

## 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

**Cost-effective molecular strategy standardization for screening of erythrocyte phenotypes and rare platelet in blood donors aiming at the organization of a rare donor bank in the state of São Paulo**

Carla Luana Dinardo<sup>1,3\*</sup>, Juliana Vieira Bianchi<sup>1\*</sup>, Ingrid H. Ribeiro<sup>1,3</sup>, Márcia Regina Dezan<sup>1</sup>, Valéria Brito Oliveira<sup>1</sup>, Francisco C. A. Gomes<sup>1</sup>, José E. Krieger<sup>2</sup>, Alexandre Costa Pereira<sup>2</sup>, Hadassa Campos Santos<sup>2</sup>, Helves Domingues<sup>3</sup>, Vanderson Geraldo Rocha<sup>1</sup>, Alfredo Mendrone-Júnior<sup>1</sup>, Ester Cerdeira Sabino<sup>3</sup>

### Correspondente

Carla Luana Dinardo, MD, PhD  
Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar  
CEP: 05403-000, São Paulo, SP  
caludinardo@gmail.com  
+55 11 45737508

Este trabalho foi parcialmente publicado no artigo C. L. Dinardo, J. V. Bianchi, M. R. Dezan, V. B. Oliveira, F. C. A. Gomes, A. J. O. Gallucci et al. Implementing a fully automated high-throughput strategy for blood donor genotyping | SBT Science Series (2017) 0, 1-8.

### RESUMO

**Objetivos:** 1- Padronizar a genotipagem em larga escala para determinação de antígenos eritrocitários e plaquetários pela plataforma de OpenArray® em doadores de sangue. 2- Elaboração de software para registro destes doadores, com interface com o equipamento de genotipagem.

**Metodologia:** Extração automatizada de DNA e genotipagem através de microarranjos líquidos (OpenArray®) para 32 alelos codificantes de antígenos eritrocitários e plaquetários.

**Resultados:** Foi realizada a genotipagem de 5487 doadores para os antígenos propostos, de forma completamente interfaceada e automatizada. O ensaio customizado de OpenArray® mostrou-se acurado e de rápida execução. Elaborou-se software próprio para interfaceamento dos resultados da genotipagem e busca dos genótipos.

**Conclusão:** Padronizou-se estratégia efetiva para rastreamento de doadores de sangue com fenótipos raros. A automação de todas as etapas experimentais e o interfaceamento completo dos dados minimizaram os erros humanos e aumentaram a rapidez do processo descrito, que pode ser aplicado como estratégia de genotipagem de doadores de todo o Estado de São Paulo.

## INTRODUÇÃO

Pacientes em regime crônico de transfusão, principalmente falcêmicos, tem uma elevada taxa de aloimunização eritrocitária, que está associada a reações hemolíticas transfusionais<sup>1</sup>. Quando há formação de múltiplos alo-anticorpos ou de alo-anticorpos contra antígenos de alta frequência populacional, somente doadores raros pode atender os pacientes. A busca por estes doadores pode ser feita por técnicas sorológicas ou moleculares, ambas economicamente desvantajosas. Nesta esfera, a técnica de genotipagem através de microarranjos líquidos em equipamento de OpenArray® representa uma estratégia promissora para ser aplicada em hemocentros, pelo baixo custo da reação<sup>2</sup>. Não há, em São Paulo, nenhum hemocentro público realizando a triagem molecular para a identificação de doadores raros, sendo o suprimento de unidades raras feito eventualmente por entidades privadas ou por outros estados/países.

## OBJETIVOS

1- 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.

## METODOLOGIA

Foram selecionados 5,470 doadores de sangue para participar do projeto. Todas as etapas metodológicas foram realizadas de forma totalmente automatizada, desde a extração de DNA até a interface dos dados para o software de referência. O fluxo de trabalho do projeto está ilustrado na Figura 1.

## EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído de amostras sangue utilizando o equipamento automatizado QIASymphony®, conforme protocolo do fabricante.

### Ensaio de PCR em tempo real na plataforma OpenArray®

A plataforma OpenArray® foi escolhida para a realização da genotipagem do estudo. As variações genéticas analisadas foram selecionadas de

acordo com a relevância clínica dos antígenos dos principais sistemas de grupos sanguíneos, sendo organizados em dois grupos:

- a) Variações genéticas codificantes de 34 antígenos eritrocitários (Tabela 1)
- b) Variações genéticas codificantes de 12 antígenos plaquetários (Tabela 1)

Cada sonda TaqMan foi projetada para um tipo de alelo e consistiu em um curto oligonucleótido de cadeia simples marcado com fluoróforos VIC e FAM. As sondas foram dispostas em uma placa composta por 48 matrizes ou subarranjos, contendo 64 ensaios cada, organizados em dois conjuntos de quatro linhas com 32 ensaios. A superfície dos arrays foi feita hidrofóbica, e os interiores dos orifícios foram feitos hidrófilos, permitindo a retenção dos fluídos da amostra para hibridação de DNA.

Primeiro, as amostras de DNA e o TaqMan Master Mix (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) foram misturados em uma placa 384 pelo pipetador automatizado Epimotion. A mistura de reagentes foi então transferida para os arrays de hibridização usando o Sistema Accu-Fill™ (Life Technologies). As placas de hibridação foram inseridas em uma caixa cheia de fluido de imersão, a qual foi selada e carregada no QuantStudio™.

A reação multiplex TaqMan foi realizada no Quantstudio™ de acordo com as instruções do fabricante. Dois controles anteriormente genotipados e um controle negativo foram introduzidos dentro de cada matriz. Os resultados da fluorescência foram lidos no QuantStudio™. Foram realizadas análises de genotipagem no software TaqMan\_Genotyper versão 1.3 (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), usando a ferramenta 'autocalling' para interpretação automática dos resultados.

O experimento foi considerado válido quando call rate foi de 80% ou mais e quando as amostras de controle foram genotipadas com 100% de precisão para todos os alelos estudados.

### Desenvolvimento de software para armazenamento dos resultados da genotipagem

Foi desenvolvido software para gerenciamento dos resultados da genotipagem com as seguintes características:

- a) Importação interfaceada dos resultados liberados pelo equipamento OpenArray® Real Time PCR System,
- b) Tradução do resultado liberado pelo equipamento em genótipo e em fenótipo deduzido do genótipo;
- c) Ferramenta de busca usando os filtros: - genótipo, - fenótipo ou - pessoa física;
- d) Organização de dados cadastrais dos doadores.

## RESULTADOS

5487 doadores foram genotipados usando a estratégia descrita, consumindo uma quantidade total de 59 placas de hibridização. Das 28 variações genéticas avaliadas, vinte e seis foram adequadamente genotipadas, gerando resultados acuradamente agrupados, e duas (K/k e U+w) falharam, devido à grande quantidade de resultados não amplificados e inválidos.

372 doadores foram genotipados por lote, consumindo tempo total de 11h30 min incluindo todas as etapas desde a extração de DNA à disponibilização dos dados para o software de gerenciamento dos dados. As amostras de todos os doadores foram genotipadas em 15 dias de trabalho.

Os resultados foram interpretados por ensaio (SNP ou variação genética incluído na placa), levando em consideração a fluorescência de VIC e FAM, e clusterizados (agrupados) pelo sistema de análise. 142.662 SNPs foram genotipados e 81,4% dos resultados foram considerados válidos, ou seja, foram automaticamente agrupados pelo software do fabricante e pertenciam a uma placa de matriz cujos controles internos foram acuradamente genotipados. Os resultados com falha totalizaram 18,6% e foram devidos a não amplificação das sequências de DNA (fluorescência VIC e FAM abaixo do pré-estabelecido limiar) (11,36%), resultados

indeterminados (não agrupados pelo software do fabricante) (6,26%) e resultados inválidos (baixo sinal de fluorescência em VIC ou FAM) (0,98%).

A quantidade total de discrepâncias envolvendo amostras-controle anteriormente genotipadas foi de 0,39% (12 resultados discrepantes em um total de 3.044 SNPs de amostras de controle genotipadas com resultados válidos). A precisão geral do ensaio foi superior a 99,6%, e a reprodutibilidade foi de 99,74%.

Os dados resultantes foram conectados ao software de criação própria que permitiu a busca de doadores com base no fenótipo desejado, facilitando a identificação de unidades compatíveis. Somente os resultados válidos estavam disponíveis para o usuário do software (Figura2).

Foram identificados 70 doadores com fenótipos muito raros, a saber: 32 doadores VS+; 2 doadores mutação C/c intron 2; 3 doadores k-; 7 doadores Jsb-; 5 doadores Lub-; 2 doadores S silencioso; 1 doador Dib-; 1 doador Joa-; 2 doadores Coa-; 9 doadores Yta- e 6 doadores Kna-.

É importante ressaltar que, no Brasil, só existe registro de um doador ativo com fenótipo Dib-, registrado em banco de sangue privado. No Hospital das Clínicas da FMUSP existem dois pacientes com anti-Lu3 e um com anti-Kpb que foram transfundidos com bolsas dos doadores identificados no presente estudo. Até o momento, a transfusão tinha sido postergada para estes três casos.

## CONCLUSÃO

A genotipagem através de microarranjos líquidos (OpenArray®) proposta neste estudo mostrou ser ferramenta efetiva para rastreamento de doadores de sangue com fenótipos raros. A automação de todas as etapas experimentais e o interfaceamento completo dos dados minimizaram os erros humanos e aumentaram a rapidez do processo descrito, que pode ser aplicado como estratégia de genotipagem de doadores de todo o Estado de São Paulo.

**TABELA 1. ENSAIO DE OPENARRAY® DESENHADO PARA O PROJETO**

Antígenos	Gene	Varição genética
K/k*	KEL	T193M (578C>T)
Kpa/Kpb	KEL	R281W (841C>T)
Jsa/Jsb	KEL	L597P (1790T>C)
Jka/Jkb	JK	N280D (838A>G)
Fya/Fyb	FY	D42G (125A>G)
Fy(a-b-)(Somente eritrócito)	FY	(1-67T>C)
Fyx	FY	R89C (265C>T)
M/N	GYPA	G5Q (59 C>T)
S/s	GYPB	T48M (143 C>T)
S/s SILENT	GYPB	230 C>T
U+w*	GYPB	Intron 5+5g>t
Lua/Lub	LU	R77H (230G>A)
Dia/Dib	SLC4A1	P854L (2561C>T)
Wra/Wrb	SLC4A1	E658K (1972G>A)
Doa/Dob	DO	N265D (793A>G)
Hy	DO	G108V (323G>T)
Joa	DO	T117I (350C>T)
Coa/Cob	AQP1	A45V (134C>T)
Yta/Ytb	ACHE	H353N (1057C>A)
Kna/Knb	CR1	V1561M (4681G>A)
Sla/Vil	CR1	R1601G (4801A>G)
Sc1/Sc2	ERMAP	G57R (169G>A)
HPA1a/1b	ITGB3	L59P (176T>C)
HPA2a/2b	GP1BA	T161M (482C>T)
HPA3a/3b	ITGA2B	I874S (2621T>G)
HPA4a/4b	ITGB3	R169Q (506G>A)
HPA5a/5b	ITGA2	E534K (1600G>A)
HPA15a/15b	CD109	S703Y (2108C>A)

\* Estes antígenos foram excluídos da análise final porque não preencheram os critérios de qualidade mínimos.



Figura 1. Descrição de todas as etapas de genotipagem de antígenos eritrocitários e plaquetários de doadores de sangue por técnica de microarranjos líquidos (OpenArray®). Todos os procedimentos foram realizados de forma automatizada e tiveram os resultados interfaceados para software especificamente elaborado para o projeto.

**SMS Genotipagem**

**Resultados** Procurar

**Fy(a-b-)** Procurar Cancelar

Paciente	Amostra	Genotipo	Alelo 1	Alelo 2	Fenotipo deduzido	Clique para tirar o filtro
(Filtrado)						
MARISTELA XAVIER MOREIRA LOPES	050259347357	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
MARISTELA XAVIER MOREIRA LOPES	050259347357	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
MARISTELA XAVIER MOREIRA LOPES	050259347357	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
RAMSDEM RIAN REIS CERQUEIRA	050259381457	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
RAMSDEM RIAN REIS CERQUEIRA	050259381457	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
RAMSDEM RIAN REIS CERQUEIRA	050259381457	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
MARAISA GOMES DE SOUZA	050259638354	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
CARLOS AUGUSTO OLIVEIRA DE SOUZA	050259686450	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar
JACQUELINE DA SILVA COSTA BAPTISTA	050259977359	Fya/Fyb	A	A	Fy(a-b-)	Mostrar

Figura 2. Função de busca por fenótipos no software desenvolvido no projeto. Na figura está representada a busca pelo fenótipo Fy(a-b-), considerado incomum na nossa população.

## REFERÊNCIAS

1. M. R. Dezan JVS, V. Rodrigues, J. H. Solano, F. C. Gomes, S. L. Bonifácio, J. E. Levi, S. F. M. Guallandro, J. E. Krieger, A. C. Pereira, E. C. Sabino, A. Mendrone-Júnior, C. L. Dinardo. Effectiveness of a red cell antigen-matching transfusion protocol in sickle cell disease patients. *ISBT Science Series* 2016;11: 132-9.
2. Bianchi JD CN, V; Mota, M; Mendrone-Júnior, A; Sabino, EC. Comparison of two high-throughput platforms for red blood cell and platelet antigens genotyping. *ISBT Science Series* 2015;10: 45-51.