

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

Julia Hofstatter Solano

ESTRATÉGIA DE GARANTIA DE QUALIDADE PARA
GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS EM LARGA ESCALA

São Paulo
2017

Julia Hofstatter Solano

**ESTRATÉGIA DE GARANTIA DE QUALIDADE PARA
GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS EM LARGA ESCALA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Professora Dra. Juliana Vieira dos Santos Bianchi, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2017

Julia Hofstatter Solano

**ESTRATÉGIA DE GARANTIA DE QUALIDADE PARA
GENOTIPAGEM DE GRUPOS SANGUÍNEOS EM LARGA ESCALA**

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

Orientadora Prof^a. Juliana Vieira dos Santos Bianchi

Examinador Prof^o. Fábio Mitsuo Lima

Dedico esse trabalho, primeiramente, a Deus, por mais esse sonho concretizado, ao ensinamento de todos os professores e ao apoio, paciência e incentivo de minha família, namorado e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a universidade, direção e administração pela confiança no mérito e ética aqui presentes.

A todos os professores que são os maiores responsáveis por estar concluindo esta etapa da minha vida, compartilhando a cada dia os seus conhecimentos.

Aos meus pais e irmã, pelo amor e apoio incondicional, além de ajudarem, direta ou indiretamente, nesta etapa.

Ao meu namorado, pela paciência, compreensão, ajuda e apoio de sempre.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram e acreditaram em meu trabalho.

Agradeço a oportunidade para a realização deste trabalho, à Ester Cerdeira Sabino, Carla Luana Dinardo, Alfredo Mendrone Júnior e, em especial, a minha orientadora Juliana Vieira dos Santos Bianchi pela ajuda, compreensão, competência e incentivo e às minhas colegas e amigas, também envolvidas neste projeto, Vanessa, Renata e Márcia. Sem vocês nada disso se tornaria possível.

Obrigada a todos vocês por participarem desta etapa, pois me fizeram crescer, tanto pessoalmente como profissionalmente.

SOLANO, Julia Hofstatter. **Estratégia de garantia de qualidade em genotipagem em larga escala**. 2017. 48f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biomedicina) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Os ensaios moleculares de alto rendimento são ferramentas essenciais para a pesquisa de doadores de sangue raros. O presente estudo tem como objetivo avaliar um fluxo de trabalho totalmente automatizado projetado para a genotipagem dos antígenos eritrocitários e plaquetários dos doadores de sangue usando o sistema de PCR em tempo real no equipamento QuantStudio. Foram genotipados 5.487 doadores de sangue utilizando a estratégia proposta nos seguintes passos: Extração de DNA no equipamento QIASymphony®, quantificação do DNA extraído no equipamento Nanodrop, normalização do DNA pelo equipamento epmotion e setup de PCR pelo equipamento Epmotion e genotipagem dos mais importantes antígenos eritrocitários e plaquetários por um ensaio personalizado configurado para o sistema de PCR em tempo real pelo equipamento QuantStudio. Foram testados 142.662 polimorfismos de nucleotídeo único em 59 lâminas, testando 26 SNPs. Os parâmetros avaliados na padronização dessa estratégia foram: capacidade do método em processamento das amostras em larga escala, qualidade dos resultados, porcentagem de ensaios com resultados válidos, exatidão e precisão do método. As amostras apresentaram média de *call rate* (qualidade dos resultados por amostra) de 80.3% e os ensaios (polimorfismos avaliados) apresentaram qualidade média de 87.3%. A exatidão foi controlada por meio de 50 amostras testadas e utilizadas como controle, as quais apresentaram apenas 0,39% de discrepância entre os resultados previamente testados. A técnica apresentou 99,6% de acurácia global e a reprodutibilidade foi de 99,74%. O software foi criado com a finalidade de interface de dados e organização de um banco de dados para utilização em uma base regular para encontrar sangue compatível para pacientes aloimunizados. A estratégia de genotipagem totalmente automatizada proposta é precisa, rápida e adequada para atender às necessidades de um laboratório de imuno-hematologia.

Palavras-chave: Genotipagem. Controle de qualidade. Antígenos de grupos sanguíneos. Aloimunização.

SOLANO, Julia Hofstatter. **Quality assurance strategy for large-scale blood group genotyping**. 2017. 48p. Final paper. (Graduation in Biomedicine) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2017.

Efficient molecular experiments are an essential tool for the research of rare blood type donors. The purpose of this study is to assess a completely automated workflow designed for the genotyping of erythrocyte and platelet antigens from blood donors, using a PCR system in real time on the QuantStudio equipment. 5.487 blood donors were genotyped using the strategy suggested in the following steps: DNA extraction using the QIASymphony® instrument, quantification of the extracted DNA using the Nanodrop instrument, DNA arrangement using the EpMotion worktable, PCR setup using the EpMotion, and genotyping of the most relevant erythrocyte and platelet antigens for a personalized experiment set up for the PCR system in real time using the QuantStudio equipment. 142.662 unique nucleotide polymorphisms were tested on 59 plates, testing 26 SNPs. The parameters evaluated in the standardization of this strategy are the following: the method's ability to process a large amount of samples, quality of the results, the percentage of experiments with valid results, method accuracy and precision. The samples presented a call rate average (quality of the results per sample) of 80.3% and the samples (evaluated polymorphisms) presented a quality average of 87.3%. The precision was controlled through 50 samples that were tested and used as a curb, these of which presented only a 0.39% discrepancy in comparison to previously tested results. The technique presented a 99,6% global accuracy rate, with a reproducibility of 99,74%. The software was created for the purpose of data interface and organization as well as a regular basis use in order to find blood that is compatible with alloimmunized patients. The completely automated genotyping strategy proposal is precise, quick, and suitable to comply with the necessities of an immunohematology laboratory.

Keywords: Genotyping techniques. Quality control. Blood group antigens. Alloimmunization.

Lista de figuras

Figura 1 - Fase pré-analítica do estudo	21
Figura 2 - Equipamento QIASymphony (Qiagen, Alemanha)	22
Figura 3 - Placa de extração e arquivo correspondente (Report) a uma amostra, gerado pelo equipamento QIASymphony® após extração	24
Figura 4 - Placa de extração e arquivo gerado após a quantificação de uma amostra no equipamento Nanodrop	25
Figura 5 - Protocolo de interfaceamento dos dados de quantificação para normalização das amostras no equipamento Epmotion	27
Figura 6 - Modelo utilizado para preenchimento da placa de 96 poços	28
Figura 7 - Exemplo da etapa de PCR no equipamento Epmotion	29
Figura 8 - Programação de pipetagem da placa de 96 para a placa de 384 e da placa de 384 para a lâmina de microarray	31
Figura 9 - Desenho da lâmina de microarray utilizada no equipamento QuantStudio® (ThermoFisher®)	32
Figura 10 - Princípio de funcionamento do PCR em tempo real	35
Figura 11 - Resultados obtidos para os alelos determinantes dos antígenos Co ^a e Co ^b (sistema Colton)	36

Lista de tabelas

Tabela 1 - SNPs incluídos na lâmina para genotipagem	33
Tabela 2 - Resumo do desempenho da plataforma Quantstudio	39
Tabela 3 - Descrição do genótipo das amostras controles/padrões e percentagem de resultados discrepantes	40

Lista de abreviaturas e siglas

µL - microlitros

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FPS/HSP - Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HTLV – vírus T-linfotrópico humano

HCV – vírus da hepatite C

HBV – vírus da hepatite B

ISBT - Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue

ng/µL – nanogramas por microlitros

nm - nanômetros

PCR - reação em cadeia da polimerase

PCR-SSP - reação em cadeia da polimerase única e específica

POP - procedimento operacional padrão

SBS - banco de sangue

SNPs - *single nucleotide polymorphism*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVO	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Casuística	18
3.2	Ética.....	18
3.3	Fase pré-analítica	18
3.4	Treinamento.....	20
3.5	Extração de DNA	21
3.6	Quantificação do DNA	24
3.7	Normalização de DNA	25
3.8	PCR	28
3.9	QuantStudio	34
3.10	Crerrios para análise de exatidão, precisão e robustez	37
3.10.1	Exatidão/Acurácia e Precisão	37
3.10.2	Robustez	37
4	RESULTADOS.....	38
5	DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

Os grupos sanguíneos começaram a ser descobertos a partir do início do século XX, com o estudo desenvolvido por Karl Landsteiner, que notou que o plasma de alguns indivíduos aglutinava na presença de eritrócitos de outros indivíduos. Entretanto, a investigação imuno-hematológica alcançou um enorme avanço a partir de 1945, com o desenvolvimento do teste de anti-imunoglobulina por *Coombs, Mourant e Race*, os anticorpos da classe IgG, chamados “incompletos” para aglutinação puderam ser detectados e então foi possível a descoberta dos outros grupos sanguíneos existentes (DANIELS, 2002).

Os antígenos são estruturas expressas na superfície da membrana eritrocitária. Eles podem ser determinados por epítomos de carboidratos em glicoproteínas e/ou glicolípídeos ou por sequências de aminoácidos que compõem proteínas de única passagem, multipassagem ou ligadas à glicosilfosfatidilinositol (DANIELS, 2002).

De acordo com a Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (ISBT), atualmente há mais de 350 antígenos organizados em 36 sistemas de grupos sanguíneos.

Tais estruturas são herdadas geneticamente e determinados por alelos; cada pessoa tem dois alelos por cada traço, um de origem paterna e outro materna. Cada sistema de grupo sanguíneo é produzido por alelos de um gene ou um conjunto de genes homólogos estreitamente ligados, e esses alelos, são co-dominantes, ou seja, ambos são expressos. Sendo assim, pode-se apresentar os resultados moleculares dos grupos sanguíneos em genótipos, alelos ou fenótipo deduzido. Pode-se também, determinar os fenótipos por meio de soros monoclonais utilizados em testes sorológicos de hemaglutinação (HARMENING, 2006).

Os antígenos de grupos sanguíneos são altamente polimórficos, e a maioria dos polimorfismos se origina de mutações no gene, principalmente polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs - *single nucleotide polymorphism* – polimorfismo de único nucleotídeo). Os SNPs são a troca de um único nucleotídeo na região codificadora, que podem converter um códon que determina um aminoácido em um códon de terminação gerando uma mutação “nonsense” ou mutação sem sentido de

transcrição; ou podem não alterar o aminoácido determinado pelo códon, gerando uma mutação silenciosa; ou que podem alterar o aminoácido resultando em uma mutação “*missense*”. A maioria dos antígenos surge de mutações “*missenses*”. Existem ainda outros mecanismos moleculares que originam formas variantes desses genes como deleções, inserções e recombinações gênicas (CASTILHO, 2009).

A biologia molecular tem sido fundamental para aplicação de metodologias com maior segurança e eficácia transfusional na rotina de laboratórios especializados. Um grande exemplo é a genotipagem de grupos sanguíneos, onde a biologia molecular supre a deficiência das técnicas normalmente utilizadas, como os testes sorológicos de hemaglutinação, principalmente quando é feita a fenotipagem de pacientes com transfusão recente, onde hemácias do doador estão presentes na circulação do receptor (DANIELS, 2002; BAIOSCHI; NARDOZZA, 2009).

A genotipagem de grupos sanguíneos contribuiu para avanços na imunohematologia, mas ela ainda é utilizada apenas em pequena escala, para casos isolados devido a quantidade de alelos diferentes que serão pesquisados para cada paciente, necessitando a realização de muitas técnicas de PCR para cada paciente estudado (DANIELS, 2002).

Segundo Castilho (2009), a alternativa para a resolução destes conflitos seria a aplicação de técnicas moleculares que permitem o trabalho em larga escala (tecnologia *microarray*), ou seja, a triagem automatizada dos SNPs de grupos sanguíneos em doadores de sangue, possibilitando uma compatibilidade exata entre doadores e receptores.

A técnica conhecida como *microarray* é uma ótima ferramenta experimental para detectar sequências específicas do gene e possuem grande valor e muitas aplicações, como a genotipagem dos antígenos plaquetários e eritrocitários, em que fragmentos de DNA (*deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucleico) são hibridizados com sondas para ativar sensores do equipamento, então é utilizado um *software* especialmente desenvolvido para a análise dos dados. É um método para detecção de SNPs em larga escala por meio da extração do DNA a partir de amostras de sangue, utilizando PCR alelo específico em que os produtos marcados são anelados às lâminas já contendo as sondas de oligonucleotídeos alelo

específico (GUINDALINI; TUFIK, 2007; QUEIROZ, 2013; ROSA; ROCHA; FURLAN, 2007).

Atualmente, existem plataformas fechadas com ensaios previamente desenhados para genotipagem dos principais antígenos eritrocitários, as mais utilizadas são: *BeadChip* (HEA, Immucor®) e *BLOODchip* (Progenika®); mas o custo dessas técnicas é muito alto, o que as torna inviável para utilização em bancos de sangue públicos. Existem também plataformas abertas para genotipagem em larga escala para investigação de polimorfismo de único nucleotídeo, o que possibilita a determinação de grupos sanguíneos com significância clínica transfusional e a escolha dos alelos a serem investigados de maneira customizada, como o equipamento QuantStudio® (ThermoFisher®, Alemanha) (BIANCHI *et al.*, 2015).

A técnica de genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala é uma ferramenta importante quando se trata de procurar fenótipos raros e de determinar fenótipos específicos envolvendo antígenos cujos anti-soros comerciais não estão disponíveis. A organização de um banco de doadores raros é importante para proporcionar aos pacientes que desenvolveram aloanticorpos contra os antígenos de alta frequência, especialmente os pacientes com células falciformes, e também os recém-nascidos que sofrem de trombocitopenia aloimune fetal e neonatal, a identificação de doadores compatíveis em menor tempo, evitando casos de aloimunização (RIBEIRO, 2009; ST-LOUIS, 2014; LATINI; GAZITO, 2014).

Entretanto, além do QuantStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), existem outras estratégias de qualidade em análises quantitativas, como o Progenika ID CORE XT (Progenika BiopharmaGrifols, Bizkaia, Espanha) e o HEA BeadChip™ (BioArray Solutions, Immucor, Warren).

O Progenika ID CORE XT (Progenika BiopharmaGrifols, Espanha), analisa 29 polimorfismos que determinam 37 antígenos dos grupos sanguíneos (Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton, Cartwright e Lutheran). Essa plataforma utiliza o sistema Luminex, um citômetro de fluxo modificado, que utiliza sondas unidas a microesferas para quantificar a quantidade de um analito que esteja ligado a uma sonda específica. Este sistema tem um amplo espectro de aplicações que requerem a detecção de alto rendimento de múltiplas sequências de ácido nucleico numa única reação, incluindo HLA e HPA, que são importantes em hemocentros e

serviços de transfusão. Por esta razão, o sistema Luminex já está presente em muitos laboratórios, facilitando a implementação e uso rotineiro do sistema de genotipagem ID CORE XT em grupos sanguíneos (GOLDMAN; NÚRIA; CASTILHO, 2009).

Este sistema pode testar de 6 a 94 amostras, com dois controles. A flexibilidade no número de amostras é útil, permitindo testes diagnósticos mais urgentes num número relativamente pequeno de amostras, bem como testes de doadores em lotes de amostras maiores. Uma vez que as amostras são introduzidas no Luminex, o sistema é totalmente automatizado. O tempo total para analisar as amostras, uma vez que o DNA foi extraído, é de aproximadamente 4 horas. Como o sistema é automatizado e usa software para interpretar os resultados, é necessária pouca experiência real na biologia molecular dos sistemas de antígenos de glóbulos vermelhos, embora a possibilidade de visualizar os gráficos de dados brutos possa fornecer alguma percepção nos casos de discordâncias entre fenotipagem e genotipagem ou resultados "No Call". O software é comum a outros sistemas de genotipagem BLOODchip ID XT (Progenika Biopharma-Grifols), como o ID HPA XT, que permite processamento simultâneo de amostras e análise de dados em lotes híbridos. Apesar de todas essas vantagens, esse sistema inclui limitações como a ausência dos alelos SC*1/SC*2 e LW*A/LW*B, não faz determinação ABO/RhD e não fornece informações sobre zigosidade ou determinação de haplótipos (GOLDMAN; NÚRIA; CASTILHO, 2009; FINNING et al., 2015).

O HEA BeadChip (BioArray Solutions, Immucor, Warren) é uma plataforma comercial atualmente disponível para prever antígenos de eritrócito humano por análise de DNA. O sistema HEA BeadChip detecta 24 polimorfismos associados a 38 antígenos e variantes fenotípicas em um único teste. O ensaio também detecta uma mutação (HgbS 173A> T) no gene da beta-globina (HASHMI et al., 2007; PACCAPELO et al, 2015).

O sistema HEA BeadChip fornece atualmente informações sobre a presença da mutação silenciadora GATA no gene Duffy, que quando presente em um potencial receptor pode permitir transfusão de sangue Fy (b+), mesmo quando o fenótipo sorológico é Fy (b-) e outros variantes de genes clinicamente importantes, tais como SNPs encontrados em alguns alelos de RHCE. Além disso, pode ajudar a

identificar variantes de alelo GYPB incomuns. O método baseia-se numa reacção de extensão curta de sondas de oligonucleotídeos ligadas a esferas codificadas por cor, utilizando um produto de PCR como molde. Consiste em cinco etapas e leva cerca de 5 horas. Em cada corrida, é possível processar desde 6 até 94 amostras, incluindo um controle negativo e um controle positivo (DELANEY et al., 2015; PACCAPELO *et al*, 2015).

A tecnologia BeadChip é um método robusto de alto rendimento para genotipagem em grande escala, que tem potencial para ser totalmente automatizado. Fornece uma ferramenta para ajudar a aumentar o inventário de unidades sanguíneas negativas para o antígeno, a identificação de doadores raros que não puderam ser detectados devido à escassez ou ausência de reagentes apropriados em métodos sorológicos e o conhecimento alargado dos perfis de antígeno dos doentes. Sua aplicação na prevenção da aloimunização pode contribuir para reduzir o custo dos testes de transfusão de sangue em receptores de transfusão crônica (PACCAPELO *et al*, 2015).

2 OBJETIVO

Estabelecer uma estratégia de garantia de qualidade na implementação da plataforma molecular para genotipagem de grupos sanguíneos em larga escala, utilizando amostras da população de doadores de sangue da Fundação Pró Sangue/ Hemocentro de São Paulo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo realizado no Instituto de Medicina Tropical (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS/HSP).

A estratégia inicial previa o processamento de 5.487 doadores da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo a participarem do estudo, no qual, foram avaliados 32 SNPs de sistemas de grupos sanguíneos eritrocitários e plaquetários.

3.2 Ética

Cada participante recebeu informações sobre a pesquisa, leram um documento com informações referentes ao projeto de pesquisa e assinaram o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), presente no apêndice A deste trabalho, incluindo também a aprovação do comitê de ética em pesquisa, no apêndice B. Após assinarem o TCLE, foram encaminhados à doação de sangue, na qual, o tubo de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) com a amostra do doador foi encaminhado para exames moleculares.

3.3 Fase pré-analítica

Para genotipagem de 32 polimorfismos em 5000 doadores por método de PCR-SSP, seria necessária a realização de aproximadamente 320.000 (32x5000x2alelos) ensaios para determinação de todos os polimorfismos, sem contar com as repetições que eventualmente são necessárias. Assim sendo, a utilização de métodos moleculares em doadores de sangue envolvendo vários polimorfismos tem sido amplamente realizada por meio da utilização de plataformas de larga escala. Entretanto, as plataformas existentes são altamente dispendiosas, apresentando como vantagem, técnicas já padronizadas com o uso de equipamentos validados e específicos. O QuantStudio (Thermo Fisher Scientific Inc.,

EUA) é uma plataforma aberta que requer padronização do protocolo utilizado, com isso foi necessário um treinamento da equipe em todos os equipamentos utilizados: QiaSymphony (Qiagen, Alemanha), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), EpMotion (Eppendorf, Alemanha), SpeedVac (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), AccuFill (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) e QuantStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

Para garantir a qualidade do resultado final do trabalho, foi necessário o máximo de atenção na fase pré-analítica que inclui desde o cadastro do doador até a extração de DNA.

Após as etapas de cadastro do doador pelo banco de sangue, pré-triagem e triagem clínica que habilitam o doador a executar a doação, os doadores eram abordados pela equipe de genotipagem e convidados a participarem do projeto para determinação dos principais genótipos eritrocitários e identificação de doadores raros. Os doadores que aceitavam, deveriam preencher e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Nesse momento, o cartão de doador era identificado com uma etiqueta verde, para que o flebotomista informasse ao sistema SBS que o doador participaria da pesquisa de genotipagem.

As amostras são coletadas imediatamente antes da coleta do hemocomponente, todos os tubos e bolsas de sangue são identificados apenas com o código de barras. Nesse momento, as informações entre doador/tubos/bolsas são “amarradas” no sistema de informação do banco de sangue (SBS). Assim sendo, optamos pelo reaproveitamento do tubo EDTA (BD Vacutainer®), enviado ao setor de imuno-hematologia de doadores, sendo necessárias adequações ao modo como é feito todo processo de doação de sangue na FPS, visando evitar desconforto ao paciente com a coleta de um tubo extra e também facilitar todo o processo de rastreabilidade da amostra, permitindo assim, a utilização do mesmo código de barras.

Após a coleta do hemocomponente e dos tubos a bolsa de sangue segue para o setor de processamento e os tubos seguem para os setores de sorologia e imuno-hematologia para testar o doador antes da liberação do hemocomponente. Na sorologia, são realizados testes de HIV, HTLV, HCV, HBV, sífilis e chagas e no setor

de imuno-hematologia clínica é realizada tipagem ABO/RH, pesquisa de anticorpos irregulares e fenotipagem.

No setor de imuno-hematologia de doadores, as amostras são recepcionadas via sistema SBS, o qual sinalizava quais amostras deveriam ser encaminhadas a equipe de genotipagem.

Entre o processo de coleta e encaminhamento para genotipagem não poderia ultrapassar a 48 horas. Caso contrário, as amostras seriam excluídas do estudo.

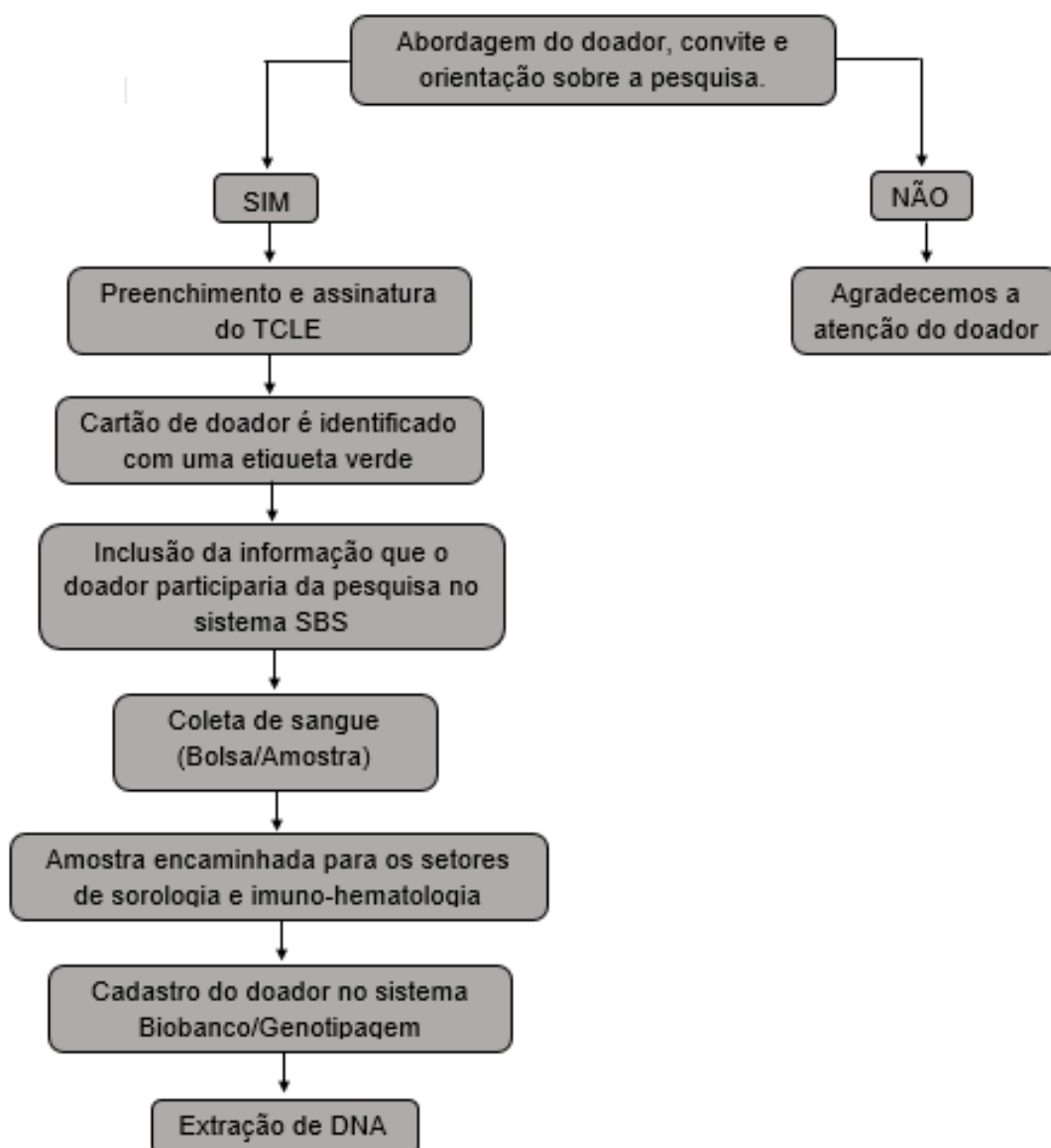
Após recebimento das amostras pela equipe de genotipagem, essas eram efetivamente incluídas no software de genotipagem de grupos sanguíneos, denominado Biobanco/Genotipagem, com o intuito de armazenamento de alíquotas, rastreio de amostras, e interfaceamento dos dados das amostras entre os sistemas envolvidos em todas as etapas do processo, por exemplo, os códigos de barras eram interfaceados do “*report*” do equipamento de extração de DNA (QiaSymphony) e importados para o software do equipamento de PCR (QuantStudio), esse por sua vez, gerava os dados com os resultados das amostras que seriam importados para o software Taqman Genotyper e posteriormente interfaceados para o Biobanco/Genotipagem, no qual é possível fazer a busca do doador por meio do genótipo ausente.

3.4 Treinamento

Foi realizado treinamento para cada equipamento utilizado, para assegurar que cada etapa do processo foi feita de forma correta. Este processo foi acompanhado por representantes da empresa responsável por cada equipamento, para assegurar um melhor desempenho da equipe para que no final do trabalho surtissem resultados consistentes e seguros.

Além do treinamento, foi necessária a padronização de cada etapa, sendo criado então, um procedimento operacional padrão (POP) para cada processo e cada equipamento, para que cada procedimento fosse entendido e realizado de forma correta, para não modificar o resultado final do trabalho. É possível observar cada etapa desta fase por meio da Figura 1.

Figura 1 – Fase pré-analítica do estudo.



3.5 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada por meio de um método automatizado, que utiliza DNA Mini Kits aplicados ao protocolo DNA *Blood* 200 V7 do equipamento de sistema fechado QIAasymphony® SP (Qiagen, Alemanha), conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Equipamento *QIAasymphony* (Qiagen, Alemanha).



Fonte: (QIAGEN, 2015)

Esta etapa era realizada após realização de testes imuno-hematológicos na amostra, que era então encaminhada para a extração de DNA. O tempo entre a coleta e a realização da extração não deveria ultrapassar 48 horas, tendo em vista que após esse tempo, aumenta o nível de hemólise da amostra tornando-a viscosa, comprometendo a qualidade da extração.

Os *DNA Mini Kits* (Qiagen, Alemanha) são usados para purificação automatizada DNA de sangue total humano, *buffy coat*, tecidos humanos e animais, células de cultura, culturas bacterianas e DNA viral. Para a aplicação do protocolo *DNA Blood 200 V7*, a amostra inicial pode ser colhida com EDTA, citrato ou heparina, com volume mínimo de 400µL. E o volume eluição final pode ser programado para 50µL, 100µL ou 200µL.

Neste estudo, todas as amostras utilizadas possuíam 400 µL de sangue total, colhido em tubo contendo anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®), e a programação do volume de eluição final foi de 50µL. Essa estratégia foi adotada com o objetivo aumentar a recuperação de DNA no processo de eluição.

Os reagentes que compõem o *DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) utilizado nessa técnica são partículas magnéticas, proteinase K, tampão de lise, tampão de lavagem e tampão de eluição.

O equipamento utiliza técnica segura e reprodutível, baseada em sílica de purificação e manuseio de partículas magnéticas. A técnica é dividida em quatro

etapas: lise, ligação, lavagem e eluição. As *beads* magnéticas são banhadas por sílica. Para que o DNA se ligue a sílica, é adicionada à amostra uma solução de sais caotrópicos (composição do tampão de lise) que desidrata o DNA e, com isso, ele se liga à sílica presente nas *beads* (BOOM et al., 1990).

Inicialmente, o equipamento posiciona os poços descartáveis (poços 1 e 2) na estação de lise. Os conjuntos de poços são chamados, pelo fabricante, de *sample prep cartridges* (cartuchos de preparação de amostras) (Qiagen, Alemanha).

Após a etapa de lavagem, as partículas magnéticas são novamente atraídas pela vareta magnética recoberta pela cobertura plástica descartável e são transferidas para o poço 3, que contém tampão de eluição (reagente 3), assim as moléculas de DNA são reidratadas e se desligam das partículas magnéticas. Assim, as partículas sem o DNA serão novamente atraídas pela vareta magnética recoberta pela cobertura plástica descartável e posteriormente são descartadas.

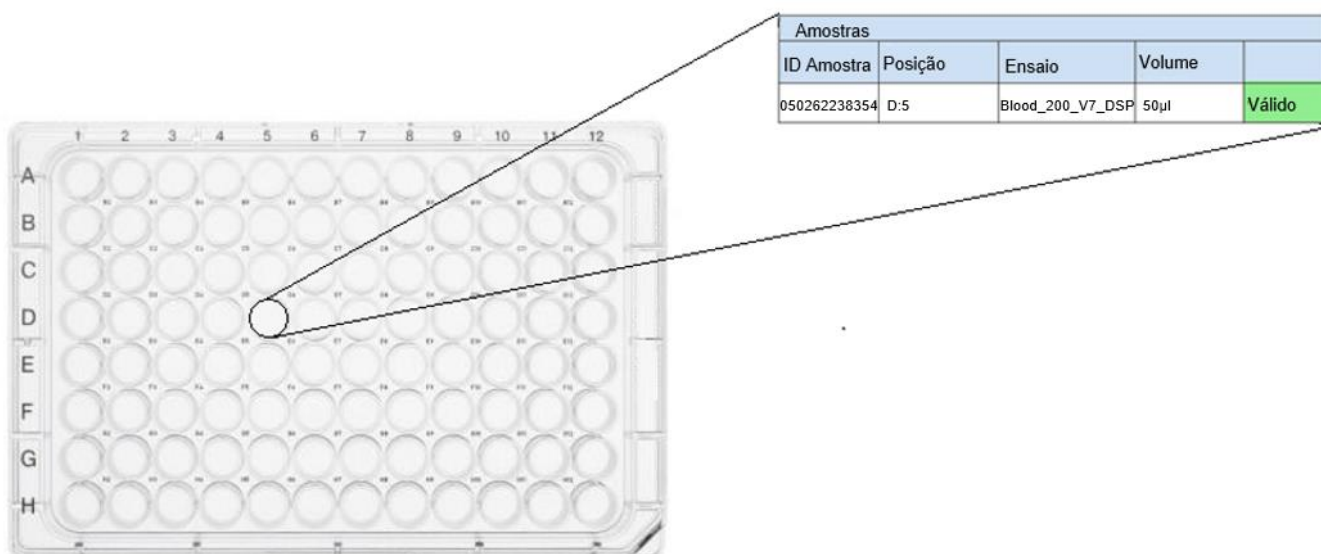
Temos então, o DNA eluído como produto destas três etapas de extração. Este eluato é transferido para uma placa de 96 poços.

O equipamento nos fornece DNA de alta qualidade, que é adequado para uso direto em outras técnicas, bem como, para armazenamento. O DNA purificado é livre de proteínas, nucleases de acordo com os dados obtidos por meio da quantificação no equipamento Nanodrop.

O software fornece um relatório com todas as informações de cada etapa do processo, apresentando a posição e identificação (código de barras) das amostras que foram extraídas, como mostra a figura 3. Esses dados são utilizados para o interfaceamento dos códigos de barras para o QuantStudio (Qiagen, Alemanha).

A extração era realizada em blocos de 93 amostras em placas de 96, com o objetivo de utilizarmos os três poços restantes com as amostras controles.

Figura 3 – Placa de extração e arquivo correspondente (*Report*) a uma amostra, gerado pelo equipamento QIAAsymphony® após extração.



3.6 Quantificação do DNA

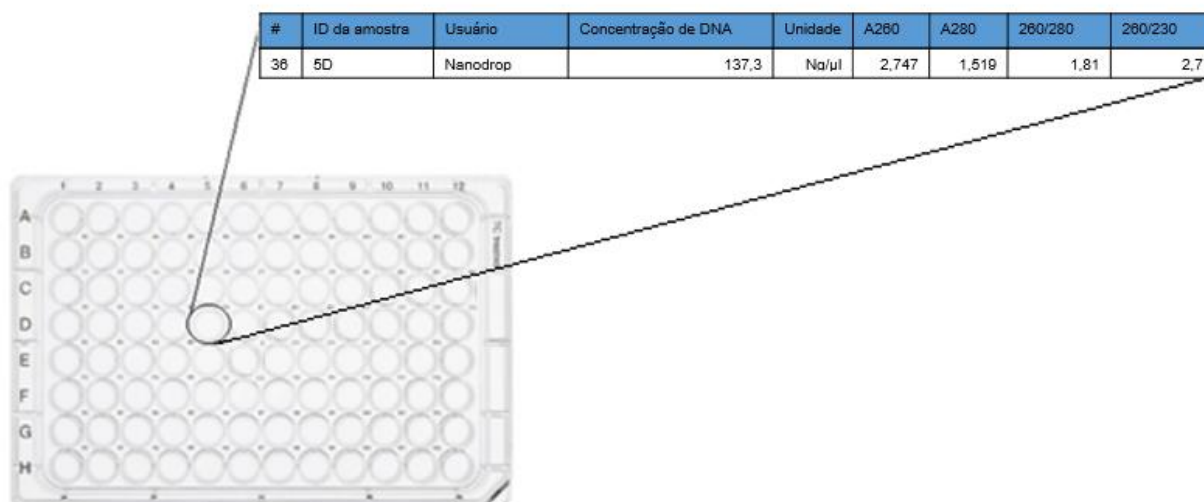
Para avaliar a concentração e a qualidade do DNA foi realizada espectrofotometria de microvolume em equipamento de quantificação de ácidos nucleicos (NanoDrop™ 2000, EUA). Todas as amostras com pureza 260/280 e 260/230 abaixo de 1.8 e acima de 2.0 foram reextraídas a partir do buffy coat da amostra primária congelada e posteriormente diluídas para uma concentração final de 50ng/uL.

Para quantificação das amostras, era necessário pipetar 2 uL de amostra para inserir no equipamento, que faz a leitura e quantifica o DNA. A razão 260nm e 280 nm são utilizadas para avaliar a pureza do DNA, que é aceito como puro uma razão de ~1,8 até ~2,0. Se a razão for baixa, indica a presença de proteína, fenol ou outros contaminantes que absorvem perto de 280nm. Já a razão 260nm e 230 nm normalmente é mais alta que a 260/280, podendo variar de ~2,0 a 2,2. Se essa razão for maior do que o range, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230nm (THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2017)

Essa etapa não foi automatizada, por limitação do próprio equipamento, assim sendo, as amostras foram identificadas com a posição na placa, como mostra a

figura 4. Para evitarmos erros, a quantificação era realizada individualmente (uma placa por vez) e os arquivos eram nomeados com o número da placa.

Figura 4 – Placa de extração e arquivo gerado após a quantificação de uma amostra no equipamento Nanodrop.



3.7 Normalização de DNA

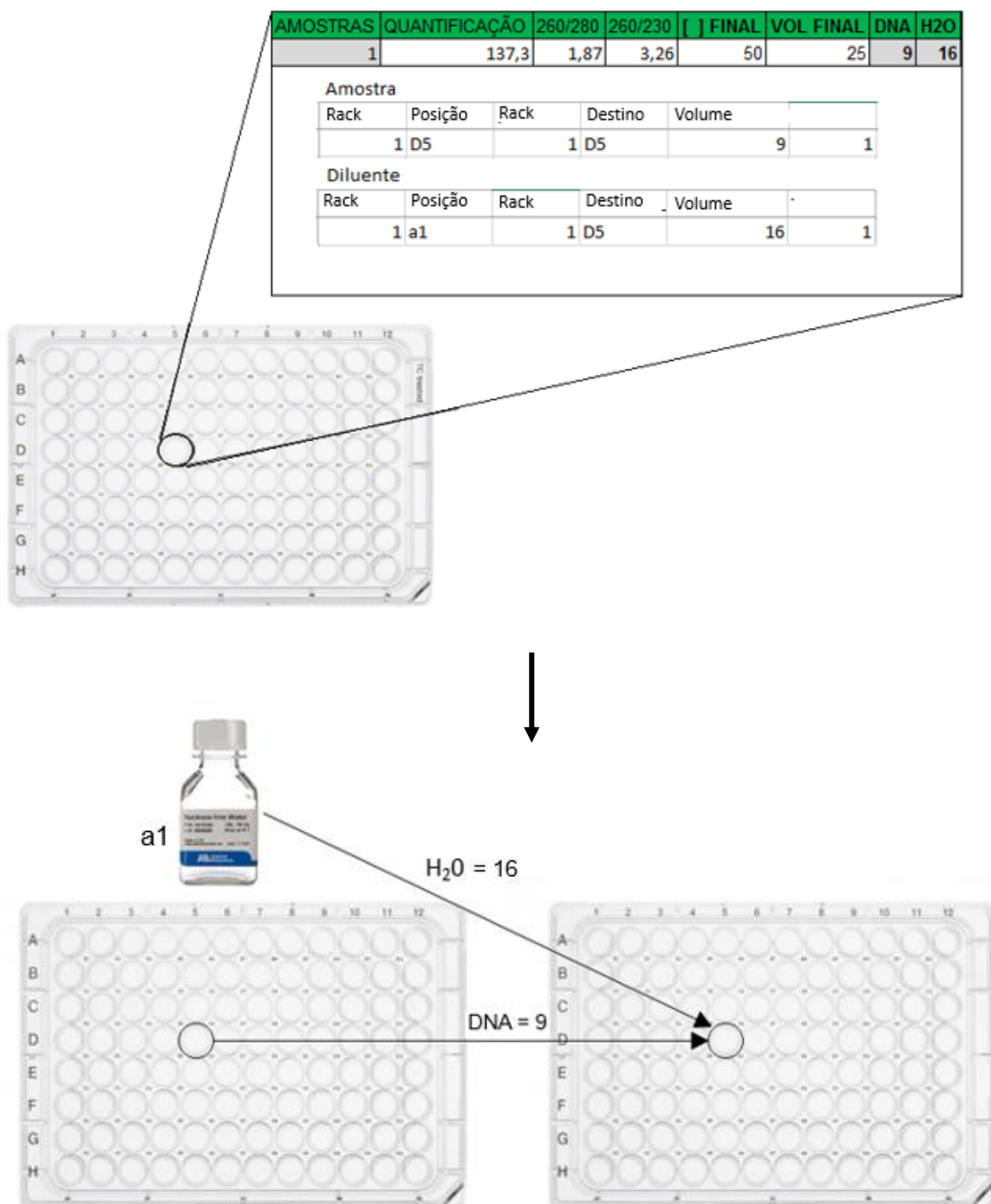
Todas as amostras que apresentavam menos de 45 ng/µL foram concentradas em centrífuga SpeedVac (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), um evaporador centrífugo, composto por uma bomba de vácuo acoplada a uma câmara de centrifugação onde as amostras são colocadas. Nesta etapa, as amostras eram transferidas para um microtubo de 1,5mL, que era centrifugado durante 10 minutos. Após esta etapa, para confirmar que as amostras foram concentradas adequadamente, foi realizada a requantificação das amostras e posterior devolução para a posição de origem.

As amostras com mais de 50 ng/µL foram diluídas no equipamento EpMotion® (Eppendorf, Alemanha), um pipetador semiautomático. Seu *software* permite a confecção de diferentes protocolos de trabalho. Assim, foi realizado o interfaceamento dos dados da quantificação das amostras e o *software* do equipamento.

Foi confeccionado um protocolo de pipetagem específico para este processo e, com isso, o equipamento é capaz de pipetar e transferir a quantidade correta de água e de DNA para a placa, realizando uma diluição precisa com concentração final de 50ng/ μ L, conforme recomendações do fabricante da plataforma QuanStudio e volume final de 25 μ L. Para a confecção deste protocolo, foi necessário a montagem de uma planilha com as informações de todas as amostras a serem normalizadas, como o valor da sua quantificação, as razões 260/280 e 260/230, a concentração final desejada para a amostra (50ng/ μ L) e o volume final necessário de amostra (25 μ L), conforme demonstrado na figura 5. Após inserir todas essas informações, a planilha calculava a quantidade de DNA (amostra) e de água (diluyente) necessários para cada amostra

As informações geradas nessa planilha davam origem a dois arquivos .CSV, sendo um para a amostra e outro para o diluyente, que posteriormente eram importados para o software do EpMotion (Eppendorf, Alemanha). Esse arquivo garantia que a posição das amostras na placa de diluição seria a mesma da placa original (placa mãe de extração).

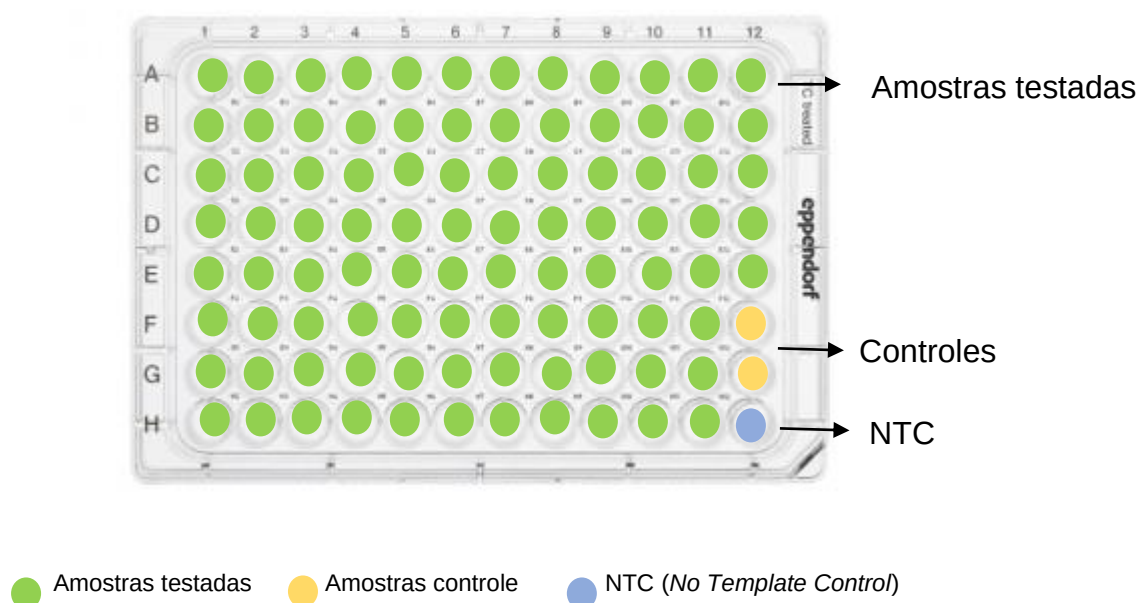
Figura 5 – Protocolo de interfaceamento dos dados de quantificação para normalização das amostras no equipamento Emotion.



3.8 PCR

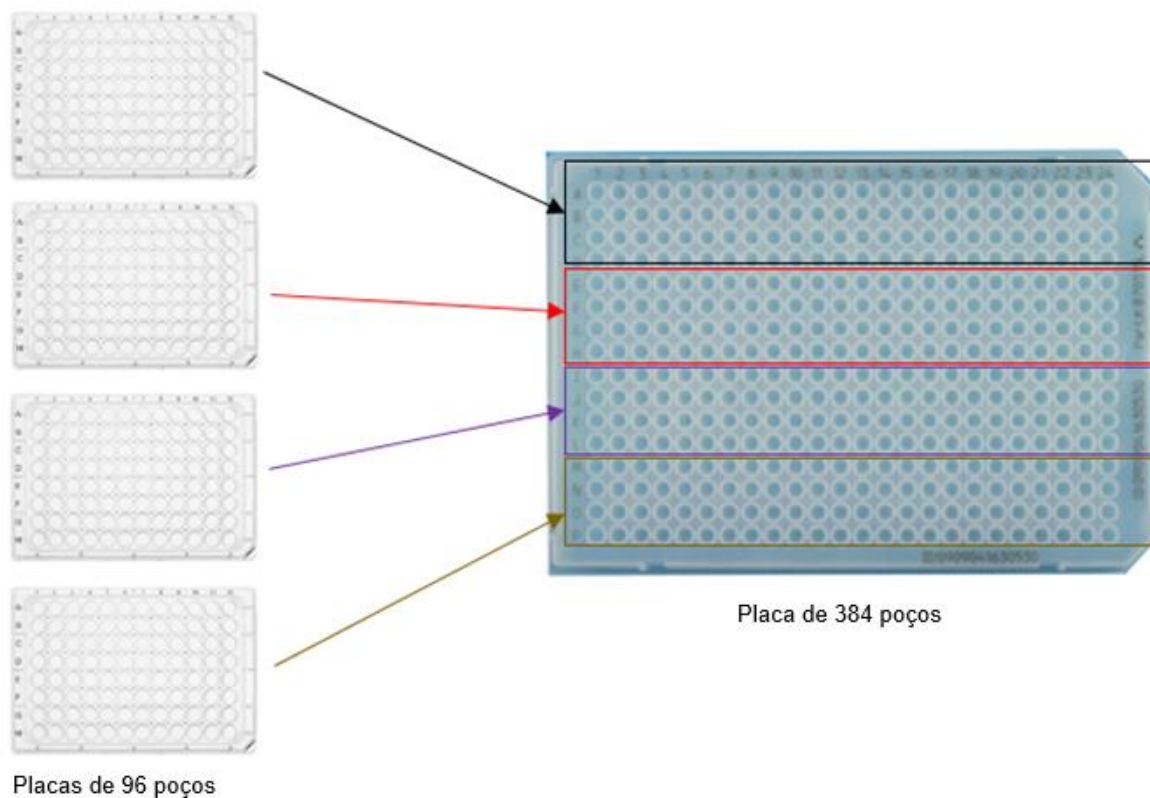
As placas de 96 poços preenchidas com 93 amostras de DNAs normalizados foram completadas manualmente com duas amostras controles e um NTC, ilustrado na figura 6. Assim sendo, em cada placa de 384 poços, estavam presentes 8 controles e 4 NTCs.

Figura 6 – Modelo utilizado para preenchimento da placa de 96 poços.



O PCR foi realizado também no equipamento EpMotion® (Eppendorf), um pipetador semiautomático. Para a realização do PCR, foi criado outro protocolo específico e programado direto no equipamento. Este protocolo apresentava uma programação em que 2,5µL de DNA de cada amostra foi transferido para uma placa de 384 (específica do sistema QuantStudio) e adicionado 2,5µL de TaqMan Genotyping Master Mix. Era utilizado então, 4 placas de 96 poços para preencher uma placa de 384 poços, como mostra a figura 7.

Figura 7 – Exemplo da etapa de PCR no equipamento Epmotion.



Como cada placa de 384 poços correspondia a 4 placas de 96 poços, era necessário o máximo de cuidado nessa etapa, para que as amostras que já tinham sido transferidas para a placa de 384 poços não evaporassem. Para evitar a perda de volume por evaporação, utilizamos um filme selador para vedar a placa de 384 após o processo de pipetagem de cada placa de 96.

Outro cuidado adotado com a finalidade de diminuir a evaporação do PCR e degradação do DNA, foi a utilização do suporte do equipamento Epmotion refrigerado.

Para garantir a qualidade dos insumos utilizados nessa etapa, era necessário o armazenamento controlado de acordo com as especificações do fabricante, incluindo o controle de temperatura do freezer e geladeira.

Após essa etapa, a placa era transportada até o pipetador Accufill® (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) acoplado à plataforma QuantStudio. No transporte da placa de 384 poços, era necessário muito cuidado, pois como os poços desta placa são extremamente pequenos, balançar a placa poderia causar contaminação de uma amostra para a outra. Além disso, nessa etapa era necessário o transporte da placa em caixa de isopor, com gelo triturado para manter a temperatura da placa e não degradar todo material dentro dela.

O pipetador Accufill® (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) era utilizado para distribuir as amostras da placa de 384 poços em lâminas de microarray. Para o carregamento da lâmina, foi interfaceado para o equipamento planilhas com as identificações dos códigos de barras dos doadores de sangue (provenientes do QiaSymphony), a posição de origem da placa de 384 e seu destino na lâmina.

As etapas do processamento das amostras, demonstrando a sua localização pode ser observada no esquema da Figura 8.

Figura 8 – Programação de pipetagem da placa de 96 para a placa de 384 e da placa de 384 para a lâmina de microarray.

PLACA QIASYMPHONY												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	

PLACA NORMALIZAÇÃO												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	CTL
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	CTL
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	NTC

PLACA DE 384																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
C	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	CTL
D	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	CTL	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	NTC
E																								
F																								
G																								
H																								
I																								
J																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								
Q																								

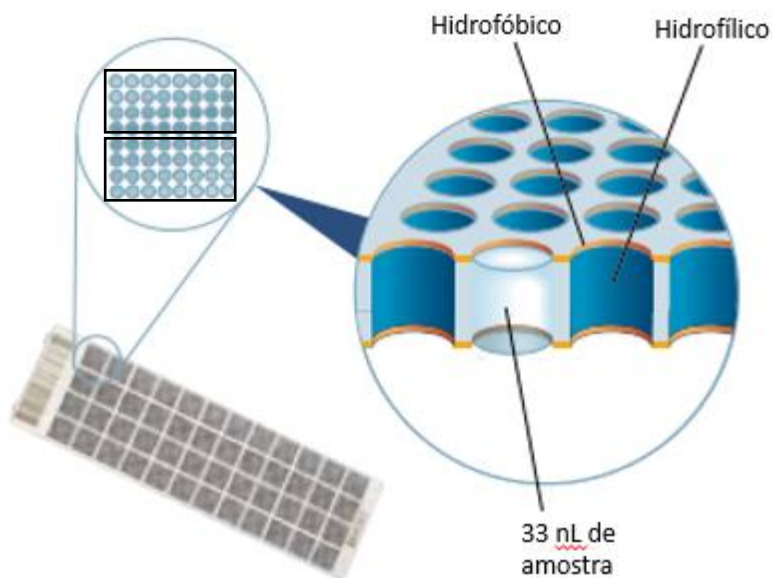
LÂMINA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
C	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	CTL
	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	CTL
D	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	NTC

Após o preenchimento da lâmina de microarray, esta era colocada em um suporte próprio do kit, o qual deveria ser preenchido com óleo mineral fornecido pelo fabricante e esse suporte era vedado com um parafuso próprio antes de transferi-lo para o QuantStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), visto que, o próprio equipamento é responsável para realização dos ciclos de PCR.

Essas lâminas proporcionam um desempenho superior a outras plataformas comparativa para utilização em larga escala. As lâminas utilizadas no projeto permitem a realização de 32 genotipagens por amostra (conforme Figura 9). A escolha dos polimorfismos foi realizada de acordo com os principais grupos

sanguíneos envolvidos no processo de aloimunização eritrocitária, refratariedade plaquetária e PTAN.

Figura 9 – Desenho da lâmina de microarray utilizada no equipamento QuantStudio® (ThermoFisher®).



Nota: A superfície da lâmina é hidrofóbica e o seu interior hidrofílico, permitindo o carregamento por meio de capilaridade. Cada microtubo é preenchido com 33 nL da amostra, os quais possuem *primers* e sondas específicas para cada alelo, que são marcados com fluoróforos VIC e FAM.

Tabela 1 - SNPs incluídos na lâmina para genotipagem

Antígeno	Gene	Variação Genética (Polimorfismo)
Kp ^a /Kp ^b	<i>KEL</i>	R281W (841C>T)
Js ^a /Js ^b	<i>KEL</i>	L597P (1790T>C)
Jk ^a /Jk ^b	<i>JK</i>	N280D (838A>G)
Fya/Fyb	<i>FY</i>	D42G (125A>G)
Fy(a-b-)(Erythrocyte only)	<i>FY</i>	(1-67T>C)
Fy ^x	<i>FY</i>	R89C (265C>T)
M/N	<i>GYPA</i>	G5Q (59 C>T)
S/s	<i>GYPB</i>	T48M (143 C>T)
S/s silente	<i>GYPB</i>	230 C>T
Lu ^a /Lu ^b	<i>LU</i>	R77H (230G>A)
Di ^a /Di ^b	<i>SLC4A1</i>	P854L (2561C>T)
Wr ^a /Wr ^b	<i>SLC4A1</i>	E658K (1972G>A)
Do ^a /Do ^b	<i>DO</i>	N265D (793A>G)
Hy	<i>DO</i>	G108V (323G>T)
Jo ^a	<i>DO</i>	T117I (350C>T)
Co ^a /Co ^b	<i>AQP1</i>	A45V (134C>T)
Yt ^a /Yt ^b	<i>ACHE</i>	H353N (1057C>A)
Kn ^a /Kn ^b	<i>CR1</i>	V1561M (4681G>A)
Sl ^a /Vil	<i>CR1</i>	R1601G (4801A>G)
Sc1/Sc2	<i>ERMAP</i>	G57R (169G>A)
HPA1a/1b	<i>ITGB3</i>	L59P (176T>C)
HPA2a/2b	<i>GP1BA</i>	T161M (482C>T)
HPA3a/3b	<i>ITGA2B</i>	I874S (2621T>G)
HPA4a/4b	<i>ITGB3</i>	R169Q (506G>A)
HPA5a/5b	<i>ITGA2</i>	E534K (1600G>A)
HPA15a/15b	<i>CD109</i>	S703Y (2108C>A)

Cada lâmina contempla 96 amostras, possibilitando o processamento de até quatro lâminas por vez, ou seja, são 384 amostras por rotina totalizando 12.288 genotipagens.

3.9 QuantStudio

Esta plataforma é utilizada para realização de PCR em tempo real, por um baixo custo por ensaio e com tempo de análise mais rápido, de forma segura e automatizada.

Após o preenchimento no pipetador Accufill® (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), a lâmina era então introduzida no equipamento QuantStudio® (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), um termociclador de reação de PCR em tempo real. Essa metodologia permite a detecção do gene de forma customizada e com alto rendimento. As amostras foram amplificadas com a utilização de sondas TaqMan. Este processo tem um tempo de duração de aproximadamente 4 horas, sendo possível, ainda neste tempo, a análise de 4 lâminas na mesma rodada.

A reação Multiplex TaqMan foi realizada no Quantstudio (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Dois controles previamente genotipados provenientes de outro estudo e um controle sem molde que consiste em água isenta de DNase foram introduzidos dentro de cada placa. A reprodutibilidade dos controles foi testada intra-ensaio (dentro de cada placa genotipada no mesmo lote) e inter-ensaio (dentro de placas genotipadas em diferentes lotes). Os resultados de fluorescência foram lidos no QuantStudio (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). As análises de genotipagem foram realizadas no software TaqMan® Genotyper versão 1.3, utilizando a ferramenta "autocalling" para a interpretação automática dos resultados. O experimento foi considerado válido quando o "*call rate*", uma porcentagem de qualidade, foi de 80% ou superior e quando as amostras de controle foram genotipadas com 100% de precisão para todos os alelos estudados.

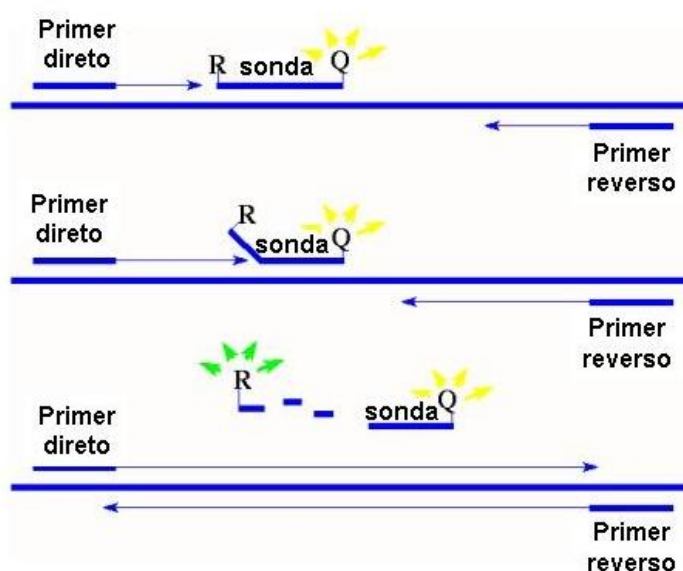
Os equipamentos que realizam PCR em tempo real, possuem um termociclador associado a um leitor de fluorescência, que mede a luz proveniente da reação de amplificação, que, quando o produto é amplificado, são excitados pela fonte de luz e emitem sinal em quantidade proporcional ao que foi sintetizado, sendo também proporcional a sequências – alvo presentes na reação de amplificação. Esses sinais são detectados por sistema óptico e serão analisados pelo software específico acoplado ao equipamento termociclador. Os sinais de fluorescência são

expressos em gráficos quando o produto é amplificado, permitindo o monitoramento da reação em tempo real (PEREIRA, MACIEL, 2004).

São utilizados fluorocromos em sondas de hibridização específicas (um em cada extremidade da sonda). Na extremidade 5' o fluorocromo só fluoresce se estiver distante do fluorocromo na posição 3'. O fluorocromo na posição 3' captura energia (*quencher*) e impede que a energia utilizada para excitar a sonda chegue em quantidade suficiente para excitar o primeiro fluorocromo. Estes dois fluorocromos são representados como R e Q (para *quencher*).

Quando o primer hibridizar a região 5', a sonda também o faz no meio da sequência. À medida em que a Taq polimerase avança sintetizando a fita nova, degrada a sonda à sua frente, liberando o fluorocromo R da sonda, o que permite a absorção de energia e emissão de luz (DENOMME, SCHANEN, 2015). A figura 10 exemplifica essa técnica.

Figura 10 - Princípio de funcionamento do PCR em tempo real.

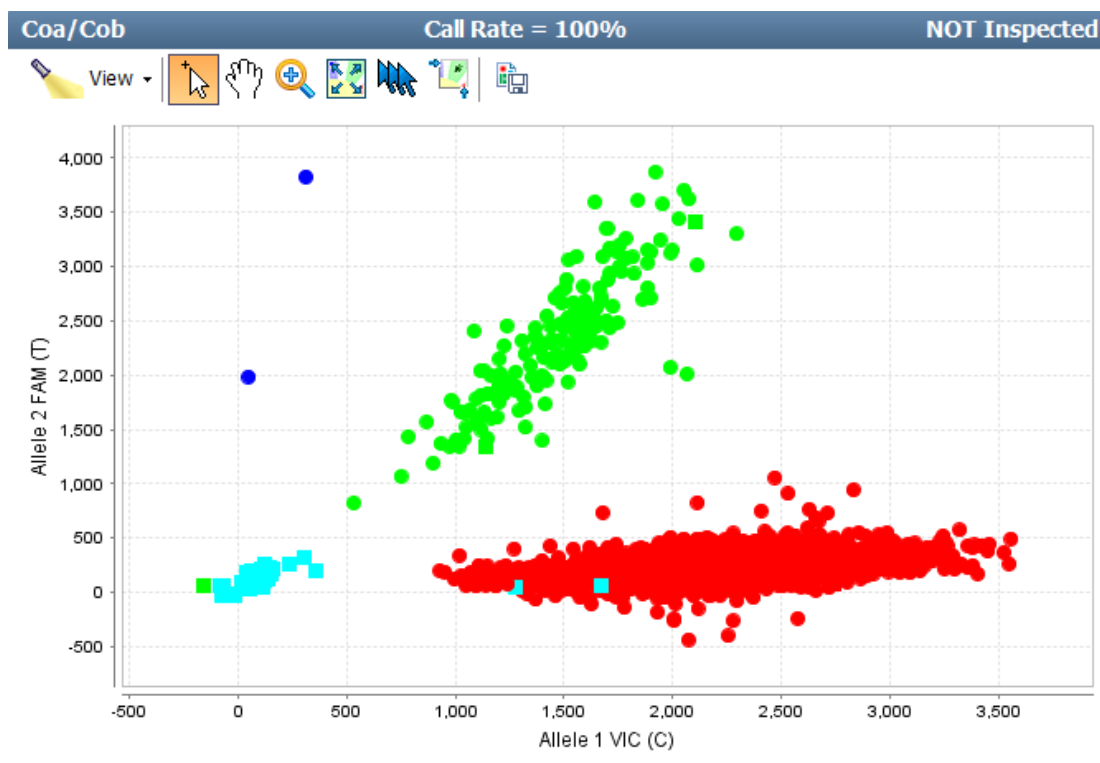


Nota: Uma sonda fita simples com dois fluorocromos é adicionada à reação de PCR. O fluorocromo Q atua como atenuador da fluorescência de R, sendo portanto um *quencher*. Para isto é preciso que esteja próximo a R. A Taq polimerase separa os dois fluorocromos à medida em que degrada a sonda quando sintetiza a fita nova. O fluorocromo R recém liberado da sonda emite então luz num comprimento de onda característico, diferente de Q. A excitação dos fluorocromos é feita com laser que atravesse o tubo de reação.

As reações do ensaio *Taqman multiplex* foram realizadas no sistema de PCR em tempo real QuantStudio™ 12K com o seguinte ciclo de PCR: um passo inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°; Seguido por um passo final durante 15 segundos a 95°C e 15 segundos em 60°C e a temperatura de anelamento e extensão é a mesma (60°C).

Os resultados do QuantStudio são demonstrados por SNPs em gráficos (Figura 11), no qual, cada SNPs pode apresentar resultados em Homozigose para o alelo 1 (VIC/VIC), Homozigose para o alelo 2 (FAM/FAM) ou em Heterozigose (VIC/FAM).

Figura 11 – Resultados obtidos para os alelos determinantes dos antígenos Co^a e Co^b (sistema Colton).



3.10 Critérios para análise de exatidão, precisão e robustez

3.10.1 Exatidão/Acurácia e Precisão

Para controlar a exatidão foram testados 50 amostras controles na primeira placa. As amostras controles foram previamente genotipadas pelo método BLOODChip (Progenika, Espanha). Estas mesmas amostras foram utilizadas como controles em todas as placas para análise da acurácia e precisão (repetitividade e reprodutibilidade). A reprodutibilidade foi realizada comparando os resultados dos controles da primeira placa com as outras placas e a repetitividade foi examinada comparando os mesmos controles nas mesmas placas testadas, cada controle foi repetido 3 a 5 vezes.

Cada controle foi repetido em 3 placas diferentes e cada placa apresentava 2 controles diferentes, para garantir a reprodutibilidade (inter-ensaio) da técnica. Ao final do processamento das lâminas, os resultados das amostras controles eram analisados e lançados em uma planilha para comparação com o resultado padrão.

3.10.2 Robustez

A robustez do equipamento foi testada, realizando-se a capacidade máxima de testes por dia no QuantStudio, assim sendo, foram testadas 2 baterias com 4 lâminas no mesmo, totalizado 8 lâminas, ou seja, 768 amostras/24.576 ensaios em 1 dia. Essa estratégia não apresentou nenhuma intercorrência, entretanto, tivemos como desvantagem a pipetagem do PCR no EpMotion de grande número de amostras em curto espaço de tempo, necessitando assim, de organização e controle de todas as etapas do processo.

4 RESULTADOS

Para analisar os resultados do PCR, foi utilizado o *software Taqman genotyper* (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). O software foi alimentado com os parâmetros de todos os SNPs incluídos nas lâminas (identificação das amostras homozigotas para o alelo 1, homozigotas para o alelo 2 e heterozigotas), a análise foi feita por SNP, sendo que, cada gráfico agrupa os resultados de acordo com o sinal de fluorescência de VIC e FAM, analisando de forma qualitativa e quantitativa.

Após a análise da primeira lâmina com as amostras controles para determinação da exatidão dos resultados, observamos que os SNPs K/k, C/c, C/c intron 2, E/e, V/V e U+^w, apresentaram resultados discrepantes dos resultados verdadeiros, invalidando a análise desses resultados. Assim sendo, restaram 26 SNPs para análise.

Foram testados 5.487 doadores em 59 lâminas (93 amostras x 59 lâminas), as amostras foram genotipadas utilizando a estratégia descrita. Cada protocolo foi realizado utilizando 4 lâminas por vez, correspondendo a testagem de 372 doadores por protocolo. O tempo para processamento de todas as etapas em 1 lâmina foi de 11h30min.

Ao final do processamento de todos os protocolos foram gerados 142.662 resultados (5.487 amostras x 26 SNPs). Desses, 81,4% dos resultados foram considerados válidos pelo *Taqman Genotyper* e 18,6% foram considerados inválidos, dos quais: 11,36% não amplificaram as sequências alvo de DNA em decorrência da fluorescência VIC e FAM abaixo do limiar pré-estabelecido, 6,26% apresentaram resultados indeterminados e 0,98% apresentaram resultados inválidos com ausência do sinal de fluorescência em VIC ou FAM. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 2.

O controle de qualidade do *software* calcula o resultado médio por amostra e SNPs, demonstrando que a média de qualidade (*call rate*) das amostras foi de 80,3% e a média de qualidade (*call rate*) dos SNPs foi de 87,3%, com variação de 74,4 - 94,4, dos quais os ensaios para HPA-5 e -15 apresentaram os piores desempenhos. A principal causa na falha dos resultados foi a incapacidade de

preencher adequadamente a lâmina, porém este fato não comprometeu a qualidade dos resultados válidos (Tabela 2).

Tabela 2 – Resumo do desempenho da plataforma Quantstudio.

Criterio	Resultados
Número de lâminas processadas	59
Número de SNPs testados (com resultados válidos)	26
Número de SNPs genotipados	142,662
Média de <i>call rate</i> (qualidade) de amostras	80.3%
Média de <i>call rate</i> (qualidade) de ensaios	87.3% (range 74.4 – 94.4)
Resultados válidos	81.4%
Resultados falhos	18.4%
	Resultados não amplificados - 11.36%
	Resultados indeterminados - 6.26%
	Resultados inválidos - 0.98%
Resultados discrepantes envolvendo amostras controle (apenas resultados válidos)	12 (0.39%)
Amplificação de controles não-modelo	8.58%

A quantidade total de discrepâncias envolvendo amostras controle previamente genotipadas foi de 0,39% (12 resultados discrepantes num total de 3.044 SNPs genotipados de amostras de controle com resultados válidos). Esta quantidade tomou em consideração apenas os resultados amplificados dos controles, como demonstrado na Tabela 3. Menos de 9% dos NTC (*No Template Control*) foram amplificados (8,58%), por conta disso, o software do equipamento reconhece essas amostras como branco e corrige a análise dos resultados, identificando que as amostras que estiverem com a mesma intensidade de fluorescência que o NTC são amostras inválidas ou indeterminadas, aumentando o limiar e justificando os resultados de não amplificação do DNA identificados pelo Taqman Genotyper. A acurácia global do ensaio foi superior a 99,6% e a reprodutibilidade foi de 99,74%, que foram calculadas através de resultados de precisão e exatidão da técnica, que apresentou 99,39% de exatidão e 99,62% de precisão.

Tabela 3 – Descrição do genótipo das amostras controles/padrões e percentagem de resultados discrepantes.

Números de amostras controle ^I					
Antígenos	Homozigoto A/A	Heterozigoto	Homozigoto B/B	Número de alelos com resultados discrepantes (n/%)	Alelos com resultados discrepantes
Kp ^a /Kp ^b	0	2	48	4 (3.7%)	<i>KEL*03</i>
Js ^a /Js ^b	2	1	47	0	-
Jk ^a /Jk ^b	16	26	9	1 (0.93%)	<i>JK*02</i>
Fy ^a /Fy ^b	11	18	21	0	-
Fy(a-b-)	34	9	7	0	-
Fyx	42	2	0	0	-
M/N	16	20	7	5 (4.63%)	<i>GYP A*01</i>
S/s	8	13	23	0	-
S/s SILENT	49	1	0	0	-
Lu ^a /Lu ^b	1	1	47	0	-
Di ^a /Di ^b	0	1	49	1 (0.93%)	<i>DI*01</i>
Wr ^a /Wr ^b II,III	0	0	50	0	-
Do ^a /Do ^b	6	20	24	0	-
Hy	49	1	0	0	-
Jo ^a	48	2	0	0	-
Co ^a /Co ^b	45	4	1	0	-
Yt ^a /Yt ^b	46	4	0	0	-
Kn ^a /Kn ^b III	47	3	0	0	-
Sl ^a /Vil ^{III}	32	17	2	0	-
Sc1/Sc2 ^{II}	0	0	0	0	-
HPA1a/1b	39	10	1	0	-
HPA2a/2b	36	12	2	0	-
HPA3a/3b	20	26	4	0	-
HPA4a/4b ^{II}	50	0	0	0	-
HPA5a/5b	40	10	0	1 (0.93%)	<i>HPA5b</i>
HPA15a/15b	13	22	15	0	-

- nenhum alelo discrepante

^I O número total de amostras controle é inferior a 50 para alguns antígenos estudados devido à indisponibilidade da genotipagem do SNP em algumas amostras controle.

^{II} SNPs sem amostras controle ou sem controle para alelos raros.

^{III} Amostra controle testada pelo OpenArray.

O software de interface permitiu a busca de doadores pela ausência de fenótipo, facilitando o encontro dos doadores. Esse interfaceamento foi realizado a partir dos resultados obtidos pelo Quantstudio, que gera planilhas de resultados que são interfaceadas para o Taqman Genotyper, sistema utilizado para análise de todos os resultados. Para validação da lâmina, eram analisados os resultados das amostras controles, para que então fosse possível o interfacemento dos resultados para o sistema Biobanco, onde seria feita a tradução dos resultados de genotipagem para fenotipagem deduzida, para que, ao ser realizada a busca de doadores, pudesse ser inserida a informação necessária a ser encontrada na bolsa doador e então o sistema apresenta a bolsa com o fenótipo necessário para o paciente.

5 DISCUSSÃO

A técnica de genotipagem de grupos sanguíneos pelo equipamento QuantStudio® (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) demonstrou ser custo-efetiva e extremamente útil para o objetivo inicial deste trabalho, o rastreamento e obtenção de sangue com genótipos raros para a criação de um banco de doadores raros. As técnicas sorológicas para pesquisa de antígenos eritrocitários em um grande número de doadores são técnicas dispendiosas, trabalhosas e apresentam uma dificuldade em relação a falta de soros para alguns antígenos, como o anti-Di^a que é comercializado somente por uma empresa e o custo de um frasco que permite a realização de 20 reações é de US\$ 1.000,00 (DENOMME, SCHANEN, 2015). O custo da técnica utilizada neste trabalho é de aproximadamente US\$ 30,00 por amostra, considerando somente os insumos utilizados na extração e PCR, sem levar em conta o investimento inicial nos equipamentos, mão de obra especializada e área física. Comparando com o custo e efetividade de outras técnicas, a genotipagem em larga escala é uma técnica de baixo custo quando realizada em grandes quantidades de indivíduos. Entretanto, não seria a técnica ideal para utilização em pacientes na investigação Imuno-hematológica de pacientes aloimunizados, visto que, esses casos não podem aguardar o acúmulo de amostras para processamento (JUNGBAUER et al., 2011).

Além disso, a técnica apresentou vantagens como a possibilidade de se pesquisar uma grande quantidade de polimorfismos de acordo com a população estudada, a customização de quais antígenos se tem interesse de utilizar na lâmina e o tempo de duração da técnica, que permite processar de forma totalmente automatizada uma enorme quantidade de polimorfismos em cinco horas e meia, o que diminui o risco de erros durante a técnica (REID, DENOMME, 2011).

O fluxo de trabalho proposto envolveu interface completa de dados, evitando erros de escrita e aboliu as etapas manuais, excetuando a etapa de quantificação de DNA, atendendo às necessidades de uma rotina em massa. O ensaio desenhado mostrou alta precisão e reprodutibilidade (mais de 99%) e foi rápido no teste de múltiplas amostras por reação. O software para interface de dados foi concebido de forma a permitir aos usuários, acesso ao genótipo e fenótipo deduzido, além de

informação demográfica das amostras dos doadores, bem como à localização das suas amostras ou unidades armazenadas (em caso de criopreservação).

Ter um grupo de doadores genotipados é essencial quando se trata de fornecer bolsa para pacientes aloimunizados que exibem múltiplos anticorpos e anticorpos contra antígenos de alta frequência ou refratariedade plaquetária, púrpura trombocitopênica aloimune neonatal e púrpura pós-transfusão (TOURNAMILLE, 2013; ZIMRING et al., 2011). Relatos iniciais de estratégias de genotipagem de doadores focam em plataformas comerciais especificamente projetadas para genótipos de antígenos eritrocitário e plaquetário (WILKINSON et al., 2012; PACCAPELO et al., 2015). A grande vantagem dessas matrizes, além de sua alta precisão, é a disponibilidade de seu próprio software para interpretação de resultados (BIANCHI et al., 2015; FLEGEL, GOTTSCHALL, DENOMME, 2015). As plataformas Openarray, realizadas pelo equipamento QuantStudio, permitem a personalização do teste de acordo com as necessidades do banco de sangue, respeitando a heterogeneidade da população de antígenos tanto eritrocitários quanto plaquetários. Além disso, essas plataformas abertas são frequentemente rentáveis e podem ser usadas para outros fins científicos, além da rotina imuno-hematológica (DENOMME, SCHANEN, 2015). O presente estudo relata uma experiência de um único centro usando a tecnologia PCR em tempo real pelo equipamento QuantStudio para a genotipagem de doadores e atestou sua alta eficácia, de acordo com estudos anteriores (HOPP et al., 2010).

Apresentando todas essas vantagens, é possível garantir que esse tipo de técnica é ideal para hemocentros com uma grande quantidade de doadores a serem genotipados (REID, 2009).

Mesmo com a possibilidade de se estudar grandes quantidades de polimorfismos, a técnica apresenta uma desvantagem, que é a impossibilidade de se pesquisar os alelos de importância clínica do sistema Rh, pois os controles apresentaram muitos resultados incorretos.

Não foi possível o genótipo de uma variação genética originalmente incluída no ensaio proposto (578C> T do gene KEL, codificando antígenos K/k), em que o número de resultados não amplificados foi enorme e exigiria o desenho de novos primers com alvos diferentes, e a síntese de novas lâminas. Outra desvantagem

desta concepção de placa é o elevado número de resultados falhos (18,6%). Acreditamos que esse fato é devido à falha no preenchimento da placa com os ensaios de formato 32 microtubos (subarrays), não observados em outra experiência em placa com o formato 64 microtubos. No entanto, como o objetivo deste estudo era a triagem de doadores raros, os resultados falhos não representam um impacto considerável, uma vez que o objetivo seria obter o maior número possível de resultados para o encontro de doadores com a ausência de alelos de alta frequência.

Qualquer tecnologia de matriz de DNA requer amostras de DNA de alta pureza, a uma concentração mínima entre 25 e 50 ng/µl (POMEROY et al., 2009). A automatização da extração de DNA é essencial para a realização desses requisitos sem uma ampla amostra, representando este primeiro estudo para engajar a genotipagem de doadores automatizada para a purificação automatizada de ácidos nucleicos. Este estudo padronizou um fluxo de trabalho onde o DNA foi extraído usando o equipamento QIASymphony® (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) e os ajustes de concentração foram feitos por um pipetador automatizado baseado em tabelas computadorizadas. Os dados provenientes de todos os equipamentos no fluxo de trabalho foram interligados, de modo que a posição da amostra doadora em qualquer matriz foi rastreada e ligada à sua identificação original. Isso assegurou amostras de DNA de alta qualidade e, conseqüentemente, ensaios de genotipagem de alta qualidade.

O software criado para a organização do banco de dados deste projeto (Ruby on Rails, Apache e banco de dados PostgreSQL) foi projetado para permitir a busca rotineira de doadores de sangue compatíveis para atendimento transfusional de pacientes aloimunizados. Para atender a esse pedido, os resultados do genótipo foram automaticamente convertidos para o fenótipo previsto, levando em consideração as mutações silenciosas mais relevantes, facilitando a busca de doadores específicos pelos usuários. Além disso, organizou todos os dados referentes às informações de contato dos doadores, bem como o referente à localização de amostras de DNA criopreservado e alíquotas da amostra utilizada. Este é o primeiro software projetado especificamente para organizar o banco de dados de doadores genotipados na América do Sul.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, descrevemos uma rotina de genotipagem de doadores totalmente automatizada usando uma plataforma aberta para genotipagem de grupos sanguíneos, que se mostrou acurada, precisa e rápida, permitindo assim, a criação de um banco de doadores genotipados. Tal estratégia permite o atendimento de pacientes cronicamente transfundidos e aloimunizados que necessitem de bolsas compatíveis de forma rápida.

O desenho da estratégia de garantia da qualidade antes do início dos ensaios foi imprescindível para análise da exatidão e precisão do método, bem como, as demais estratégias adotadas: automatização das etapas, estabelecimento de fluxogramas de trabalhos, treinamentos técnicos dos equipamentos envolvidos, desenvolvimento de instruções de trabalho ou POPs e interfaceamento de entradas e saída dos dados, que minimizaram os erros das fases pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas.

A técnica utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente para o objetivo, mostrando que é eficaz para rotina de grandes hemocentros, facilitando a rotina, se comparada com a técnica utilizada atualmente, que é a fenotipagem.

REFERÊNCIAS

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L. M. M. Aloimunização. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 6, p. 311-319, jun. 2009.

BIANCHI, J.V.S. et al. Comparison of two high-throughput platforms for red *blood* cell and platelet antigens genotyping. **ISBT Science Series**, São Paulo, v. 1, p. 1-7. 2015.

BOOM, R. et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **Journal Of Clinical Microbiology**. Amsterdam, v. 28, n. 3, p. 495-503. 1990.

CASTILHO, L. **Aplicações da biologia molecular em imunohematologia eritrocitária**. Lagoa Santa: DiaMed, 2009. Disponível em: <http://www.imunohematologia.com.br/ello_plugins/content/images/file/19_apostila_genotipagem.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2017.

DANIELS, G. **Human Blood Groups**. 2. ed. UK: Wiley Blackwell, 2002.

DELANEY, M. et al. Red blood cell antigen genotype analysis for 9087 Asian, Asian American, and Native American blood donors. **Transfusion**, v. 55, p. 2369-75. 2015.

DENOMME, G.A.; SCHANEN, M.J. Mass-scale donor red cell genotyping using real-time array technology. **Immunohematology**, v. 31, p. 69-74. 2015.

FINNING, K. et al. Evaluation of red blood cell and platelet antigen genotyping platforms (ID CORE XT / ID HPA XT) in routine clinical practice. **Blood Transfusion**, v. 14, n. 2, p. 160-167. 2015.

FLEGEL, W.A.; GOTTSCHALL, J.L.; DENOMME, G.A. Implementing mass-scale red cell genotyping at a blood center. **Transfusion**, v. 55, p. 2610-5. 2015.

GOLDMAN, M.; NURIA, N.; CASTILHO, L.M. An overview of the Progenika ID CORE XT: an automated genotyping platform based on a fluidic microarray system. **Immunohematology**, v. 31, p. 62-8. 2015.

GUINDALINI, C.; TUFIK, S. Uso de microarrays na busca de perfis de expressão gênica - aplicação no estudo de fenótipos complexos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 4 n. 29, p. 370-374. 2007.

HARMENING, D.M. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

HASHMI, G. et al. Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. **Transfusion**, v. 47, n. 4, p. 736-747. 2007.

HOPP, K. et al. High-throughput red blood cell antigen genotyping using a nanofluidic real-time polymerase chain reaction platform. **Transfusion**, v. 50, p. 40-6. 2010.

JUNGBAUER, C. et al. High-throughput multiplex PCR genotyping for 35 red blood cell antigens in blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 102, n. 3, p.234-242. 2011.

KELLER, M.A. The role of red cell genotyping in transfusion medicine. **Immunohematology**, v. 31, p. 49-52. 2015.

LATINI, F.R.M.; GAZITO, D. A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. **Blood Transfusion**, v. Supl 1, p. 256-263. 2014.

PACCAPELO, C. et al.: HEA BeadChip technology in immunohematology. **Immunohematology**, v. 31, p. 81-90. 2015.

PEREIRA, F.; MACIEL, L.. **PCR quantitativo em tempo real**. Publicações Weinmann. 2004. Disponível em:
<<http://www.publicacoesweinmann.com.br/2009/04/pcr-quantitativo-em-tempo-real.html>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

POMEROY, R. et al. A low-cost, high-throughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications. **Analytical biochemistry**, v. 395, p. 61-7. 2009.

QUEIROZ, M.A.. **O uso da genotipagem de grupos sanguíneos na prática transfusional**. 2013. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2013.

REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C.; OLSSON, M.L. **The Blood Group Antigens Facts Book**. 3. ed. UK: Elsevier, 2012.

REID, M.E. Transfusion in the age of molecular diagnostics. **Hematology**, v. 2009, n. 1, p.171-177. 2009.

REID, M.E.; DENOMME, G.A. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. **Transfusion And Apheresis Science**, v. 44, n. 1, p.65-72. 2011.

RIBEIRO, K.R. et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. **Vox Sang**, v. 97, p. 147-52. 2009.

RIBEIRO, K.A.R. **Genotipagem eritrocitária em larga escala: impacto na medicina transfusional**. 2009. 105 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

ROSA, G.J.M.; ROCHA, L.B.; FURLAN, L.R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. **R. Bras. Zootec**, v. 36, p. 186-209. 2007.

ST-LOUIS, M. Molecular *blood* grouping of donors. **Transfusion And Apheresis Science**, v. 50, n. 2, p. 175-182. 2014.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios**. Disponível em: <<http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2017.

TOURNAMILLE, C.. Les technologies de biologie moléculaire en immunohématologie. **Transfusion Clinique Et Biologique**, v. 20, n. 2, p.72-79. 2013.

WILKINSON, K. et al. Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease. **Transfusion**, v. 52, p. 381-8. 2012.

ZIMRING, J.C. et al. Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. **Transfusion**, v. 51, p. 435-41. 2011.

APÊNDICE A

FUNDACÃO
PRO-SANGUE
HEMOCENTRO DE SÃO PAULO



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **PADRONIZAÇÃO DE ESTRATÉGIA MOLECULAR CUSTO-EFETIVA PARA RASTREAMENTO DE FENÓTIPOS ERITROCITÁRIOS E PLAQUETÁRIOS RAROS EM DOADORES DE SANGUE VISANDO À ORGANIZAÇÃO DE BANCO DE DOADORES RAROS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

2. PESQUISADOR : **Prof. Dra. Ester Cerdeira Sabino**

CARGO/FUNÇÃO: **Docente** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: **Instituto de Medicina Tropical**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒x

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

- 1 – Você está sendo convidado a participar de um estudo sobre sangue raro. Além dos tipos sanguíneos A, B O e AB que normalmente são avaliados na rotina da doação, existem outros tipos que eventualmente podem causar dano ao paciente que vai receber o seu sangue. Este estudo vai testar o seu sangue para estes outros marcadores
- 2 – Caso você aceite participar, além das amostras coletadas na sua doação iremos adicionar um tubo de 5 mL de sangue;
- 3 – No momento da doação, você poderá apresentar uma dor leve no momento da picada da agulha e, eventualmente, um hematoma no local desta. Lembramos que estas são complicações que podem acontecer em qualquer punção venosa rotineira; a Fundação Pró-Sangue rotineiramente dá assistência a todos os doadores quando acontece algum problema. A coleta de um tubo extra de 5mL não aumenta o tempo de doação nem o seu risco de desenvolver um hematoma.
- 5 – Todos os dados de tipo sanguíneo gerados neste estudo serão utilizados para identificar a suas doações de sangue futuras. Com isso, você poderá beneficiar muitos pacientes que precisam receber bolsas de sangue de tipos sanguíneos específicos.
- 6- Como não se trata de estudo de tratamento, a sua participação no estudo está restrita à coleta da amostra de sangue.
- 7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Ester Cerdeira Sabino que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 Cerqueira Cesar 05403-000 - São Paulo, SP – Brasil. Telefone(s): (11) 30619669 (ramal 336) Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Rua Santo Antônio, 590 - 2º andar– tel: 3116-8566, FAX: (11)3105-2772– E-mail: cepis@isaude.sp.gov.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros doadores e pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum participante;
- 10 – Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas,
- 11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.
- 12 – Você será solicitado a assinar um outro consentimento para transferência do que sobrar do seu material para o biobanco do Instituto de Medicina Tropical. Nossa expectativa

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

APÊNDICE B

INSTITUTO DE SAÚDE CEPIS -
SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PADRONIZAÇÃO DE ESTRATÉGIA MOLECULAR CUSTO-EFETIVA PARA RASTREAMENTO DE FENÓTIPOS ERITROCITÁRIOS E PLAQUETÁRIOS RAROS EM DOADORES DE SANGUE VISANDO À ORGANIZAÇÃO DE BANCO DE DOADORES RAROS NO ESTADO DE SÃO PAULO

Pesquisador: Ester Cerdeira Sabino

Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 34991614.5.0000.5469

Instituição Proponente: INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 838.289

Data da Relatoria: 17/10/2014

Apresentação do Projeto:

Reapresentação do Projeto: Estudo de Coorte “transversal”, objetiva padronizar técnica para genotipar alelos eritrocitários e plaquetários para determinação de 32 grupos sanguíneos humanos em 5000 voluntários e mais 200 portadores de anemia falciforme da Fundação Pró-sangue de São Paulo – Hemocentro. Pacientes em regime crônico de transfusão, principalmente falcêmicos, tem uma elevada taxa de aloimunização eritrocitária, que está associada a reações hemolíticas transfusionais. A aloimunização contra antígenos eritrocitários é uma complicação transfusional tardia que afeta entre 8 e 12% dos receptores de transfusão. Apenas doadores raros atendem as requisições. Existe dificuldade de obtenção de reagentes e testes que são caros, por exemplo o soro anti-Dia é comercializado por uma única empresa e o custo de um frasco para 5 reações é de R\$ 1.000,00. Os sistemas de genotipagem de antígenos eritrocitários disponíveis custam aproximadamente \$100,00 Euros, contra US\$ 30,00 por amostra. Não existe no SUS sistema para rastrear e mapear doadores raros, levando à necessidade de recorrer ao setor privado ou não atendimento de solicitações. (Não houve necessidade de alterações no escopo do projeto).

Endereço: Rua Santo Antônio, 590 - 2º andar

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.314-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3293-2270

Fax: (11)3105-2772

E-mail: cepis@isaude.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 838.289

Objetivo da Pesquisa:

Padronizar a genotipagem em larga escala para determinação de antígenos eritrocitários e plaquetários pela técnica de microarranjos líquidos em equipamento OpenArray® em doadores de sangue, de forma a torná-la estratégia viável para a identificação de doadores raros para atendimento do estado de São Paulo. 2- Elaboração de software para registro destes doadores, com interface com o equipamento de genotipagem. 3 - Caracterização molecular das variantes do sistema Rh em pacientes falcêmicos, de forma a prover unidades de hemácias compatíveis. Construção de um Biobanco (Sangue) e banco de dados genômicos. Redução de tempo no atendimento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não acrescenta risco ao procedimento de doação de sangue, ao qual o sujeito da pesquisa estará exposto no ato de doação de sangue. Os benefícios decorrentes do sucesso da padronização da técnica trará benefício tanto para os indivíduos, quanto para o Sistema de Saúde Pública.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem fundamentado e é de alta relevância para saúde pública. 1- Apesar do título citar o aspecto custo-efetivo do estudo não há na metodologia nenhuma abordagem deste cunho nos procedimentos informados. Os autores já entendem que esta técnica já é mais econômica que as outras. 2- Outro ponto que merece registro é a utilização de métodos e tecnologias patenteadas (comercial), embora os autores citem que os sistemas são “abertos” 3- Um pré-teste já foi realizado e pelo cronograma a coleta de amostras já se iniciou em 01/09/2014. A resposta da pesquisadora esclarece as observações apresentadas pelo CEPIS, o qual considera o projeto como benéfico para a sociedade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os sujeitos serão recrutados entre os doadores do Hemocentro. Critério de inclusão e exclusão são definidos, o tamanho da amostra aparentemente é de conveniência. TCLE – Texto padrão, sob a forma de itens da pesquisa, com caráter técnico e árido. No item 12 do termo cita a utilização da “sobra do sangue” e também não cita a quantidade a ser coletada. 1- As recomendações referentes à linguagem e a forma de convite foram atendidas. 2- As considerações acerca do volume de a ser utilizado; O tempo da coleta do sangue; Os aspectos referentes ao desconforto na coleta e a retaguarda assistencial e assinatura em duas vias

Endereço: Rua Santo Antônio, 590 - 2º andar

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.314-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3293-2270

Fax: (11)3105-2772

E-mail: cepis@isaude.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 838.289

do documento foram atendidos. 3- Considerando que o Instituto de Medicina Tropical já possui um Biobanco autorizado pelo CONEP, bem como TCLE específico também aprovado pelo CONEP, consideramos atendida a recomendação de consulta à RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011 a respeito da guarda de banco de dados de informação genômica.

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora atendeu os requisitos éticos apresentados pelo CEPIS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa está em consonância com a resolução 466/2012 - Conep/CNS e não apresenta óbices éticos que impeçam a sua realização.

SAO PAULO, 20 de Outubro de 2014

Assinado por:
Ligia Rivero Pupo
(Coordenador)

Endereço: Rua Santo Antônio, 590 - 2º andar

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.314-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3293-2270

Fax: (11)3105-2772

E-mail: cepis@isaude.sp.gov.br