

with unexplained Rh antibodies. All patients had complete serological and molecular analyses. A lookback on the donor units transfused to those patients was performed and donors suspected of having Rh variants were recruited for further analysis. Laboratory and clinical findings were used to evaluate the clinical significance of the alloantibodies produced. **Results:** Unexpected Rh antibodies found in these patients were not linked to expression of partial Rh phenotypes according to serological and molecular analyses. Anti-D was found in 2 patients, anti-C was found in one patient, anti-c was found in one patient and anti-e was found in 3 patients carrying conventional D, C, c and e antigens respectively. Serological and molecular analyses on donors' samples revealed that 6 donors whose RBCs were transfused to these patients carried partial Rh antigens. Only one anti-e in a patient with β -thalassemia was autoreactive and could not be explained by RH diversity in his donors. Laboratory and clinical evidences of a delayed hemolytic transfusion or decreased survival of transfused RBCs were associated with 3 of 7 Rh antibodies at first detection. **Discussion:** Our study provides evidence that patients exposed to RBC units from donors with Rh variants may develop antibodies and some of these may be of clinical significance.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.581>

580

SYSTEMATIC RHD GENOTYPING IN BRAZILIANS REVEALS A HIGH FREQUENCY OF PARTIAL D IN CHRONICALLY TRANSFUSED PATIENTS SEROLOGICALLY TYPED AS WEAK D



I. Leal, T.D.D. Santos, M.R.M. Miranda, L. Castilho

Centro de Hematologia e Hemoterapia
(Hemocentro), Universidade Estadual de
Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Background: RHD molecular analysis has been used to differentiate weak D and partial D. This discrimination can be of clinical importance because carriers of partial D antigen may develop anti-D when transfused with D-positive red blood cell units what is not commonly observed in the weak D phenotype, with rare exceptions. The aim of this study was to determine the type of D variants among Brazilian patients requiring chronic transfusions serologically typed as weak D. **Methods:** Samples from 87 patients (53 with sickle cell disease, 10 with thalassemia and 24 with myelodysplastic syndrome), typed as weak D by manual tube indirect antiglobulin test or gel test were first RHD genotyped by using the RHD BeadChip Kit (BioArray, Immucor). Sanger sequencing was performed when necessary. **Results:** RHD molecular analysis revealed 32 (36.8%) variant RHD alleles encoding weak D phenotypes and 55 (63.2%) alleles encoding partial D antigens. RHD variant alleles were present in the homozygous state or as a single RHD allele, one variant RHD allele associated with the RHD Y allele, or two different variant RHD alleles in compound heterozygosity with each other in 67 patients, 6 patients and 14 patients respectively. The most common RHD alleles pre-

dicting partial D were RHD*DAR1.2, RHD*DAR3.1, RHD*DAU4, RHD*DAU*6, RHD*DVI, RHD*DVII, RHD*DMH while the most common RHD alleles predicting weak D were RHD*weak D type 1, RHD*weak D type 3, RHD*weak D type 4.0 and RHD*weak D type 38. Alloanti-D was found in 9 (16.4%) cases with variant RHD alleles (specifically RHD*DAR1.2, RHD*DAR3.1, RHD*DVI and RHD*DVII) predicting a partial D. **Conclusions:** The frequency of partial D was higher than weak D in Brazilian patients serologically typed as weak D, showing the importance to differentiate weak D and partial D in chronically transfused patients to establish a transfusion policy recommendation. Systematic RHD molecular analysis in patients receiving red blood cell transfusions provides relevant information of variant RHD alleles improving transfusion therapy and preventing alloimmunization. It also helps to avoid wasting of D- red blood cell units because carriers with the most common weak D types may safely receive D+ units.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.582>

581

TÉCNICA DE BIOLOGIA MOLECULAR COMO ALTERNATIVA EM FENOTIPAGENS INCONCLUSIVAS



L.F. Silva^a, B.R. Cruz^b, M.G. Quirino^c, J.E.L. Visentainer^c, A.M. Sell^c

^a UCT HEMEPAR Irati, Irati, PR, Brasil

^b Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), Ponta Grossa, PR, Brasil

^c Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, PR, Brasil

Objetivos: O objetivo desse trabalho foi demonstrar a contribuição da técnica de genotipagem eritrocitária na prática transfusional. **Material e métodos:** Foram genotipadas 18 amostras de pacientes com fenotipagem inconclusiva ou incompleta. A extração do DNA das amostras foi realizada utilizando-se o conjunto "iopur Kit Extração Mini Spin Plus" (Möbius Life Sciences, Brasil) conforme instruções do fabricante e as determinações dos alelos RHCE (RHCE**C*, RHCE**c*, RHCE**E*, RHCE**e*), KEL (KEL*01 e KEL*02) e FY (FY*01, FY*02) foram realizadas por PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase – Sequência Específica de Primers). As dificuldades e os motivos de não fenotipagens e das limitações da técnica foram levantadas. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS 21.0 (IBM, 2012). **Resultados:** As causas de não fenotipagem inicial foram relacionadas à: anemia falciforme, autoanticorpo e/ou prova de Coombs direto positivo, campo misto e/ou dupla população, prova cruzada incompatível, transfusão recente e causas não descritas. Observou-se que as fenotipagens realizadas previamente, ainda que incompletas, conseguiram definir aproximadamente 50% dos antígenos de grupos analisados: 08 (44,4%) para antígenos RhC/RhE, 09 (50%) para antígeno Kell, Fya e Fyb e 10 (55,6%) para antígenos eritrocitários Rhc e Rhe. Observou-se a concordância com a genotipagem em 57 (96,61%) dos 59 antígenos testados sendo que em 2 (3,38%) casos houve discrepância de resultados entre as técnicas para os alelos RHCE**E* e FY**B* (FY*02). **Discussão:** A genotipagem foi eficaz na definição

dos fenótipos eritrocitários em amostras que apresentavam dificuldade de realização da técnica sorológica ou foram inconclusivas. As discrepâncias podem ser justificadas: para RHCE*E pela presença de falsas reações positivas decorrentes da população mista de hemácias (células do doador + células do receptor); no caso específico de FY*B a genotipagem permite a identificação da presença da mutação deste gene nas situações onde este não é expresso na superfície das hemácias, mas é expresso em outras células endoteliais. Esta mutação no gene decorreu de um processo de seleção natural relacionada à defesa contra a infecção para o *Plasmodium* sp., uma vez que o antígeno Fy(b) é receptor necessário para que este parasita penetre na hemácia. A técnica de PCR-SSP é mais econômica comparada a outros métodos; porém, o método sorológico é mais rápido que os métodos moleculares. O tempo maior para leitura de resultados comparando aos métodos sorológicos se transforma numa barreira a ser vencida, principalmente nos casos de transfusões de urgência e emergência. Demonstra-se que as pesquisas com genotipagem eritrocitária apresentam um grande e próspero caminho pois oferece uma contribuição decisiva como técnica auxiliar na resolução de exames com fenotipagens inconclusivas. O campo da medicina transfusional está pronto para expandir o uso do diagnóstico molecular. **Conclusão:** Concluímos que a detecção de antígenos eritrocitários pela técnica PCR-SSP mostrou-se eficaz e viável quando a fenotipagem foi inconclusiva.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.583>

582

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-A E ANTI-B PARA EVITAR HEMÓLISE PASSIVA EM TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS ABO INCOMPATÍVEL: COMPARAÇÃO ENTRE TÉCNICAS

F.S.A. Silva^a, C.P. Arnoni^a, F.M.R. Latini^a, A.J.P. Cortez^a, L. Castilho^b, T.P. Vendrame^a

^a Associação Beneficente de Coleta de Sangue (COLSAN), São Paulo, SP, Brasil

^b Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Introdução: A titulação de anticorpos é um teste semi-quantitativo onde é determinada a concentração de anticorpos presente no soro/plasma. Na rotina transfusional de plasma e plaquetas nem sempre é possível disponibilizar ABO compatível, sendo necessária a utilização da titulação dos anticorpos anti-A e anti-B para reduzir o risco de hemólise passiva. Atualmente, a técnica de hemaglutinação em tubo tem sido a de escolha, entretanto, outras técnicas de hemaglutinação manual ou automatizadas como o gel, fase sólida ou citometria de fluxo, podem também ser utilizadas. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo realizar a comparação da técnica de hemaglutinação em tubo manual e da técnica em microplacas automatizada para a titulação de anticorpos anti-A e anti-B da classe IgM. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas 75 amostras de doadores de plaquetas por aférese da Colsan no período de 19/05/2020 a 10/06/2020,

sendo 25 doadores do tipo A, 25 doadores do tipo B e 25 doadores do tipo O. As amostras foram coletadas em tubo com EDTA de 2 mL. A técnica em tubo utilizou reagentes de hemácias A1 e B (Fresenius) e na técnica automatizada realizada no equipamento Neo-Immucor[®] foram utilizadas hemácias A1 e B (Reference cells, Immucor) e microplacas de fundo em U. Título de corte 128 foi utilizado para ambas as técnicas. **Resultados:** Os resultados obtidos entre as 2 técnicas foram similares, sendo que 36% dos plasmas analisados apresentaram mesmo título, 53% apresentaram variação de 1 título, 10% variaram em 2 títulos e 1% em 3 títulos. **Conclusão:** Embora ambas as técnicas avaliadas tenham demonstrado similaridade entre os resultados a realização da titulação de anticorpos IgM anti-A e anti-B em microplacas com equipamento automatizado apresenta diversas vantagens sobre a técnica em tubo, como tempo do teste, interpretação menos subjetiva, consistência e reprodutibilidade dos resultados.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.584>

583

USING DROPLET DIGITAL PCR TO SCREEN FOR RARE BLOOD DONORS: PROOF OF PRINCIPLE

M.R. Dezan^a, A.C. Peron^b, T.G.M. Oliveira^a, V.B. Oliveira^a, C.N. Gomes^a, N.A. Salles^a, V. Rocha^a, A. Mendrone-Junior^a, C.L. Dinardo^a

^a Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b BIORAD, Lagoa Santa, MG, Brazil

Background: Digital droplet PCR (ddPCR) is a very sensitive high throughput genotyping methodology. To date, the use of ddPCR in immunohematology is restricted to fetal genotyping of red blood cell antigens. Our hypothesis is that this technology could be applied to screen for rare red blood cell genotypes, such as Di(b-). **Methods:** Nucleic acid of 3,168 donors was extracted for viral screening routine in pools of 6, which were converted into three types of 48-donor pools: control pools (only DI*B/B samples), pools with varying amount of DI*A/B samples (n=1 to 5) and a pool with one rare DI*A/A sample. Pools were genotyped using ddPCR to detect and quantify DI*A and DI*B alleles. **Results:** DI*A allele was accurately detected in all pools containing Di(a+b+) samples and in the pool containing one Di(a+b-) sample. No copies were detected in the control pools (n=60). The ratio between the number of DI*A and DI*B copies varied significantly between the pools and the triplicates. **Conclusion:** The proposed ddPCR assay was accurate in identifying the rare DI*A allele in large pools of donors and can be applied to screen for Di(b-) phenotype. The strategy can potentially be extended to search for other rare RBC phenotypes.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.10.585>