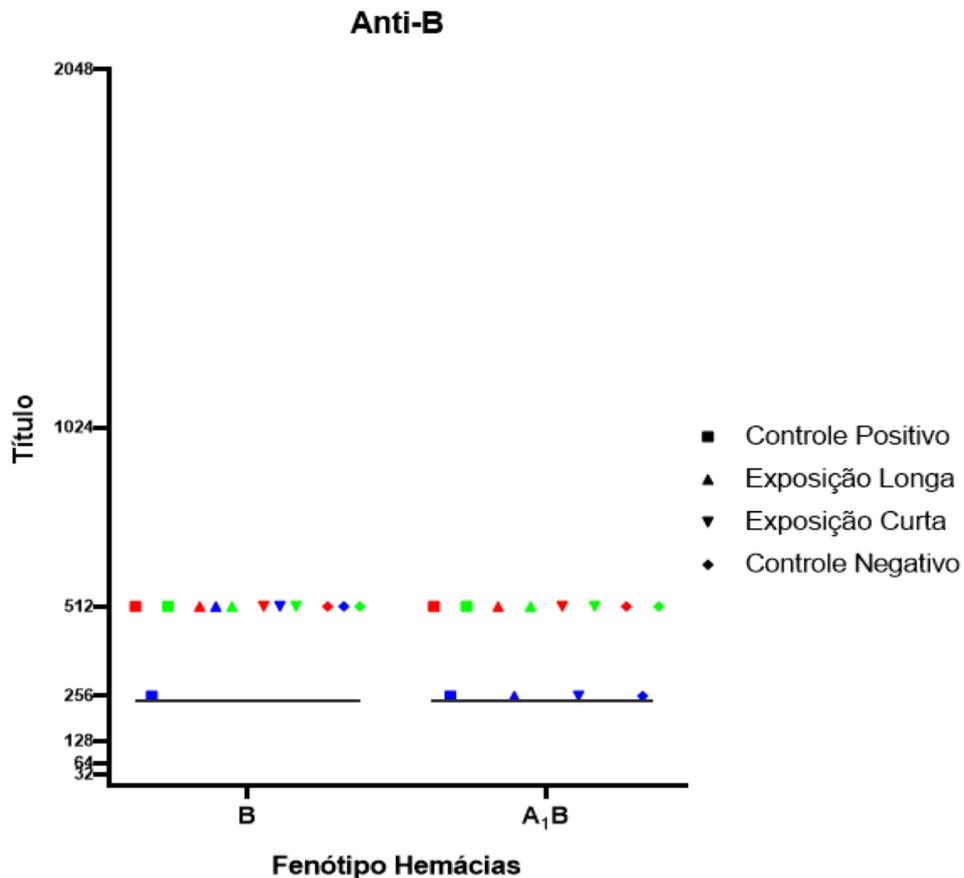
Fonte: Elaborado pela autora.

Os menores títulos foram observados quando o reagente foi testado com hemácias de fenótipo A<sub>2</sub> e A<sub>2</sub>B, as quais apresentam menor número de sítios antigênicos. Não foi observada variação de título entre as diferentes condições de exposição deste reagente quando testado com esses fenótipos de hemácias nos três experimentos realizados.

Variações de título foram observadas nos testes com hemácias  $A_1$  e  $A_1B$ . No primeiro experimento, a alíquota controle positivo apresentou queda de um título em comparação com as demais alíquotas quando testado com hemácias  $A_1$ , assim como ocorreu no terceiro experimento no teste com hemácias  $A_1B$ . No primeiro experimento, também foi observada a queda de um título da alíquota de exposição curta em comparação com as demais alíquotas no teste com hemácias  $A_1B$ .

A Figura 5 apresenta os resultados de título do soro anti-B em reação com as hemácias B e  $A_1B$  após as quatro semanas de exposição em três experimentos.

Figura 5 - Título do soro anti-B em reação com hemácias de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

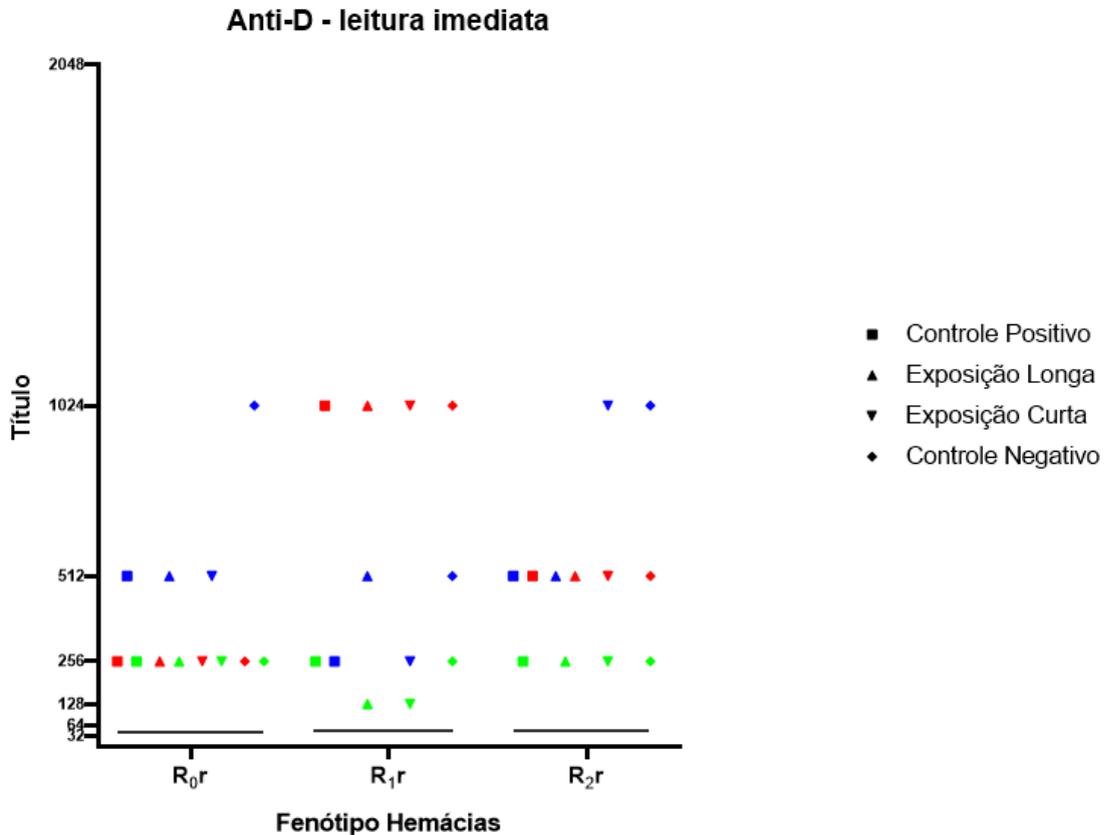
Notas: Resultados individuais do primeiro experimento estão representados em azul, do segundo experimento em vermelho e do terceiro em verde. As linhas contínuas representam os títulos mínimos preconizados pela Portaria de Consolidação nº 5 para o soro avaliado frente ao respectivo fenótipo de hemácias.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os títulos do soro anti-B variaram entre 256 e 512. No teste com hemácias A<sub>1</sub>B, não foi observada nenhuma variação de título entre as diferentes condições de exposição deste reagente. Apenas em um dos experimentos a alíquota controle positivo apresentou queda de um título em comparação com as demais alíquotas no teste com hemácias de fenótipo B.

Os resultados de título do soro anti-D, em leitura imediata, em reação com hemácias de diferentes fenótipos após exposição às diferentes condições, em três experimentos, são apresentados na Figura 6. Em relação aos demais reagentes avaliados, este foi o que apresentou maior variação entre os diferentes períodos de exposição à temperatura ambiente.

Figura 6 - Título do soro anti-D, em leitura imediata, em reação com hemácias de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

Notas: Resultados individuais do primeiro experimento estão representados em azul, do segundo experimento em vermelho e do terceiro em verde. As linhas contínuas representam os títulos mínimos preconizados pela Portaria de Consolidação nº 5 para o soro avaliado frente ao respectivo fenótipo de hemácias.

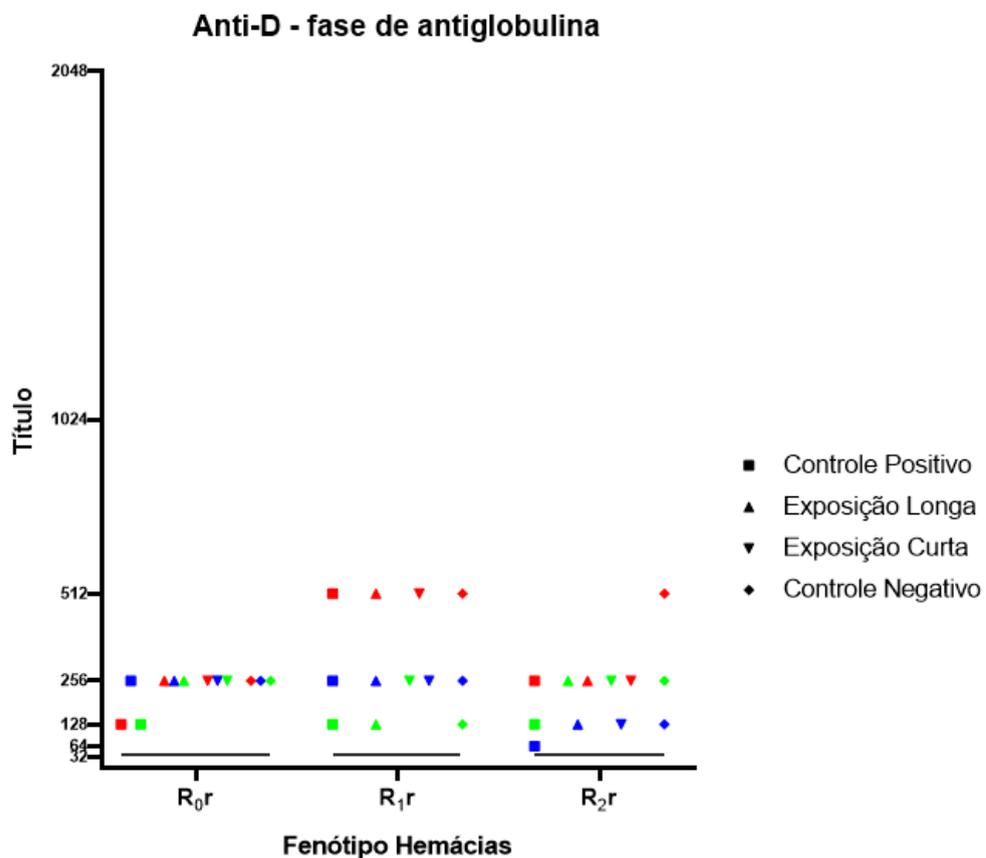
Fonte: Elaborado pela autora.

No primeiro experimento, a alíquota controle negativo apresentou acréscimo de um título comparado com as demais alíquotas quando testado com hemácias R<sub>0</sub>r e as alíquotas controle negativo e exposição curta também aumentaram um título em comparação com as demais no teste com hemácias R<sub>2</sub>r.

No teste com hemácias R<sub>1</sub>r, no primeiro experimento, o título das alíquotas variou entre 256 e 512, conforme é possível observar na Figura 6. No terceiro experimento, as alíquotas controle positivo e negativo apresentaram aumento de um título em relação às demais.

Os valores de título do soro anti-D dos três experimentos, em fase de antiglobulina, em reação com hemácias de diferentes fenótipos após as exposições à temperatura ambiente estão apresentados na Figura 7. Neste teste, de forma geral, os resultados de título foram iguais ou inferiores aqueles em temperatura ambiente, oscilando entre 64 e 512, não sendo observada diferença maior que um título entre as alíquotas para os testes com cada fenótipo.

Figura 7 - Título do soro anti-D, em fase de antiglobulina, em reação com hemácias de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

Notas: Resultados individuais do primeiro experimento estão representados em azul, do segundo experimento em vermelho e do terceiro em verde. As linhas contínuas representam os títulos mínimos preconizados pela Portaria de Consolidação nº 5 para o soro avaliado frente ao respectivo fenótipo de hemácias.

Fonte: Elaborado pela autora.

No entanto, nenhuma variação superior a um título foi detectada nos antissoros testados. Em todas as condições de exposição, todos os reagentes atenderam aos títulos mínimos preconizados na Portaria de Consolidação nº 5, os quais são de 64 a 256 para o soro anti-A, a depender do fenótipo da hemácia utilizada; de 256 para o soro anti-B e de 32 para o soro anti-D. No teste estatístico Kruskal-Wallis, não foi observada diferença significativa entre os títulos das alíquotas dos reagentes expostas à temperatura ambiente por diferentes períodos.

#### 5.4 POTÊNCIA E ESPECIFICIDADE DOS REAGENTES DE HEMÁCIAS A<sub>1</sub> E B

A potência e a especificidade dos reagentes de hemácias foram determinadas através da intensidade de reação com plasmas que expressam e que não expressam os respectivos anticorpos.

A intensidade de reação dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B em reação com plasmas B e A, respectivamente, determina a potência dos reagentes. As intensidades obtidas foram de 4+ após exposição destes reagentes à temperatura ambiente por diferentes períodos e condições, atendendo ao critério de legislação. A Tabela 4 apresenta as intensidades de reação observadas nos testes de potência e especificidade dos reagentes de hemácias e o critério de legislação para estes reagentes.

Para a especificidade, os reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B foram testados com plasmas de tipagem “AB”. Foram observadas reações negativas para todas as condições de exposição, mostrando que a exposição à temperatura ambiente e/ou homogeneização não influenciou a especificidade destes reagentes.

Tabela 4 – Intensidade de reação dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B com plasmas de diferentes fenótipos após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos e condições.

Reagente	Plasma	Após quatro semanas exposição					Intensidade exigida pela legislação*
		Exp.+ Homog	Controle Positivo	Exposição Longa	Exposição Curta	Controle Negativo	
Hemácia A <sub>1</sub>	B	4+	4+	4+	4+	4+	2+
Hemácia A <sub>1</sub>	AB	0	0	0	0	0	0
Hemácia B	A	4+	4+	4+	4+	4+	2+
Hemácia B	AB	0	0	0	0	0	0

Exp. + Homog: 11,5 horas de exposição à temperatura ambiente + 30 minutos de exposição à temperatura ambiente com simultânea homogeneização por dia, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.\* Portaria de Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde.

Nota: Resultados individuais foram iguais nos três experimentos.

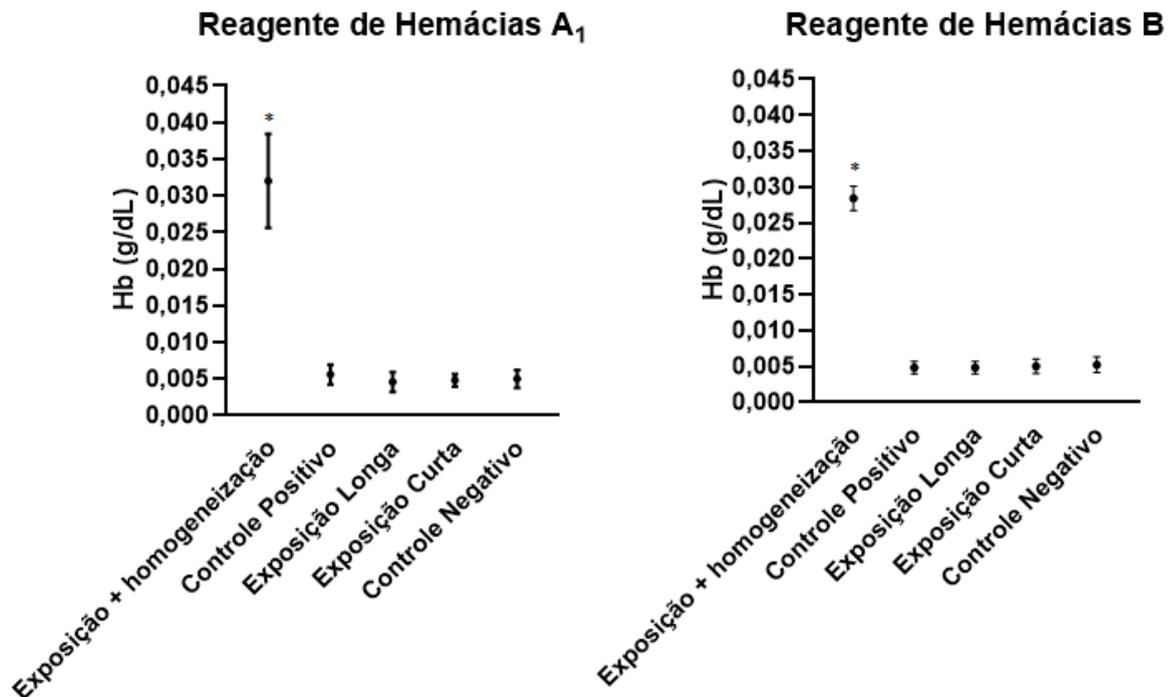
Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.5 HEMOGLOBINA LIVRE NOS REAGENTES DE HEMÁCIAS A<sub>1</sub> E B

A concentração média de hemoglobina livre das alíquotas dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B que sofreram exposição à temperatura ambiente com simultânea homogeneização foi de 0,0320 e 0,0284 g/dL, respectivamente. Nesta condição de exposição, foi possível observar no reagente de hemácias uma quantidade superior de hemoglobina livre quando comparado com as condições de exposição curta e longa e controles positivo e negativo ( $p < 0,05$ ). As outras alíquotas dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B apresentaram concentrações médias de hemoglobina livre entre 0,0046 e 0,0056 g/dL e, entre 0,0048 e 0,0052 g/dL nas diferentes exposições, respectivamente.

A concentração média e o desvio padrão de hemoglobina livre de cada uma das alíquotas dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B após as quatro semanas de exposição podem ser visualizadas na Figura 8.

Figura 8 - Concentração de hemoglobina livre no sobrenadante dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B, antes e após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Exposição + homogeneização: 11,5 horas de exposição à temperatura ambiente + 30 minutos de exposição à temperatura ambiente com simultânea homogeneização por dia, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração; \*  $p < 0,05$  para comparação entre as alíquotas dos reagentes.

Notas: Resultados apresentados como média +/- desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

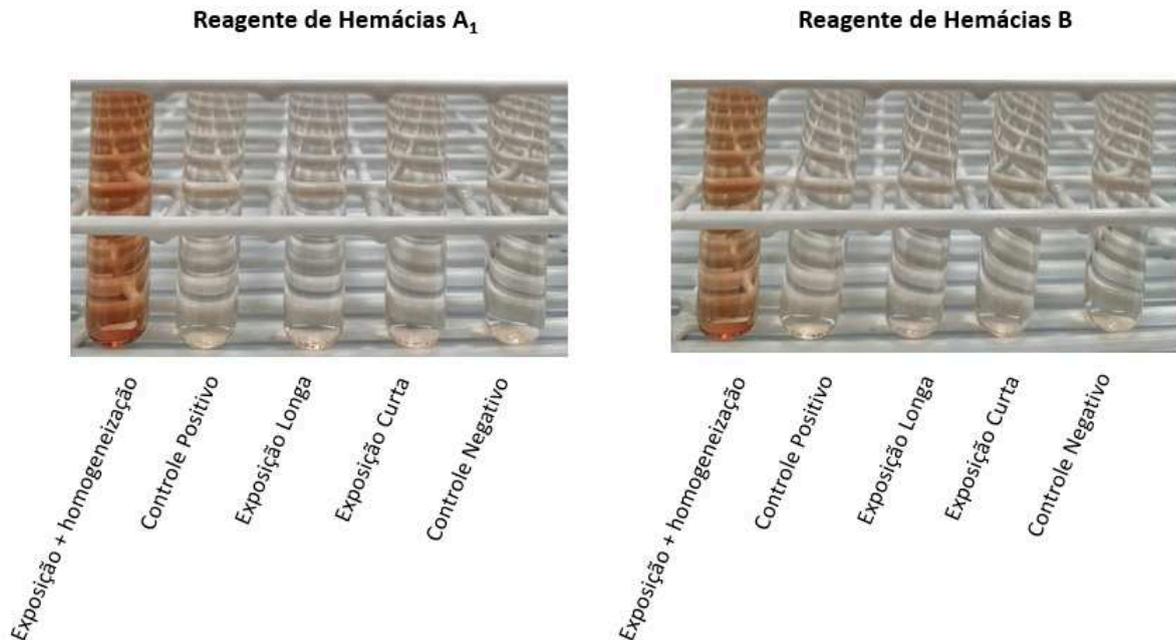
As Figuras 9 e 10 ilustram o aspecto do sobrenadante dos reagentes de hemácias antes e após o período de quatro semanas de exposição à temperatura ambiente, respectivamente.

Figura 9 - Sobrenadante dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B antes da exposição à temperatura ambiente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10 - Sobrenadante dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B e após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Exposição + homogeneização: 11,5 horas de exposição à temperatura ambiente + 30 minutos de exposição à temperatura ambiente com simultânea homogeneização por dia, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: oito horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: quatro horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

Fonte: Elaborado pela autora.

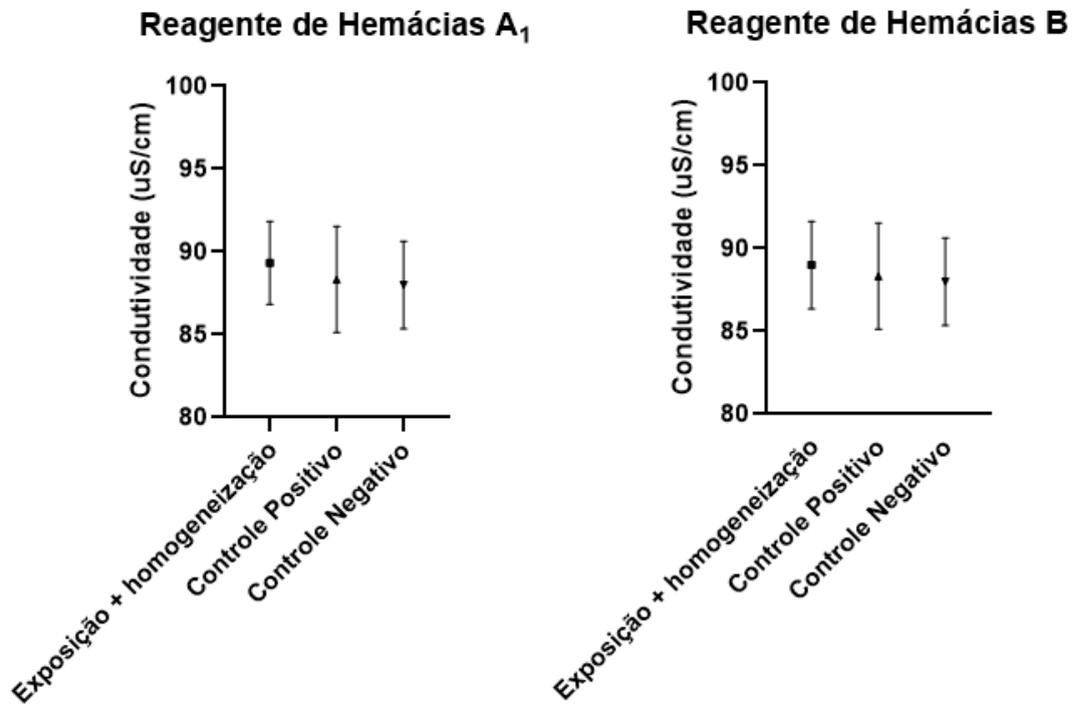
Visualmente é possível observar nos sobrenadantes das alíquotas “Exposição + homogeneização”, dos reagentes de hemácias  $A_1$  e B, a hemólise pronunciada em comparação com as demais alíquotas. Essa observação é concordante com a dosagem de hemoglobina livre nestes reagentes, os quais apresentaram resultados médios estatisticamente superiores aos demais reagentes.

## 5.6 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS REAGENTES DE HEMÁCIAS $A_1$ E B

A condutividade elétrica média e o desvio padrão das alíquotas “exposição + homogeneização”, “controle positivo” e “controle negativo” dos reagentes de hemácias  $A_1$  e B, após as quatro semanas de exposição às diferentes condições, podem ser observados na Figura 11.

A condutividade média das alíquotas dos reagentes de hemácias  $A_1$  e B variou entre 88 e 89,33  $\mu\text{S}/\text{cm}$  e, entre 88 e 89  $\mu\text{S}/\text{cm}$  nas diferentes exposições, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre as alíquotas.

Figura 11 - Condutividade dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B antes e após quatro semanas de exposição à temperatura ambiente por diferentes períodos.



Exposição + homogeneização: 11,5 horas de exposição à temperatura ambiente + 30 minutos de exposição à temperatura ambiente com simultânea homogeneização por dia, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle positivo: 12 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Longa: 8 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Exposição Curta: 4 horas por dia de exposição à temperatura ambiente, cinco dias/semana/quatro semanas; Controle Negativo: quatro semanas permanentemente sob refrigeração.

Nota: Resultados apresentados como média +/- desvio padrão.

Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

A análise laboratorial do fenótipo ABO/RhD se mostra harmonizada internacionalmente, com a utilização de reagentes que detectam a presença ou ausência dos antígenos/anticorpos através de reações sorológicas de hemaglutinação por diferentes métodos. Embora a técnica em gel tenha ganhado espaço em função da possibilidade de automação e da facilidade de execução, a tipagem em tubo, que representa um avanço em termos de sensibilidade em relação a metodologia de lâmina, ainda é prevalente em serviços hemoterápicos e laboratórios clínicos (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003; MUJAHID; DICKERT, 2015; QURASHY; SAPATNEKAR, 2016; MENY, 2017), o que reforça a importância do estudo realizado.

Além do aperfeiçoamento das metodologias, a substituição dos reagentes policlonais por monoclonais nos testes imuno-hematológicos proporcionam testes mais potentes e específicos, livres de contaminantes e em quantidade adequada para suprir a demanda dos serviços transfusionais (VOAK, 1990).

Paralelamente, as normativas nacionais e internacionais para fabricantes de reagentes garantem um padrão mínimo de qualidade aos reagentes imuno-hematológicos disponíveis aos serviços de hemoterapia. Tais fatos, contribuem para a qualidade e segurança transfusional e, possivelmente, são determinantes para os resultados de estabilidade encontrados neste estudo.

Contudo, a realização de controle da qualidade nas rotinas hemoterápicas é imprescindível para a segurança transfusional. Tanto no Brasil como nos países Europeus, Britânicos, Australianos e Neozelandeses, os controles interno e externo da qualidade são preconizados aos serviços de hemoterapia. De forma complementar, as normativas preconizam, em vários países, a avaliação dos reagentes antes do uso, sendo no Brasil especificada para cada lote/remessa recebida (BRASIL, 2017).

Considerando as condições às quais os reagentes imuno-hematológicos são expostos durante o uso, o protocolo experimental deste estudo foi desenhado de modo a simular a utilização na rotina. Este modo parece mais adequado que os modelos de teste de estabilidade em condições aceleradas, tendo em vista que as

normas não especificam um tempo máximo para permanência dos reagentes fora da temperatura indicada para armazenamento. Adicionalmente, os reagentes foram avaliados através dos testes de potência (intensidade de reação, título e avidéz) e especificidade, os quais são preconizados no Brasil para a avaliação de cada lote/remessa de reagentes recebidos (BRASIL, 2017) e internacionalmente por diferentes sociedades científicas para avaliação dos reagentes antes do uso. O propósito foi realizar, após as diferentes condições de exposição, uma avaliação complementar a avaliação qualitativa de reprodutibilidade, comumente realizada durante o uso com o emprego de controles positivos e negativos.

Com relação aos antissoros avaliados, não foi evidenciada alteração nos testes de intensidade de reação e especificidade. Embora algumas variações de título e de avidéz tenham sido observadas, não houve diferença significativa entre as diferentes condições de exposição, indicando estabilidade dos antissoros testados em termos de potência e especificidade. Esse resultado também vai ao encontro ao relatado por Fink *et al.* (2020), que demonstraram a estabilidade funcional dos anticorpos utilizados em testes imunoenzimáticos e de cultura de células através da avaliação do desempenho nos testes de ELISA e cultura celular. Zheng *et al.* (2017) demonstraram que, para afetar as forças de interação proteína-proteína, os anticorpos monoclonais terapêuticos foram mais suscetíveis a alterações de pH do que a alterações de temperatura.

Com relação aos reagentes de hemácias, Sutter *et al.* (2017) relataram que os antígenos do sistema ABO são estáveis por pelo menos 77 dias em amostras anticoaguladas, quando armazenadas sob refrigeração. Esse dado corrobora a estabilidade que também foi observada nos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B quando expostos à temperatura ambiente por até 12 horas diárias, cinco dias por semana, durante quatro semanas, mantendo-se a potência e especificidade.

Diferentemente dos antissoros, os reagentes de hemácias devem ser sempre homogeneizados antes do uso, a fim de ressuspender as hemácias que se depositam durante o armazenamento e assegurar a quantidade adequada para o uso. Para os experimentos, uma alíquota destes reagentes foi submetida a 210 inversões completas por dia, cinco dias por semana, por quatro semanas, com

simultânea exposição à temperatura ambiente. Essa agitação foi suficiente para aumentar significativamente a hemoglobina livre nos reagentes de hemácias.

A determinação da hemoglobina livre não é preconizada para controle da qualidade dos reagentes imuno-hematológicos. Porém, é um teste importante e obrigatório para análise da qualidade dos hemocomponentes e possui uma relação direta com o grau de hemólise (BRASIL, 2017). A presença de hemoglobina livre pode indicar a degradação do reagente, o que levaria à perda da reatividade e consequente discrepância nos resultados de tipagem ABO em função de reações falso negativas.

Embora não tenha sido observada alteração de reatividade e especificidade dos reagentes de hemácias, a concentração de hemoglobina livre superior nos reagentes expostos à homogeneização, em comparação com as demais alíquotas que sofrem apenas exposições a temperatura ambiente, sugere que este fator cause a hemólise. Porém, quando a homogeneização é realizada de forma suave e por inversão, como no experimento, a hemólise observada não impacta nos testes imuno-hematológicos. Isso reforça a importância da homogeneização completa, porém suave, dos reagentes de hemácias, conforme recomendado nas instruções de uso pelos fabricantes. Adicionalmente, o fabricante do reagente utilizado no estudo orienta a homogeneização através de pelo menos 10 inversões completas. Sendo assim, a homogeneização do estudo corresponderia a 21 exames diários. Entretanto, nem todos os fabricantes de reagente preconizam o número de exato de homogeneizações necessárias e, na prática, a quantidade de inversões para homogeneização eficaz varia de acordo com a demanda dos serviços, a quantidade de reagente no frasco e a quantidade de hemácias depositadas.

A maioria dos antígenos está integrada na membrana das hemácias, porém alguns, como o sistema Lewis, são antígenos plasmáticos adsorvidos à superfície da hemácia (QURAI SHY; SAPATNEKAR, 2016). No caso dos antígenos ABO, a alta densidade antigênica, cerca de um milhão de antígenos presentes em cada hemácia (RAHFELD; WITHERS, 2020), pode ter contribuído para a manutenção da potência dos reagentes de hemácias A<sub>1</sub> e B, mesmo após as homogeneizações e aparente comprometimento do reagente representado pela quantidade de hemoglobina livre

aumentada. Sutter *et al.* (2017) também atribuíram a estabilidade das amostras a alta densidade antigênica do sistema ABO.

A alteração da estrutura da hemácias poderia impactar na permeabilidade da membrana e modificar a condutividade do reagente. No entanto, a condutividade elétrica dos reagentes de hemácias expostos à homogeneização foi semelhante em relação às demais condições de armazenamento. Alterações na condutividade elétrica podem estar relacionadas com modificações de carga elétrica das hemácias e, conseqüentemente, alterações no potencial zeta. A diminuição do potencial zeta torna o meio mais instável, tendendo a agregação, o que poderia afetar os resultados dos testes imuno-hematológicos de controle da qualidade levando a reações inespecíficas (OLIVEIRA; RIBEIRO; VIZZONI, 2013).

Os resultados obtidos apontam para a estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos testados, os quais são utilizados para determinação da tipagem sanguínea ABO e RhD, mesmo deixando-os por até 12 horas diárias, cinco dias por semana, durante quatro semanas, expostos à temperatura ambiente na bancada durante as atividades laboratoriais. Assim, uma vez que o título, a avidéz e a intensidade das reações dos antissoros e das hemácias devem ser assegurados, conforme legislação, a cada lote e remessa de reagentes antes de introduzi-los na rotina (BRASIL, 2017), a relação custo-benefício não justifica a realização de tais testes para requalificação dos reagentes que estão em uso. Uma vez em uso, no período de manipulação e armazenamento, as avaliações dos reagentes através de amostras com resultados conhecidos e adoção de controles positivos e negativos, para avaliação qualitativa da capacidade de reproduzir um resultado esperado, parecem ser suficientes para detectar alterações na rotina por causas diversas e garantir a qualidade dos testes.

Os resultados também apontam que a qualidade dos reagentes imuno-hematológicos é mantida quando a temperatura do ambiente onde são realizados os exames imuno-hematológicos é controlada e permanece entre 20 e 24°C, conforme preconizado nacionalmente aos laboratórios de testagem de amostras de doadores e receptores de sangue (BRASIL, 2014).

Enfim, considerando que os bancos de sangue e as agências transfusionais não podem ter menos do que certeza de que os reagentes funcionam como

pretendido, este estudo demonstrou a estabilidade de uma marca de reagentes nas condições de uso. Neste sentido, práticas mais rígidas com frequências ou testes de controle da qualidade adicionais aos realizados não se mostraram necessárias.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo apontam que os reagentes imuno-hematológicos anti-A, anti-B, anti-D, controle RhD e reagentes de hemácias A1 e B testados, do respectivo fabricante, utilizados para determinação de tipagem sanguínea na técnica de tubo, são estáveis em termos de potência e especificidade nas condições que foram estudados.

Diante destes resultados, uma vez que a potência e especificidade tenham sido asseguradas antes de colocar em uso, a cada lote e remessa recebida, a avaliação qualitativa dos reagentes quanto à capacidade de reproduzir um resultado esperado com o uso de controles positivos e negativos parecem ser suficientes para garantir a qualidade dos resultados dos testes de tipagem sanguínea ABO e RhD em tubo. Em condições adequadas de uso, com controle da temperatura do ambiente onde são realizados os exames imuno-hematológicos, entre 20 e 24°C e, homogeneização suave dos reagentes de hemácias, entende-se não haver necessidade de adoção de medidas extras durante a manipulação dos reagentes estudados, salvo quando indicado pelo fabricante.

## REFERÊNCIAS

ABE, Y. *et al.* Temperature-dependent formation of N-nitrosodimethylamine during the storage of ranitidine reagent powders and tablets. **Chemical And Pharmaceutical Bulletin**, v. 68, n. 10, p. 1008-1012, 1 out. 2020.

ANZBST. Australian and New Zealand Society of Blood Transfusion Ltd. **Guidelines for transfusion and immunohaematology laboratory practice**. 1 ed. Sydney: 2020.

BARNSTABLE, C. J. *et al.* Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. **Cell**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 9-20, maio 1978.

BARRIE, E. K. *et al.* Monoclonal anti-B produced by the immunization of mice with soluble salivary glycoproteins. **European Journal of Immunogenetics**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 41-44, fev. 1983.

BARROS, C. *et al.* Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 269-274, dez. 2006.

BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 1, n. 25, p. 47-58, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 343, de 13 de dezembro de 2002**. Regulamento técnico para a obtenção, testagem, processamento e controle de qualidade de sangue e hemocomponentes para uso humano. Brasília, DF. 2002. Disponível em: <[http://www.aeap.org.br/doc/resolucao\\_rdc\\_343\\_de\\_13\\_de\\_dezembro\\_de\\_2002.pdf](http://www.aeap.org.br/doc/resolucao_rdc_343_de_13_de_dezembro_de_2002.pdf)>. Acesso em: 02 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 153, de 14 de junho de 2004**. Determina o regulamento técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. Brasília, DF. Disponível em: <[http://www.sbpc.org.br/upload/noticias\\_gerais/320100416113458.pdf](http://www.sbpc.org.br/upload/noticias_gerais/320100416113458.pdf)>. Acesso em: 02 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim do programa de avaliação externa da qualidade em serviços de hemoterapia**. Brasília, DF. out. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/4048533/5235251/1%C2%BA+Boletim+do+Programa+AEQ/ac40dd7b-1bec-4c07-9615-dd453d7e8a69>>. Acesso em: 01 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010**. Determina o regulamento sanitário para serviços que desenvolvem atividades relacionadas ao ciclo produtivo do sangue humano e componentes e procedimentos transfusionais. Brasília, DF. Disponível em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/anexo/anexo\\_res0057\\_16\\_12\\_2010.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/anexo/anexo_res0057_16_12_2010.pdf)>. Acesso em: 02 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 34, de 11 de junho de 2014**. Dispõe sobre as boas práticas no ciclo do sangue. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC\\_34\\_2014\\_CO MP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC_34_2014_CO MP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a)>. Acesso em: 07 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 36, de 26 de agosto de 2015**. Dispõe sobre a classificação de risco, os regimes de controle de notificação e registro e os requisitos de rotulagem e instruções de uso de produtos para diagnóstico *in vitro*, inclusive seus instrumentos e dá outras providências. Disponível em:

<[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32421597/do1-2015-08-27-resolucao-rdc-n-36-de-26-de-agosto-de-2015-32421440%3E](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/32421597/do1-2015-08-27-resolucao-rdc-n-36-de-26-de-agosto-de-2015-32421440%3E)>.

Acesso em: 18 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1353, de 13 de junho de 2011**. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. Brasília, DF. Disponível em:

<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt1353\\_13\\_06\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt1353_13_06_2011.html)>.

Acesso em: 02 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia**. INCA. Rio de Janeiro, RJ, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Imuno-hematologia laboratorial**. 1. ed., Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços do Sistema Único de Saúde. Brasília, DF. Disponível em:

<<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2019.

BUNDLE, D. R. *et al.* Hybridomas specific for carbohydrates: synthetic human blood group antigens for the production, selection and characterization of monoclonal typing reagents. **Journal of Immunology**, v. 129, n. 2, p. 678-682, ago. 1982.

CANADA. Minister of Justice. **Blood Regulation**. Canadá, 2015. Disponível em: <<https://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/SOR-2013-178.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2022.

CRAWFORD, D. H. *et al.* Production of human antibody to Rhesus D antigen. **Lancet**, v. 321, n. 8321, p. 386-388, fev. 1983.

CORREIA, R. P. *et al.* Recommendations for quality assurance in multiparametric flow cytometry: first consensus of the brazilian group of flow cytometry

(gbcflux). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], v. 51, n. 6, p. 389-396, dez. 2015.

COUNCIL OF EUROPE. **European Treaty Series – N° 39: European agreement on the exchanges of blood-grouping reagents**. Strasbourg, 1962a.

COUNCIL OF EUROPE. **European Treaty Series – N° 39: European agreement on the exchanges of blood-grouping reagents: protocol to the agreement**. Strasbourg, 1962b.

COUNCIL OF EUROPE. COMMITTEE OF MINISTERS. **Recommendation No. R (95) 15, of 12 October 1995**. On the preparation, use and quality assurance of blood components. Disponível em: <<https://ekea.gr/wp-content/uploads/Rec9515-Preperation-use-and-quality-assurance-of-blood-components.pdf>>. Acesso em 25 jun. 2021.

COUNCIL OF EUROPE. **Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components**. 20th ed. Strasbourg: European Directorate for the Quality of medicines & healthcare of the Council of Europe (EDQM), 2020.

DANIELS, G. **Human blood groups**. 3. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013.

DIAS, V. S.; BARQUETTE, F. R. S.; BELLO, A. R.. Padronização da qualidade: alinhando melhorias contínuas nos laboratórios de análises clínicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 2, p.164-169, fev. 2017.

DOYLE, A. *et al.* In vitro development of human monoclonal antibody-secreting plasmacytomas. **Human Immunology**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 199-209, jul. 1985.

EDELMAN, L. *et al.* Thermodynamic and immunological properties of a monoclonal antibody to human blood group A. **Immunology**. v. 44, n. 3, p. 549-554, nov. 1981.

EUROPEAN UNION. **Council Directive 93/42/EEC, of June 1993**. Concerning medical devices. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31993L0042&from=PT>>. Acesso em: 25 jun. 2021.

EUROPEAN UNION. **Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council, of 27 October 1998**. On in vitro diagnostic medical devices. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0079&from=PT>>. Acesso em: 25 jun. 2021.

EUROPEAN UNION. **Directive nº 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council, of 27 January 2003**. Setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:033:0030:0040:EN:PDF>>. Acesso em 25 jun. 2021.

EUROPEAN UNION. **Commission Directive n° 2005/62/EC, of 30 September 2005.** Implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards community standards and specifications relating to a quality system for blood establishments. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005L0062&from=EN>>. Acesso em 25 jun. 2021.

EUROPEAN UNION. **Commission Decision no 2009/886/EC, of 27 November 2009.** Amending Decision 2002/364/EC on common technical specifications for in vitro diagnostic medical devices. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:318:0025:0040:EN:PDF>>. Acesso em 15 jul. 2021.

FINK, M. *et al.* Monoclonal antibody reagent stability and expiry recommendation combining experimental data with mathematical modeling. **The AAPS Journal**, v. 22, n. 6, p. 145, 8 nov. 2020.

FLETCHER, A.; HARBOUR, C; ZWART, R. Monoclonal antibodies specific for blood groups A and B. **Australian Journal Of Experimental Biology And Medical Science**, [S.L.], v. 62, n. 4, p. 421-428, ago. 1984.

GANDHI, M. J. *et al.* A brief overview of clinical significance of blood group antibodies. **Immunohematology**, v. 33, n. 1, p. 4-6, jan. 2018.

HARBOE, M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. **Scandinavian Journal Of Clinical And Laboratory Investigation**, v. 11, n. 1, p.66-70, 1959.

HARMENING, D. M. **Modern blood banking and transfusion practices.** 5. ed. Filadélfia: F.A. Davis Company, 2005.

HÖGMAN, C. F. Preparation and preservation of red cells. **Vox Sanguinis**, v. 74, n. 2, p. 177-187, jun. 1998.

ISBT (org.). **Working Party: Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology.** 2021. Disponível em: <<https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>>. Acesso em: 04 abr. 2022.

JPAC. **Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom.** 8. ed. Londres: TSO, 2013.

JUDD, W. J. *et al.* **Judd's Methods in Immunohematology.** 3. ed. Bethesda: AABB Press, 2008.

KEMKES-MATTHES, B.; FISCHER, R.; PEETZ, D. Influence of 8 and 24-h storage of whole blood at ambient temperature on prothrombin time, activated partial thromboplastin time, fibrinogen, thrombin time, antithrombin and D-dimer. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 215-220, abr. 2011.

KLEIN, H. G.; ANSTEE, D. J. **Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine**. 12. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, [S.L.], v. 256, n. 5517, p. 495-497, ago. 1975.

KULKARNI, S. S. *et al.* Potential of commercial anti-D reagents in the identification of partial D variants in Indian population. **Indian Journal of Medical Research**, v. 125, n. 5, p. 641-644, maio 2007.

LANDIS, J. R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LINSKENS, E. A.; DEVREESE, K. M. J. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 40, n. 3, p. 292-303, 5 fev. 2018.

MAJDIC, O. *et al.* Hybridomas secreting monoclonal antibodies to human group A erythrocytes. **Immunobiology**, v. 156, p. 226-227, 1979.

MARACAJA, D. L. V. *et al.* A flow cytometric study of reagent cells to resolve ABO typing discrepancy. **American Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 155, n. 1, p. 117-123, 13 out. 2020.

MARSH, W. L. Scoring of hemagglutination reactions. **Transfusion**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 352-353, 10 set. 1972.

MCGOWAN, A. *et al.* Stability of murine monoclonal anti-A, anti-B and anti-A,B ABO grouping reagents and a multi-center evaluation of their performance in routine use. **Vox Sanguinis**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 122-130, mar. 1989.

MENY, G. M. Recognizing and resolving ABO discrepancies. **Immunoematology**, v. 33, n. 2, p. 76-81, 2017.

MESSETER, L. *et al.* Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities; some superior to human polyclonal ABO reagents. **Vox Sanguinis**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 185-194, abr. 1984.

MUJAHID, A.; DICKERT, F. Blood group typing: from classical strategies to the application of synthetic antibodies generated by molecular imprinting. **Sensors**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 51, 31 dez. 2015.

NARDOZZA, L. M. M. *et al.* Bases moleculares do sistema rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 6, p 724-728, 2010.

NOVARETTI, M. C. Z. *et al.* Controle de qualidade interno de reagentes imuno-hematologia: aspectos práticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 24, n. 04, p.270-285, out/dez. 2002.

ODEIGAH, P. G. Monoclonal antibodies in ABO serology: an evaluation. **East African Medical Journal**, v. 66, n. 11, p. 764-768, nov. 1989.

OKUBO, Y. Reactivity of monoclonal antibodies as blood grouping reagentes. **Nihon rinsho**, v. 55, n. 9, p. 2340 – 2346, set. 1997.

OLIVEIRA, M. B. S.C.; RIBEIRO, F. C.; VIZZONI, A. G. (org.). **Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia**. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, 2013.

PASQUINI, N. C. Implantação de sistema de qualidade (PALC) em laboratório clínico: Um estudo de caso. **Revista Tecnológica da Fatec Americana**, São Paulo, v. 06, n.1, out/mar. 2018.

PERSON, R. D. M. *et al.* Serologic strategy in detecting RHD altered alleles in Brazilian blood donors. **Hematology, Transfusion And Cell Therapy**, v. 42, n. 4, p. 365-372, out. 2020.

QURASHY, N.; SAPATNEKAR, S. Advances in blood typing. **Advances In Clinical Chemistry**, [S.L.], p. 221-269, 2016.

RAHFELD, P.; WITHERS, S. G. Toward universal donor blood: enzymatic conversion of A and B to O type. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 295, n. 2, p. 325-334, jan. 2020.

ROUGER, P. *et al.* Study of blood group B antigen with a specific monoclonal antibody (anti-B, b-183). **Immunology**, v. 49, n. 1, p. 77-82, maio 1983.

RUDDLELL, J. P. *et al.* Effect of 24-hour storage at 25 degrees C on the in vitro storage characteristics of CPDA-1 packed red cells. **Transfusion**, v. 38, n. 5, p. 424-428, maio 1998.

SACKS, S. H.; LENNOX, E. S. Monoclonal anti-B as a new blood-typing reagent. **Vox Sanguinis**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 99-104, fev. 1981.

SONNEBORN, H. H. *et al.* Monoclonal antibodies in blood group serology. Part 1: Technique of production, ABO and Lewis system. **InfusionstherTransfusionsmed**, v. 20, n. 6, p. 328-335, dez. 1993.

STROBEL, E. Comparison Of monoclonal and polyclonal anti-P1 reagents. **Clinical Laboratory**, v. 47, n. 5-6, p. 249-255, 2001.

SUTTER, B. *et al.* Estabilidade de antígenos eritrocitários humanos para controle interno da qualidade imunohematológica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S.L.], v. 49, n. 3, p. 275-282, 2017.

THOMPSON, K. M. *et al.* Production of human monoclonal IgG and IgM antibodies with anti-D rhesus specificity using heterohybridomas. **Immunology**, v. 58, n. 1, p. 157-160, maio 1986.

VEGE, S.; WESTHOFF C. M. Rh and RhAG blood group systems. *In*: SHAZ, B. H.; HILLYES, C. D.; GIL, M. R. (org.). **Transfusion medicine and hemostasis**. 3. ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2019. p. 149-155.

VOAK, D. *et al.* Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: evaluation as a blood grouping reagent. **Vox Sanguinis**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 134-140, set. 1980.

VOAK, D. *et al.* Monoclonal anti-A and anti-B: development as cost-effective reagents. **Med. Lab. Sci**, v. 39, n. 2, p. 109-122, abr. 1982.

VOAK, D. Monoclonal blood group antibodies. **Beirt Infusionsther.**, v. 24, p. 200-213, 1989.

VOAK, D. Monoclonal antibodies as blood grouping reagents. **Baillière 'S Clinical Haematology**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 219-242, abr. 1990.

Von Dungern, E.; Hirszfeld, L. Über gruppenspezifische Strukturen des Blutes III. **Z ImmunForsch**, v. 8, p. 526 – 562, 1911.

VUK, T. *et al.* Quality monitoring and risk management in blood transfusion services. **ISBT Science Series**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 284-289, 14 fev. 2018.

ZHENG, S. *et al.* Investigating the degradation behaviors of a therapeutic monoclonal antibody associated with pH and buffer species. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 1, 2017.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Comparação da leitura das 54 reações com diferentes intensidades realizadas pelos profissionais 1 e 2.

P1	Intensidade de Reação	P2								Total
		4+	3+	2+	1+	W	0	CM	HE	
	4+	21	0	0	0	0	0	0	0	21
	3+	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	2+	0	0	3	0	0	0	0	0	3
	1+	0	0	0	5	0	0	0	0	5
	W	0	0	0	1	2	0	0	0	3
	0	0	0	0	0	0	17	0	0	17
	CM	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	HE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	21	3	3	6	2	17	2	0	54

Legenda: P1 – profissional 1; P2 – profissional 2; W – vestígio de reação; CM – campo misto; HE – Hemólise.

Fonte: Elaborado pela autora.

### APÊNDICE B - Comparação da leitura das 54 reações com diferentes intensidades realizadas pelos profissionais 1 e 3.

P1	Intensidade de Reação	P3								Total
		4+	3+	2+	1+	W	0	CM	HE	
	4+	21	0	0	0	0	0	0	0	21
	3+	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	2+	0	0	3	0	0	0	0	0	3
	1+	0	0	0	5	0	0	0	0	5
	W	0	0	0	1	2	0	0	0	3
	0	0	0	0	0	1	16	0	0	17
	CM	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	HE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	21	3	3	6	3	16	2	0	54

Legenda: P1 – profissional 1; P3 – profissional 3; W – vestígio de reação; CM – campo misto; HE – Hemólise.

Fonte: Elaborado pela autora.

**APÊNDICE C - Comparação da leitura das 54 reações com diferentes intensidades realizadas pelos profissionais 2 e 3.**

P2	Intensidade de Reação	P3								Total
		4+	3+	2+	1+	w	0	CM	HE	
	4+	21	0	0	0	0	0	0	0	21
	3+	0	3	0	0	0	0	0	0	3
	2+	0	0	3	0	0	0	0	0	3
	1+	0	0	0	6	0	0	0	0	6
	w	0	0	0	0	2	0	0	0	2
	0	0	0	0	0	1	16	0	0	17
	CM	0	0	0	0	0	0	2	0	2
	HE								0	0
	Total	21	3	3	6	3	16	2	0	54

Legenda: P2 – profissional 2; P3 – profissional 3; W – vestígio de reação; CM – campo misto; HE – Hemólise.

Fonte: Elaborado pela autora.

**ANEXO A**

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DE SANTA  
CATARINA - HEMOSC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para determinação da tipagem sanguínea de receptores na técnica de tubo.

**Pesquisador:** Flávia Martinello

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 24255019.8.3001.0110

**Instituição Proponente:** Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.754.341

**Apresentação do Projeto:**

O estudo será realizado pelas pesquisadoras Flávia Martinello (Professora do Departamento de Análises Clínicas da UFSC) e Julia Hermes (farmacêutica-bioquímica do Hemosc), com o objetivo de analisar a estabilidade de reagentes imuno-hematológicos que podem ser utilizados nas rotinas de doadores e pacientes.

O estudo proposto trata-se de uma pesquisa de natureza experimental, analítica e quantitativa.

Os experimentos serão realizados nas dependências do Hemosc, sob supervisão dos setores envolvidos. Os reagentes imuno-hematológicos serão testados antes do início da pesquisa e posteriormente alíquotados em quatro diferentes tubos que serão expostos diferentes condições de armazenamento, serão realizados três ciclos de testes em meses distintos e alternados. Serão realizados testes para a avaliação de potência, especificidade e integridade. Os resultados dos testes de potência, especificidade e integridade de cada alíquota dos reagentes serão comparados entre si, conforme períodos de exposição e comparados com os controles negativo e positivo.

**Critério de Inclusão:**

Serão incluídas nas análises as amostras provenientes de doadores de sangue de acordo com os fenótipos acima citados, coletadas há menos de 144 horas, armazenadas de 2-8oC e sem sinais

**Endereço:** Avenida Othon Gama D'Eça, Praça Dom Pedro I, 756

**Bairro:** Centro

**CEP:** 88.015-240

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3251-9826

**E-mail:** cep.fns@hemosc.org.br

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DE SANTA  
CATARINA - HEMOSC



Continuação do Parecer: 3.754.341

de hemólise.

**Critério de Exclusão:**

Serão excluídas das análises as amostras coletadas há mais de 144 horas, que foram armazenadas em temperatura inadequada ou que apresentarem resultado conhecido de Coombs direto positivo que possa vir a interferir nas análises.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Geral:

Avaliar a estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos (soros anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, controle RhD e hemácias A1 e B) utilizados em testes de tipagem sanguínea de receptores de sangue após diferentes períodos de exposição à temperatura ambiente.

Objetivos Secundários:

- Avaliar a potência dos reagentes anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Avaliar a especificidade dos reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e controle RhD após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Avaliar a potência, especificidade e integridade das hemácias A1 e B após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Propor melhorias na padronização existente para a manipulação dos reagentes imuno-hematológicos de acordo com os resultados do estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco foi considerado mínimo pelas pesquisadoras, sendo o principal deles a quebra de sigilo. As mesmas relatam que adotarão todas as medidas para que tal fato não ocorra, obtendo os dados das amostras sem identificação nominal. Nenhuma informação sócio-demográfica será acessada ou utilizada e somente serão conhecidos o código de identificação e fenótipo da amostra (teste já realizado na rotina do Hemosc).

**Endereço:** Avenida Othon Gama D'Eça, Praça Dom Pedro I, 756

**Bairro:** Centro

**CEP:** 88.015-240

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3251-9826

**E-mail:** cep.fns@hemosc.org.br

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DE SANTA  
CATARINA - HEMOSC



Continuação do Parecer: 3.754.341

Os benefícios da pesquisa são indiretos e relacionados ao levantamento da estabilidade dos reagentes e possíveis impactos da exposição à temperatura ambiente sobre os resultados dos testes. Esse conhecimento permitirá o manuseio dos reagentes de forma mais adequada, possibilitando o aumento da segurança dos processos e a garantia da qualidade dos resultados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Os resultados da pesquisa são importantes, visto que aumentam o conhecimento técnico referente ao tema e pode ser utilizado como fonte de pesquisa e orientação da hemorrede nacional, aumentando a segurança e qualidade dos testes imuno-hematológicos.

A pesquisa é relevante e trará um conhecimento mais aprofundado referente às técnicas de manipulação, armazenamento e estabilidade dos reagentes. Sendo que essas fases são fundamentais a segurança e qualidade dos testes realizados, considera-se que o maior entendimento das mesmas poderá proporcionar um aprimoramento nas rotinas até então estabelecidas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos necessários foram apresentados adequadamente.

As pesquisadoras solicitam a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com as seguintes justificativas:

- As amostras de doadores serão utilizadas somente como padrão para a avaliação dos reagentes imuno-hematológicos.
- Nenhum teste será realizado de forma adicional aos testes já executados na triagem imuno-hematológica dos doadores, ou seja, não serão gerados, a partir da pesquisa, nenhum resultado além daqueles já disponibilizados pela rotina do hemocentro.
- O doador assina o termo de consentimento que autoriza a utilização do sangue doado para produção de reagentes bem como a utilização das amostras em trabalhos científicos, desde que seja preservado o anonimato;
- As amostras serão selecionadas a partir de relatórios identificadas apenas por códigos, não havendo necessidade de identificação dos doadores;
- A seleção das amostras será feita somente pela pesquisadora principal, sob a supervisão dos

**Endereço:** Avenida Othon Gama D'Eça, Praça Dom Pedro I, 756

**Bairro:** Centro

**CEP:** 88.015-240

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3251-9826

**E-mail:** cep.fns@hemosc.org.br

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DE SANTA  
CATARINA - HEMOSC



Continuação do Parecer: 3.754.341

responsáveis pelos setores envolvidos;

- O estudo não fará referência a dados sócio-demográficos;

**Recomendações:**

Recomenda-se que a população do estudo e os critérios de inclusão e exclusão incluam as informações relacionadas aos reagentes e amostras de doadores.

Recomenda-se apresentar emenda caso a pesquisa seja vinculada, posteriormente, a algum programa de graduação e/ou pós graduação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisaCEPSH.pdf	24/10/2019 12:11:30	Flávia Martinello	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativaausenciatermo.pdf	22/10/2019 15:06:25	Flávia Martinello	Aceito
Outros	Cartaanuencia.pdf	22/10/2019 15:05:15	Flávia Martinello	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Avenida Othon Gama D'Eça, Praça Dom Pedro I, 756

**Bairro:** Centro

**CEP:** 88.015-240

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3251-9826

**E-mail:** cep.fns@hemosc.org.br

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DE SANTA  
CATARINA - HEMOSC



Continuação do Parecer: 3.754.341

FLORIANOPOLIS, 09 de Dezembro de 2019

---

**Assinado por:**  
**Jussara Carginin Ferreira**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Othon Gama D'Eça, Praça Dom Pedro I, 756

**Bairro:** Centro

**CEP:** 88.015-240

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3251-9826

**E-mail:** cep.fns@hemosc.org.br

**ANEXO B**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos utilizados para determinação da tipagem sanguínea de receptores na técnica de tubo.

**Pesquisador:** Flávia Martinello

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 24255019.8.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.707.888

**Apresentação do Projeto:**

Trata o presente de projeto de pesquisa da Profa Flávia Martinello, do Departamento de Análises Clínicas da UFSC, com a participação da farmacêutica-bioquímica Julia Hermes. Consta como instituição coparticipante o Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina.

Não há informação se o projeto está vinculado a algum trabalho acadêmico, e considerando a assinatura da folha de rosto pela chefia do departamento (ACL-UFSC), entende-se que seja um projeto da própria professora.

O estudo pretende analisar a estabilidade de reagentes imuno-hematológicos utilizados em testes de tipagem sanguínea. Não é informado o número de participantes; o n da amostra é igual a 80. Não haverá uso de fontes secundárias de dados.

O estudo proposto é uma pesquisa de natureza experimental, analítica e quantitativa. Os reagentes imuno-hematológicos serão testados previamente e aliqüotados em quatro diferentes tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca esterilizados, que serão expostos a temperatura ambiente por oito ou quatro horas, de segunda a sexta feira, por quatro semanas consecutivas. Como controle negativo, uma alíquota será utilizada para realização dos testes após quatro semanas de armazenamento sob refrigeração sem exposição intermediária à temperatura

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-400

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-6094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.707.888

ambiente. Como controle positivo, uma alíquota será utilizada para realização dos testes após quatro semanas de armazenamento em temperatura ambiente. Com cada uma das quatro alíquotas (controle positivo, controle negativo, curta e longa exposição à temperatura ambiente) serão realizados testes para avaliação de potência, especificidade e integridade. Os resultados dos testes de potência, especificidade e integridade de cada alíquota dos reagentes serão comparados entre si, conforme períodos de exposição e comparados com os controles negativo e positivo. Além disso, os resultados encontrados também serão avaliados quanto aos parâmetros mínimos de potência e especificidade estabelecidos na legislação brasileira. Cada experimento será realizado três vezes em meses alternados e a leitura das reações imunohematológicas será realizada por dois profissionais (pesquisador e auxiliar), de forma cega e independente. A concordância entre os pesquisadores nas leituras dos testes será determinada previamente na rotina do laboratório através do teste estatístico Kappa. Será aceito uma concordância mínima de 0,8 na escala Kappa (0-1) entre os pesquisadores. No momento das análises, caso haja divergência entre os resultados, um terceiro pesquisador atuará de forma decisiva.

**Critério de Inclusão:**

Serão incluídas nas análises as amostras provenientes de doadores de sangue de acordo com os fenótipos acima citados, coletadas há menos de 144 horas, armazenadas de 2-8oC e sem sinais de hemólise.

**Critério de Exclusão:**

Serão excluídas das análises as amostras coletadas há mais de 144 horas, que foram armazenadas em temperatura inadequada ou que apresentarem resultado conhecido de Coombs direto positivo que possa vir a interferir nas análises.

As pesquisadoras pretendem, através do estudo, conhecer a estabilidade dos reagentes e possíveis impactos da exposição à temperatura ambiente sobre os resultados dos testes.

As pesquisadoras solicitam dispensa de TCLE.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos (soros anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D, controle RhD e hemácias A1 e B) utilizados em testes de tipagem sanguínea de receptores de sangue após diferentes períodos de exposição à temperatura ambiente.

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

**Bairro:** Trindade

**CEP:** 88.040-400

**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3721-6094

**E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.707.888

**Objetivos Secundários:**

- Avaliar a potência dos reagentes anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;-
- Avaliar a especificidade dos reagentes anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e controle RhD após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Avaliar a potência, especificidade e integridade das hemácias A1 e B após longos e curtos períodos de exposição diária à temperatura ambiente;
- Propor melhorias na padronização existente para a manipulação dos reagentes imuno-hematológicos de acordo com os resultados do estudo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

É citado o risco, considerado mínimo, de quebra de sigilo. As pesquisadoras adotarão todas as medidas para que tal fato não aconteça, obtendo os dados das amostras sem identificação nominal dos doadores de sangue.

Os benefícios são indiretos e relacionados ao levantamento da estabilidade dos reagentes e possíveis impactos da exposição à temperatura ambiente sobre os resultados dos testes, o que permitirá o manuseio de forma adequada, aumentando a segurança dos processos e a garantia da qualidade dos resultados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa pode contribuir para o conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A folha de rosto vem assinada pela pesquisadora responsável e pela Chefia do Departamento de Análises Clínicas.

Consta declaração do Centro de Hematologia e Hematologia de SC (HEMOSC), firmada pelo seu Diretor, autorizando a pesquisa e comprometendo-se a cumprir os termos da res. 466/12. Na declaração, está explicitada a necessidade de aprovação prévia pelo CEPESH do HEMOSC.

O cronograma informa que a coleta de dados acontecerá a partir de 01/05/2020.

O orçamento informa despesas de R\$ 3.036,99 com financiamento próprio.

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.707.888

As pesquisadoras solicitam dispensa de TCLE com base nas seguintes justificativas:

- o estudo está relacionado à avaliação da estabilidade dos reagentes imuno-hematológicos e não às amostras de sangue;
- serão utilizados hemácias e plasmas provenientes de amostras de doadores de sangue coletados como rotina no processo de doação e no ato da doação, o doador assina o termo de consentimento que autoriza a utilização do sangue doado para produção de reagentes bem como a utilização das amostras em trabalhos científicos, desde que seja preservado o anonimato;
- as amostras serão selecionadas a partir de relatórios de amostras fenotipadas identificadas apenas por códigos, não havendo necessidade de identificação dos doadores. apesar disso, serão adotadas as medidas para que tal fato não aconteça;
- a seleção das amostras será feita somente pela pesquisadora principal;
- o estudo não fará referência a dados sócio-demográficos, pois as amostras serão utilizadas somente para análise da estabilidade dos reagentes após diferentes períodos de exposição à temperatura ambiente;
- o acesso às amostras e demais informações será realizada mediante autorização institucional, sob a supervisão dos responsáveis pelos setores envolvidos, os quais iniciarão somente após a autorização do CEP da UFSC e do HEMOSC.

**Recomendações:**

Sem recomendações adicionais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há informação se o projeto está vinculado a algum trabalho acadêmico, e considerando a assinatura da folha de rosto pela chefia do departamento (ACL-UFSC), entende-se que seja um projeto da própria professora. Caso haja vinculação com algum trabalho acadêmico, solicita-se que a situação seja informada posteriormente, na forma de uma emenda, e que seja apresentada carta de anuência da instância correspondente (dependendo do nível de formação do estudante, conforme orientações na página do CEP SH-UFSC).

A solicitação para dispensa de TCLE foi entendida como pertinente pelo CEP SH-UFSC, considerando as justificativas apresentadas.

Com base na documentação apresentada, este Comitê entende não haver impedimentos para o desenvolvimento da pesquisa.

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.707.888

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1453084.pdf	24/10/2019 12:11:57		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisaCEPSH.pdf	24/10/2019 12:11:30	Flávia Martinello	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	24/10/2019 12:07:59	Flávia Martinello	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativaausenciatermo.pdf	22/10/2019 15:06:25	Flávia Martinello	Aceito
Outros	Cartaanuencia.pdf	22/10/2019 15:05:15	Flávia Martinello	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 15 de Novembro de 2019

---

**Assinado por:  
Maria Luiza Bazzo  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401  
**Bairro:** Trindade **CEP:** 88.040-400  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br