

técnicas sorológicas complementares é importante para elucidação dos caso e liberação da tipagem corretamente.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.798>

ANTICORPO CONTRA ANTÍGENO DE ALTA FREQUÊNCIA, ANTI-KNA: RELATO DE CASO

TAP Vendrame, FSA Silva, GF Devides,
AJP Cortez, F Latini, CP Arnoni

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

Introdução: O sistema de grupos sanguíneos Knops consiste em quatro antígenos de baixa prevalência (Kn_b, Mc_{Cb}, S₁₃ e Vil) e seis antígenos de alta prevalência (Sl_a, KC_{AM}, K_{na}, Mc_{Ca}, Y_{ka} e Sl₃). Anticorpos para antígenos Knops geralmente não são clinicamente significativos, mas são comuns em pacientes. A identificação e exclusão dos anticorpos são difíceis, pois a maioria dos painéis comerciais não possuem a informação da fenotipagem para os antígenos do sistema Knops, sendo necessário utilizar ferramentas sorológicas adicionais e testes de Biologia Molecular. **Relato de caso:** Paciente LGJ, 82 anos, sexo feminino, diagnóstico de doença pulmonar obstrutiva crônica, com histórico de gestação foi encaminhada ao Laboratório de referência de imunohematologia para identificação de anticorpos irregulares e com solicitação de 02 concentrados de hemácias. A paciente foi tipada como O RhD positivo, a pesquisa de anticorpos irregulares em gel Liss/Coombs (Grifols) demonstrou o mesmo padrão de reatividade (2+) em todas as hemácias da triagem e painel testados (total de 18 hemácias), exceto em 2 hemácias. Nos testes adicionais realizados com hemácias tratada com papaína, tripsina, quimotripsina e DTT não foram observados reatividade. Os testes de antiglobulina direta (TAD) e autocontrole (AC) foram positivos (2+), com eluato negativo e o fenótipo estendido demonstrou que a paciente era negativa para os antígenos E, K, S. Foram realizados testes adicionais de alo adsorção os quais descartaram a presença de anti-E -K,-S e confirmaram a presença de anticorpo contra antígeno de alta frequência. Foi realizada titulação com hemácia R1r K- S- e o anticorpo a ser identificado apresentou título 16. Através da genotipagem eritrocitária foi realizada a investigação do gene do sistema Knops e a técnica de sequenciamento demonstrou que a paciente apresentava o genótipo KN*02/KN*02 tendo como fenótipo deduzido Kn(a-). **Conclusão:** Apesar da presença do anti-K_{naa} paciente recebeu 02 concentrados de hemácias Kn (a+) sem intercorrências, pois o aloanticorpo não apresenta importância clínica.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.799>

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO DE GENOTIPAGEM DO GRUPO SANGUÍNEO DUFFY POR PCR EM TEMPO REAL

ALA Mafra, TF Silva, FMA Coury, AEN Lima,
GGs Rodrigues, PF Araújo, WR Mesquita,
LA Coelho, ECA Pinheiro, DFM Mühlbeier

Fundação Hemocentro de Brasília (FHB), Brasília,
DF, Brasil

Introdução: O sistema de grupo sanguíneo Duffy apresenta significado clínico e os anticorpos formados contra seus antígenos estão envolvidos em reações hemolíticas transfusionais e em casos de doença hemolítica do feto e do recém nascido. Os principais antígenos desse sistema são os antígenos Fy_a e Fy_b, codificados pelos alelos co-dominantes FY*A (FY*01) e FY*B (FY*02), que diferem por um único polimorfismo de nucleotídeo, c.125G>A. Os fenótipos expressos podem ser: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) e Fy(a-b-). O fenótipo Fy(a-b-) surge da homozigose para um alelo FY*B portador de uma mutação pontual c.-67T > C na região 5' não traduzida. Essa mutação dá origem ao alelo FY*BES (FY*02N.01), que prejudica a atividade do promotor em células eritróides ao interromper um sítio de ligação para o fator de transcrição eritróide GATA. Essa mutação impede a expressão do antígeno Fy_b apenas nas hemácias, mas não em outros tecidos. Para a definição correta dos fenótipos Fy_a e Fy_b, a partir da caracterização alélica dos genótipos FY*A e FY*B, a presença da mutação c.-67T>C deve sempre ser investigada. **Objetivo:** Padronizar a genotipagem para os alelos FY*A e FY*B e da mutação c.-67T>C por método de PCR em tempo real e elucidar a interpretação dos resultados em amostras de doadores de sangue da Fundação Hemocentro de Brasília. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas para o estudo amostras de doadores de sangue previamente fenotipados para os antígenos Fy_a e Fy_b, sendo 10 amostras de cada perfil fenotípico: Fy(a+b-), Fy(a-b+), Fy(a+b+) e Fy(a-b-). O DNA genômico foi extraído utilizando o Kit Biopur, conforme instruções do fabricante. Para a genotipagem, os primers e as sondas foram adquiridos em ensaios customizados, da Thermo Fisher Scientific, rs12075 e rs2814778, os quais detectam os polimorfismos de único nucleotídeo, Duffy (c.125 A>G) e GATA (c.-67T>C), respectivamente. As sondas foram marcadas pelos fluoróforos FAM e VIC para cada alelo. As reações em tempo real foram realizadas usando o QuantStudio™5 Real-Time PCR System, em volume de 10µL. Em cada reação foram adicionados 5µL de TaqPath™ ProAmp™ Master Mix (2X), 0,5 µL de TaqMan® SNP Genotyping Assay (20X), 3,5 µL de água nucleasse free e 1µL de DNA genômico 20ng/µL. As condições de ciclagem para as duas reações foram 40 ciclos de pré-leitura (ruído basal) 60°C por 30 segundo; desnaturação inicial/ativação da enzima 95°C por 5 minutos; desnaturação 95°C por 15 minutos; anelamento/extensão 60°C por 60 segundos e pós-leitura 60°C por 30 segundos. **Resultados e discussão:** O resultado de genotipagem do alelo FY*A em homozigose apresentou 100% de concordância com o fenótipo previamente cadastrado, enquanto que, a genotipagem do alelo FY*B, em homozigose ou heterozigose, apresentou resultados discrepantes com o fenótipo. Os resultados da genotipagem da mutação c.-67T>C, que caracteriza o alelo FY*BES, demonstrou que em todas as amostras, as quais apresentaram discrepância com o fenótipo, havia a presença da mutação c.-67T>C. A ocorrência dessa mutação interrompe a transcrição do alelo FY*B, e a não expressão do antígeno Fy_b nas hemácias, causando a discrepância entre genótipo e fenótipo. Ao ser analisado os dois ensaios em conjunto 06 genótipos puderam ser encontrados: 1. FY*A/FY*A; 2. FY*B/FY*B; 3. FY*A/FY*B; 4. FY*A/

FY*BES; 5. FY*B/FY*BES; 6. FY*BES/FY*BES. **Conclusão:** O ensaio de genotipagem dos alelos FY*A e FY*B e da mutação FY*BES por PCR em tempo real foram padronizados e, portanto, estão aptos para a realização da validação do método, utilizando amostras com resultados prévios de genotipagem para esses alelos. O uso desse ensaio na rotina laboratorial auxiliará na resolução de casos complexos e no aumento da segurança transfusional.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.800>

AVALIAÇÃO DE REAGENTES E TÉCNICAS NA DETECÇÃO DE VARIANTES RHCE NA ROTINA SOROLÓGICA

TAP Vendrame^a, GF Devides^a, FSA Silva^a,
F Latini^a, AJP Cortez^a, CP Armoni^a,
LM Castilho^b

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

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

Introdução: As variantes RhCE são mais frequentes em indivíduos afrodescentes e estão relacionadas principalmente com o alelo RHCE*ce, que codifica antígenos c e e parciais e pode silenciar antígenos de alta frequência, como os antígenos HrB e HrS, caracterizando um sangue raro, já que estes antígenos estão presentes em quase 100% da população. A identificação das variantes RhCE é realizada exclusivamente por técnicas de biologia molecular, entretanto os achados sorológicos, como a detecção da fraca expressão dos antígenos são importantes para reconhecer um antígeno variante e direcionar a investigação molecular. O objetivo deste trabalho foi investigar amostras de hemácias de doadores e pacientes com alteração fenotípica dos antígenos RhCE. **Metódos:** Quinze amostras de hemácias de doadores de sangue e 6 amostras de pacientes que apresentaram alteração na expressão fenotípica dos antígenos RhCE com antissoros monoclonais utilizados na rotina sorológica em tubo, gel e microplaca foram caracterizadas por biologia molecular através das técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento Sanger. Os clones utilizados para a fenotipagem dos antígenos RhCE foram: MS-24 e MS8011531019 (Anti-C), MS-33 e MS8011531019 (Anti-c), MS-260, MS-80, MS-906, MS-80 e MS-258 e MS80115310119 (Anti-E), MS-16, MS-21, MS-63 e MS80115310119 (Anti-e) dos fabricantes BioRad, Lorne, Fresenius, Immucor e Grifols. **Resultados:** A variante RHCE*ceJAL associada ao fenótipo c parcial foi encontrada em 2 amostras e reagiu apenas com o antissoro MS-33 (Biorad) enquanto que a mesma variante associada ao fenótipo e parcial foi encontrada em 4 amostras e apresentou diminuição na expressão com todos os antissoros monoclonais e técnicas utilizadas. O alelo RHCE*ceMO que codifica o fenótipo e parcial e c parcial foi encontrado em 2 amostras e ambas com reatividade reduzida nos testes em tubo mas com reatividade normal em gel teste com os clones dos antissoros anti-c e anti-e utilizados. A variante alélica RHCE*ceJU foi encontrada em uma amostra que apresentou fraca expressão do antígeno E com todos os

antissoros testados em tubo com exceção do clone MS-80 (Fresenius), que não apresentou reatividade. O alelo RHCE*ceAR associado aos fenótipos c-parcial e e-parcial encontrado em 4 amostras apresentou fraca expressão dos antígenos c parcial e e parcial com os clones MS-33 e MS-21, MS-16, MS-63 (Fresenius). O alelo RHCE*ceVS.01 (n=4) associado ao fenótipo e-parcial reagiu fracamente (2+) em 4 amostras apenas nos testes em tubo, enquanto que o mesmo alelo associado ao antígeno c parcial apresentou fraca expressão apenas com o clone MS-33 (BioRad e Fresenius) em uma amostra. O antígeno C parcial detectado em 3 amostras derivado do haplótipo (C)ceS apresentou fraca expressão com os clones MS-24 e MS80115310119 (Fresenius e Lorne respectivamente). **Conclusão:** Nossos resultados demonstram a importância do teste em tubo e da utilização de mais que um clone de antissoro monoclonal para detecção de variantes RhCE que apresentam fraca expressão na rotina sorológica e assim direcionar a investigação molecular. Esta prática pode ser útil no reconhecimento de um antígeno RhCE variante e na prevenção da aloimunização Rh em pacientes politransfundidos.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.801>

A GE:-13 (GECT-) HETEROZIGOUS AND GE:-14 (GEAR) HOMOZIGOUS PHENOTYPE DETECTED BY RANDOM SCREENING FOR GE:-2 BLOOD DONORS IN BRAZIL

MG Aravechia, TH Costa, HW Jesus, LD Santos,
MB Pereira, MF Sirianni, MDG Messias, CB Bub,
JM Kutner

Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo,
SP, Brazil

Aims: We report a rare case of GE:-13 and GE:-14 phenotype blood donor identified by random screening during blood bank routine. **Material and methods:** This is a descriptive work using immunohematology data from immunohematology reference laboratory (LRI) where samples were tested. **Case report:** A 29 year old blood donor, woman, self-declared as african american from the São Paulo city with no history of previous transfusions or pregnancies. Her blood was typed as O RhD+ (C-E+c+e+) and K- and the antibody screening was negative in gel cards. The phenotypes identified as Ge:-2,3 were confirmed by screening for GE:-2 blood group performed by hemagglutination in DG Gel cards using in house anti-Ge2 and others anti-Ge2 and anti-Ge3 from our inventory. Genomic DNA was isolated from donor whole blood and GE genotyping was performed by PCR-SSP techniques for analysis of exons 2, 3 and exon 4. The genetic variations that influence the expression of high-incidence antigens are deletions that involve exons 2, 3, 4 and the single nucleotide exchange (SNVs) in exons regions of the GYPC gene. These mutations, if not studied by molecular tests, may result in serological interpretation errors. Thus, sequencing by Sanger method of GE gene was performed and revealed a nucleotide change 59C>T (Pro20Leu in GPC) in Exon 2 in heterozygous and a nucleotide change 333A>C (non-coding) (Gly19Arg in GPD) in Exon 4 in homozygous state. No other nucleotide changes