

## FREQUÊNCIA DE HEMOLISINAS ANTI-A E ANTI-B EM UMA POPULAÇÃO DE ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS.

### FREQUENCY OF ANTI-A AND ANTI-B HEMOLYSIN IN A POPULATION OF UNIVERSITY STUDENTS.

<sup>1</sup>RIBEIRO, C.A.A; <sup>2</sup>GATTI, L.L.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Farmácia do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos

<sup>2</sup> Coordenador do Curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos e Professor Dr do curso de Farmácia da UNIFIO

#### RESUMO

Atualmente a transfusão de sangue e hemocomponentes, estão sendo considerados como tecnologias essenciais para muitos indivíduos, pois, quando utilizada de forma adequada em condições de morbidade ou mortalidade significativa, não tendo outras opções de tratamento, ou seja, sendo insubstituível, podem salvar vidas e melhorar a saúde dos pacientes. Entretanto, a transfusão sanguínea e de hemocomponentes, necessita de atenção, pois podem levar a complicações agudas ou tardias, como o risco de hemólise intravascular, entre outras complicações clínicas. Visto que, anticorpos da classe IgG ativos a 37°C são usualmente referidos como hemolisinas, onde os mesmos ativam o sistema complemento fortemente, isto é possuem a capacidade de promover hemólise (potencialmente hemolíticos), e desencadear reações transfusionais ao receptor. Portanto, objetivo do estudo é identificar a frequência e titulação de hemolisinas, bem como classificar o sistema ABO e Rh em estudantes do Centro Universitário de Ourinhos (UNIFIO). Foi possível observar que 43% das amostras do tipo sanguíneo O, 10,11% destas foi possível verificar a presença de hemolisinas, e 5,05% foram considerados doadores "O" perigosos. Assim, conclui-se que 5,05% de uma população de estudantes universitários continham altos títulos de hemolisinas, demonstrando o quanto é necessário realizar o monitoramento de doadores sanguíneos, para a identificação dos doadores "O" perigosos.

**Palavras-chave:** Hemolisinas. Reações Transfusionais. Doadores "O" perigosos.

#### ABSTRACT

Currently, blood transfusion and hemocomponents are considered as essential technologies for many individuals, because when used appropriately in conditions of significant morbidity or mortality, there are no other options of Treatment, i.e., being irreplaceable, can save lives and improve the health of patients. However, blood transfusion and hemocomponents need attention, as they may lead to acute or delayed complications, such as the risk of intravascular haemolysis, among other clinical complications. Since IgG antibodies active at 37 ° C are usually referred to as Hemolysin, where they activate the complement system strongly, this is the ability to promote haemolysis (potentially haemolytic), and trigger reactions Transfusionals to the receptor. Therefore, the aim of this study is to identify the frequency and titration of Hemolysin, as well as to classify the ABO and RH system in students of the University Center of Ourinhos (UNIFIO). It was possible to observe that 43% of the blood type O samples, 10.11% of these were possible to verify the presence of Hemolysin, and 5.05% were considered dangerous "O" donors. Thus, it is concluded that 5.05% of a population of university students contained high titers of Hemolysin, demonstrating how much is necessary to monitor blood donors, to identify the dangerous "O" donors.

**Keywords:** Hemolysin. Transfusion reactions. Dangerous "O" donors.

#### INTRODUÇÃO

De acordo com Freire, Cunha, Andrade (2015) a transfusão sanguínea é um procedimento que auxilia no tratamento e cura de muitas pessoas, no entanto é necessário inspecionar todas as etapas deste processo, para que não acometa a saúde dos receptores que carecem de doações sanguíneas. Logo o monitoramento inadequado pode acarretar reações transfusionais adversas, que variam desde febre autolimitada até uma reação severa, que ocorre entre minutos após o início da

transusão até horas após o seu término, processo denominado como reação hemolítica aguda (imunológica), podendo ser desencadeado pela presença de hemolisinas (www.hu.ufsc.br, 2017).

No ano de 1900 Karl Landsteiner, descobriu o sistema de grupos sanguíneos ABO, estes antígenos eritrocitários apresentam grande importância dentro da prática transfusional, pois sabe-se que uma transfusão sanguínea ABO incorreto pode gerar vários danos ao indivíduo, podendo chegar ao óbito do paciente, por conta da hemólise intravascular tendo como consequências modificações imunológicas e bioquímicas (GIRELLO; KÜHN, 2002).

Outros grupos sanguíneos foram descobertos, dentre estes está o grupo sanguíneo Rh, depois do ABO é o mais importante na prática transfusional. A presença e ausência de antígenos D nos eritrócitos é o que caracteriza Rh positivo e Rh negativo, portanto os eritrócitos Rh negativo não expressam a proteína RhD inteiramente na superfície dos eritrócitos enquanto as hemácias positivas expressam por inteira (NARDOZZA *et al.*, 2010).

Os grupos sanguíneos ABO e H são considerados carboidratos, portanto não são produtos primários dos genes que realiza sua expressão. Primeiramente os genes produzem as enzimas chamadas de glicosiltransferases, que transportam os açúcares em uma substância precursora encontrada na membrana dos eritrócitos, caracterizando o grupo sanguíneo do indivíduo (GAMBERO *et al.*, 2004).

Existem dois tipos de anticorpos do sistema ABO presentes no soro do indivíduo, os que são de ocorrência natural ou imunes (FERNANDES *et al.*, 2008). Os de ocorrência natural aparecem no soro cerca de três a seis meses após o nascimento, sendo a maioria da classe IgM, e os da classe IgG em pequena quantidade. Já os anticorpos ABO imunes são caracterizadas por aparecerem após uma aloimunização prévia, seja por heteroimunização por meio de substâncias de origem animal ou bacteriana, ou aloimunização por consequência de uma gestação ou transfusão ABO incompatível. Estes anticorpos da classe IgG ativos a 37°C são usualmente referidos como hemolisinas (GAMBERO *et al.*, 2004).

Portanto, agentes ou anticorpos, que ativam o sistema complemento fortemente, isto é possuem a capacidade de promover hemólise (potencialmente hemolíticos) são titulados como hemolisinas. Dessa forma a presença de altos títulos de anticorpos anti-A e anti-B são identificados como: presença de hemolisina A e/ou B (GAMBERO *et al.*, 2004; www.hu.ufsc.br, 2017).

Devido a extrema importância de monitorar a presença de hemolisinas, o

presente estudo terá como objetivo identificar a frequência e titulação de hemolisinas, bem como classificar o sistema ABO e Rh em estudantes do Centro Universitário de Ourinhos (UNIFIO).

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Trata-se de um estudo quantitativo, realizado no Centro Universitário de Ourinhos (UNIFIO), no período de Março a Novembro de 2019.

Após aprovação desta pesquisa no CEP-FEMA (Protocolo nº. 3.419.957) foi realizado coletas de amostras sanguíneas para a identificação da frequência de hemolisinas anti-A e anti-B.

Os participantes foram de caráter voluntário, sendo esclarecido aos mesmos que o procedimento realizado não oferecia riscos. Posteriormente os voluntários da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A pesquisa foi baseada e adaptada na metodologia de Gambero *et al.*, (2004) como demonstrado a seguir:

#### **Amostras**

Foram coletadas amostras de sangue (5 mL) de 40 estudantes universitários, sendo estes separados em grupos feminino e masculino. Obteve-se as amostras através de punção venosa, onde foi explicado ao participante todo o procedimento a ser realizado e acondicionado em tubo de ensaio com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e tubo seco. Com o tubo de EDTA realizou-se os procedimentos imuno-hematológico como, classificação do sistema ABO e Rh, pesquisa de antígenos RhD, D fraco. O soro do tubo sem anticoagulante foi reservado à prova reversa da tipagem sanguínea ABO, pesquisa de hemolisina negativas e/ou positivas e realização das titulações hemolisinas anti-A e anti-B

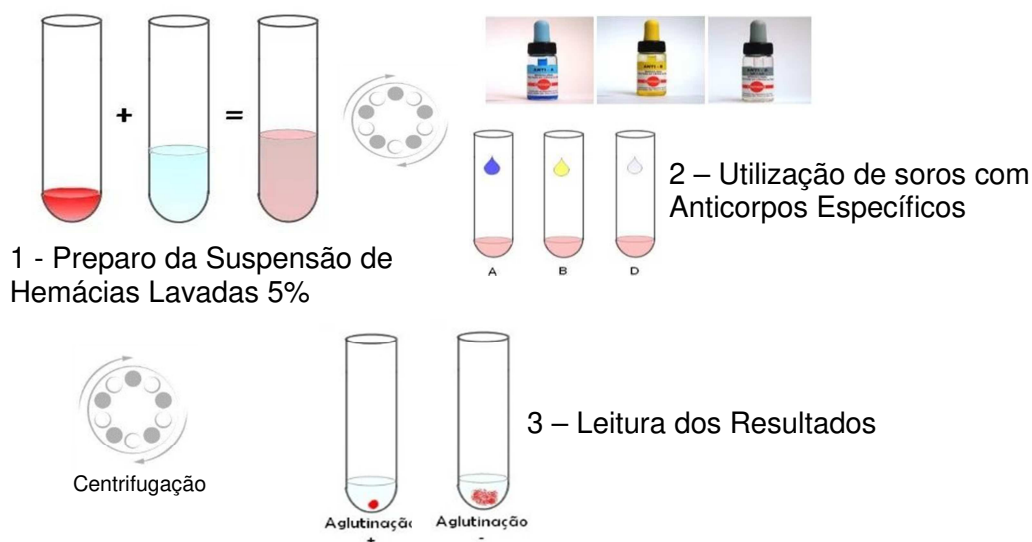
#### **Procedimento Técnico para Determinação ABO e Rh**

Para os procedimentos imuno-hematológico as hemácias foram lavadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%, sendo adicionado 50 µL da hemácia em 950 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% para lavagem, e homogeneizou a amostra, em seguida foi para centrifugação por 30 segundos a 3.400 rpm, este procedimento foi realizado por três vezes e ressuspendidas. Sendo que quatro tubos foram identificados como A, B, AB e D, adicionando 50µL cada soro industrializado anti-A, anti-B, anti-AB e anti-D em seu determinado tubo e 100µL da hemácia lavada a ser analisada, e os

mesmos foi para centrifugação por 15 segundos a 3.400 rpm.

A técnica encontra-se ilustrada abaixo na Figura 1.

**Figura 1- Esquema do Procedimento Prático para Determinação Sanguínea ABO e RH**



A leitura das reações de Hemaglutinação foram realizadas de acordo com a intensidade de reação demonstradas no quadro 1, apenas para determinar se a mostra continha positividade ou não.

**Quadro 1 – Grau de intensidade de aglutinação das hemácias**

Intensidade	Interpretação
++++	Um agregado sólido de eritrócitos
+++	Vários agregados grandes
++	Agregados de tamanho médio de fundo claro
+	Pequenos agregados, fundo turvo, avermelhado ou somente agregados microscópico

### Pesquisa de D Fraco

Todas as amostras que foram tipadas como RH negativa, submeteu-se a pesquisa do D fraco, que refere-se a uma pequena quantidade da proteína RH na membrana do eritrócito. Para isso, os tubos classificados como RH negativo foram

incubados em banho maria 37°C por 15 minutos, posteriormente realizou-se a leitura com a centrifugação a 3.400 rpm por 15 segundos. Dando positivo, foi classificado como RH positivo (D fraco), permanecendo negativo a amostra foi lavada com solução de cloreto de sódio a 0,9% por 3 vezes (mesmo procedimento da lavagem das hemácias inicialmente), e posteriormente adicionado duas gotas de soro de COOMBS (Antiglobulina Humana). A amostra foi novamente centrifugada em 3.400 rpm por 15 segundos e realizado a leitura. Amostra com aglutinação (RH positiva – D fraco), amostra sem aglutinação, confirmou-se o RH Negativo.

### **Prova reversa da tipagem sanguínea ABO**

Inicialmente adicionou-se 100µL do soro do indivíduo em questão em dois tubos de ensaios, sendo adicionado a hemácia A no primeiro tubo de ensaio e hemácia B no segundo tubo de ensaio, em seguida foi realizado a centrifugação a 3.400 rpm por 15 segundos. Assim, foi possível verificar se a tipagem sanguínea estava de acordo.

### **Procedimento técnico para Determinação das Hemolisinas anti-A e anti-B**

A metodologia para a pesquisa de hemolisina foi baseada na técnica de Hemaglutinação em tubo. Primeiramente foi adicionar 100µL do soro do indivíduo O em dois tubos de ensaios, e adicionou-se hemácia A no primeiro tubo de ensaio e hemácia B no segundo tubo de ensaio, posteriormente os tubos foram para a estufa em uma temperatura de 37°C por 15 minutos, em seguida foi realizado a centrifugação a 3.400 rpm por 15 segundos. A leitura foi realizada através de uma avaliação macroscópica de aglutinação ou hemólise.

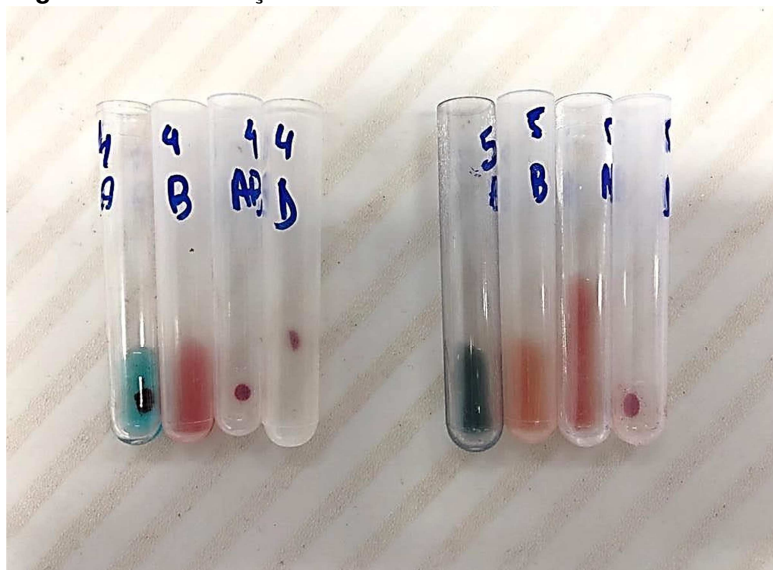
### **Titulação de hemolisinas anti- A e/ou anti- B**

A técnica da titulação das amostras que apresentaram hemolisinas A e/ou B positiva, foi realizado através de diluições seriadas do soro, e os resultados foram expressos em títulos de anticorpos correspondente a mais alta diluição do soro com reação positiva. A análise realizada utilizou diluições seriadas em solução salina 0,9% a partir de 1:2 até 1:1024, sendo adicionado o soro dos voluntários em volumes de 100µL. Após as diluições foi acrescentado 50µL da suspensão das hemácias A ou B na diluição da solução salina com o soro do participante em todos os tubos. Após centrifugação de 15 segundos, a leitura foi realizada através da presença de aglutinação.

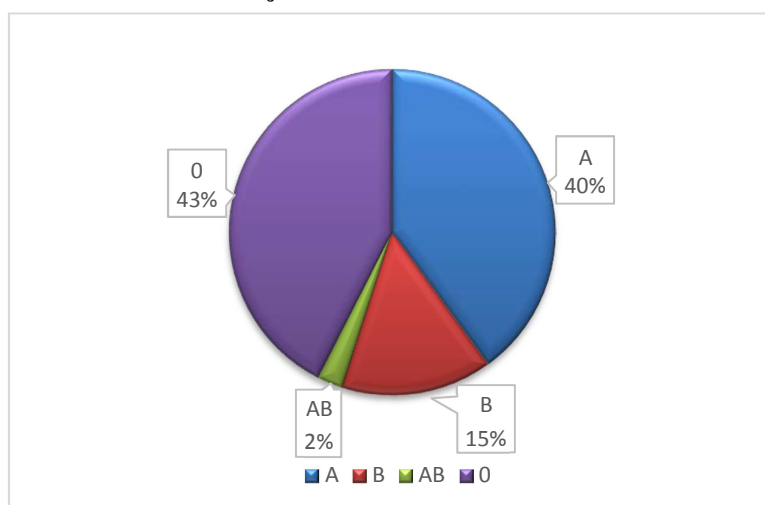
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Tabela 1.** Determinação ABO e Rh de uma população de estudantes universitários

Genêro	ABO	Rh
MASCULINO	A	+
FEMININO	O	+
MASCULINO	O	+
FEMININO	A	-
FEMININO	O	+
MASCULINO	A	+
MASCULINO FEMININO	O O A	+
FEMININO	A	+
FEMININO		+
		+
FEMININO	A	+
FEMININO	O	+
FEMININO	B	+
FEMININO	B	+
MASCULINO	B	+
FEMININO	AB	-
FEMININO	O	+
FEMININO	O	+
FEMININO	A	+
MASCULINO	O	+
MASCULINO	A	+
MASCULINO	A	+
FEMININO	A	+
FEMININO	A	-
FEMININO	O	+
FEMININO	O	+
MASCULINO	O	+
MASCULINO	O	+
MASCULINO	O	+
FEMININO	B	+
FEMININO	A	-
MASCULINO	O	+
MASCULINO	A	+
FEMININO	B	+
MASCULINO	O	+
FEMININO	B	+
MASCULINO	O	+
MASCULINO	A	+
FEMININO	A	+
MASCULINO	A	+

**Figura 1.** Determinação ABO e Rh

Arquivo Pessoal

**Gráfico 1.** Determinação ABO

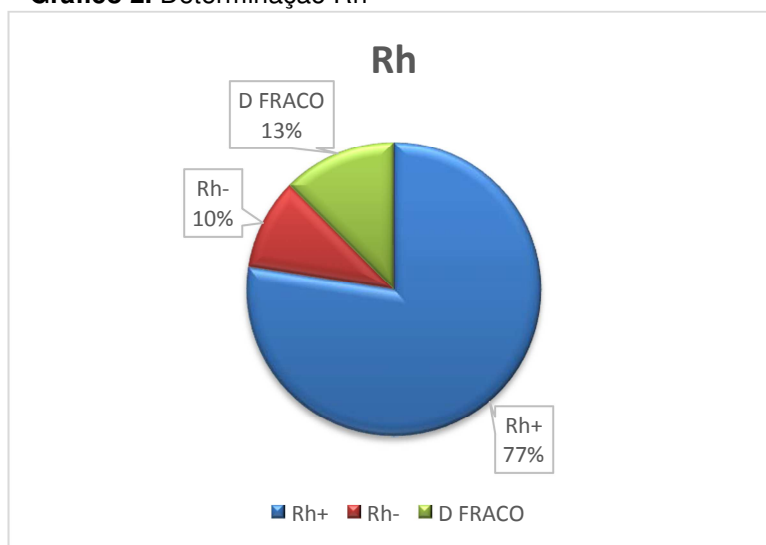
Como demonstrado no gráfico 1 e na tabela 1, de 40 amostras 17 (43%) eram voluntários do tipo O, no qual foi realizado pesquisa de hemolisinas anti – A e anti – B. Logo 16 (40%) dos participantes eram do tipo A e 6 (15%) eram do tipo B, onde foi possível utilizar tais eritrócitos para pesquisa das hemolisinas.

O resultado obtido da pesquisa foi semelhante ao estudo realizado de Sousa (2012), onde o tipo sanguíneo mais prevalente foi tipo O, seguido do tipo A. Assim como o estudo que foi realizado com aproximadamente 50 alunos que estavam visitando a Feira da Semana de Saúde, realizada no Centro de convenções da UNIVAP, a maior



prevalência, foi também do grupo sanguíneo O e apenas um aluno continha o grupo sanguíneo AB, semelhante ao da pesquisa.

**Gráfico 2.** Determinação Rh

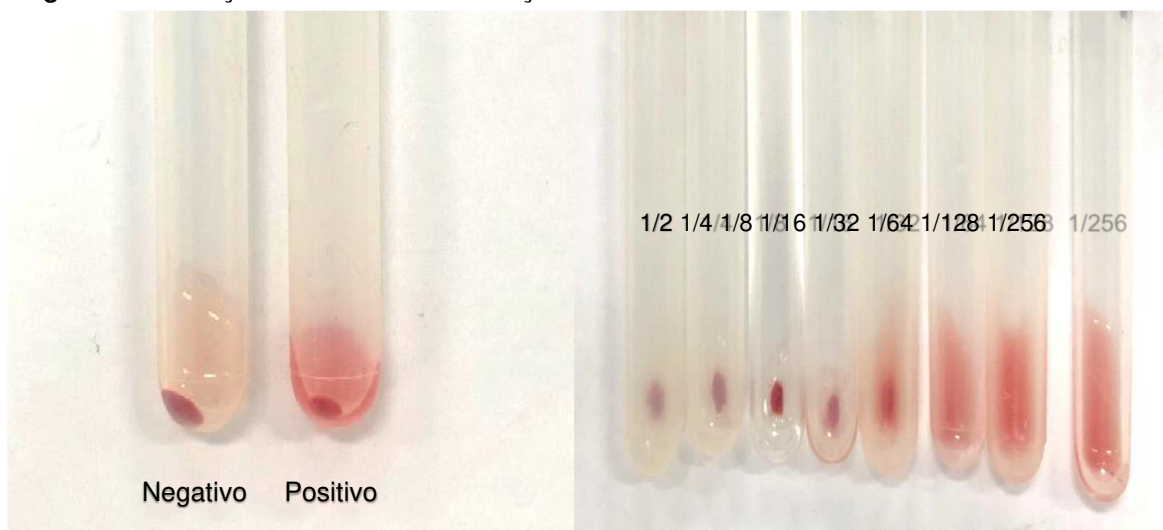


De acordo com o gráfico 2 e a tabela 1, 31 (77%) amostras foram classificadas como Rh positivo, e 4 (10%) Rh negativa, já os 5 participantes restantes foram identificados como D fraco.

No estudo realizado com aproximadamente 50 alunos, também foi possível identificar a prevalência de Rh+, principalmente a predominância de O+. Em alguns casos, ocorrem substituições de aminoácidos nas porções transmembranas, devido a mutação do gene RhD, gerando como consequência fenótipos denominados D fracos, estes foram identificadas com densidade variando entre 70 a 5200, no entanto normalmente hemácias RhD positivas, possuem uma densidade antigênica variando entre 15000 a 33000 antígenos por célula. Logo, é de grande interesse, realizar estudos sobre o grupo sanguíneo Rh, pois é o mais complexo, polimórfico e imunogênico sistema de grupo sanguíneo já conhecido em humanos, por isso, uma transfusão incompatível da mesma, podem causar graves reações transfusionais no receptor (NARDOZZA *et al.*, 2010; SOUSA, 2012).

**Tabela 2.** Frequência e Titulação de Hemolisinas anti-A e anti-B

Amostras O	Positiva	anti-A	anti-B	Titulação (anti-A)	Titulação (anti-B)
17	4	4	1	1/32, 1/64, 1/128, 1/256	1/32

**Figura 2.** Presença de hemolisinas e titulação de hemolisinas

Arquivo Pessoal

Das 17 (43%) amostras do tipo sanguíneo O, 4 (10,11%) destas foi possível verificar a presença de hemolisinas, sendo que estes voluntários que continham positividade para hemolisinas eram do sexo masculino, e os mesmos foram classificados como Rh +.

Como visto na Tabela 2, as 4 amostras apresentaram positividade para hemolisina anti-A, no entanto para hemolisina anti-B apenas 1 participante que positivou para o anti-A também positivou para anti-B. Dentro das hemolisinas presentes, foi possível observar, que 4 amostras que continham hemolisinas anti-A obteve positividade, na titulação de 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256, já na hemolisina anti-B positivou até titulação de 1/32.

Como demonstrado acima 4 participantes positivaram para hemolisinas, sendo que, as mesmas eram de voluntários do sexo masculino. Esta relação foi demonstrada também no estudo realizado por Fernandes *et al.* (2008), no qual foi possível visualizar que na cidade de Ourinhos a chance de um doador ter hemolisina positiva é 4,14 vezes

maior do que um doador de Itapeva, visto também que a chance de um doador de Ourinhos ter hemolisina positiva é 1,82 vezes maior para o gênero masculino. Porém na cidade de Itapeva, a chance de hemolisina positiva é maior para doadores do sexo feminino. Portanto, foi possível concluir que a chance de uma pessoa ter hemolisina positiva é 1,89 vezes maior para os homens, independente da cidade de origem do doador.

Atualmente estão sendo realizados vários estudos sobre a frequência de hemolisinas, em diferentes populações, muitos destes estudos demonstraram altos títulos de hemolisinas (anti – A e/ou anti – B) principalmente em doadores do grupo O (NOVARETTI, 2008).

Sabe-se que transfusão de sangue pode salvar vidas, através da reposição de sangue ou de hemocomponentes sanguíneos, específicos ao paciente. Quando ocorre a transfusão de pequena quantidade de plasma incompatível, a concentração de anticorpo é baixa, por tanto os mesmos podem estar diluídos em uma quantidade superior de eritrócitos, podendo não causar nenhuma reação transfusional. Todavia, existem casos de reações hemolíticas graves, que podem ser desencadeados pela presença de hemolisinas (FERNANDES *et al.*, 2008).

Na presente pesquisa, não foi delimitado questões de etnia, porém vale ressaltar que no estudo realizado em Zimbábue e na Nigéria, negros obteve maior positividade para hemolisinas, o que contradiz os dados obtidos da cidade de Ourinhos, onde a positividade maior de doadores do grupo O com hemolisinas foi superior para os declarados brancos (FERNANDES *et al.*, 2008).

De acordo com o estudo de De Bartolo, Okafor & Enebe, apud Gambero *et al.* 2004, foram apresentados altos índices de hemolisinas, sendo antagônico ao presente estudo, no entanto, vale salientar que os números de amostras utilizadas nestes estudos foram superiores ao da pesquisa. Porém, o estudo em questão obteve titulações superiores a 1/100, assim como nos resultados obtidos por Gambero *et al.*, 2004, onde os 77 doadores considerados “O” perigosos obtiveram título  $\geq 1/100$ .

Portanto, segundo Gambero *et al.*, 2004, o título de hemolisinas superior a 1/100, já é considerado doador “O” perigoso, ou seja, dos 4 (10,11%) voluntários com positividade de hemolisinas, 2 (5,05%) são considerados doadores “O” perigosos, onde uma amostra obteve titulação de 1/128 e a segunda amostra titulação de 1/256, quantidade suficiente para causar reação transfusional, caso seja necessária transfusão sanguínea não-isogrupo. Visto que o indivíduo de grupo O contém em seu

soro/plasma anticorpos anti-A, anti-B, mesmo se o doador realizar doação apenas de concentrado de hemácias, uma porcentagem de plasma estará presente, ou seja, se o título de hemolisinas for  $\geq 1/100$  pode desencadear uma reação transfusional, pois hemolisinas são da classe IgG se ativam a 37° C (temperatura corpórea) e se ligam fortemente ao sistema complemento desencadeando hemólise intravascular e/ou extravascular.

No ano de 2015 no Brasil ocorreu o quantitativo de 3.385.651 procedimentos realizados, de transfusões sanguíneas, justificando o quanto é necessário monitorar o perfil dos doadores para que não acometa a saúde do receptor que carece da doação (BRASIL, 2017).

### CONCLUSÃO

Concluiu-se que a frequência das hemolisinas anti-A e anti-B de uma população de estudantes do Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos (UNIFIO), foi inferior do que é observado em estudos semelhantes. No entanto, 5,05 % continham altos títulos de hemolisinas, ou seja, eram capazes de desencadear severas reações transfusionais, demonstrando o quanto é necessário realizar o monitoramento de doadores sanguíneos, para a identificação dos doadores “O” perigosos.

### REFERÊNCIAS

BRASIL. **Caderno de informações Sangue e hemoderivados Dados de 2015**. Brasília – DF: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: < [bvsms.saude.gov.br](http://bvsms.saude.gov.br)>. Acesso em: 06 set. 2019.

FERNANDES, V. C. *et al.* Frequência de hemolisinas anti – A e anti – B em doadores de sangue de Itapeva e Ourinhos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.30, n. 6, p. 453 – 456, 2008.

FREIRE, M. R. L. C, CUNHA, M. C, ANDRADE S. P. Importância dos testes imuno-hematológicos em receptores de sangue e a ocorrência das reações transfusionais. **Revista eletrônica de farmácia**. v. 12, n. 1, p. 56-59, 2015.

GAMBERO S. *et al.* Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 26, n. 1, p. 28-34, 2004.

GIRELLO A.L, KÜHN T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. 4. ed. São Paulo: Senac, 2002.

MANUAL para o uso racional de sangue. [org]. Universidade Federal de Santa Catarina. 2017. Disponível em URL: < <http://www.hu.ufsc.br/setores/banco-de-sangue/wp-content/uploads/sites/39/2017/11/Manual-completo-web-min.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

NARDOZZA, L. M. M. *et al.* Bases moleculares do sistema Rh e suas aplicações em obstetrícia e medicina transfusional. **Rev. Assoc. Med.Bras.**, v.56, n.6, p.724-728, 2010.

NOVARETTI, Marcia Cristina Z. Hemolisinas anti-A e anti-B na prática transfusional. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**,v. 30, n.6, p. 433-436, 2008.

SOUSA, C. K. L. **FREQUÊNCIA DA CLASSIFICAÇÃO SANGUÍNEA NO LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS (LAC) DO HOSPITAL DISTRIAL DE ITAPORANGA (HDI) – PARAÍBA.** 2012. 13 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação de Farmácia - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PARAÍBA (UEPB), Paraíba. Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br/>>. Acesso em: 06 set. 2019.