

Eduardo Peres Bastos

**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ABO
E TESTE DE HEMOLISINA QUALITATIVO NA REDUÇÃO DO RISCO DE
HEMÓLISE PASSIVA ASSOCIADA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert
Einstein para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

São Paulo

2020

Eduardo Peres Bastos

**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ABO
E TESTE DE HEMOLISINA QUALITATIVO NA REDUÇÃO DO RISCO DE
HEMÓLISE PASSIVA ASSOCIADA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jose Mauro Kutner

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Bonet
Bub

São Paulo

2020

B327c

Bastos, Eduardo Peres

Comparação das técnicas de titulação de anticorpos ABO e teste de hemolisina qualitativo na redução do risco de hemólise passiva associada à transfusão de plaquetas / Eduardo Peres Bastos. -- São Paulo, 2020.
viii, 31 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Anti-A and anti-B with critical IgM and IgG titers of 64 correlate to safe ABO-minor incompatible platelet transfusion practice.*

1. Plaquetas. 2. Soro. 3. Proteínas hemolisinas. 4. Imunoglobulinas. 5. Hemocomponentes.

NLM – WH 300

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Eduardo Peres Bastos

**COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ABO E
TESTE DE HEMOLISINA QUALITATIVO NA REDUÇÃO DO RISCO DE
HEMÓLISE PASSIVA ASSOCIADA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS**

Presidente da banca: Prof. Dr. Jose Mauro Kutner

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho

Prof. Dr. Ricardo Weinlich

Prof. Dr. José Eduardo Levi

Membros suplentes:

Profa. Dra. Andreza Alice Feitosa

Profa. Dra. Luciana Cavaleiro Marti

Aprovada em: 10/02/2020.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jose Mauro Kutner, por acreditar em mim, pela orientação prestada, pelo incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Carolina Bonet Bub, pela paciência, disponibilidade e orientação prestada. Seus conselhos e sugestões contribuíram para o meu crescimento profissional e para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

A todos os colaboradores do Serviço de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein em especial ao Setor de Imunohematologia.

A minha coordenadora Maria Giselda Aravechia por possibilitar a realização do estudo.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Lista de tabelas	vii
Resumo	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	4
2 MÉTODOS	6
2.1 Sujeitos.....	6
2.1.1 Amostras de soro e plasma de doadores de sangue	6
2.1.2 Aspectos éticos da pesquisa	6
2.1.3 Forma de análise e estatística dos resultados.....	7
2.1.4 Riscos e benefícios	7
2.1.4.1 Riscos.....	7
2.1.4.2 Benefícios.....	8
2.1.5 Desenho do estudo.....	8
2.1.6 Titulação de anticorpos anti-A e anti-B classe IgM.....	8
2.1.7 Titulação de anticorpos anti-A e anti-B classe IgG	9
2.1.8 Teste qualitativo de hemolisina	9
2.1.9 Determinação das subclasses de IgG	10
3 RESULTADOS	11
4 DISCUSSÃO	19
5 CONCLUSÕES	23
6 ANEXOS.....	24
7 REFERÊNCIAS	30
Abstract	
Bibliografia consultada	

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades biológicas de subclasses de IgG	3
Tabela 2. Dados demográficos.....	11
Tabela 3. Associação entre título de anti-A do hemocomponente com título de anti-A da amostra.....	12
Tabela 4. Associação entre título de anti-B do hemocomponente com título de anti-B da amostra.....	12
Tabela 5. Associação entre título de anti-A IgM/IgG com teste de anti-A de hemolisina	12
Tabela 6. Associação entre título de anti-B IgM/IgG com teste de anti-B de hemolisina	13
Tabela 7. Associação entre título anti-A IgG com título de anti-A em temperatura ambiente	13
Tabela 8. Associação entre título anti-B IgG com título de anti-B em temperatura ambiente	13
Tabela 9. Associação entre título de anti-A IgM/IgG com teste de anti-A de hemolisina (Negativo/Parcial - Total)	14
Tabela 10. Associação entre título de anti-B IgM/IgG com teste de anti-B de hemolisina (Negativo/Parcial - Total)	14
Tabela 11. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com teste de anti-A de hemolisina	15
Tabela 12. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com teste de anti-B de hemolisina	15
Tabela 13. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com título de anti-A IgM	16
Tabela 14. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2 IgG3, IgG4) com título de anti-B IgM.....	17
Tabela 15. Associação categorias IgG de anti-A e teste de hemolisina IgG3, IgG4) com título de anti-A IgM.....	18
Tabela 16. Associação categorias IgG de anti-B e teste de hemolisina IgG3, IgG4) com título de anti-B IgM.....	18
Tabela 17. Título de IgG anti-A e título de IgG anti-B (sensibilidade, especificidade e acurácia)	18

Resumo

Introdução: A transfusão de plaquetas incompatível com ABO-menor tem sido uma prática comum quando plaquetas idênticas a ABO não estão disponíveis, mas pode causar hemólise aguda e eficácia reduzida. Uma das estratégias usadas para reduzir o risco de hemólise devido a transfusões de plaquetas com incompatibilidade ABO menor é realizar um teste de triagem para identificar doadores do grupo O com altos títulos de anti-A e anti-B. No entanto, os títulos críticos de IgM e IgG e outros fatores de risco para eliminar o risco de hemólise ainda não estão claros. **Objetivos:** Avaliar e comparar o teste de titulação de anticorpos IgM e IgG ABO e o teste da hemolisina em soro de doadores do grupo O e em seus hemocomponentes de plaquetas como possíveis indicadores de hemólise *in vivo*. Pretendemos também identificar a subclasse de anti-A e anti-B IgG (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) desses doadores para caracterizar os anticorpos envolvidos nas reações hemolíticas. **Métodos:** Foram analisadas 151 amostras de doadores de plaquetas por aférese do grupo O provenientes do Banco de Sangue do Hospital Israelita Albert Einstein. A titulação de anticorpos IgM anti-A e Anti-B foram realizados por técnica automatizada em gel à temperatura ambiente na amostra soro do doador e no plasma do hemocomponente. Nos testes de titulação de anticorpos IgG anti-A e anti-B, o soro foi tratado com Ditiotretol 0,01M (DTT) em técnica por aglutinação automática em gel a 37°C. Foi considerada uma diluição de 1:64 como ponto de corte para IgM e IgG. O teste qualitativo de hemolisina foi realizado em tubo, adicionando soro AB fresco como fonte de complemento, com incubação a 37°C por 60 minutos. Os anticorpos monoclonais IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foram utilizados para determinar as subclasses de IgG por aglutinação em gel. **Resultados:** Foi demonstrada associação entre títulos de IgM anti-A e anti-B ($p < 0,001$). As subclasses de IgG1 e IgG3 foram associadas à hemólise total e títulos acima de 64, enquanto IgG2 e IgG4 foram associadas à ausência de hemólise e títulos abaixo de 64 ($p < 0,001$). **Conclusões:** Nossos dados sugerem que, se considerarmos 64 como título crítico, poderíamos usar um único método de IgM anti-A e anti-B como um teste de triagem para evitar reações transfusionais. Essa pode ser uma abordagem segura e econômica para gerenciar transfusões de plaquetas incompatíveis com ABO.

Descritores: Plaquetas; Soro; Proteínas hemolisinas; Imunoglobulinas; Hemocomponentes

1 INTRODUÇÃO

A busca pela segurança transfusional tem sido reforçada, nos últimos anos, especialmente com relação a compatibilidade transfusional entre doadores e receptores de sangue. Como plasma contém anticorpos anti-A e anti-B de ocorrência natural dirigidos a antígenos A e B, não somente transfusões de hemácias ABO incompatíveis têm sido evitadas, mas também as transfusões de plasma com incompatibilidade menor (anticorpos anti-A e anti-B presente no plasma dos hemocomponentes contra os antígenos A e B do receptor) devido aos sérios e graves problemas decorrentes da hemólise.⁽¹⁾ Além disso, sabe-se que plaquetas expressam antígenos ABO na sua superfície e, portanto o procedimento ideal é que os pacientes recebam plaquetas ABO isogrupo pois a transfusão de plaquetas com incompatibilidade maior (antígenos A e B presente no plasma dos hemocomponentes contra os anticorpos anti-A e anti-B do receptor) pode diminuir o incremento após transfusões ABO incompatíveis.⁽²⁾ No entanto, devido ao estoque limitado de plaquetas (o tempo de validade da plaqueta no estoque é de 5 dias), alguns pacientes adultos ainda são transfundidos com plaquetas ABO não isogrupo. A literatura apresenta uma grande diversidade na abordagem das transfusões de plaquetas ABO incompatíveis: os serviços que transfundem plaquetaférese, 54% indicam selecionariam componentes com incompatibilidade ABO menor, enquanto 29,9% selecionariam qualquer plaqueta disponível. Se plaquetas com incompatibilidade ABO menor fossem selecionadas, 48,1% dos entrevistados tomariam nenhuma ação adicional, enquanto 37,7% selecionariam plaquetas com isohemaglutininas de baixo título.⁽³⁾ Na rotina transfusional do Banco de Sangue do Hospital Israelita Albert Einstein, são realizadas em média 8,20% de transfusões de plaquetas com incompatibilidade ABO menor, sendo doador do grupo O e paciente A,B ou AB.

Estratégias para reduzir o risco de reações transfusionais hemolíticas, associadas à transfusão de plaquetas ABO incompatíveis, incluem redução no volume do plasma em concentrado de plaquetas e pesquisa de altos títulos de isohemaglutininas ABO em doadores de sangue. No entanto, nenhum destes métodos parece eliminar o risco de hemólise passiva.⁽⁴⁾

A redução do risco de reações hemolíticas devido a transfusões de plasma ABO incompatível tem sido uma área de interesse crescente. As normas da

Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB)⁽⁵⁾ preconizam que "o serviço de transfusão deve ter uma política para transfusão de componentes que contêm quantidades de anticorpos eritrocitários inesperados". Alguns países europeus já possuem políticas definidas para prevenir reações hemolíticas de transfusões de plasma ABO incompatível. A legislação brasileira, através da portaria n. 158 (4 de fevereiro de 2016)⁽⁶⁾ exige uma análise de isohemaglutinina anti-A e anti-B do doador para liberação de hemocomponentes de plaquetas, se incompatível. Recomenda-se que a análise das isohemaglutininas possa ser realizada através do teste qualitativo (teste de hemolisina).

A titulação de isohemaglutinina ABO no soro de doadores do grupo O tem sido utilizada como uma estratégia para identificar potenciais doadores de risco, mas ainda não existe um método padrão para sua realização. Alguns laboratórios utilizam a técnica em tubo, outros utilizam gel centrifugação, fase sólida ou até mesmo citometria de fluxo. Esta padronização depende muito dos métodos utilizados ou mesmo da automação de cada laboratório. Além disto, a determinação do título crítico de isohemaglutininas que permite selecionar o hemocomponente a ser transfundido e evitar o risco de hemólise ainda não está bem estabelecida.⁽⁷⁾

Outro teste recomendado, e que tem sido utilizado para identificar doadores "O perigosos", é o teste da hemolisina que utiliza soro fresco e avalia a capacidade hemolítica do anticorpo "*in vitro*". Este teste apresenta uma interpretação funcional do anticorpo e seu resultado pode ser: hemólise negativa, hemólise parcial e hemólise total. O teste é mais difícil de ser implementado na rotina por depender da disponibilidade de soro fresco ou de uma fonte de complemento adicional.

A correlação entre os títulos de anticorpos ABO com os resultados do teste de hemolisina parece não estar bem clara (não necessariamente o maior título de isohemaglutinina representa teste de hemolisina com hemólise total).^(8,9) A intenção de entender essa correlação é valiosa para que se possa estabelecer um programa universal de *screening* de plaquetas do grupo O e então reduzir as variações interlaboratoriais. Não é de conhecimento dos pesquisadores desse estudo a descrição na literatura de dados referentes a análise de subclasses de IgG das isohemaglutininas. Sendo assim, aventamos a hipótese de que essa correlação entre os títulos de anticorpos ABO e hemolisina não ocorre associado somente ao aspecto quantitativo do título, mas também associado a subclasse de IgG presente no soro do doador (IgG1 e IgG3 estariam mais associados ao risco de hemólise passiva).

As subclasses também têm variações eletroforética e em propriedades biológicas como a capacidade de fixar complemento (Tabela 1).⁽¹⁰⁾

Tabela 1. Propriedades biológicas de subclasses de IgG

Característica	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Proporção de IgG sérica total (%)	65-70	23-28	4-7	3-4r
Fixação do complemento	Moderada	Leve	Forte	Ausente
Ligação a receptores de macrófagos Fc	Forte	Moderada	Forte	Fraca
Habilidade de cruzar a placenta	Leve	Fraca	Leve	Leve

Fc: ligação a receptores de macrófagos fragmento cristalizável.

As reações transfusionais hemolíticas agudas (RTHA) ocorrem com mais frequência com doadores de plaquetas do grupo O em pacientes do grupo A. Anticorpos passivos ABO podem também ocorrer na transfusão de sangue total que geralmente resulta em teste direto da antiglobulina positivo. Os hemocomponentes plaquetários que não pertencem ao grupo O raramente estão associados a RTHA.⁽³⁾ No Reino Unido, todas as doações de sangue são submetidas a testes de titulação IgM de anti-A e aquelas com títulos >100 são transfundidas em pacientes do grupo O. A maioria dos serviços de hemoterapia nos EUA não realiza o teste de títulos de iso-hemaglutinina (IgM ou IgG) antes da transfusão de plaquetas ou plasma incompatíveis ABO, embora essa prática esteja se tornando mais utilizada. É amplamente utilizado uma “nota de corte” de 100 para anti-A/B IgM reativos em temperatura ambiente. Foi demonstrada a correlação direta entre queda de hemoglobulina e aumento dos títulos anti-A/B: maior diminuição no valor de hemoglobulina foi observado quando os títulos aumentaram de indetectável ou estavam acima de 512.⁽¹¹⁾ Assim, produtos com alto títulos devem ser transfundidos em pacientes ABO compatíveis. A probabilidade de hemólise depende da classe e subclasse do anticorpo, a temperatura em que esse anticorpo pode fixar o complemento, o número de hemácias transfundidas (ou volume de plasma incompatível transfundido), densidade do antígeno correspondente nas hemácias e eficiência do sistema complemento. Na maioria das RTHA estão envolvidos anticorpos com uma mistura de IgM e IgG. A IgM pode ligar-se a C1q e iniciar a cascata do complemento, levando a formação do complexo de ataque à membrana e à lise eritrocitária. Alguns anticorpos IgG também podem fixar complemento com eficiência e geralmente são das subclasses IgG1 e IgG3, podendo causar RTHA leves a fatais. A hemólise intravascular resulta na liberação de hemoglobina livre. A hemoglobina livre liga-se ao óxido nítrico (NO) a uma taxa 1000 vezes maior que a dos

glóbulos vermelhos. A eliminação da hemoglobina leva à diminuição da biodisponibilidade do NO e, portanto, à vasoconstrição e alterações na resposta capilar à hipóxia.⁽¹¹⁾

Hemólise clinicamente significativa é uma complicação rara, mas potencialmente grave nestas situações. O risco de uma reação transfusional hemolítica devido à transfusão passiva de anticorpos anti-A e/ou anti-B varia amplamente de 1:2.000 a 1:46.176. Além disso, enquanto altos títulos de anti-A e anti-B devem logicamente estar mais fortemente associados ao desenvolvimento de sintomas do que títulos mais baixos, há relatos de casos de adultos que desenvolvem hemólise devido a transfusão de plaquetas por aférese incompatível com plasma com títulos menores do que 128.^(8,12) Plaquetas do grupo O são as mais implicadas nestas reações que ocorrem devido a presença de altos títulos de anti-A e anti-B no soro de alguns doadores. Alguns estudos demonstraram que entre 10% e 40% dos doadores de sangue do grupo O tem altos títulos de anti-A e anti-B IgM e IgG e também hemolisinas anti-A e anti-B com grande capacidade hemolítica.^(2,13) No entanto, o risco de uma reação transfusional hemolítica por transfusão passiva de anticorpos anti-A e/ou anti-B varia muito. Essas reações são provavelmente raras devido a capacidade que o organismo tem para diluir os anticorpos ABO serem incompatíveis, pois os antígenos A e B são encontrados em secreções, vários tecidos epiteliais e em outras proteínas do plasma^(2,7) Apesar de anticorpos ABO da classe IgM estarem mais envolvidos nestas reações transfusionais, anticorpos da classe IgG também foram relatados associados a hemólise grave.^(14,15)

1.1 Objetivos

1. Avaliar e comparar o teste de titulação de anticorpos ABO em soro de doadores do grupo O e em seus hemocomponentes de plaquetas como indicadores de hemólise;
2. Avaliar e comparar o teste da hemolisina em soro de doadores do grupo O como indicadores de hemólise;
3. Comparar os resultados obtidos do teste de titulação de anticorpos ABO da classe IgM e IgG com o teste qualitativo de hemolisina, em soro e hemocomponentes de plaquetas de doadores do grupo O e comparar os resultados do

título de anticorpos ABO da classe IgM e IgG identificados nas amostras de soro dos doadores com os resultados obtidos nos hemocomponentes de plaquetas produzidos das suas respectivas doações;

4. Classificar as subclasses das imunoglobulinas IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) nas amostras de soro tratadas com Dithiothreitol 0,01M para os doadores avaliados.

2 MÉTODOS

2.1 Sujeitos

2.1.1 Amostras de soro e plasma de doadores de sangue

Foram utilizadas amostras de plasma e soro de 151 doadores (gênero feminino e masculino) de plaquetas colhidas por aférese do grupo O já coletadas para rotina imunohematológica. Além desse procedimento, foram utilizadas também amostras de plasmas dos hemocomponentes de plaquetas produzidas pelo Serviço de Hemoterapia e Terapia Celular do HIAE provenientes desses doadores e disponíveis no estoque a serem transfundidos.

2.1.2 Aspectos éticos da pesquisa

Doadores de plaquetas foram selecionados para o estudo. Os doadores foram informados sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, assegurando-lhes o direito de participarem ou não da mesma, sem constrangimento ou modificação de sua assistência.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (CAAE: 78853917.1.0000.0071).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi apresentado pelo pesquisador responsável ou indivíduo indicado para que o possível voluntário leia (ou lhe será lido), e, após concordar em participar, foi assinado e recebeu uma cópia do mesmo. Todo este procedimento foi realizado no primeiro contato do doador com o pesquisador. Os voluntários tiveram, assim, uma total liberdade de abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Durante todo o processo de análise dos dados, a identificação nominal das pacientes foi substituída pelo número do caso correspondente, assegurando o direito do sigilo pré-estabelecido na Declaração de Helsinki, 1986 e nas determinações do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 466/12 e suas

complementares). Os responsáveis pela pesquisa garantiram a não utilização do material e dos dados obtidos nesta pesquisa em qualquer outro projeto de pesquisa, bem como o descarte de todo material biológico ao final deste estudo.

O pesquisador responsável aceita as responsabilidades pela condução científica do projeto.

2.1.3 Forma de análise e estatística dos resultados

O tamanho amostral de 151 doadores foi calculado de acordo com o cálculo de tamanho de amostra considerando uma prevalência de 25% de doadores com hemolisina (teste de referência) positiva (total ou parcial), considerando uma margem de erro de 6%.

Os resultados foram apresentados de forma descritiva em relação aos dados demográficos dos doadores e aos testes de titulação e hemolisina encontrados.

Os testes de titulação de anticorpos ABO e hemolisina foram analisados através de cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, acurácia, a concordância será avaliada através do coeficiente kappa.

2.1.4 Riscos e benefícios

2.1.4.1 Riscos

O estudo proposto apresentou riscos mínimos, devido a natureza observacional e não intervencionista do mesmo. Os riscos inerentes a perda de confidencialidade dos dados foram assegurados pelos pesquisadores que garantem o sigilo na análise destes.

2.1.4.2 Benefícios

Através da análise comparativa dos testes de hemolisina e titulação de isohemaglutininas ao identificarmos o título crítico ou o melhor teste para detectar anticorpos ABO “perigosos”, foi possível estabelecer uma estratégia laboratorial segura que possibilitou eliminar o risco de hemólise passiva em transfusões de plaquetas ABO incompatíveis.

2.1.5 Desenho do estudo

O presente estudo foi realizado no laboratório de Imunohematologia do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do HIAE após aprovação do comitê de ética local.

Os doadores foram selecionados de forma prospectiva contínua e que aceitaram participar do estudo. De acordo com avaliação estatística, onde apresentou resultados significantes, foi decidido um número total de 151 doadores.

Na primeira fase, foram realizados testes de rotina imunohematológica e dos hemocomponentes de plaquetas do grupo O para realização da titulação de anticorpos ABO da classe IgM e IgG e para realização do teste qualitativo de hemolisina.

As amostras foram congeladas para que na segunda fase fossem classificadas as subclasses de IgG de todos os doadores avaliados.

2.1.6 Titulação de anticorpos anti-A e anti-B classe IgM

Os testes de titulação de anticorpos anti-A e anti-B da classe IgM foram realizados no plasma e soro por aglutinação a temperatura ambiente (TA). Foram separadas cerca de 1mL de amostra de soro e 1mL de amostra de plasma dos respectivos doadores e inseridos no equipamento automático (Wadiana – Diagnostic Grifols, Barcelona, Espanha) juntamente com seus reagentes/hemácias. O equipamento dispensou cerca de 50µL das hemácias em cada microtubo dos cartões DG Gel NaCl (Wadiana – Diagnostic Grifols, Barcelona, Espanha) e realizou uma

diluição de 1:64 no soro/plasma dos doadores [10µL do soro/plasma + 640µL do DG Gel Sol (Wadiana – Diagnostic Grifols, Barcelona, Espanha)]. Ocorreu uma dispensação de 50µL dessa diluição nos respectivos microtubos do cartão DG Gel NaCl onde foram dispensados as hemácias A₁ e B. Após a dispensação e centrifugação do cartão pelo equipamento, o mesmo liberou os resultados como maior que 64 (1+ até 4+) ou menor que 64 [0, *weak* (+)].

2.1.7 Titulação de anticorpos anti-A e anti-B classe IgG

Para os testes de titulação de anticorpos anti-A e anti-B da classe IgG foi realizado um tratamento da amostra de soro com Dithiothreitol (DTT) 0,01M para destruição dos anticorpos da classe IgM rompendo as pontes de dissulfeto. Os testes de titulação de anticorpos anti-A e anti-B da classe IgG foram realizados por aglutinação a temperatura de 37°C após tratamento ou não do soro com Dithiothreitol (DTT) 0,01M em equipamento automático (Wadiana – Grifols) adotando uma nota de corte de diluição de 64. Foram separadas cerca de 1mL de amostra de soro tratada com DTT 0,01M dos respectivos doadores e inseridos no equipamento automático (Wadiana-Grifols) juntamente com seus reagentes/hemácias. O equipamento dispensou cerca de 50µL das hemácias em cada microtubo dos cartões DG Gel Liss e realizou uma diluição de 1:64 no soro dos doadores (10µL do soro + 640µL do DG Gel Sol). Ocorreu uma dispensação de 50µL dessa diluição nos respectivos microtubos do cartão DG Gel Liss onde foram dispensados as hemácias A₁ e B. Após a dispensação e centrifugação do cartão pelo equipamento, o mesmo liberou os resultados como maior que 64 (1+ até 4+) ou menor que 64 [0, *weak* (+)].

2.1.8 Teste qualitativo de hemolisina

O teste qualitativo de hemolisina foi realizado na metodologia em tubo realizando um preparo da suspensão a 3% do pool de hemácias A₁ e B. Posterior a esse processo, ocorreu uma dispensação de 100µL do anticorpo anti-A e anti-B no seu respectivo tubo e foi adicionado à amostra soro AB fresco (100µL) como fonte de complemento e incubados a 37°C por 60 minutos. Os resultados obtidos foram

classificados em Hemólise Total (Vermelho), Hemólise Parcial (Rosea) ou Ausência de Hemólise (Límpido). Todos os testes foram acompanhados dos seus devidos controles positivos e negativos.

2.1.9 Determinação das subclasses de IgG

Anticorpos anti-A e anti-B da classe IgG detectados foram classificados de acordo com a subclasse. Utilizamos anticorpos anti-IgG1, anti-IgG2, anti-IgG3 e anti-IgG4 obtidos da Sigma. Após padronização da melhor diluição dos anticorpos realizamos a identificação das subclasses pela técnica indireta da AGH em gel utilizando-se cartões neutros impregnados com os anticorpos específicos de cada subclasse adicionando em cada microtubo o anti-A e anti-B com sua respectiva hemácia.

A padronização da técnica foi realizada no setor de Imuno-Hematologia do Serviço de Hemoterapia do Hospital Israelita Albert Einstein seguindo o seguinte procedimento:

- Identificar um título de isohemaglutinina de anti-A e anti-B onde apresente um resultado positivo na leitura em AGH e negativo a temperatura ambiente na técnica em tubo pós-tratamento das amostras com DTT;
- Realizar a diluição dos monoclonais IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 de acordo com sua padronização do laboratório e posterior impregnação dos mesmos nos cartões neutros centrifugando por 10 minutos a uma rotação de 3500-rpm;
- Adicionar ao cartão neutro impregnado com as subclasses 50µL das respectivas hemácias em suspensão mais 25µL do soro da plaqueta diluída e tratada com DTT;
- Realizar uma incubação por 15 minutos a 37°C, centrifugar o cartão por 10 minutos a uma rotação de 3500-rpm e realizar a leitura.

3 RESULTADOS

Nesse estudo foram realizados testes em 151 amostras de doadores de plaquetas sendo 9 do sexo feminino e 142 do sexo masculino. As idades variaram entre 19 e 70 anos com as seguintes etnias: 96 brancas, 12 amarelas, 42 pardas e 1 afrodescendente (Tabela 2). O volume médio de anticoagulante utilizado nesses hemocomponentes foi de 60mL para plaquetas duplas e 30mL para plaquetas simples.

Tabela 2. Dados demográficos

Variável	Descrição (N=151)
Sexo, n (%)	
Feminino	9 (6)
Masculino	142 (94)
Etnia, n (%)	
Caucasiana	96 (63,6)
Parda	42 (27,8)
Afrodescendente	1 (0,7)
Asiática	12 (7,9)
Idade (anos)	
Média ± DP	41,6 ± 11,4
Mediana (mín.; máx.)	41 (19; 70)
Volume do Hemocomponente (mL)	
Média ± DP	345,3 ± 115,3
Mediana (mín.; máx.)	250 (135; 579)

Na tabela 3, associamos os títulos de anti-A do hemocomponente com os títulos de anti-A da amostra. Obtivemos 48,3% de títulos menores que 64 nos hemocomponentes e nas amostras de soro/plasma e 24,5% de títulos maiores que 64 nos hemocomponentes e nas amostras. Na tabela 4 associamos o título de anti-B do hemocomponente com o título de anti-B da amostra. Obtivemos 57% de títulos menores que 64 nos hemocomponentes e nas amostras e 20,5% de títulos maiores que 64 nos hemocomponentes e nas amostras. De acordo com os resultados encontrados foi identificada uma associação entre título de anti-A e anti-B dos hemocomponentes com título de anti-A e anti-B das amostras de sor/plasma ($p < 0,001$).

Tabela 3. Associação entre título de anti-A do hemocomponente com título de anti-A da amostra

Título de anti-A do hemocomponente	Título de anti-A da amostra		Total n (%)	Valor-p
	≤64 n (%)	>64 n (%)		
≤64	73 (48,3)	41 (27,2)	114 (75,5)	<0,001
>64	0 (0)	37 (24,5)	37 (24,5)	
Total	73 (48,3)	78 (51,7)	151 (100)	

Teste McNemar.

Tabela 4. Associação entre título de anti-B do hemocomponente com título de anti-B da amostra

Título de anti-B do hemocomponente	Título de anti-B da amostra		Total n (%)	Valor-p
	≤64 n (%)	>64 n (%)		
≤64	86 (57)	34 (22,5)	120 (79,5)	<0,001
>64	0 (0)	31 (20,5)	31 (20,5)	
Total	86 (57)	65 (43)	151 (100)	

Teste McNemar.

Na tabela 5, associamos o título de anti-A IgM/IgG com teste de hemolisina anti-A, obtivemos 66,7% títulos maiores que 64 de anticorpos IgM e hemolisina total e 45,7% títulos maiores que 64 de IgG e hemolisina total. Na tabela 6, associamos o título de anti-B IgM/IgG com teste de hemolisina anti-B, obtivemos 38,5% títulos maiores que 64 de anticorpos IgM e hemolisina total e 25,0% títulos maiores que 64 de IgG e hemolisina total. A associação dos títulos de IgM de anti-A e anti-B com teste de hemolisina ($p < 0,001$).

Tabela 5. Associação entre título de anti-A IgM/IgG com teste de anti-A de hemolisina

Anticorpo	Hemolisina anti-A			Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Parcial n (%)	Total n (%)		
Título IgM					<0,001
≤64	29 (39,7)	28 (38,4)	16 (21,9)	73	
>64	13 (16,7)	13 (16,7)	52 (66,7)	78	
Título IgG					0,805
≤64	8 (32,3)	6 (25,0)	10 (41,7)	24	
>64	34 (26,8)	35 (27,6)	58 (45,7)	127	
Total	42 (27,8)	41 (27,2)	68 (45)	151	

Teste qui-quadrado. #Teste da razão de verossimilhanças.

Tabela 6. Associação entre título de anti-B IgM/IgG com teste de anti-B de hemolisina

Anticorpo	Hemolisina anti-B			Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Parcial n (%)	Total n (%)		
TA*					<0,001
≤64	62 (72,1)	13 (15,1)	11 (12,8)	86	
>64	20 (30,8)	20 (30,8)	25 (38,5)	65	0,728
DTT**					
≤64	30 (58,8)	10 (19,6)	11 (21,6)	51	
>64	52 (52,0)	23 (23,0)	25 (25,0)	100	
Total	82 (54,3)	33 (21,9)	36	151	

Teste qui-quadrado. #Teste da razão de verossimilhanças. *Temperatura ambiente.

**Ditheiouthreitol.

Na tabela 7 associamos o título de anti-A IgG com o título de anti-A IgM, onde foi observado n=73 (57,5%) títulos maiores que 64 para IgG e IgM. Na tabela 8 associamos o título de anti-B IgG com o título de anti-B IgM, onde foi observado n=53 (53,5%) títulos maiores que 64 para IgG e IgM. A associação entre o título de IgM de anti-A e anti-B com o título de IgG de anti-A e anti-B o foi significativa (p=0,001).

Tabela 7. Associação entre título anti-A IgG com título de anti-A em temperatura ambiente

Variável	Título de anti-A da amostra em temperatura ambiente		Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		
Título de anti-A IgG				0,001
Negativo	19 (79,2)	5 (20,8)	24	
Positivo	54 (42,5)	73 (57,5)	127	
Total	73 (48,3)	78 (51,7)	151	

Teste qui-quadrado.

Tabela 8. Associação entre título anti-B IgG com título de anti-B em temperatura ambiente

Variável	Título de anti-B da amostra em temperatura ambiente		Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)		
Título de anti-B IgG				0,001
Negativo	39 (76,5)	12 (23,5)	51	
Positivo	47 (47)	53 (53)	100	
Total	86 (57)	65 (43)	151	

Teste qui-quadrado.

O teste de titulação de anti-A IgM quando associado a hemolisina anti-A (Negativo/Parcial e Total) apresentou uma sensibilidade de 76,5% (VPP=66,7),

uma especificidade de 68,7% (VPN=78,1) e acurácia de 72,2%. O teste de titulação de anti-A IgG quando associado a hemolisina anti-A (Negativo/Parcial e Total) apresentou uma sensibilidade de 85,3% (VPP=45,7), uma especificidade de 16,9% (VPN=58,3) e acurácia de 47,7% (Tabela 9).

Tabela 9. Associação entre título de anti-A IgM/IgG com teste de anti-A de hemolisina (Negativo/Parcial - Total)

Anticorpo	Hemolisina anti-A		Total n (%)	Sens.	Espec.	VPP	VPN	Acurácia
	Negativo/ Parcial n (%)	Total n (%)						
Título anti-A TA				76,5	68,7	67	78,1	72,2
≤64	57 (37,7)	16 (10,6)	73 (48,3)					
>64	26 (17,2)	52 (34,4)	78 (51,7)					
Total	83 (55)	68 (45)	151 (100)					
Título anti-A IgG				85,3	16,9	46	58,3	47,7
≤64	14 (9,3)	10 (6,6)	24 (15,9)					
>64	69 (45,7)	58 (38,4)	127 (84,1)					
Total	83 (55)	68 (45)	151 (100)					

Sens.: sensibilidade; Espec.: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

O teste de titulação de anti-B IgM, quando associado a Hemolisina anti-B (Negativo/Parcial e Total), apresentou uma sensibilidade de 69,4% (VPP=38,5), especificidade de 65,2% (VPN=87,2) e acurácia de 66,2%. O teste de titulação de anti-B IgG, quando associado a hemolisina anti-A (Negativo/Parcial e Total), apresentou uma sensibilidade 69,4% (VPP=25,0), especificidade de 34,8% (VPN=78,4) e acurácia de 43% (Tabela 10).

Tabela 10. Associação entre título de anti-B IgM/IgG com teste de anti-B de hemolisina (Negativo/Parcial - Total)

Anticorpo	Hemolisina anti-B		Total n (%)	Sens.	Espec.	VPP	VPN	Acurácia
	Negativo/ Parcial n (%)	Total n (%)						
Título anti-B TA				69,4	65,2	39	87,2	66,2
≤64	75 (49,7)	11 (7,3)	86 (57)					
>64	40 (26,5)	25 (16,6)	65 (43)					
Total	115 (76,2)	36 (23,8)	151 (100)					
Título anti-B IgG				69,4	34,8	25	78,4	43
≤64	40 (26,5)	11 (7,3)	51 (33,8)					
>64	75 (49,7)	25 (16,6)	100 (66,2)					
Total	115 (76,2)	36 (23,8)	151 (100)					

Sens.: sensibilidade; Espec.: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Na tabela 11 associamos as subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com o teste de anti-A hemolisina, onde o resultado mostra um n=62 (88,6%) para IgG1 e hemolisina total, n=36 (54,5%) para IgG2 e hemolisina negativa, n=21 (77,8%) para IgG3 e hemolisina total e n=33 (24,8%) para IgG4 e hemolisina negativa. Na tabela 12 associamos as subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com o teste de anti-B hemolisina, onde o resultado mostra um n=25 (83,3%) para IgG1 e hemolisina total, n=56 (75,7%) para IgG2 e hemolisina negativa, n=16 (69,6%) para IgG3 e hemolisina total e n=51 (47,2%) para IgG4 e hemolisina negativa.

Tabela 11. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com teste de anti-A de hemolisina

Anticorpo	Hemolisina anti-A			Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Parcial n (%)	Total n (%)		
IgG1					<0,001
Negativo	39 (48,1)	36 (44,4)	6 (7,4)	81	
Positivo	3 (4,3)	5 (7,1)	62 (88,6)	70	
IgG2					<0,001
Negativo	6 (7,1)	13 (15,3)	66 (77,6)	85	
Positivo	36 (54,5)	28 (42,4)	2 (3,0)	66	
IgG3					<0,001
Negativo	41 (33,1)	36 (29,0)	47 (37,9)	124	
Positivo	1 (3,7)	5 (18,5)	21 (77,8)	27	
IgG4					<0,001#
Negativo	33 (24,8)	33 (24,8)	67 (50,4)	133	
Positivo	9 (50,0)	8 (44,4)	1 (5,6)	18	
Total	42 (27,8)	41 (27,2)	68 (45,0)	151	

Teste qui-quadrado; # Teste da razão de verossimilhanças.

Tabela 12. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com teste de anti-B de hemolisina

Anticorpo	Hemolisina anti-B			Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Parcial n (%)	Total n (%)		
IgG1					<0,001
Negativo	81 (66,9)	29 (24,0)	11 (9,1)	121	
Positivo	1 (3,3)	4 (13,3)	25 (83,3)	30	
IgG2					<0,001
Negativo	26 (33,8)	16 (20,8)	35 (45,5)	77	
Positivo	56 (75,7)	17 (23,0)	1 (1,4)	74	
IgG3					<0,001

continua...

...continuação

Negativo	80 (62,5)	28 (21,9)	20 (15,6)	128	
Positivo	2 (8,7)	5 (21,7)	16 (69,6)	23	
IgG4					<0,001
Negativo	51 (47,2)	21 (19,4)	36 (33,3)	108	
Positivo	31 (72,1)	12 (27,9)	0 (0,0)	43	
Total	82 (54,3)	33 (21,9)	36 (23,8)	151	

Teste qui-quadrado; # Teste da razão de verossimilhanças.

Na tabela 13 associamos as subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com o teste de titulação de anti-A IgM, onde o resultado obtido foi um n=48 (68,6%) para IgG1 e títulos maiores que 64, n=44 (66,7%) para IgG2 e títulos menores que 64, n=19 (70,4%) para IgG3 e títulos maiores 64 e n=10 (55,6%) para IgG4 e títulos menores que 64. Na tabela 14 associamos as subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com o teste de titulação de anti-B IgM, onde o resultado obtido foi um n=19 (63,3%) para IgG1 e títulos maiores que 64, n=54 (73,0%) para IgG2 e títulos menores que 64, n=19 (82,6%) para IgG3 e títulos maiores 64 e n=24 (55,8%) para IgG4 e títulos menores que 64. Foi encontrado uma associação entre os resultados obtidos com teste da pesquisa das subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com os resultados obtidos do teste de hemolisina para anti-A e anti-B $p<0,001$ (Tabela 11 e Tabela 12). Houve associação dos resultados do teste da pesquisa das subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com o resultado do teste de titulação IgM ($p<0,001$) para IgG1, IgG2, IgG3 de anti-A e anti-B. A mesma significância não foi encontrado quando associado a imunoglobulina IgG4 $p=0,514$ (anti-A) e $p=0,858$ (anti-B) (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) com título de anti-A IgM

Variável	Título de anti-A		Total	Valor-p
	<64 n (%)	>64 n (%)		
IgG1				<0,001
Negativo	51 (63,0)	30 (37,0)	81	
Positivo	22 (31,4)	48 (68,6)	70	
IgG2				<0,001
Negativo	29 (34,1)	56 (65,9)	85	
Positivo	44 (66,7)	22 (33,3)	66	
IgG3				0,032
Negativo	65 (52,4)	59 (47,6)	124	

continua...

...continuação

Positivo	8 (29,6)	19 (70,4)	27	0,514
IgG4				
Negativo	63 (47,4)	70 (52,6)	133	
Positivo	10 (55,6)	8 (44,4)	18	
Total	73 (48,3)	78 (51,7)	151	

Teste qui-quadrado.

Tabela 14. Associação entre subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2 IgG3, IgG4) com título de anti-B IgM

Variável	Título de anti-B		Total	Valor-p
	<64 n (%)	>64 n (%)		
IgG1				0,012
Negativo	75 (62,0)	46 (38,0)	121	
Positivo	11 (36,7)	19 (63,3)	30	
IgG2				<0,001
Negativo	32 (41,6)	45 (58,4)	77	
Positivo	54 (73,0)	20 (27,0)	74	
IgG3				<0,001
Negativo	82 (64,1)	46 (35,9)	128	
Positivo	4 (17,4)	19 (82,6)	23	
IgG4				0,858
Negativo	62 (57,4)	46 (42,6)	108	
Positivo	24 (55,8)	19 (44,2)	43	
Total	86 (57,0)	65	151	

Teste qui-quadrado.

Na tabelas 15 associamos as subclasses das imunoglobulinas [Negativos, Protetor (IgG2 ou IgG4), Risco (IgG1 ou IgG3), Protetor/Risco (IgG2 ou IgG4) e (IgG1 ou IgG3)] com o teste de hemolisina de anti-A, onde o resultado obtido foi um n=1 (100%) negativo para IgG e negativo para teste de hemolisina, n=38 (53,5%) protetor para IgG e negativo para teste de hemolisina, n=66 (86,8%) risco para IgG e total para teste de hemolisina e n=2 (66,7%) protetor/risco e negativo para teste de hemolisina. Na tabela 16 associamos as subclasses das imunoglobulinas [Negativos, Protetor (IgG2 ou IgG4), Risco (IgG1 ou IgG3), Protetor/Risco (IgG2 ou IgG4) e (IgG1 ou IgG3)] com o teste de hemolisina de anti-B, onde o resultado obtido foi um n=3 (75%) negativo para IgG e negativo para teste de hemolisina, n=76 (73,8%) protetor para IgG e negativo para teste de hemolisina, n=34 (79,1%) risco para IgG e total para teste de hemolisina e n=1 (100%) protetor/risco e negativo para teste de hemolisina.

Tabela 15. Associação categorias IgG de anti-A e teste de hemolisina IgG3, IgG4) com título de anti-A IgM

Categorias IgG anti A	Hemolisina anti-A			Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Parcial n (%)	Total n (%)		
Negativos	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1	<0,001
Protetor (2 ou 4)	38 (53,5)	32 (45,1)	1 (1,4)	71	
Risco (1 ou 3)	1 (1,3)	9 (11,8)	66 (86,8)	76	
Protetor/Risco [(2 ou 4) e (1 ou 3)]	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	3	
Total	42 (27,8)	41 (27,2)	68 (45,0)	151	

Teste da razão de verossimilhanças.

Tabela 16. Associação categorias IgG de anti-B e teste de hemolisina IgG3, IgG4) com título de anti-B IgM

Categorias IgG anti B	Hemolisina anti-B			Total	Valor-p
	Negativo n (%)	Parcial n (%)	Total n (%)		
Negativos	3 (75,0)	0 (0,0)	1 (25,0)	4	<0,001
Protetor (2 ou 4)	76 (73,8)	26 (25,2)	1 (1,0)	103	
Risco (1 ou 3)	2 (4,7)	7 (16,3)	34 (79,1)	43	
Protetor/Risco [(2 ou 4) e (1 ou 3)]	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1	
Total	82 (54,3)	33 (21,9)	36 (23,8)	151	

Teste da razão de verossimilhanças.

A correlação entre títulos maiores que 64 de anti-A e anti-B IgG com o teste de hemolisina total não ficou estabelecida. Na tentativa de identificar o melhor título que pudesse correlacionar com teste de hemolisina foi contruído uma curva ROC com a titulação seriada de IgG para anti-A e anti-B. O ponto de corte de 24 para o título IgG anti-A apresentou sensibilidade 73,5%, especificidade 47,0% e acurácia 58,9%. O ponto de corte de 12 para o título IgG anti-B apresentou sensibilidade 61,1%, especificidade 53,9% e acurácia 55,7% (Tabela 17).

Tabela 17. Título de IgG anti-A e título de IgG anti-B (sensibilidade, especificidade e acurácia)

	Área sob a curva	IC (95%)		Ponto de corte	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
		Inferior	Superior				
Título IgG anti A	0,561	0,469	0,654	24	73,5	47,0	58,9
Título IgG anti B	0,584	0,475	0,692	12	61,1	53,9	55,7

4 DISCUSSÃO

O estudo demonstrou que resultados de títulos de anticorpos ABO IgM dos hemocomponentes reativos a TA são iguais ou inferiores quando comparados a títulos de anticorpos ABO IgM de amostras de soro reativos a TA adotando uma nota de corte de 64. Apesar da literatura levantada não abordar a diferença entre títulos de amostra versus hemocomponentes, especulamos que a redução de alguns títulos observados nos hemocomponentes pode ser devido a presença de anticoagulante na bolsa de coleta. Tal fato causaria um efeito de diluição e, por consequência, reduziria os valores dos títulos encontrados nos hemocomponentes. Na prática laboratorial resultados são liberados com títulos obtidos nas amostras de soro do doador e, portanto, há uma margem conservadora e de segurança para evitar possíveis reações transfusionais hemolíticas.

Foi demonstrada também uma associação significativa entre as variáveis: títulos maiores que 64 de anti-A e anti-B IgM se correlacionaram com teste de Hemolisina total de anti-A e anti-B. Por outro lado, títulos menores que 64 de anti-A e anti-B IgM se correlacionaram com teste de Hemolisina negativa de anti-A e anti-B. Os resultados por nós encontrados diferem dos que foram encontrados em um trabalho publicado no Brasil.⁽⁹⁾ No entanto, a comparação entre o presente estudo e o anteriormente publicado é dificultada pela diferença entre as notas de corte adotadas: em nosso serviço (menor 64) e no trabalho de Landim et al.⁽⁹⁾ a nota de corte foi de 100. Optamos por adotar o corte da prática assistencial transfusional e reproduzir a rotina do nosso serviço, com intuito de verificar o quão seguro o título menor que 64 significava na prática clínica. De acordo com nossos resultados esta é uma prática transfusional segura.

A correlação entre títulos maiores que 64 de anti-A e anti-B IgG com teste de hemolisina total não ficou bem estabelecida. Na tentativa de identificar o melhor título que pudesse correlacionar com teste de hemolisina foi contruído uma curva ROC com a titulação seriada de IgG para anti-A e anti-B. O ponto de corte de 24 para o título IgG anti-A e o ponto de corte de 12 para o título IgG anti-B foram os que apresentaram melhor sensibilidade e especificidade. Contudo, para uma rotina assistencial de banco de sangue, tais níveis de corte tornariam inviáveis a demanda transfusional devido ao seu baixo valor.

Os resultados encontrados nas pesquisas das subclasses corroboram os achados encontrados nos testes de hemolisina e titulação. Foi encontrado uma significância entre todos os testes apresentados. A presença de Imunoglobulinas IgG das classes 1 e 3 foi associado com a hemolisina total e títulos maiores que 64. Essas imunoglobulinas (IgG1 e IgG3) ativam fisiologicamente a fração do complemento e estão ligadas as principais causas de reações transfusionais graves.⁽¹⁶⁾

Mesmo encontrando uma significância entre todas as variáveis descritas no parágrafo anterior, não podemos excluir a realização do teste de hemolisina, pois a acurácia dos títulos de anti-A e anti-B IgM, título de anti-A e anti-B IgG foi de 72,2, 66,2, 47,7 e 43% respectivamente. Foram identificados resultados de hemólise parcial ou hemólise total de doadores de plaquetas por aférese que apresentaram resultados de títulos inferiores a 64. Esse dado demonstra que o aspecto quantitativo das isohemaglutininas não é exclusivo para a prevenção de reações transfusionais. Há sim, no entanto, o aspecto funcional que necessita ser levado em consideração; o teste de hemolisina representa laboratorialmente isso.

Em síntese, o presente estudo apresentou algumas limitações, sendo a mais importante o critério de diluição que adotou uma nota de corte e não um título seriado, porém a logística para implantação de tal teste fica inviável na prática diária do laboratório. Mas o objetivo principal do trabalho foi alcançado onde correlacionamos as diversas variáveis (título de anti-A IgM, título de anti-B IgM, título de anti-A IgG, título de anti-B IgG, teste de hemolisina de anti-A e teste de hemolisina de anti-B).

Doadores de plaquetas do grupo O que apresentam elevados títulos de isohemaglutinina, também conhecidos como “O perigosos”^(2,17) são extremamente preocupantes quando transfundidos em pacientes incompatíveis. Nesse sentido, a realização de testes laboratoriais que possibilitam a transfusão segura de plaquetas com incompatibilidade menor torna-se cada vez mais importante como preconizado pela Portaria Nº. 158, de 4 de fevereiro. Por outro lado, a determinação de um título crítico para doadores seguros *versus* perigosos é um motivo de discussão contínua e ainda uma pergunta sem resposta. Embora suas variedades técnicas, como descrito anteriormente, a titulação tenha sido o método de escolha para a profilaxia da hemólise associada a transfusões de plaquetas incompatíveis com plasma na maioria dos serviços de bancos de sangue. Ainda assim, há uma falta de concordância de um título

crítico que preveja hemólise in vivo. A literatura sugere que títulos entre 16 e 600 (IgM e IgG) podem ser clinicamente relevantes.^(13,18) Em nosso estudo, algumas limitações devem ser apontadas como sendo a mais importante o critério de diluição e a adoção de um grau de corte e não um título em série, mas a logística para a implementação desses testes é impraticável na prática diária do laboratório.

Nossos dados sugerem que um ponto de corte de título de 64 mostrou uma boa correlação entre os aspectos quantitativos da isohemaglutinina, os aspectos funcionais e as subclasses de anticorpos: os títulos acima de 64 se correlacionaram com a hemólise total e as subclasses de IgG1 / IgG3. Assim, poderíamos usar um único método de triagem para evitar reações transfusionais. De fato, um acompanhamento de 5 anos de pacientes que receberam componentes plaquetários com incompatibilidade menor de anti-A e anti-B com um título de IgM $\leq$ 64 forneceu evidências clínicas de uma prática segura de transfusão, pois após a implementação dessa abordagem não observamos quaisquer reações transfusionais hemolíticas associadas a plaquetas em nossa instituição.

Foi relatado que os títulos anti-A e anti-B são comparáveis entre plaquetas por aférese do e pool de plaquetas do grupo O.^(18,19) Embora níveis mais baixos de IgM tenham sido encontrados no plasma de produtos plaquetários considerando pontos de corte de 1:64, também encontramos uma associação de títulos de IgM anti-A e anti-B em amostras de plasma de componentes de plaquetas.

Tomando todos os dados juntos e levando em consideração uma abordagem prática, poderíamos recomendar titulação anti-A e anti-B com um título IgM de 64 em amostras de doadores de soro / plasma como um teste de triagem útil de doadores “O perigosos” usando um método automatizado isso permite uma melhor padronização e eficácia. Essa estratégia profilática pode ser facilmente implementada na rotina dos doadores e pode ser uma abordagem segura e econômica para o gerenciamento de transfusões de plaquetas de incompatibilidade ABO. Fornecemos aqui evidências clínicas e laboratoriais de que Anti-A e anti-B com títulos críticos de IgM e IgG de 64 se correlacionam com a prática segura e segura de transfusão de plaquetas incompatível com ABO. de 2016, Art 123.⁽⁶⁾ Contudo, a legislação brasileira se apresenta vaga nas definições de conduta laboratorial referente a obrigatoriedade desses testes. Na atualidade, há somente uma recomendação da realização do teste de hemolisina. Dada a frequência incomum de reações transfusionais por plaquetas o custo da efetividade de testes de triagem é discutível. Outro ponto na triagem é a

ausência de um método padrão reconhecido. Tentativas de padronização e métodos de comparação foram feitas recentemente para fornecer uma referência para os laboratórios.⁽¹⁸⁾

O estudo foi financiado pelo Serviço de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein e Projeto AMIGOH (Anexo 1), tendo um custo de R\$ 26.839,00 (Anexo 2) e com aprovação do Comitê e Ética local (Anexo 3).

5 CONCLUSÕES

1. Títulos dos hemocomponentes são similares ou menores quando associamos com o título das amostras (41 amostras de 114 para anti-A e 34 amostras de 120 para anti-B);

2. Títulos maiores do que 64 na sua maioria são hemolisinas positivas (52 amostras de 78 para anti-A e 25 de 64 para anti-B). Títulos menores do que 64 nem sempre são hemolisinas negativas (13 amostras de 78 para anti-A e 20 amostras de 64 para anti-B);

3. Houve uma associação nas 151 amostras estudadas entre teste de titulação IgM anti-A e anti-B e teste de hemolisina adotando uma nota de corte de 64;

4. A pesquisa das subclasses das imunoglobulinas (IgG1, IgG2, IgG3 e Ig4) apresentou significância quando associado ao teste de hemolisina. A associação entre as subclasses e ao teste de titulação IgM foi encontrada nas imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG3;

5. Teste recomendado na rotina de doadores de plaqueta é o teste de titulação de isohemaglutinina adotando uma nota de corte de 64;

6. Anti-A e anti-B com títulos críticos de 64 correlacionam com a prática segura de transfusão de plaquetas com incompatibilidade ABO menor.

6 ANEXOS

Anexo 1. Projeto com o patrocínio do AMIGO H – Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que o projeto intitulado **“TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ABO E TESTE DE HEMOLISINA QUALITATIVO NA REDUÇÃO DO RISCO DE HEMÓLISE PASSIVA ASSOCIADA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS”**, foi aprovado pelo Comitê Gestor de Projetos da AMIGO H, para que receba o financiamento para sua execução, no valor de R\$ 26.839,00 – vinte e seis mil, oitocentos e trinta e nove cruzeiros.

Cláudia Toledo de Andrade

Gerente de projetos e parcerias

Cláudia Toledo de Andrade
Gerente de Projetos e Parcerias
AMIGO H – Oncologia e Hematologia

Anexo 2. Reagentes e insumos utilizados nesse estudo no quadro abaixo

Item	Descrição	Qtde.	Valor unitário (R\$)	Total (R\$)
1	Anticorpo Monoclonal Anti-IgG1- SIGMA	5	1.385,00	6.925,00
2	Anticorpo Monoclonal Anti-IgG2- SIGMA	5	1.086,00	5.430,00
3	Anticorpo Monoclonal Anti-IgG3- SIGMA	5	1.086,00	5.430,00
4	Anticorpo Monoclonal Anti-IgG4- SIGMA	5	1.306,00	6.530,00
5	Tubo cristal 205 12X75 PCT1000	1	41,00	41,00
6	Pipetas pasteur cx c/500	1	24,50	24,50
7	Referencells (A1 e B) - GRIFOLS 10mL/frasco	2	78,00	156,00
8	Reagente DG gel neutral GRIFOLS	4	388,00	1.100,50
9	DL-Dithiothreitol, 5G, Marca SIAL	1	658,00	658,00
10	Pacote de folhas sulfite	2	22,00	44,00
11	Cartucho de impressora	3	150,00	450,00
12	Hora do estatístico	1	50,00	50,00
Total				26.839,00

Anexo 3. Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ABO E TESTE DE HEMOLISINA QUALITATIVO NA REDUÇÃO DO RISCO DE HEMÓLISE PASSIVA ASSOCIADA À TRANSFUSÃO DE PLAQUETAS

Pesquisador: EDUARDO PERES BASTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 78853917.1.0000.0071

Instituição Proponente: SOCIEDADE BENEF ISRAELITABRAS HOSPITAL ALBERT EINSTEIN

Patrocinador Principal: SOCIEDADE BENEF ISRAELITABRAS HOSPITAL ALBERT EINSTEIN

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.348.818

Apresentação do Projeto:

O estoque limitado de plaquetas nos bancos de sangue é um sério problema e dificulta a transfusão isogrupo de plaquetas para muitos pacientes. As consequências da transfusão de plasma e plaquetas ABO incompatível podem ser severas ao paciente devido a ocorrência de hemólise pós transfusional. Estratégias para diminuir o risco de reações transfusionais hemolíticas associadas a transfusão de plaquetas ABO incompatíveis podem ser uma possível solução: redução do volume de plasma no concentrado de plaquetas, pesquisa de altos títulos de isohemaglutininas ABO e de hemolisinas anti-A e anti-B no plasma de doadores de sangue são métodos que têm sido utilizados. No entanto, ainda não está claro na literatura a estratégia mais segura para eliminar o risco de hemólise passiva. Não existe um consenso se anticorpos da classe IgM são mais perigosos que anticorpos da classe IgG. Altos títulos de isohemaglutininas parecem não se correlacionar com testes de hemolisinas positivas e ainda não se conhece bem as características dos anticorpos ABO que causam hemólise severa. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar e comparar o teste de titulação de anticorpos ABO e o teste da hemolisina em plasma de doadores do grupo O e em seus produtos de plaquetas como possíveis indicadores de hemólise in vivo. Pretendemos também identificar a subclasse de anti-A e anti-B IgG (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) desses doadores para caracterizar os anticorpos envolvidos nas reações hemolíticas.

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 2.348.818

Hipótese: O estoque limitado de plaquetas nos bancos de sangue é um sério problema e dificulta a transfusão isogrupo de plaquetas para muitos pacientes.

As consequências da transfusão de plasma e plaquetas ABO incompatível podem ser severas ao paciente devido a ocorrência de hemólise pós transfusional.

A correlação entre os títulos de anticorpos ABO com os resultados do teste de hemolisina, parece não estar bem clara (não necessariamente o maior título de isohemaglutinina representa teste de hemolisina com hemólise total). Sendo assim, aventamos a hipótese de que essa correlação entre os títulos de anticorpos ABO e hemolisina não ocorre associado somente ao aspecto quantitativo do título, mas também associado a subclasse de IgG presente no soro do doador (IgG1 e IgG3 estariam mais associados ao risco de hemólise passiva).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar e comparar o teste de titulação de anticorpos ABO em plasma de doadores do grupo O e em seus produtos de plaquetas como indicadores de hemólise.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O estudo proposto apresenta riscos mínimos, devido a natureza observacional e não intervencionista do mesmo. Os riscos inerentes a perda de confidencialidade dos dados são assegurados pelos pesquisadores que garante o sigilo na análise destes.

Benefícios:

Através da análise comparativa dos testes de hemolisina e titulação de isohemaglutininas Ao identificarmos o título crítico ou o melhor teste para detectar anticorpos ABO "perigosos" será possível estabelecer uma estratégia laboratorial segura que possibilitará eliminar o risco de hemólise passiva em transfusões de plaquetas ABO incompatíveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo será realizado no laboratório de Imunohematologia do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do HIAE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE está redigido em linguagem clara e acessível, utilizando-se das estratégias mais apropriadas à cultura, faixa etária, condição socioeconômica e autonomia dos convidados a participar da

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



HOSPITAL ISRAELITA ALBERT
EINSTEIN-SP



Continuação do Parecer: 2.348.818

pesquisa.

Recomendações:

É atribuição do CEP "acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa". Por isso o/a pesquisador/a responsável deverá encaminhar para o CEP Einstein os Relatórios Parciais a cada seis meses e o Relatório Final de seu projeto, até 30 dias após o seu término.

Segundo a Resolução CNS 466/2012 o pesquisador responsável deve prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise, os seguintes itens foram Aprovados:

- 1-Projeto de Pesquisa - Versão original datada de 04 de Setembro de 2017;
- 2-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Versão 02 datada de 25 de Outubro de 2017.

Considerações Finais a critério do CEP:

DOCUMENTAÇÃO APROVADA PELO CEP DO HOSPITAL ISRAELITA ALBERT EINSTEIN EM REGIME AD-REFERENDUM

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1009023.pdf	25/10/2017 10:38:22		Aceito
Outros	Resposta_a_pendencia.pdf	25/10/2017 10:37:52	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_Apos_Informacao_versao_2.pdf	25/10/2017 10:29:02	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Termo_de_Consentimento_Livre_Esclarecido_versao1.pdf	13/10/2017 11:58:50	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss

Bairro: Morumbi

CEP: 05.652-000

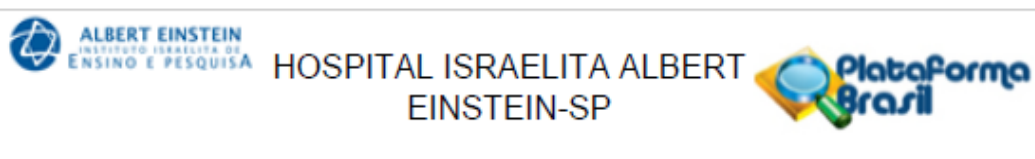
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2151-3729

Fax: (11)2151-0273

E-mail: cep@einstein.br



Continuação do Parecer: 2.348.818

Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_Livre_Esclarecido_versao1.pdf	13/10/2017 11:58:50	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_responsabilidade_do_pesquisador_responsavel_estudos_envolvendo seres humanos.pdf	10/10/2017 09:40:05	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_para_pesquisa_envolvendo seres humanos.pdf	09/10/2017 10:18:17	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_dos_participantes_AMIGOH.pdf	05/10/2017 10:23:19	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
Outros	termo_de_compromisso_do_coordenaador_AMIGOH.pdf	05/10/2017 10:22:36	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
Declaração do Patrocinador	declaracao_de_apoio_financeiro_amigo H.pdf	05/10/2017 10:18:29	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_isohe maglutinas_versao_ original_datado_de_04_09_2017.pdf	05/10/2017 10:16:15	EDUARDO PERES BASTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 25 de Outubro de 2017

Assinado por:
Fabio Pires de Souza Santos
 (Coordenador)

Endereço: Av. Albert Einstein 627 - 2ss
 Bairro: Morumbi CEP: 05.652-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2151-3729 Fax: (11)2151-0273 E-mail: cep@einstein.br

7 REFERÊNCIAS

1. Shanwell A, Andersson TM, Rostgaard K, Edgren G, Hjalgrim H, Norda R, et al. Post-transfusion mortality among recipients of ABO-compatible but non-identical plasma. *Vox Sang*. 2009;96(4):316–23.
2. Fung MK, Downes KA, Shulman IA. Transfusion of platelets containing ABO-incompatible plasma: a survey of 3156 North American laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(6):909–16.
3. Lozano M, Heddle N, Williamson LM, Wang G, AuBuchon JP, Dumont LJ; Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative. Practices associated with ABO-incompatible platelet transfusions: a BEST Collaborative international survey. *Transfusion*. 2010;50(8):1743–8.
4. Dunbar NM, Ornstein DL, Dumont LJ. ABO incompatible platelets: risks versus benefit. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(6):475–9.
5. American Association of Blood Banks. Standards for blood banks and transfusion services. 30th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks; 2016.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 158, de 4 de fevereiro de 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial da União*, 2016 fev 5; seção 1:37-57.
7. Cooling L. ABO and platelet transfusion therapy. *Immunohematology*. 2007;23(1):20–33.
8. Quillen K, Sheldon SL, Daniel-Johnson JA, Lee-Stroka AH, Flegel WA. A practical strategy to reduce the risk of passive hemolysis by screening plateletpheresis donors for high-titer ABO antibodies. *Transfusion*. 2011;51(1):92–6.
9. Landim CS, Gomes FC, Zeza BM, Mendrone-Junior A, Dinardo CL. Prophylactic strategies for acute hemolysis secondary to ABO-minor incompatible platelets: correlation between hemolysin qualitative test and isohemagglutinin titration. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015; 37:217–22.
10. Harmening DM. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 4a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2015.
11. Goel R, Tobian AA. Acute hemolytic transfusion reactions. In: Shaz BH, Hillyer CD, Gil MR, editors. *Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier; 2019. p. 393-6.
12. Larsson LG, Welsh VJ, Ladd DJ. Acute intravascular hemolysis secondary to out-of-group platelet transfusion. *Transfusion*. 2000;40(8):902–6.
13. Josephson CD, Mullis NC, Van Demark C, Hillyer CD. Significant numbers of apheresis-derived group O platelet units have “high-titer” anti-A/A,B: implications for transfusion policy. *Transfusion*. 2004;44(6):805–8.
14. Kulkarni AG, Ibazebe R, Fleming AF. High frequency of anti-A and anti-B haemolysins in certain ethnic groups of Nigeria. *Vox Sang*. 1985;48(1):39–41.

15. Ziprin JH, Payne E, Hamidi L, Roberts I, Regan F. ABO incompatibility due to immunoglobulin G anti-B antibodies presenting with severe fetal anaemia. *Transfus Med*. 2005;15(1):57–60.
16. Araujo MA, Deffune E, Carlos LM, Magalhaes SM, Golim MA, Camara MC. [Assessment of IgG1 and IgG3 subclasses in perinatal hemolytic disease]. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2003;25(4):201-6. Portuguese.
17. Josephson CD, Castillejo MI, Grima K, Hillyer CD. ABO-mismatched platelet transfusions: strategies to mitigate patient exposure to naturally occurring hemolytic antibodies. *Transfus Apheresis Sci*. 2010;42(1):83–8.
18. Yazer MH, Dunbar NM, Bub CB, Condict BE, Dunn R, Janoušková M, et al. Comparison of titer results obtained using immediate spin one-dilution techniques to a reference method. *Transfusion*. 2019;59(Suppl 2):1512-7.
19. Park ES, Jo KI, Shin JW, Park R, Choi TY, Bang HI, et al. Comparison of total and IgG ABO antibody titers in healthy individuals by using tube and column agglutination techniques. *Ann Lab Med*. 2014;34(3):223–9.

Abstract

Introduction: The limited inventory of platelets in blood banks is a serious problem and makes it difficult to transfuse platelet ABO identical for many patients. The consequences of transfusion of ABO incompatible plasma and platelets may be severe to the patient due to the occurrence of post-transfusion hemolysis. Strategies to reduce the risk of hemolytic transfusion reactions associated with transfusion of incompatible ABO platelets may be a possible solution: reduction of plasma volume in platelet concentrate, search for high titers of ABO isohemagglutinins and anti-A and anti-B hemolysin in plasma donors are methods that have been used. However, it is not yet clear in the literature the safest strategy to eliminate the risk of passive hemolysis. There is no consensus that antibodies of the IgM class are more dangerous than antibodies of the IgG class. High isohemagglutinin titers do not appear to correlate with positive haemolysin tests and the characteristics of ABO antibodies that cause severe haemolysis are not well understood. **Purpose:** The objective of the present study is to evaluate and compare the ABO antibody titration test and the plasma hemolysin assay of O group donors and their platelet products as possible indicators of in vivo hemolysis. We also intend to identify the subclass of anti-A and anti-B IgG (IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4) from these donors to characterize the antibodies involved in the hemolytic reactions. **Methods:** A total of 151 samples of male and female platelet donors were analyzed by group O apheresis from the Blood Bank of Hospital Israelita Albert Einstein. **Results:** The study demonstrated that blood component titre results at room temperature are equal or lower when compared to sample titers at RT. An association was found between titration tests, hemolysin and immunoglobulin subclasses. **Conclusions:** There is an association in the 151 samples studied between IgG titration test, IgM titration test, hemolysin test and immunoglobulin subclass. Platelet transfusion with minor incompatibility with partial or negative hemolysin test to be performed only in adult patients.

Keywords: Blood platelets; Serum; Hemolysin proteins; Immunoglobulins; Blood components

Bibliografia consultada

Cid J, Harm SK, Yazer MH. Platelet transfusion - the art and science of compromise. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(3):160–71.

Cooling LL, Downs TA, Butch SH, Davenport RD. Anti-A and anti-B titers in pooled group O platelets are comparable to apheresis platelets. *Transfusion*. 2008;48(10):2106–13.

Dugoujon JM, de Lange GG, Blancher A, Alie-Daram S, Marty Y. Characterization of an IgG2, G2m(23) anti-Rh-D antibody. *Vox Sang*. 1989;57(2):133–6.

Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion*. 2015;55(Suppl 2):S47–58.

François-Gérard C, Opret-Meunier C. An enzyme-linked immunosorbent assay utilizing monoclonal antibodies for the characterization of immunoglobulin classes and subclasses of anti-red cell antibodies. *Vox Sang*. 1987;52(4):322–9.

Gambero S, Secco VN, Ferreira R, Deffune E, Machado PE. Anti-A and anti-B hemolysin frequencies in blood donors from the Hemotherapy Center of Unesp, Botucatu. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(1):28–34.

Kang SJ, Lim YA, Baik SY. Comparison of ABO antibody titers on the basis of the antibody detection method used. *Ann Lab Med*. 2014;34(4):300–6.

Karabin MS, Blagg L, Tobian AA, King KE, Ness PM, Savage WJ. ABO antibody titers are not predictive of hemolytic reactions due to plasma-incompatible platelet transfusions. *Transfusion*. 2012;52(10):2087–93.

Khampanon K, Chanprakop T, Sriwanitchrak P, Setthakarn M, Oota S, Nathalang O. The characteristics of ABO antibodies in group O Thai blood donors. *J Clin Lab Anal*. 2012;26(4):223–6.

Lundberg WB, McGinniss MH. Hemolytic transfusion reaction due to anti-A. *Transfusion*. 1975;15(1):1–9.

McLeod BC, Sassetti RJ, Weens JH, Vaithianathan T. Haemolytic transfusion reaction due to ABO incompatible plasma in a platelet concentrate. *Scand J Haematol*. 1982;28(3):193–6.

McManigal S, Sims KL. Intravascular hemolysis secondary to ABO incompatible platelet products. An underrecognized transfusion reaction. *Am J Clin Pathol*. 1999;111(2):202–6.

Oyedemi OA, Adeyemo TA, Ogbenna AA, Akanmu AS. Prevalence of anti-A and anti-B hemolysis among blood group O donors in Lagos. *Niger J Clin Pract*. 2015;18(3):328–32.