

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA



**TIPAGEM SANGUÍNEA EM CÃES DEA 1 POSITIVO:
ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE CITOMETRIA DE FLUXO,
IMUNOCROMATOGRAFIA E HEMAGLUTINAÇÃO
E AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA E
RISCO TRANSFUSIONAL**

Salvador
2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

**TIPAGEM SANGUÍNEA EM CÃES DEA 1 POSITIVO: ANÁLISE
COMPARATIVA ENTRE CITOMETRIA DE FLUXO,
IMUNOCROMATOGRÁFIA E HEMAGLUTINAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA FREQUÊNCIA E RISCO TRANSFUSIONAL**

Salvador
2018

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

**TIPAGEM SANGUÍNEA EM CÃES DEA 1 POSITIVO: ANÁLISE
COMPARATIVA ENTRE CITOMETRIA DE FLUXO,
IMUNOCROMATOGRAFIA E HEMAGLUTINAÇÃO E AVALIAÇÃO
DA FREQUÊNCIA E RISCO TRANSFUSIONAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA), como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa

Salvador
2018

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Santos, Suzana Cláudia Spínola dos

Tipagem sanguínea em cães DEA 1 positivo: análise comparativa entre citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação e avaliação da frequência e risco transfusional./ [Manuscrito]. Suzana Cláudia Spínola dos Santos. Salvador, 2018.

119f. : il.

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Fátima Dias Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2018.

1. Tipagem Sanguínea em Cães. 2. Medicina Transfusional em Cães. 3. Risco de Transusão em Cães. 4. Antígeno Eritrocitário Canino 1. 5. Citometria de Fluxo I. Costa, Maria de Fátima Dias. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. III. Título

CDD – 636.089 21. ed.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO

DEFESA PÚBLICA DA TESE

SUZANA CLAUDIA SPÍNOLA DOS SANTOS

Tipificação Sanguínea em Cães AEC 1 Positivo: Análise Comparativa entre Citometria de Fluxo, Imunocromatografia e Hemoaglutinação e Avaliação da Frequência e Risco Transfuntional

Salvador, Bahia, 06 de novembro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Dias Costa – Universidade Federal da Bahia

Prof.^a Dr.^a Patrícia Mendes Pereira – Universidade Estadual de Londrina

Prof.^a Dr.^a Fernanda Washington de Mendonça Lima – Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Wellington Francisco Rodrigues – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento – Universidade Federal da Bahia

Dedico àqueles que ao longo dos séculos contribuíram para o crescimento da Medicina Transfusional humana e veterinária, aos quais devemos respeito e amor: os cães.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são constantes.

São muitos, sinceros e devotados...

A Deus, por nos ter criado, homens e animais.

Aos meus pais, Antônio (*in memoriam*) e Geovana, por terem me dedicado todo amor.

Às minhas amadas filhas, Yasmine e Janaína, por terem sido minhas melhores colegas de estudo.

A Jean, esposo que sempre acreditou em mim.

À minha professora orientadora Maria de Fátima Dias Costa, incrível neurocientista, por ter acreditado e fomentado minhas ideias e assim me aceitado como orientanda com imensa gentileza.

Ao professor Roberto Meyer, por ter tido reservado seu precioso tempo de cientista para abrir as portas do Labimuno – ICS/UFBA, onde foram realizados os testes de tipagem sanguínea dos cães deste estudo, pela citometria de fluxo.

A Mariane, biomédica do Labimuno – ICS/UFBA, que contribuiu para a realização dos exames de citometria de fluxo deste estudo.

Ao professor e amigo Wellington, da Universidade Federal de Uberlândia, por ter me auxiliado nas avaliações estatísticas.

Aos tutores dos cães, que participaram com boa vontade e confiança plena na doação de sangue, que sem isso não haveria a realização dos exames deste estudo.

Aos cães que participaram desse estudo, os quais reagiram bravamente doando sangue com uma única meta: ajudar seus irmãos caninos.

A todos aqueles, tão especiais, que estiveram e estão ao meu lado, contribuindo direta e indiretamente para o meu crescimento profissional e a minha formação humana sempre.

Todo nosso conhecimento inicia-se nos sentidos, passa ao entendimento e termina na razão.

Immanuel Kant

SANTOS, Suzana Cláudia Spínola dos. **Tipagem sanguínea em cães DEA 1 positivo: Análise comparativa entre citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação e avaliação da frequência e risco transfusional.** 119f. il. 2018. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

Na atualidade, o grupo sanguíneo DEA 1 passou a ser denominado como um sistema alélico autossômico dominante com o tipo DEA 1 negativo e suas variações de positividade. Sendo este grupo o mais imunogênico em cães, as transfusões sanguíneas podem desencadear alguns efeitos indesejáveis nos pacientes veterinários, que estão diretamente associadas à transfusões incompatíveis. O presente estudo pesquisou o antígeno DEA 1, pela técnica da citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação. Foram avaliados 203 cães de diversas raças, com idade entre 1 e 8 anos, com peso a partir de 28 kg e de ambos os sexos. Também foi pesquisado, em Salvador – BA, a frequência do tipo sanguíneo DEA 1, com amostras de sangue de cães doadores de distintas raças sem nenhum grau de parentesco. E, calculado o risco de transfusão sanguínea incompatível tanto em uma primeira como em uma segunda transfusão. Concluindo, a citometria de fluxo é uma técnica precisa e de acurácia. Dentre os indivíduos positivos para o grupo DEA 1, tipados pela citometria de fluxo, foram encontradas intensidades médias de fluorescência que são indicadoras de antigênicidade fraca, moderada e forte, podendo-se dividir o grupo DEA 1 em positivo fraco, positivo moderado e positivo forte. As técnicas de tipagem sanguínea para o grupo DEA 1 por citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação tiveram correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). A frequência do grupo DEA 1 variou entre as raças estudadas de 0% a 100%, porém com uma positividade média de 62,07%. E, o risco de transfusões sanguíneas incompatíveis, com base na frequência do grupo DEA 1, variou de acordo com as raças dos doadores e receptores, porém podendo ser anulado ao serem realizados testes de tipagem e prova de reação cruzada para compatibilidade.

Palavras-chave: Tipagem sanguínea em cães. Medicina Transfusional em cães. Risco de transfusão em cães. Antígeno eritrocitário canino 1. Citometria de fluxo.

SANTOS, Suzana Claudia Spínola dos. *Blood typing in dogs DEA 1 positive: Comparative analysis between flow cytometry, immunochromatography and hemoagglutination and transfusion frequency and risk assessment*. 119f. il. 2018. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

Nowadays, the DEA 1 blood group started being known as an autosomal dominant allelic system with the negative DEA 1 group and its positivity variations. Once this group is the most immunogenic among dogs, the blood transfusions can develop some undesirable effects in veterinary patients which are directly associated with incompatible transfusions. The present study investigated the DEA 1 antigen through the flow cytometry technique, agglutination and immunochromatography. 203 dogs from different breeds were evaluated, aged between 1 and 8 years, with a weight of 28 kg and of both sexes. Also, it was investigated, in Salvador - BA, the frequency of the DEA 1 blood type with blood samples from donor dogs of different breeds without any degree of kinship. Moreover, it was calculated the risk of incompatible blood transfusion in either a first or a second transfusion. In conclusion, the flow cytometry is an accurate technique among the positive animals for the DEA 1 group, typified by flow cytometry, medium intensities of fluorescence were found, which are indicative of weak, moderate and strong antigenicity, being able to divide the DEA 1 group into weak positive, moderate positive and strong positive. The blood typing techniques for the DEA 1 group by flow cytometry, agglutination and immunochromatography had positive (Spearman $r = 0,70$) and statistically significant ($p < 0,0001$) correlation. The DEA 1 group frequency ranged from 0% to 100%, however, with an average positivity of 62.07%. Also, the risk of incompatible blood transfusions, based on the frequency of the DEA 1 group, varied according to the donors and recipients breeds, however, it can be annulled when typing and cross-reaction tests are performed for compatibility.

Keywords: Typification in dogs. Canine transfusion medicine. Transfusion risk in dogs. Dog erythrocyte antigen 1. Flow cytometry.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Frequência do tipo sanguíneo DEA 1.1 e grupo DEA 1 em variadas localidades	23
Quadro 2	Gradação da aglutinação dos testes em cruces	32
Quadro 3	Fórmula para cálculo de risco de sensibilização de cão com sangue não submetido à prova de compatibilidade e tipagem na primeira transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo	35
Quadro 4	Fórmula para cálculo de risco do mesmo cão não submetido à prova de compatibilidade e tipagem desenvolver reação hemolítica aguda com a segunda transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo	35
Quadro 5 (Artigo 2)	Raças e número de animais incluídos no grupo Bulldogs	57
Quadro 6 (Artigo 2)	Raças e número de animais incluídos no grupo Raças Definidas Diversas	57
Quadro 7 (Artigo 2)	Fórmula para cálculo de risco de sensibilização de cão com sangue não submetido à prova de compatibilidade e tipagem na primeira transfusão, de acordo com a prevalência de DEA positivo	57
Quadro 8 (Artigo 2)	Fórmula para cálculo de risco do mesmo cão não submetido à prova de compatibilidade e tipagem desenvolver reação hemolítica aguda com a segunda transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Artigo 1)	Sequência da análise dos controles negativo e positivo com os soros primários anti-DEA 1 negativo e positivo, em gráficos de tamanho e granulosidade de eritrócitos e histogramas individuais	40
Figura 2 (Artigo 1)	Sequência dos gráficos em tamanho e granulosidade de eritrócitos e histogramas individuais, dos eritrócitos dos animais estudados negativos e positivo para o grupo DEA 1, que apresentaram valores mínimo e máximo das fluorescências	41
Figura 3 (Artigo 1)	Análise comparativa entre os resultados positivos de cada técnica abordada quanto à sensibilidade	46
Figura 4 (Artigo 1)	Análise comparativa dos valores quantitativos dos testes positivos das técnicas de hemaglutinação (aglutinação) e citometria de fluxo (citometria)	47
Figura 5 (Artigo 2)	Comparação entre a positividade e negatividade do grupo DEA 1 entre as raças estudadas com dependência estatisticamente positiva (qui-quadrado)	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo 1)	Comparação dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) obtidos na citometria de fluxo com a hemaglutinação (Escore de aglutinação 0, 1+, 2+, 3+, 4+) dos animais que apresentaram resultados negativos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1	43
Tabela 2 (Artigo1)	Comparação dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) obtidos na citometria de fluxo com a hemaglutinação (Escore de aglutinação 0, 1+, 2+, 3+, 4+) dos animais que apresentaram resultados positivos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1	44
Tabela 3 (Artigo 1)	Distribuição dos animais com resultados positivos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1, reunidos pelos escores de aglutinação obtidos (1+, 2+, 3+), comparados aos resultados de intensidade média de fluorescência (IMF) da citometria de fluxo	45
Tabela 4 (Artigo 2)	Número total e frequência (%) do grupo sanguíneo DEA 1 dentre as diferentes raças estudadas – Salvador – 2017	58
Tabela 5 (Artigo 2)	Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram taxa entre 33,33 e 50% de DEA 1- dentre todos estudados: Pastor Alemão (P. A.), Raças Diversas Definidas (R. D. D.) e mestiços (M.), com doador do grupo das raças de maior taxa de DEA 1+: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.) – Salvador – 2017	60
Tabela 6 (Artigo 2)	Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram as menores taxa de DEA 1- dentre todos estudados: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.) – Salvador – 2017	60
Tabela 7 (Artigo 2)	Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram taxa de DEA 1- entre 33,33 e 50% dentre todos estudados: Raça Pastor Alemão (P. A.), Raças Diversas Definidas (R. D. D.) e mestiços (M.), entre eles próprios – Salvador – 2017	60
Tabela 8 (Artigo 2)	Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram menores taxas de DEA 1- dentre todos estudados: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.), com os animais com do grupo DEA 1+ entre 50 e 66,67% – Salvador – 2017	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DEA	<i>Dog Erythrocyte Antigen</i>
SGT	Shigeta
mAb	anticorpos monoclonais
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
IMF	Intensidade Média de Fluorescência
A1	DEA 1
A2	DEA 2
A3	DEA 3

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	OS GRUPOS SANGUÍNEOS	18
2.2	TESTES DE TIPAGEM	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	GERAL	28
3.2	ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	CÁLCULO AMOSTRAL	29
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
4.2.1	Padronização do antissoro	30
4.2.1.1	Metodologia da citometria de fluxo para padronização do antissoro	30
4.2.1.2	Metodologia da titulação do antissoro contendo anticorpos anti-DEA 1	31
4.2.2	Tipagem sanguínea das amostras do estudo	31
4.2.2.1	Imunocromatografia	32
4.2.2.2	Hemaglutinação	32
4.2.2.3	Citometria de fluxo	33
4.2.3	Prevalência do tipo sanguíneo DEA 1 positivo	34
4.2.4	Cálculo do risco de transfusão sanguínea incompatível	34
4.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5	RESULTADOS	36

5.1	ARTIGO 1 - Tipagem sanguínea em cães DEA 1 positivo: Análise comparativa entre a citometria de fluxo, cromatografia, hemaglutinação	36
5.1.1	Resumo	36
5.1.2	Introdução	36
5.1.3	Materiais e Métodos	37
5.1.4	Resultados	39
5.1.5	Discussão	47
5.1.6	Conclusões	52
5.1.7	Referências	53
5.2	ARTIGO 2 - Frequência do grupo sanguíneo DEA 1 e risco de transfusão incompatível em cães de diferentes raças e mestiços da cidade de Salvador – BA, Brasil	55
5.2.1	Resumo	55
5.2.2	Introdução	56
5.2.3	Materiais e Métodos	56
5.2.4	Resultados	58
5.2.5	Discussão	61
5.2.6	Conclusões	65
5.2.7	Referências	66
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS GERAIS	78
	ANEXO A- Certificado do CEUA	84
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	85

APÊNDICE B- Cálculo amostral de estudo	87
APÊNDICE C- Protocolo Metodológico da Citometria de Fluxo	88
APÊNDICE D- ARTIGO 1	89
APÊNDICE E- ARTIGO 2	107

1 INTRODUÇÃO

Em nosso meio os animais de estimação são considerados membros da família e com isso passaram a receber cuidados médicos veterinários mais amplos, o que inclui os benefícios da medicina transfusional. Os cães rotineiramente desenvolvem afecções médicas clínicas e cirúrgicas como os humanos, tornando-se modelos de estudo¹. Por isso muitos cientistas, além dos médicos veterinários, podem se beneficiar com os estudos acerca dos grupos sanguíneos, aloanticorpos e técnicas de tipagem com tecnologia avançada, como a citometria de fluxo.

Na medicina veterinária, a demanda por hemoterapia tem crescido na proporção em que aumenta a população de animais de companhia. A Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 estimou a proporção de que 44,3% dos domicílios do país possuíam pelo menos um cão, o que corresponde a 28.900.000 de domicílios. Hoje a população estimada de cães é de 52.200.000 em todo território nacional, o que corresponde a 1,8 cão para cada domicílio². E esses, ao serem acometidos de patologias que comprometem o sistema hematopoiético serão candidatos ao recurso de transfusões sanguíneas. Apesar disto, os animais doadores ainda são limitados, por envolver a disponibilidade de seus tutores.

A Medicina Transfusional apresenta papel importante na clínica de animais de companhia pois, dentre seus objetivos, reestabelece a volemia e a reposição de proteínas hemostáticas, assim como a oxigenação tecidual, melhora a atividade oncótica e facilita transferência passiva de imunidade^{3,4}. A transfusão sanguínea é uma forma de transplante, apresentando, portanto, riscos associados aos seus procedimentos⁵. Uma rigorosa seleção de doadores reduz o risco de reações transfusionais.

Estudos relacionados à Medicina Transfusional, apontam o uso desta terapia nos Estados Unidos, em torno de 70% em situações de perdas sanguíneas por traumatismos, 14 a 22% em anemias hemolíticas e de 8 a 14% em casos de eritropoiese deficitária. O crescente uso de hemocomponentes e o declínio do uso do sangue total tem ocorrido nos cães, motivado pelo desenvolvimento de pesquisas no meio científico¹.

Atualmente, em Medicina Veterinária, a prática segura das transfusões sanguíneas ganha cada vez mais destaque, estabelecendo-se normas de triagem para os animais doadores, o que representa uma tendência de padronização da avaliação pré-transfusional⁶.

Sabe-se que, para uma transfusão de sangue segura, é importante que se faça uso do sangue tipificado e compatível^{7,8}. O reconhecimento dos tipos sanguíneos na imunohematologia em diferentes populações caninas de variadas raças tem sido estabelecido com o objetivo de manter um arquivo de dados dos doadores⁹.

Santos, Costa e Meyer¹⁰ observaram que animais doadores repetitivos, mantinham parâmetros hematológicos dentro da normalidade desde que o intervalo de coleta para doação não fosse aquém de 30 dias e no período máximo de dois anos consecutivos, parâmetro esse que anteriormente limitava-se a 12 meses¹¹. Em 2014, foi verificado a prevalência de 60% do antígeno eritrocitário canino (DEA) subtipo DEA 1.1, em cães doadores potenciais¹².

Transfusões sanguíneas podem desencadear reações de incompatibilidade que vão desde febre a reações agudas imunomediadas e outras reações tardias que estão diretamente associadas à transfusões incompatíveis, que podem ser minimizadas pela prática da realização de provas de reação cruzada e de tipagem¹³. O estudo da frequência do grupo sanguíneo DEA 1 e o risco transfusional entre grupos raciais caninos, leva à redução dos riscos de sensibilização em uma primeira transfusão e reação hemolítica em uma transfusão posterior.

As técnicas de tipagem sanguínea vem sendo aperfeiçoadas para garantir maior segurança aos procedimentos transfusionais. A tipagem para o DEA 1 através da citometria de fluxo, deverá oferecer mais confiabilidade à rotina da imunohematologia em cães doadores e receptores assegurando mais precisão e confiabilidade a tais procedimentos, razão pela qual este método é então proposto como padrão-ouro dentro da tipagem sanguínea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS GRUPOS SANGUÍNEOS

Os grupos sanguíneos foram primeiramente documentados por Von Dungern e Hirszfeld em 1910, sendo reconhecidos pela presença de quatro hemolisinas e aglutininas, baseadas em amostras sanguíneas caninas obtidas por aloimunizações¹⁴.

Segundo Dodds⁷ e Giger⁸, os cães não apresentam anticorpos naturais contra o grupo antigênico DEA 1. Já para Lacerda¹⁵, aloanticorpos podem estar presentes antes do animal sofrer exposições a outro tipo sanguíneo, pois sua expressão pode ocorrer por meio de uma exposição a organismos, como plantas, bactérias, protozoários e helmintos, que por possuírem moléculas similares ou idênticas aos antígenos encontrados na superfície dos eritrócitos, podem levar a uma reação cruzada. Os anticorpos antieritrocitários são formados apenas após a exposição a um tipo sanguíneo diferente, seja por uma transfusão de sangue ou por via transplacentária⁶. Porém, a gestação em cadelas não sensibiliza as fêmeas contra antígenos eritrocitários devido ao tipo de placenta canina que é endoteliocoriônica, que separa o endotélio coriônico fetal do sangue materno^{8,16}.

Devido ao fato dos cães não portarem aloanticorpos de importância clínica adquiridos naturalmente, os grupos sanguíneos têm sido alvo de investigações experimentais da produção de aloanticorpos após sensibilização via transfusão sanguínea. Mais de 12 tipos sanguíneos foram descritos nos cães, mas eles não são bem determinados por causa de limitada viabilidade ou falta de reagentes de tipagem, além de carência de estudos comparativos entre os diferentes sistemas de grupos sanguíneos e reagentes¹⁷⁻²⁰.

A falta de aloanticorpos naturais reduz a necessidade de se obter sangue de tipo específico na primeira transfusão, no entanto, não exclui o risco de sensibilização deste receptor^{15,17}. A aloimunização e reações hemolíticas pós-transfusionais surgem a partir do quarto dia pós-transfusão²¹.

Os grupos sanguíneos dos cães são marcadores genéticos presentes na superfície dos eritrócitos onde dois ou mais alelos de um locus gênico definem o tipo sanguíneo^{8,19,22}. Eles expressam antígenos (glicoproteínas ou glicolípídios) que se encontram na superfície da membrana celular do eritrócito e têm grande habilidade em desencadear uma reação antígeno-anticorpo, causada por anticorpos antieritrocitários circulantes no cão receptor²³.

Os tipos sanguíneos são de característica autossômica dominante, por isso há predomínio em cães com proximidade genética (fator racial) ou consanguinidade^{1,24}. Por causa dessa característica, grupos raciais com muita consanguinidade ou mesmo diferentes raças, mas com a diversidade gênica restrita a uma localidade geográfica concentram um tipo sanguíneo mais que outro^{20,25}.

Inicialmente, os tipos sanguíneos eram designados por letras de A até G. Em 1976, durante o segundo Workshop Internacional de Imunogenética Canina, os grupos sanguíneos caninos foram determinados pela sigla DEA (*Dog Erythrocyte Antigen*) seguida de números^{24,26}.

O reconhecimento do sistema DEA, só foi possível graças à utilização de anticorpos policlonais gerados após aloimunizações^{21,27}.

Uma padronização internacional foi então proposta para sete grupos sanguíneos diferentes. No entanto, apenas cinco destes são avaliados, porque para eles há antissoros específicos: DEA 1 (1.1, 1.2, 1.3), 3, 4, 5 e 7^{15,18,26}. Os grupos DEA 6 e 8 foram reconhecidos na Segunda Oficina Internacional em Imunogenética Canina, mas por não haver antissoros disponíveis para esses antígenos, juntamente com a dificuldade em obtê-los, os estudos acerca desses grupos são escassos^{9,15}. Esses dois grupos também são pouco frequentes, e transfusões incompatíveis com eles geralmente não resultam em sinais clínicos de reação transfusional, embora a meia-vida dos eritrócitos transfundidos possa ser diminuída²³. Atualmente estabeleceu-se sete tipos sanguíneos (DEA 1.1, 1.2, 1.3, 3, 4, 5 e 7) com seis antígenos viáveis (DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 5 e 7)^{24,26}.

Existe uma classificação japonesa baseada em quatro anticorpos monoclonais, denominada Shigeta (SGT) A, B, D e E. No entanto, sua correlação com o sistema DEA não tem sido bem definida, à exceção do SGT A, o qual é comparado ao DEA 3, razão pela qual esta classificação não é reconhecida internacionalmente^{15,18}.

As bases bioquímicas e moleculares do grupo sanguíneo DEA 1.1 são pouco esclarecidas. No entanto, os glicolipídios das membranas dos eritrócitos caninos têm sido determinados e podem estar associados a cada tipo sanguíneo. Os glicolipídios são esfingolipídios contendo resíduos de ácido siálico onde alguns DEA 1.1 apresentam ácido N-acetilneuramínico, outros o ácido N-gliconeuramínico e outros ambos, pois a conversão do primeiro para o segundo ocorre via hidroxilase. O que se observou é que os cães que apresentam apenas o ácido N-acetilneuramínico têm genótipo homozigótico¹.

Há estudos que avaliam as proteínas de membrana de eritrócitos, DEA 1.1 positivo e negativo, com pesos moleculares que variam de acordo com os métodos de pesquisa de anticorpos e de eletroforese. Por *immunoblotting* encontrou-se polipeptídeos com pesos moleculares de 50 a 200 kDa nos DEA 1.1, enquanto em testes usando menos antissoro específico identificou-se proteína de 85 kDa em eritrócitos DEA 1.2 positivos. Estes estudos não foram aprofundados e necessitam de trabalhos adicionais para definir as características bioquímicas e de genética molecular desse antígeno²⁰. Quando foram utilizados anticorpos monoclonais (mAb) específicos para o DEA 1.1 e DEA 3 chegou-se ao conhecimento de dois pesos moleculares de 50 a 200 kDa para o DEA 1.1 e cinco variações de peso molecular de 34 a 71 kDa para o DEA 3. Essa diferença é atribuída ao tipo de epitopo reconhecido pelos anticorpos monoclonais ou policlonais. Estudos com antissoro policlonal específico para dois peptídios oriundos da sequência do grupo sanguíneo humano Rhesus (Rh30A-C e Rh50A-C) foram usados no *western blotting* contra membranas de eritrócitos humanos e caninos. O antissoro Rh30A-C identificou um peso molecular de 32 kDa tanto no eritrócito canino como no humano e o antissoro específico Rh50A-C identificou de 38 a 60 kDa nas membranas eritrocitárias humanas e de 40 a 53 kDa nas dos caninos. Esse achado explica que há áreas da sequência da proteína Rhesus comuns aos eritrócitos humanos e caninos²⁸.

De todos os grupos, apenas o DEA 1 apresenta vários alelos, enquanto os demais apenas dois, positivo e negativo. Todos os grupos sanguíneos são determinados a partir de um mecanismo autossômico dominante¹. O DEA 1, inicialmente foi representado por quatro alelos: negativo, 1.1, 1.2, e 1.3. Sendo que o DEA 1.1 apresenta característica dominante sobre o DEA 1.2 e o negativo é recessivo a ambos. O DEA 1.2 foi mais prevalente em cães dingo (*Canis dingo*) oriundos da Austrália que em cães domésticos (*Canis lupus familiaris*). O DEA 1.3 foi reconhecido apenas em cães da Austrália e especificamente em cães da raça pastor alemão^{1,13}. No entanto, recentemente, através da tipagem por anticorpos monoclonais anti-DEA 1, passou a ser denominado como um sistema alélico autossômico dominante com o tipo DEA 1 negativo e suas variações de positividade (fraca, média e intensa)^{20,29-31}.

Em algumas raças o DEA 1.1 é muito frequente, mas os estudos que pesquisam a sua prevalência sempre advém de anticorpos policlonais, não informando uma gradação da sua expressão. Pois, baseada na variabilidade de suas expressões, indivíduos com reações fraca a forte DEA 1.1 precisam ser investigados quanto à sua antigênicidade. Para o DEA

1.3 os reagentes não estão disponíveis para investigações^{20,32}. De todos os tipos sanguíneos dos cães o DEA 1.1 é o mais imunogênico, em seguida o DEA 1.2 (ambos grupo DEA 1) e depois o DEA 7. Todos os anticorpos anti-DEA 1.1 reagem em aglutinação, mas os anticorpos anti-DEA 1.1 são mais fortemente hemolíticos que aglutinantes, produzindo títulos nos cães sensibilizados mais altos que antissoros usados comercialmente para tipagem do DEA 1.1³³.

A transfusão do sangue DEA 1.2 para o receptor DEA 1.1 negativo que possua aloanticorpos anti-DEA 1.2 resulta em uma meia-vida das hemácias transfundidas de 12 horas²³.

A prevalência do grupo DEA 4 é muito alta na população canina e a importância deste grupo está no fato de que raramente ocorrem anticorpos naturais anti-DEA 4 e os cães DEA 4 negativos, ao serem transfundidos com sangue DEA 4 positivo, não apresentam hemólise intra ou extravascular. Dessa forma, os cães positivos apenas para DEA 4 são considerados doadores universais³⁴.

O DEA 7 é um antígeno não eritrocitário que é adsorvido na superfície celular. Os cães DEA 7 negativos podem ter naturalmente aloanticorpos anti-DEA 7, mas sua importância ainda é discutida²³. Spada et al.³⁵ detectaram a presença de aloanticorpos anti-DEA 7, permitindo a possibilidade da já suspeitada, porém não antes comprovada, reação transfusional tardia, pois encontraram através da aglutinação de amostra de soro de animais negativos para o tipo DEA 7 junto com eritrócitos de cães DEA 7 positivo, usando a técnica cromatográfica de coluna em gel, 23% de aloanticorpos anti-DEA 7, correspondendo a 73 testes positivos em uma amostra de 317 cães. Goy-Thollot et al.³⁶ propõem em seus estudos com cães pós-transfundidos, que não há essas reações transfusionais tardias provocadas por aloanticorpos naturais contra o DEA 7 e sim, uma sensibilização pós-transfusional desenvolvendo novos anticorpos. Os mesmos reforçam que não existe comprovação científica *in vivo*, após transfusões, desse tipo de reação hemolítica tardia, já que os estudos anteriores são *in vitro*.

Blais et al.¹⁸ descobriram um antígeno eritrocitário denominado Dal, após a identificação de um aloanticorpo em um cão que recebeu transfusão sanguínea de um canino da raça dálmata, mesmo sendo rara em alguns cães desta raça. Após sensibilização via transfusão, o desenvolvimento de anticorpos anti-Dal pode resultar em transfusões ineficientes ou reações transfusionais hemolíticas, se um sangue com o tipo Dal positivo for utilizado.

Lee, Giger, Kim³¹ produziram dois anticorpos monoclonais que aglutinavam fortemente com dois antígenos eritrocitários, denominados de Kai 1, com peso molecular de 200 e 50 kDa, e Kai 2, com peso molecular de 80 kDa. Os anticorpos anti-Kai 1 e anti-Kai 2 foram isolados como IgM kappa e IgG3 lambda respectivamente, e aglutinados a duas proteínas antigênicas de membrana com 200 kDa e 80 kDa cada um. Observaram também que animais Kai 1 negativo e Kai 2 negativo ao receberem sangue Kai 1 positivo e Kai 2 positivo, respectivamente, produziram aloanticorpos demonstrados pela prova de reação cruzada, demonstrando a importância clínica desse grupo sanguíneo. Esses estudos foram realizados na Coreia do Sul, onde a palavra “kai” que significa cão, inspirou a denominação Kai para esse grupo sanguíneo.

Para Iazbik et al.²⁴, doador universal é o cão que for negativo para DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 3, DEA 5 e DEA 7, por serem muito imunogênicos, e positivo para DEA 4, o tipo mais prevalente e com apenas um relato de reação transfusional³³. Já para Blais et al.¹⁸ o cão doador universal ainda precisa ser Dal negativo. Mais recentemente, Lee, Giger e Kim.³¹ demonstraram anticorpos pós-transfusional anti-Kai 1 e anti-Kai 2 e assim, é preciso que o doador, para ser considerado universal, também seja negativo para o Kai 1 e para o Kai 2.

O tipo sanguíneo canino de maior significado clínico é o DEA 1.1 e os anticorpos contra esse antígeno não se verificam naturalmente^{33,37}. Assim, a primeira transfusão sanguínea raramente ocasiona uma reação pós-transfusional. No entanto, se o cão já foi submetido a uma prévia transfusão sanguínea, existe a possibilidade dele produzir anticorpos anti-eritrocitários e nesse caso, é imprescindível a realização da prova de reação cruzada ou utilizar testes disponíveis comercialmente, para a detecção do tipo DEA 1.1, que podem ser realizados nos cães doadores e receptores^{6,16}. Com relação a gestações, só foi reportado na medicina veterinária, importância de sensibilização na espécie equina e felina, devido ao fato de que a gestação na espécie canina, não induz à produção de aloanticorpos devido aos cães apresentarem a placenta endoepitelial, que é impermeável às proteínas^{8,16}. Lee et al.³¹ ao estudarem cães dos tipos Kai 1 e Kai 2 negativos, não encontraram aloanticorpos anti-Kai 1 nem anti-Kai 2 respectivamente, nos mesmos. No entanto, ao avaliarem amostras de plasma de um pequeno número de cães Kai 1 e Kai 2 negativos, que receberam sangue do grupo sanguíneo DEA 1 positivo sem tipificar para o Kai 1 e Kai 2, foram detectados aloanticorpos anti-Kai 1 e anti-Kai 2. Isso demonstra a

natureza antigênica dessas proteínas na membrana eritrocitária, qualificando-as como um sistema de grupo sanguíneo independente.

Em vários países a prevalência do DEA 1.1 varia entre 45 a 64%¹⁹. Porém para Acierno, Raj e Giger²⁰ sua prevalência varia de menos de 10% a 100%, estimando-se que internacionalmente a proporção seja de 50%.

A literatura aponta que a frequência do tipo sanguíneo DEA 1.1 no Brasil equivale a 51,33% em uma amostragem de 150 cães estudados em São Paulo¹⁷. E outro estudo, detectou que 53,35% de uma população de 300 cães, também se mostraram positivos para esse tipo sanguíneo³⁸. No Rio Grande do Sul, verificou-se que numa população de 100 cães doadores de sangue de raças variadas, a prevalência de cães DEA 1.1 foi de 61%⁹ enquanto no Estado da Bahia, Santos¹² encontrou, num grupo de 30 cães doadores de sangue, uma prevalência de 60% do tipo DEA 1.1. Avaliando 300 cães para o grupo DEA 1, Souza et al.³⁸ em São Paulo encontraram 71% de positividade. No cenário internacional encontrou-se prevalências bem variadas como evidenciado no quadro 1. Giger, Gelens e Oakley³³ já postulavam que essas prevalências do tipo DEA 1.1 estão ligadas a diferenças e proximidades geográficas.

Quadro 1 – Frequência do tipo sanguíneo DEA 1.1 e grupo DEA 1 em variadas localidades

Autores	Local	Frequência
Swisher, Young ¹⁴	U.S.A.	44,60% DEA 1.1
Ejima, Kurokawa, Ikemoto ³⁹	Japão	44% DEA 1.1
Van der Merwe, Jacobson, Pretorius ⁴⁰	Africa do Sul	78% Rottweilers; 0% hounds DEA 1.1
Giger, Stieger, Palos ⁴¹	U.S.A.	33 a 51% DEA 1.1
Deluca, Glass, Johnson, Burger ⁴²	U.S.A	54% DEA 1.1
Nottidge et al. ⁴³	Nigéria	32,02% DEA 1.1; 38,89% DEA 1
Gracner et al. ⁴⁴	Croácia	66,70% Istrian pointers DEA 1.1

Zubcic et al. ⁴⁵	Croácia	90% Croatian sheepdogs DEA 1.1
Arikan, Guzel M, Mamak N, Ograk ²²	Turkia	61,1% kangals DEA 1.1
Iazbik et al. ²⁴	U.S.A.	24,60% Greyhounds DEA 1.1
Marques ⁴⁶	Portugal	51,72% DEA 1.1
Ferreira, Gopegui, Matos ³²	Portugal	56,90% DEA 1.1
Costa ⁴⁷	Portugal	55% DEA 1
Gracner et al. ³⁷	Croácia	95% Dálmata DEA 1.1
Riond et al. ⁴⁸	Suissa	53% DEA 1.1
Zivcic et al. ⁴⁹	Croácia	60% Tosavaz hound; 53,30% Tornjak hound DEA 1.1
Mesa-Sanchez, Gopegui- Fernandez, Granados- Machuca ²⁵	Espanha	53,40% Greyhound DEA 1.1
Unny, Mathew, Pillai ⁵⁰	India	80% DEA 1.1
Spada et al. ⁵¹	Espanha	54,6% Greyhound DEA 1
Spada et al. ⁵²	Espanha	75% Ibizan hound DEA 1.1
Milczak et al. ⁵³	Polônia	15% Pastor alemão DEA 1.1
Dhliwayo et al. ⁵⁴	Zimbabwe	78% DEA 1.1
Carli et al. ⁵	Itália	62% DEA 1
Novais, Santana, Vincentin ¹⁷	SP – Brasil	51,33% DEA 1.1; 91,3 DEA1
Esteves et al. ⁹	RS – Brasil	61% DEA 1.1
Souza et al. ³⁸	SP – Brasil	53,35% DEA 1.1; 71% DEA1
Santos ¹²	Ba – Brasil	60% DEA 1.1

Fonte: Autores citados - organizado pela autora.

2.2 TESTES DE TIPAGEM

Os testes laboratoriais para tipagem sanguínea baseiam-se na visualização da reação de hemaglutinação entre os antígenos de superfície dos eritrócitos do paciente canino com o antissoro monoclonal conhecido ou policlonal^{8,15}.

O repertório de anticorpos alelo-específicos exerce grande influência na medicina transfusional no que diz respeito à ligação ao antígeno alélico dos eritrócitos do doador incompatível²⁷. No entanto, até então, não foi possível distinguir diferenças alélicas entre os fenótipos do grupo DEA 1 por não ser simples a obtenção de anticorpos policlonais que constantemente manifestem a mesma especificidade. Mas, essa possibilidade poderá ser alcançada a partir da técnica de hibridomas murinos para secretarem anticorpos monoclonais, como inicialmente foram obtidos contra o grupo sanguíneo DEA 3 por Hara et al.⁵⁶. A tecnologia com uso de bacteriófagos - *Phage display technology* – tem sido utilizada na produção de fragmentos de anticorpos humanos contra vários antígenos sem precisar da realização de imunizações deliberadas²⁷.

Vários são os métodos de tipagem sanguínea em cães, e dentre as primeiras técnicas que foram inicialmente utilizadas na rotina laboratorial veio a *Standard gel*, que utiliza anticorpos monoclonais para o tipo DEA 1.1 e a aglutinação em tubo, utilizada para pesquisa de DEA 1.1, 1.2, 3, 4 e 7²¹. O gel estendido ou coluna de gel, que apresenta um antissoro canino policlonal para pesquisa de DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 7 e Dal^{6,21,57}. Além dessas técnicas utiliza-se também o *Cross-matching/Coombs*, padronizado com amostras de cães tipados usando o gel *Coombs* que avalia também autoaglutinação e controle do doador^{6,17,21,58,59} e o teste 96W, onde placas de 96 poços são usadas com volumes de antissoro e hemácias lavadas que é uma variante do procedimento de tipagem em tubo²¹. Outra técnica também bem difundida é o Método do cartão, onde um cartão possui um reagente liofilizado que é reconstituído com um diluente e determina positividade ou não para o DEA 1.1 com área de teste e controle⁶. O Teste do Cartucho (*Cartridge*) é uma técnica que consiste em um único cartucho com três canais capilares usado em um analisador e aplica-se para diagnosticar o DEA 1.1, usando anticorpo monoclonal, sendo de uso mais restrito por requerer equipamento de leitura especializado^{19,58}. A Tipagem reversa, usa uma metodologia de hemaglutinação na qual se pesquisa o tipo sanguíneo desconhecido a partir de sangue tratado em ácido etilenodiamínico tetracético (EDTA) ao reagir com um antissoro obtido a partir de aloimunização conhecida¹⁵. A

imunocromatografia, é a técnica amplamente utilizada na rotina dos bancos de sangue veterinários com o Kit Alvedia[®] (Limonest-França). Finalmente, a Citometria de Fluxo, usada para pesquisa do grupo DEA 1 utilizando o anticorpo monoclonal de origem murina, é restrita ainda à pesquisa experimental, por não ter sido definido nenhuma técnica padrão-ouro de tipagem sanguínea na Medicina Veterinária^{20,29,36,47,60,61}.

Originalmente o DEA 1.1 era identificado pela interação do anticorpo policlonal DEA 1.1 derivado de cães aloimunizados e apresentava uma aglutinação fraca, por ser um reagente contendo aglutinina fraca e requerer uma antiglobulina canina (*Coombs*) para melhor se visualizar a reação de aglutinação em tubo ou microtitulação^{8,20}. Em testes de hemaglutinações, dois erros potenciais que podem ocorrer estão ligados a reações hemolíticas potencialmente fatais, a hemólise difícil de ser reconhecida por esse método e as reações de efeito prozona por excesso de anticorpo e redução de antígeno, levando à falha na aglutinação¹³.

A hemaglutinação ocorre quando crescentes concentrações de IgG e IgM estão cobrindo a superfície do eritrócito. Para que essas reações não sejam confundidas com alguma patologia, deve-se proceder três lavagens dos eritrócitos a serem testados, porque outras proteínas na superfície celular podem estar contribuindo para a aglutinação^{8,62}. Uma amostra de sangue com intensa hemólise, rouleaux ou aglutinação dificulta a visualização e a interpretação para a tipagem do sangue⁶. Outro desafio é a tipagem em amostras de animais com anemia hemolítica imuno mediada por causa da própria autoaglutinação, que persiste apesar das lavagens dos eritrócitos⁵⁷. A tipagem reversa, que é uma metodologia de hemaglutinação, na qual se pesquisa aloanticorpos do tipo sanguíneo a partir de sangue tratado com EDTA, é um teste que originalmente é feito em animais que receberam transfusão de sangue com tipo conhecido para detectar se ocorreu produção de anticorpos contrários ou não. Logo, se baseia na prova de reação cruzada utilizando-se um antissor conhecido obtido pela aloimunização, com os eritrócitos a serem testados^{15,63,64}.

A técnica da imunocromatografia se baseia na interação do antígeno do tipo sanguíneo presente na superfície dos eritrócitos com o anticorpo monoclonal presente na membrana do kit. A aglutinação desses eritrócitos formam uma linha visível na membrana do mesmo^{19,20,59,65}. É utilizada uma tira de papel absorvente que é inserida em amostra de sangue com anticoagulante e depois no poço contendo o diluente. Uma marcação imunocromatográfica será evidenciada quando reagir com o anticorpo monoclonal após a

corrida dos anticorpos para o tipo sanguíneo^{20,59,65}. Cães com baixa expressão de DEA 1.1 geralmente apresentam um resultado fraco positivo⁵⁷.

Os kits de tipagem e reação cruzada apresentam controle positivo para que não haja dúvidas quanto aos resultados falso negativos. A autoaglutinação e contaminações cruzadas em materiais de pipetagem podem levar a falsos positivos nesses métodos. Falsos negativos podem advir de sangue de animais extremamente anêmicos como os que têm volume globular menor que 10% gerando efeito prozona¹³. Nos dias atuais, já há disponibilidade de kits com anticorpos monoclonais anti-DEA 1^{18,20,29}. Para os tipos DEA 3, 4 e 7 existem reagentes policlonais, bem como para o tipo Dal^{18,21,30}. E para os tipos Kai 1 e Kai 2, mais recentemente, conseguiu-se reagentes com anticorpos monoclonais^{30,31,36}.

Para identificar anticorpos anti-eritrocitários e grupos sanguíneos, a técnica de citometria de fluxo pode ser aplicada com vistas à tipagem de indivíduos incompatíveis para transfusão sanguínea. A citometria de fluxo tem uma ampla aplicação na hematologia veterinária, incluindo a identificação de células-tronco hematopoiéticas, contagens celulares diferenciais da medula óssea, quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos anti-eritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas reticuladas⁶⁶. Essa tecnologia permite verificar características físico-químicas de células ou partículas suspensas em meio fluido. Utiliza anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos e necessita de controles isotípicos para definição da região negativa (*background*). Esses controles são constituídos por imunoglobulinas de mesmo isotipo e fluorocromo dos anticorpos teste, sendo o isotiocianato de fluoresceína (FITC) o marcador fluorescente mais utilizado na conjugação de anticorpos⁶⁰.

Acierno, Raj, Giger.²⁰ pesquisaram o tipo sanguíneo DEA 1.1 através da citometria de fluxo utilizando o marcador FITC conjugado ao anticorpo policlonal anti-murino de origem caprina como anticorpo secundário. Pois o anticorpo primário que era usado para interagir com o DEA 1.1 presente na superfície de cada eritrócito investigado era monoclonal anti-DEA 1.1 de origem murina. Santos et al.⁶¹ pesquisando anticorpos anti-DEA 1 em cães pós-transfundidos com sangue DEA 1 encontraram nove animais aloimunizados, o que representou 27% do grupo de animais do estudo. Essas amostras de soro podem ser utilizadas como fonte de anticorpo primário, para pesquisar os epitopos dos grupos DEA 1 presentes na superfície dos eritrócitos e possibilitar tipagem.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a técnica de citometria de fluxo para a tipagem sanguínea em cães.

3.2 ESPECÍFICOS

- 1- Determinar a tipagem do grupo sanguíneo DEA 1 com as amostras de sangue de cães utilizando as técnicas de citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação;
- 2- Estabelecer o escore de positividade das amostras de animais DEA 1 testados pela hemaglutinação e citometria de fluxo e classificar a antigênicidade em fraca, moderada e forte;
- 3- Correlacionar os resultados dos achados das técnicas citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação;
- 4- Estabelecer a frequência do grupo sanguíneo DEA 1 por imunocromatografia, com amostras de sangue de cães doadores de distintas raças sem nenhum grau de parentesco da cidade de Salvador - BA;
- 5- Calcular o risco de transfusão sanguínea incompatível tanto em uma primeira como em uma segunda transfusão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto recebeu aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto das Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia através do Parecer nº 090/2016 (12/08/2016) (ANEXO A).

Os tutores dos animais, objeto do estudo, receberam informação sobre a metodologia do trabalho e concordaram voluntariamente assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no momento da coleta do sangue de cada um. O mesmo encontra-se no Apêndice A.

4.1 CÁLCULO AMOSTRAL

Com base em análise estatística de margem de 95% de confiabilidade na amostragem, em que se observa na literatura uma fração de sucesso de 90% para frequência de uma variável populacional, o cálculo amostral levou em consideração uma fração de sucesso em torno de 85%, utilizando um erro de 5% e um intervalo de confiança dos testes, correspondendo a 95%. Seguindo-se esse cálculo, o estudo precisaria ser realizado com um número mínimo de 196 cães de variadas raças não aparentados em Salvador – Bahia para avaliar prevalência do grupo sanguíneo DEA 1. Participaram do estudo todos os cães que foram doar sangue no período de 4 de junho de 2016 a 3 de junho de 2017 em um hemocentro de Salvador-Bahia, totalizando 203 animais. O cálculo amostral descrito encontra-se no Apêndice B.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.2.1 Padronização do antissoro

Para a realização dos exames de hemaglutinação e da citometria de fluxo foram utilizadas amostras de soros caninos provenientes de cães pós-transfundidos com sangue tipo DEA 1, que foram submetidos à pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo como acompanhamento de aloimunização dos mesmos, segundo Santos et al.⁶¹. Cada antissoro apresentou uma intensidade de média de fluorescência (IMF), que oscilou de IMF 15 a 538,99 representando suas concentrações de anticorpos anti-DEA 1. E ao serem unificados, formando um *pool* de antissoro, este apresentou uma fluorescência maior com IMF 979,52 demonstrando uma potencialização do antissoro.

Este *pool* de antissoro foi diluído na proporção de 1:2 que foi a titulação que apresentou boa reação de aglutinação com sangue conhecido DEA 1, pois em diluição maior não foi encontrada aglutinação na prova de reação cruzada lenta em tubos e quando submetido à nova avaliação por citometria de fluxo apresentou IMF de 623,24. Esse procedimento adotado foi realizado para que não ocorresse efeito prozona como já preconizado^{1,13,20,63}.

4.2.1.1 Metodologia da citometria de fluxo para padronização do antissoro

O procedimento experimental se resumiu na centrifugação de 2 mL de sangue total em EDTA, com 6 milhões de eritrócitos/dL conhecido DEA 1 positivo, a 2200 x g por 3 minutos; o plasma desprezado e o sedimento de eritrócitos ressuspenso com solução salina no mesmo volume do plasma desprezado. A seguir, 2 µL desse concentrado eram misturados com 998 µL de solução salina e homogeneizados em vortex. As amostras teste e o controle negativo, cada uma contendo 50 µL, eram incubadas a 56°C por 10 minutos, e em seguida, incubadas com 40 µL da solução de eritrócitos diluídos em temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras de soro com a suspensão de eritrócitos eram lavadas com salina a 2200 x g por 3 minutos, 3 vezes. Foram acrescentados, aos soros dos frascos a serem testados e ao controle negativo, 3µL do anticorpo policlonal IgG

anti-cão de origem ovina AA132FFITC AbD Serotec* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) incubados em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida os soros foram lavados 2 vezes com salina, centrifugados a 2200 x g por 3 minutos, ressuspensos em 300 µL de salina e por fim, realizadas as leituras no citômetro. As células controle no teste da citometria de fluxo para a pesquisa de anticorpos anti-DEA 1 foram sempre as mesmas hemácias de um cão doador de sangue DEA 1 positivo. Ao anticorpo anti-DEA 1 pesquisado no teste, obtido do soro dos animais receptores de sangue aloimunizados por uma única transfusão sanguínea, já disponível em soroteca, era adicionado o IgG total policlonal conjugado com FITC. Para a realização da citometria de fluxo utilizou-se o citômetro Becton Dickinson FACSCalibur™ interligado a um PC Power Macintosh (Apple), instalado no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, com o software instrumento-específico (BD CellQuest Pro™ software, Becton, Dickinson and Company).

4.2.1.2 Metodologia da titulação do antissoro contendo anticorpos anti-DEA 1

Cada amostra de sangue DEA 1 era centrifugada a 1035 x g por 5 minutos para separação do plasma seguido por 3 lavagens do sedimento de eritrócitos com solução salina a 1035 x g por 5 minutos. Uma suspensão de eritrócitos a 4% em solução salina (200µL do concentrado de eritrócitos para 4,8 mL de solução salina) era adicionada à amostra do *pool* do antissoro, na proporção de 25µL da suspensão de eritrócitos para 50µL de antissoro, diluindo-o até 1:2 com salina que foi a titulação máxima encontrada em que visualizou-se a reação de hemaglutinação. As amostras de suspensão de eritrócitos com antissoro foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos, centrifugadas a 1035 x g por 15 segundos e, para realizar a leitura, tiveram as células ressuspensas para visualização de aglutinação, segundo Gibson⁶⁶.

4.2.2 Tipagem sanguínea das amostras do estudo

4.2.2.1 Imunocromatografia

As provas de imunocromatografia foram realizadas através do *kit* comercial para detecção do grupo sanguíneo DEA 1 Alvedia[®] (Limonest-França), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante. Onde eram colocadas três gotas da solução tampão, seguidas de 3µL de sangue total com EDTA a 5% e após homogeneização por sete segundos, as amostras eram depositadas nas tiras para ocorrer evidência ou não de reação, seguida da leitura.

4.2.2.2 Hemaglutinação

A hemaglutinação utilizou o antissoro policlonal anti-DEA 1, obtido de cães sensibilizados por transfusão sanguínea com sangue conhecidamente DEA 1. As amostras testadas foram submetidas à três lavagens com salina e uma obtenção de suspensão de eritrócitos de 4%. Para uma gota da suspensão de eritrócitos foram acrescentadas duas gotas do antissoro policlonal anti-DEA 1. Essa metodologia seguiu o princípio da tipagem reversa, onde realiza-se a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos²³, quando já é do conhecimento que o soro padrão trata-se de um antissoro conhecido anti-antígeno eritrocitário específico, segundo Lacerda¹⁵. Nesse caso contendo anticorpos anti-DEA 1. Os resultados foram determinados pelo escore de intensidade de cruces, segundo Gibson⁶⁶.

Quadro 2 - Graduação da aglutinação dos testes em cruces

4+	um agregado sólido de células
3+	vários largos agregados de células
2+	medianos agregados de células/luz de fundo (<i>background</i>) clara
1+	pequenos a microscópicos agregados de células/luz de fundo (<i>background</i>) avermelhado turvo
+/-	microscópicos agregados
0	ausência de agregados

Fonte: Gibson⁶⁶.

4.2.2.3 Citometria de fluxo

Para a tipagem do grupo DEA 1 utilizou-se a metodologia desenvolvida por Santos et al.⁶¹, de pesquisa de anticorpos anti-DEA 1 em cães pós-transfundidos com sangue do grupo DEA 1 por citometria de fluxo. Nesse estudo, a partir do antissoro conhecido anti-DEA 1, foi possível a pesquisa do antígeno para proceder a tipagem. Os procedimentos de dupla marcação que consistem em hemácias marcadas com anticorpos não conjugados foram submetidos a uma segunda reação utilizando-se um anticorpo secundário conjugado a um fluorocromo, o que impediu simultânea quantificação de múltiplos marcadores em células individuais. Para cada amostra, houve reações controle por meio de células da mesma amostra, porém, não submetidas à marcação e células marcadas com um anticorpo de isotipo igual que não se conjuga especificamente a qualquer antígeno diferente das hemácias. As células não marcadas corrigiram a autofluorescência e a intensidade de fluorescência do anticorpo irrelevante era relacionada à reação de fundo, como adotaram Nakage, Santana, Capua, Coelho⁶⁵ e Ramos-Vara, Avery, Avery⁶⁷. O ponto de corte foi estabelecido a partir do resultado de maior intensidade média de fluorescência obtida negativa, acrescida de uma unidade numérica decimal.

Para a tipagem de cada amostra de sangue a ser testada procedia-se a centrifugação de 2 mL de sangue total em EDTA, a 2200 x g por 3 minutos; o plasma era desprezado e o sedimento de eritrócitos ressuspenso com solução salina no mesmo volume do plasma desprezado. A seguir, 2 µL eram misturados com 998 µL de solução salina e homogeneizados em vortex e reservados para realização do teste. 50 µL do antissoro que iria interagir se ligando com o eritrócito com o tipo DEA 1 positivo em sua superfície e, 50 µL do soro sem aloanticorpos que representava o controle negativo, que não iria interagir na ligação com os eritrócitos DEA 1 positivo ou negativo, eram incubadas a 56°C por 10 minutos, e em seguida, passavam por uma segunda incubação com 40 µL da solução de eritrócitos a serem testados, em temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras de soro policlonal anti-DEA 1 e do controle negativo com a suspensão de eritrócitos eram lavadas com salina a 2200 x g por 3 minutos, 3 vezes. E acrescentados nos frascos a serem testados, controles positivo e negativo, 3µL do anticorpo IgG anti-cão conjugado ao FITC, em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida os tubos testes eram lavados com salina a 2200 x g por 3 minutos 2 vezes para serem ressuspenso os conteúdos dos tubos em 300 µL de salina, e por fim, realizadas as leituras no citômetro.

Quando ocorria a interação do anticorpo secundário anti-cão à ligação do antígeno DEA 1, presente no eritrócito testado, com o aloanticorpo introduzido na técnica, o resultado era considerado positivo para o tipo DEA 1. Do contrário era considerado resultado negativo.

No Apêndice C encontra-se, de forma sucinta, o protocolo metodológico da citometria de fluxo para determinação do antissoro quando se tem o antígeno conhecido, ou determinação do antígeno quando se tem o antissoro.

Utilizando-se as metodologias de tipagem sanguínea do estudo foi possível confrontar os achados das três técnicas e quantificar as intensidades de fluorescência de cada resultado positivo para identificar as graduações de antigênicidade de cada resultado em fraca, moderada e intensa.

4.2.3 Prevalência do tipo sanguíneo DEA 1 positivo

Através dos resultados da imunocromatografia foi realizada uma pesquisa de prevalência do tipo sanguíneo canino DEA 1, com os animais tipados sem nenhum grau de parentesco com base nos registros de nascimento disponíveis. A imunocromatografia foi a técnica escolhida para o cálculo da prevalência por se tratar de técnica já padronizada, reconhecida e disponível mundialmente. Foram testados 203 cães.

4.2.4 Cálculo do risco de transfusão sanguínea incompatível

O risco de transfusão sanguínea incompatível foi determinado através de cálculos relativos ao risco de um animal negativo para o grupo DEA 1 receber sangue de um animal DEA 1 positivo na primeira e na segunda transfusão. As fórmulas usadas para o cálculo do risco após a primeira transfusão e a segunda transfusão, de acordo com a prevalência encontrada de DEA 1 positivo neste estudo, encontram-se nos quadros 3 e 4 segundo Spada et al.⁵².

Quadro 3 – Fórmula para cálculo de risco de sensibilização de cão com sangue não submetido à prova de compatibilidade e tipagem na primeira transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo

$$\frac{(\% \text{ DEA 1 negativo} \times \% \text{ DEA 1 positivo})}{100}$$

Fonte: Spada et al.⁵².

Quadro 4 – Fórmula para cálculo de risco do mesmo cão não submetido à prova de compatibilidade e tipagem desenvolver reação hemolítica aguda com a segunda transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo

$$\frac{(\% \text{ DEA 1 negativo} \times \% \text{ DEA 1 positivo}) \times \% \text{ sensibilização na primeira transfusão}}{10.000}$$

Fonte: Spada et al.⁵².

4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram realizadas análises para um estudo descritivo, analítico, com variáveis quantitativas e qualitativas das três técnicas realizadas: citometria de fluxo, imunocromatografia e aglutinação. Para avaliar a citometria de fluxo aplicou-se Média, Desvio Padrão, Mediana, Valor Mínimo, Valor Máximo e Variância pelo programa Excel versão 2013. Para a análise comparativa entre as três técnicas foi realizado teste Spearman e todas as variáveis foram analisadas pelo teste qui-quadrado de Pearson. Os gráficos foram realizados através do programa *Graph Pad Prism* (<http://www.graphpad.com>).

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1 - Tipagem sanguínea em cães DEA 1 positivo: Análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação

Suzana Cláudia Spinola dos Santos¹; Mariane Melo dos Santos²;
³ Wellington Francisco Rodrigues; Roberto Meyer²; Maria de Fátima Dias Costa⁴

¹Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador – BA, Brasil.; ²Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Salvador – BA, Brasil; ³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/Biologia Celular, Uberaba – MG, Brasil; ⁴Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Salvador – BA, Brasil

5.1.1 Resumo

As técnicas de tipagem sanguínea vem sendo aperfeiçoadas para garantir maior segurança aos procedimentos transfusionais. A tipagem para o antígeno DEA 1 através da citometria de fluxo, deverá oferecer mais confiabilidade à rotina da imunohematologia em cães doadores e receptores. Na atualidade, o grupo DEA 1 passou a ser denominado como um sistema alélico autossômico dominante com o tipo DEA 1 negativo e suas variações de positividade. O presente estudo pesquisou o antígeno DEA 1, pela técnica da citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação, comparando as três técnicas. Dentro dos indivíduos positivos para o grupo DEA 1, tipados pela citometria de fluxo, foram encontradas intensidades médias de fluorescência que são indicadoras de antigênicidade fraca, moderada e forte, podendo-se dividir o grupo DEA 1 em positivo fraco, positivo moderado e positivo forte. As técnicas de tipagem sanguínea para o grupo DEA 1 por citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação tiveram correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Palavras-chave: Tipagem sanguínea em cães. Medicina Transfusional em cães. Antígeno eritrocitário canino 1. Citometria de fluxo.

5.1.2 Introdução

Atualmente, em Medicina Veterinária, a prática segura das transfusões sanguíneas ganha cada vez mais destaque, estabelecendo-se normas pré-transfusionais de triagem para os animais doadores, o que representa uma tendência de padronização da avaliação pré-

transfusional¹. Sabe-se que, para uma transfusão de sangue segura, é importante que se faça uso do sangue tipado e compatível^{2,3}.

Recentemente, através da tipagem por anticorpos monoclonais anti-DEA 1, o grupo DEA 1 passou a ser denominado como um sistema alélico autossômico dominante com o tipo DEA 1 negativo e suas variações de positividade (fraca, média e intensa)⁴⁻⁷.

O presente estudo pesquisou o antígeno DEA 1, pela técnica da citometria de fluxo e aglutinação em 69 cães de diversas raças, com idade entre 1 e 8 anos, com peso a partir de 28 kg e de ambos os sexos, testados pela imunocromatografia. Através da correlação entre as três técnicas pode-se identificar cada escore de positividade em animais DEA 1 positivos, e classificar em fraca, moderada e forte. As técnicas de tipagem sanguínea vem sendo aperfeiçoadas para garantir maior segurança aos procedimentos transfusionais. A tipagem para o antígeno DEA 1 através da citometria de fluxo, deverá oferecer mais confiabilidade à rotina da imunohematologia em cães doadores e receptores. Este método é então proposto como padrão-ouro dentro da tipagem sanguínea assegurando mais precisão e confiabilidade a tais procedimentos.

5.1.3 Materiais e Métodos

Para a realização dos exames de hemaglutinação e da citometria de fluxo foram utilizadas amostras de antissoros caninos provenientes de cães pós-transfundidos com sangue tipo DEA 1 que foram submetidos à pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo como acompanhamento de aloimunização dos mesmos, por Santos et al.⁸. Cada antissoro apresentou uma intensidade própria de média de fluorescência, que oscilou de 15 a 538,99 representando suas concentrações de anticorpos anti-DEA 1. E ao serem unificados formando um *pool* de antissoro, este apresentou uma intensidade média de fluorescência maior, que foi de 979,52 demonstrando uma potencialização do antissoro.

Este *pool* de antissoro foi diluído na proporção de 1:2 que foi a titulação que apresentou boa reação de hemaglutinação com sangue conhecido DEA 1, pois em diluição maior não foi encontrada hemaglutinação na prova de reação cruzada lenta em tubos e quando submetido à nova avaliação por citometria de fluxo apresentou média de fluorescência de 623,24. Esse procedimento adotado foi realizado para que não ocorresse efeito prozona, com uma concentração de anticorpos maior que a do antígeno como preconizado^{4,9-11}.

Para a realização da citometria de fluxo utilizou-se o citômetro Becton Dickinson FACSCalibur™ interligado a um PC Power Macintosh (Apple, Salvador, BA, Brasil, Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia) com o software instrumento-específico (BD CellQuest Pro™ software, Becton, Dickinson and Company).

As provas de imunocromatografia foram realizadas através do *kit* comercial para detecção do grupo sanguíneo DEA 1 Alvedia® (Limonest-França), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante. Onde eram colocadas três gotas da solução tampão, seguidas de 3µL de sangue total com EDTA a 5% e após homogeneização por sete segundos, as amostras eram depositadas nas tiras para ocorrer evidenciação ou não de reação, seguida da leitura.

As amostras testadas foram submetidas à três lavagens com salina e uma obtenção de suspensão de eritrócitos de 4%. Para uma gota da suspensão de eritrócitos foram acrescentadas duas gotas do antissoro policlonal anti-DEA 1. Essa metodologia seguiu o princípio da tipagem reversa, onde realiza-se a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, quando já é do conhecimento que o soro padrão trata-se de um antissoro conhecido anti-antígeno eritrocitário específico. Nesse caso contendo anticorpos anti-DEA 1¹². Os resultados foram determinados pelo escore de intensidade de cruces, segundo Gibson¹³.

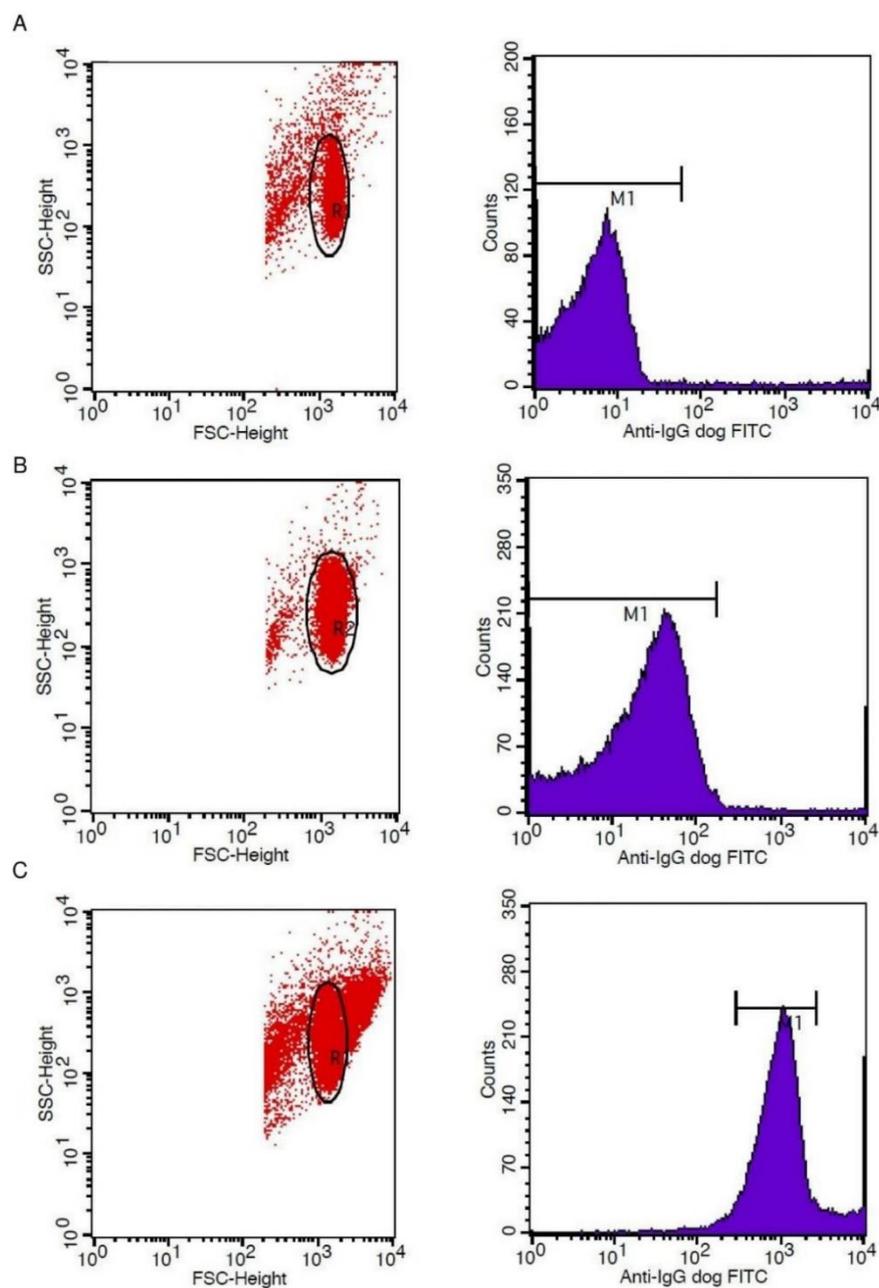
A tipagem pela citometria de fluxo, seguiu técnica descrita por Santos et al.⁸ assim descrita: amostras de 2 mL de sangue total em EDTA, foram centrifugadas a 2200 x g por 3 minutos; o plasma foi desprezado e o sedimento de eritrócitos ressuspendido com solução NaCl 0,09% no mesmo volume do plasma desprezado. A seguir, 2 µL da suspensão foram misturados com 998 µL de solução NaCl 0,09%, homogeneizados em vortex e reservados para realização do teste. Foram utilizados 50 µL do antissoro com anticorpos anti-DEA 1 e 50 µL do soro sem aloanticorpos, incubados a 56°C por 10 minutos. A seguir, procedeu-se uma segunda incubação em temperatura ambiente por 30 minutos com 40 µL da suspensão de eritrócitos. As amostras foram lavadas 3 vezes com solução NaCl 0,09% a 2200 x g por 3 minutos e acrescentados aos controles positivo e negativo, 3µL do anticorpo IgG anti-cão e incubados em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas com solução NaCl 0,09%, centrifugados 2 vezes a 2200 x g por 3 minutos e ressuspendidos em 300 µL de solução NaCl 0,09%, sendo por fim realizadas as leituras no citômetro.

Para a análise comparativa entre as três técnicas foi realizado teste Spearman e todas as variáveis foram analisadas pelo teste qui-quadrado de Pearson. Para as tabelas foram aplicadas média, desvio-padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo e variância pelo programa EXCEL versão 2013. Os gráficos foram realizados através do programa GRAPH PAD PRISM (<http://graphpad.com>).

5.1.4 Resultados

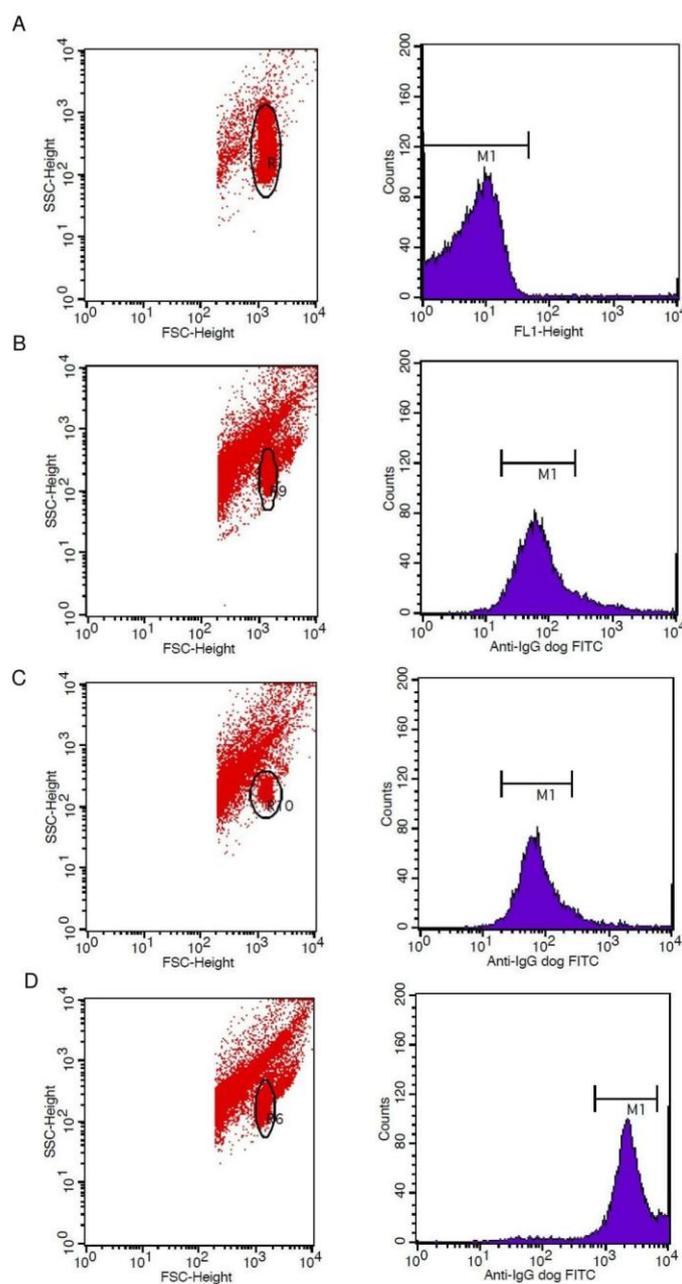
Durante a padronização dos resultados positivo e negativo foram realizados testes de tipagem pela citometria de fluxo em animais já tipados pela imunocromatografia, onde o valor de média de fluorescência mais baixo foi 5,92 e o mais alto de 31,53 em nove animais negativos que estavam sendo testados. E para controle positivo foi também realizada a técnica da citometria de fluxo em soros de animais conhecidamente positivos pela imunocromatografia, encontrando o valor de média de fluorescência de 979,52 e de 623,24, onde foi escolhido como controle positivo o de maior valor. A figura 1 apresenta os histogramas dos controles negativo e positivo e a figura 2 apresenta os histogramas dos resultados de média de fluorescência mínimo e máximo dos animais negativos do estudo, bem como dos animais positivos.

Figura 1 – Sequência da análise dos controles negativo e positivo com os soros primários anti-DEA 1 negativo e positivo, em 10.000 eventos, em gráficos de tamanho e granulosidade de eritrócitos e histogramas individuais. Nota: (A) Controle negativo obtido com média de fluorescência mais baixa (5,92) oriundo de eritrócitos negativos para o grupo DEA 1. (B) Controle negativo obtido com média de fluorescência mais alta (31,53) oriundo de eritrócitos negativos para o grupo DEA 1. (C) Controle positivo obtido a partir de animal conhecidamente do grupo DEA 1 (979,52) representando eritrócitos positivos



Fonte: Autoria própria

Figura 2 – Sequência dos gráficos em tamanho e granulosidade de eritrócitos e histogramas individuais, dos eritrócitos dos animais estudados negativos e positivo para o grupo DEA 1, em 10.000 eventos, que apresentaram valores mínimo e máximo das fluorescências. Nota: (A) Animal negativo para o grupo DEA 1, apresentando a menor média de fluorescência do grupo dos animais negativos (7,67). (B) Animal negativo para o grupo DEA 1, apresentando a maior média de fluorescência do grupo dos animais negativos (71,46). (C) Animal positivo para o grupo DEA 1, apresentando a menor média de fluorescência do grupo dos animais positivos (77,65) representando a fluorescência mais próxima do ponto de corte estabelecido (71,47). (D) Animal positivo para o grupo DEA 1, apresentando a maior média de fluorescência do grupo dos animais positivos (2391,82)



Fonte: Autoria própria

O grupo de 69 animais do estudo foi tipificado pela técnica da imunocromatografia, pela citometria de fluxo e hemaglutinação, seguindo a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, com o antissoro já conhecido anti-DEA 1. Dos 69 animais tipados nesta análise pela imunocromatografia, 30 foram negativos e 39 positivos para o grupo sanguíneo DEA 1. A tabela 1 apresenta o perfil das médias de fluorescência e hemaglutinação dos animais DEA 1 negativos, onde as médias de fluorescência oscilaram de 5,92 a 71,46 e todos apresentaram hemaglutinação negativa (Escore 0). A tabela 2 apresenta o perfil das médias de fluorescência dos animais DEA 1 positivos, cujos valores variaram de 77,65 a 2391,82 e seus escores de aglutinação obtidos foram de 1 a 3 cruces (1+, 2+, 3+), não se observando nenhum com escore 4 cruces (4+). Os 39 animais DEA 1 positivos, na imunocromatografia e citometria de fluxo, tiveram seus resultados de médias de fluorescência, confrontados com os escores da aglutinação, apresentados na tabela 3.

Tabela 1 – Comparação dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) obtidos na citometria de fluxo com a hemaglutinação (Escore de aglutinação 0, 1+, 2+, 3+, 4+) dos animais que apresentaram resultados negativos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1

Animal	Fluorescência	Aglutinação
1	31,53	0
2	12,77	0
3	5,92	0
4	8,24	0
5	9,44	0
6	9,76	0
7	7,67	0
8	8,37	0
9	8,35	0
10	28,51	0
11	71,46	0
12	43,26	0
13	20,49	0
14	14,11	0
15	13,45	0
16	9,41	0
17	9,87	0
18	17,62	0
19	36,49	0
20	15,25	0
21	52,8	0
22	43,1	0
23	61,8	0
24	68,32	0
25	30,21	0
26	49,47	0
27	23,35	0
28	16,13	0
29	30,39	0
30	26,24	0
Média		26,126
Desvio Padrão		19,23265
Mediana		19,055
Mínimo		5,92
Máximo		71,46
Variância		369,8949

(n)=30 animais. Média e Desvio Padrão (Pearson; $p < 0,0001$)

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2 – Comparação dos valores de intensidade média fluorescência (IMF) obtidos na citometria de fluxo com a hemaglutinação (Escore de aglutinação 0, 1+, 2+, 3+, 4+) dos animais que apresentaram resultados positivos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1

Animal	IMF	Aglutinação
1	119,48	1
2	140,4	1
3	266,27	3
4	1421,43	1
5	250,54	1
6	240,21	1
7	91,51	1
8	174,01	1
9	316,11	2
10	127,54	1
11	226,52	3
12	293,4	3
13	270,91	3
14	123,96	1
15	187,83	1
16	2391,82	3
17	688,98	2
18	348,25	2
19	377,76	2
20	688,21	3
21	704,6	2
22	1592,5	3
23	1627,38	3
24	593,86	2
25	865,08	2
26	94,99	1
27	222,5	1
28	85,93	1
29	142,48	1
30	145,11	2
31	113,98	1
32	293,4	2
33	270,91	2
34	161,75	1
35	81,35	1
36	174,24	2
37	467,84	2
38	213,73	2
39	77,65	1
Média		427,5492
Desvio Padrão		509,4232

Mediana	240,21
Mínimo	77,65
Máximo	2391,82
Variância	259511,9

(n)=39 animais. Média e Desvio Padrão (Pearson; $p < 0,0001$)

Nota: Tratamento estatístico da tabela 2

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3 – Distribuição dos animais com resultados positivos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1, reunidos pelos escores de aglutinação obtidos (1+, 2+, 3+), comparados aos resultados de intensidade média de fluorescência (IMF) da citometria de fluxo

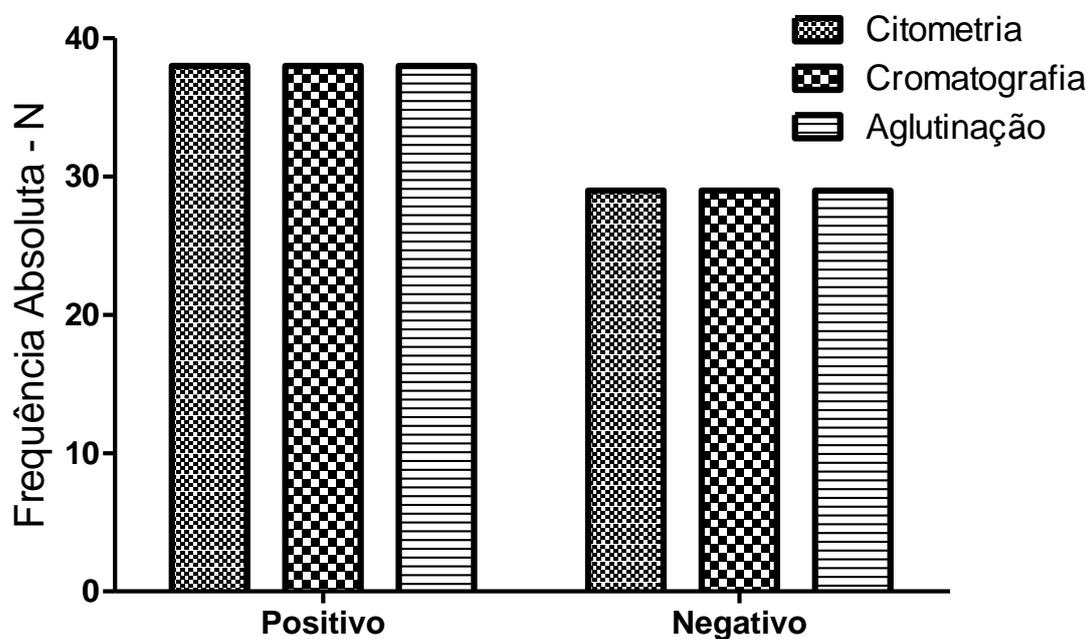
Nº de animais DEA 1+	Aglutinação	IMF					
		Mínimo	Máximo	Média	D. P.	Mediana	Variância
18	1+	77,65	1421,43	214,3078	305,9991	133,97	93635,48
13	2+	145,11	865,08	419,99	227,0188	348,25	51537,51
8	3+	226,52	2391,82	919,6263	836,2198	490,805	699263,6

(n) = 39 animais. Média e Desvio Padrão (Pearson; $p < 0,0001$)

Fonte: Dados da pesquisa

Após estabelecer os respectivos pontos de cortes para valores positivos e negativos, foram detectadas as positivities e negatividades utilizando os três distintos métodos: citometria de fluxo, imunocromatografia (cromatografia) e hemaglutinação (aglutinação), onde os mesmos foram comparados quanto à sensibilidade (Figura 3). Após avaliação dos dados não foram encontradas diferenças quanto à sensibilidade de detecção de soros positivos e negativos ($p > 0,05$).

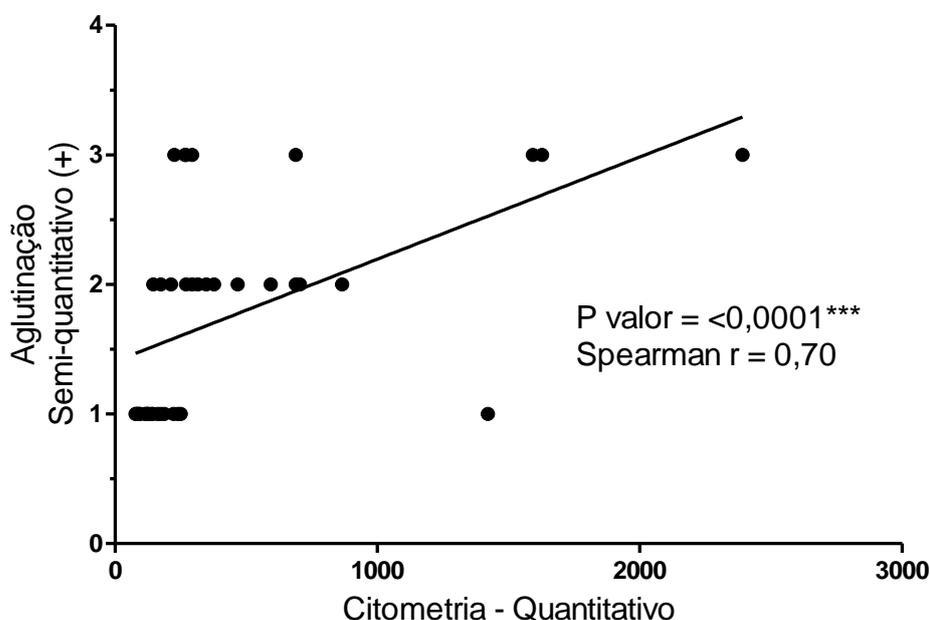
Figura 3 – Análise comparativa entre os resultados positivos de cada técnica abordada quanto à sensibilidade



Nota: Após avaliação dos dados não foram encontradas diferenças quanto à sensibilidade de detecção de soros positivos e negativos ($p > 0,05$)

Devido à variabilidade da intensidade de aglutinação, bem como os valores encontrados na imunocromatografia, verificou-se existência de uma correlação para a positividade entre os diferentes métodos (Figura 4). Após as comparações, constata-se que há uma correlação positiva (Spearman $r = 0,70$), e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), quanto à sensibilidade dos testes.

Figura 4 – Análise comparativa dos valores quantitativos dos testes positivos das técnicas de hemaglutinação (aglutinação) e citometria de fluxo (citometria)



Nota: Após as comparações, constata-se que há uma correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) quanto à sensibilidade dos testes

5.1.5 Discussão

No presente trabalho, foi utilizada a técnica da citometria de fluxo para detectar o tipo sanguíneo de cães DEA 1. E com isso confrontou-se os resultados com os da técnica de imunocromatografia e da hemaglutinação. Na medicina transfusional veterinária ainda não está estabelecida a técnica padrão-ouro para tipagem sanguínea e busca-se contribuir para este fim.

Os resultados obtidos neste estudo, da análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação se assemelharam aos encontrados por Acierno, Raj, Giger ⁴, quando tipificaram 66 cães pela imunocromatografia e citometria de fluxo, onde os resultados DEA 1 na imunocromatografia eram positivos também para DEA 1 na citometria de fluxo. Os mesmos utilizaram anticorpo monoclonal murino anti-DEA 1 como anticorpo primário, conjugando ao anticorpo secundário anti-murino policlonal de origem caprina. Enquanto que neste estudo utilizou-se como anticorpo primário anti-DEA 1, anticorpo policlonal oriundo de cães aloimunizados pós-transfusão sanguínea com

sangue do grupo DEA 1 positivo e como anticorpo secundário, policlonal anti-canino de origem ovina.

A tipagem sanguínea de cães, em geral, baseia-se na identificação sorológica por reações de aglutinação. Originalmente, o soro de cães sensibilizados vem sendo utilizado para a tipagem, através dos aloanticorpos polivalentes, que variam entre os grupos de animais devido à cada intensidade de antigênicidade individual dos mesmos^{14,15}. Bioquimicamente pouco sabe-se acerca desse grupo e suas correlações moleculares com os grupos sanguíneos de humanos ou de outras espécies, então um ensaio de anticorpos monoclonais alelo-específicos oriundos de sensibilização por aloantígenos caninos eritrocitários pode significar uma imensa fonte de resultados desejáveis para a medicina transfusional e se tornar possível a comparação bioquímica entre os aloantígenos. No entanto ainda é feito o reconhecimento do grupo sanguíneo DEA 1 através de anticorpos policlonais obtidos por aloimunização canina^{15,16}. O antissoro aqui utilizado como anticorpo primário na citometria de fluxo, que apresentou alta concentração, foi utilizado como anticorpo policlonal para ligar-se aos antígenos DEA 1 na prova de reação cruzada lenta em tubos, cujo princípio é a hemaglutinação, o que permitiu gerar reação antígeno-anticorpo sem utilização do reagente da antiglobulina canina de Coombs para se obter uma melhor visualização da aglutinação. Blais, Berman, Oakley, Giger¹⁶ e Giger³ relataram que inicialmente o soro de cães sensibilizados era utilizado para tipagem, sabendo-se que tratava-se de soro policlonal, podendo haver variação entre os indivíduos, e requerer o reagente de Coombs para melhor visualização da aglutinação, mas nem sempre gerando uma ótima avaliação. Neste estudo não observou-se em nenhuma amostra o escore de 4 cruces em aglutinação, apenas a variação de 1 a 3 cruces, pois neste método os anticorpos produzidos apresentam fraca reação por não utilizar o reagente de Coombs. Hara et al.¹⁷ atestaram a especificidade dos anticorpos monoclonais, quando estudavam anticorpos contrários ao tipo DEA 3 confirmando por aglutinação cruzada, usando eritrócitos positivos e negativos. No entanto, encontraram títulos muito baixos de 1:4 a 1:8 e com a reação desaparecendo muito rapidamente. No presente estudo a titulação máxima possível do antissoro policlonal para evidenciação de aglutinação foi 1:2 sem auxílio do reagente Coombs.

Os testes de imunocromatografia apresentaram resultados de ligações variáveis de fortes a fracas, o que é esperado nesta técnica, no entanto foi preferível não categorizar as reações em fraca, moderada e forte, por tratar-se de um teste onde a marcação de

intensidade de positividade é visual, o que leva à subjetividade de interpretação. Diferentemente do método de imunocromatografia usado por Acierno et al.⁴, que foi possível quantificar um escore de intensidade de 0 a 4 cruces (0+, 1+, 2+, 3+, 4+) por meio de leitura das tiras do teste em densitômetro, onde 0+ e 1+ eram resultados negativos e os seguintes positivos aumentando por intensidade antigênica.

Segundo Giger³ o sistema DEA 1 representa uma exceção dentre os demais sistemas que se apresentam em positivo e negativo, como os DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 7 e Dal, sendo subdividido em DEA 1.1 (A1) e DEA 1.2 (A2) que são aparentemente alélicos, e um outro alelo que seria o DEA 1.3 (A3). No entanto estudos recentes indicaram que o grupo DEA 1 é mais adequado ser caracterizado como tipo negativo, fraco positivo, moderado positivo e forte positivo, do que ser subdividido em dois ou três subtipos^{6,7}. O que foi possível observar nos resultados encontrados nas comparações dos escores de 1+, 2+ e 3+ das hemaglutinações e as médias de fluorescências demonstradas na tabela 3.

Ao serem realizadas as análises de citometria de fluxo foi encontrada uma variação de reações de ligações, o que é revelado pelas médias de fluorescências e, quando foram comparadas aos resultados encontrados na hemaglutinação, que seguiu a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, foi possível fazer uma categorização em grupos de resultados de escore 1+, 2+ e 3+ que foram encontrados, correlacionando-os como ilustra a tabela 3. Acierno et al.⁴ preconizaram através dos resultados obtidos em seus estudos com a técnica da citometria de fluxo para o diagnóstico do grupo sanguíneo DEA 1, que é mais adequado que seja utilizado um esquema de tipagem em DEA 1 positivo e DEA 1 negativo, com a detecção de sua expressão antigênica em fraca, moderada e forte, com isso eliminando a padronização previamente definida dos tipos sanguíneos DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 1.3.

Polak et al.⁵ avaliando o grupo sanguíneo DEA 1 tipificando 53 cães DEA 1 positivo, os subdividiram em DEA 1 positivo fraco, DEA 1 positivo moderado e DEA 1 positivo forte. Tornando consistente a informação de que esse modelo é dependente de uma dominância autossômica com 4 a 5 alelos: DEA 1 negativo (0), DEA 1 positivo fraco (1+), DEA 1 positivo moderado (2+) e DEA 1 positivo forte (3+ e 4+) comparando os achados das intensidades de reação de tiras cromatográficas aos valores médios de fluorescência pela técnica de tipagem pela citometria de fluxo que trata-se de técnica quantitativa. Euler et al.⁶ também encontraram uma forte correlação entre os resultados

semiquantitativos visual e densitométrico dos graus de positividade do grupo DEA 1 em fraco, moderado e forte.

Lucidi et al.¹⁸ tipificando amostras de sangue, pela citometria de fluxo com anticorpo anti-DEA 1.1 monoclonal em 62 cães DEA 1.1 negativos pela técnica de tipagem em tubo, encontraram intensidades médias de fluorescência (IMF) menores que 25 (média=16 e mediana=15) e em 110 cães DEA 1.1 positivos, também pela tipagem em tubo, encontraram médias de fluorescência maiores que 73 (média=407 e mediana=391). Goy-Thollot et al.¹⁹ tipificando animais DEA 1 com antissoro monoclonal, encontraram uma expressão antigênica que designaram de DEA 1 negativo o que apresentava uma intensidade média de fluorescência menor que 10 ($IMF < 10$), em fraco positivo de $10 \leq IMF < 100$, moderado positivo de $100 \leq IMF < 300$ e em forte positivo com $IMF \geq 300$. No presente estudo os 30 animais negativos pela imunocromatografia e aglutinação apresentaram na citometria de fluxo com anticorpo anti-DEA 1 policlonal intensidades médias de fluorescências menores que 71,46 (média=26,126 e mediana=19,055) e os 39 animais positivos, também pelas mesmas duas técnicas, apresentaram na citometria de fluxo intensidades médias de fluorescências maiores que 77,65 (média=427,5492 e mediana=240,21). Ao serem comparadas as amostras de sangue tipadas pela imunocromatografia com as mesmas tipadas pela citometria de fluxo, utilizando o anticorpo primário anti-DEA 1 obtido por sensibilização pós-transfusional, encontrou-se uma correlação direta positiva, pois todos apresentaram resultados positivos. De forma semelhante, Euler et al.⁶ tipificando amostras de sangue de cães com anticorpo monoclonal pelas técnicas de coluna gel, citometria de fluxo e imunocromatografia também obtiveram resultados de correlação direta positiva. Isso leva à conclusão que esse antissoro apresentava anticorpos em alta concentração específicos para o grupo DEA 1. Comparando, Polak et al.⁵ realizaram a retipagem de animais considerados DEA 1.1 negativos, DEA 1.1 positivos e DEA 1.2 positivos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais paralelamente para determinar sua correlação e, encontraram nos animais DEA 1.1 positivos uma reação forte quando utilizaram antissoro para tipificar DEA 1. No mesmo estudo, as amostras DEA 1.1 negativas testadas pelo anticorpo anti-DEA 1 monoclonal continuaram apresentando resultado negativo, porém quando testados com anticorpos policlonais foram encontrados DEA 1.1 positivos fraco a moderado. Surpreendentemente seis amostras antes tipadas como DEA 1.2 positivo apresentaram discordância de resultado, tendo reações de variações moderadas tanto com os reagentes

monoclonais como com os policlonais, encontrando nestas amostras resultados de DEA 1 positivo moderado a forte e DEA 1 negativo.

Lee, Giger, Kim ⁷ em estudo comparativo com os tipos de sangue Kai 1 e Kai 2 argumentaram que o grupo sanguíneo DEA 1 é composto por uma variação de tipos DEA 1 e não dividido em DEA 1.1 e DEA 1.2, visto que em seus ensaios de imunocromatografia e *immunoblotting* identificaram através do anticorpo monoclonal anti-Kai 1 que esse antígeno é uma proteína de 200 kDa e 50 kDa, enquanto que o anticorpo monoclonal anti-Kai 2 identificou que esse antígeno é uma proteína de 80 kDa. Essas mesmas proteínas de 200/50 kDa e 80 kDa dos tipos Kai 1 e Kai 2 respectivamente assemelham-se aos estudos anteriores para os tipos DEA 1.1 e DEA 1.2 onde Corato et al.²⁰ nos primeiros ensaios de *immunoblotting* visualizaram a corrida de 200/50 kDa no DEA 1.1 e 85 kDa no DEA 1.2. Para Polak et al.⁵ é incomum que tenham-se duas proteínas diferentes para os tipos DEA 1.1 e DEA 1.2 como partes do mesmo sistema de grupo sanguíneo, pois ao utilizarem anticorpos monoclonais anti-DEA 1 não confirmaram esses estudos prévios para essas duas proteínas. E simultaneamente, através de suas pesquisas pela citometria de fluxo demonstraram que o DEA 1.1 e o DEA 1.2 são o mesmo antígeno e não estando correlacionados a variações de expressão do grupo. É um antígeno DEA 1 positivo, como também foi observado neste estudo, com variações de intensidade fraca, moderada e forte. Safra et al.²¹ em estudos preliminares do genoma canino, encontraram apenas um nucleotídeo de polimorfismo para o DEA 1 na região do cromossomo CFA27. Lee, Giger e Kim ⁷, baseando-se nos achados da técnica por *immunoblotting* e reações com vários anticorpos monoclonais e policlonais, sugerem que os tipos sanguíneos Kai 1 e Kai 2 correspondam às proteínas originalmente descritas como DEA 1.1 e DEA 1.2 e o atual anticorpo monoclonal anti-DEA 1 reconheça um antígeno eritrocitário único, como foi observado várias intensidades de antigênicidade neste estudo. A técnica da citometria de fluxo é capaz de detectar concentrações de antígeno na superfície de eritrócitos que são insuficientes para identificação de resultados positivos pela aglutinação em tubo, ou seja tipificações em tubo por aglutinação estão mais sujeitas a erros devido à natureza subjetiva da interpretação da aglutinação e, a citometria de fluxo é uma técnica de acurácia com diferenciação clara entre resultado positivo e negativo e reprodutível.

5.1.6 Conclusões

A citometria de fluxo, com uso de anticorpo policlonal, para a tipagem sanguínea do grupo DEA 1 é uma técnica precisa e de acurácia, com diferenciação clara entre os resultados positivo e negativo;

Dentro dos indivíduos positivos para o grupo DEA 1, tipados pela citometria de fluxo, existem intensidades médias de fluorescência que são indicadoras de antigênicidade fraca, moderada e forte, podendo-se dividir o grupo DEA 1 em positivo fraco, positivo moderado e positivo forte;

As técnicas de tipagem sanguínea para o grupo DEA 1 por citometria de fluxo, aglutinação e imunocromatografia têm correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

5.1.7 Referências

1. Tocci LJ, Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg and Critical Care*. 2009; 19: 66-73.
2. Dodds WJ. Practical Veterinary Transfusion Medicine. In: Anais do World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 2005. México: World Small Animal Veterinary Association; 2007. p.1-4.
3. Giger U. Blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility. In: Bonagura JD, Twedt DC, eds. *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. Philadelphia, United States: Saunders, Elsevier Inc; 2014:143-8.
4. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analysed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med*. 2014; 28(2): 592-8.
5. Polak K, Acierno MM, Raj K, Mizukami K, Siegel DL, Giger U. Dog erythrocyte antigen 1: mode of inheritance and initial characterization. *Vet Clin Pathol*. 2015; 44(3): 369-79.
6. Euler CC, Lee JH, Kim HY, Raj K, Mizukami K, Giger U. Survey of two new (Kai 1 and Kai 2) and other blood groups in dogs of North America. *J Vet Intern Med*. 2016; 30(5): 1642-7.
7. Lee JH, Giger U, Kim HY. Kai 1 and Kai 2: characterization of these dog erythrocyte antigens by monoclonal antibodies. *Plos One*. 2017; 12(6): 1-13.
8. Santos SCS, Moroz LR, Santos MM, Santos AS, Trindade SC, Meyer R, et al. Detection of canine anti-DEA 1 antibodies using flow cytometry in dogs following DEA 1-positive blood transfusion. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2018; 55(1): 1-7.
9. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev*. 2004 Apr 2; 18: 117-26.
10. Stieger K, Palos H, Giger U. Comparison of various blood-typing methods for the feline AB blood group system. *Am J Vet Res*. 2005; 8(66): 1393-9.
11. Vap LM. An update on blood typing, crossmatching, and doing no harm in transfusion dogs and cats. *Vet. Med*. 2010; 1: 447-53.
12. Lacerda LA. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: Anais do 2º Simposio De Patologia Clínica Veterinária Da Região Sul do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. Porto Alegre; 2005. p. 62-81.
13. Gibson G. Transfusion Medicine. In: King LG, Boag A. *Manual of canine and feline emergency and critical care*. 2. ed. BSAVA; 2007. p. 2015-227.

14. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Am J Vet Res.* 2005; 66(8): 1386-92.
15. Chang HW, Nguyen DD, Washington E, Walker ID, Holloway SA. Phage display antibodies to allelic determinants of canine blood cells. *J Immunol Methods.* 2006; 311: 1-11.
16. Blais MC, Berman L, Donna A, Oakley DA, Giger U. Canine dal blood type: A red cell antigen lacking in some dalmatians. *J Vet Intern Med.* 2007; 21(2): 281-6.
17. Hara Y, Ejima H, Aoki S, Tagawa M, Motoyoshi S, Sugiyama M, et al. Preparation of monoclonal antibodies against Dog Erythrocyte Antigen D1 (DEA-3). *J Vet Med Sci.* 1991; 53(6):1105-7.
18. Lucidi CA, Takahira RK, Gerlach JÁ, Davis JM, Schwartz KA, Scott MA. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(4): 435-43.
19. Goy-thollot I, Giger U, Boisvineau C, Perrin R, Guidetti M, Chaprier B, et al. Pre-and post-transfusion alloimmunization in dogs characterized by 2 antiglobulin-enhanced cross-match tests. *J Vet Intern Med.* 2017; 31(5): 1420-9.
20. Corato A, Mazza G, Hale AS, Barker RN, Day MJ. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification of a dog erythrocyte membrane antigen homologous to human Rhesus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 59: 213-23.
21. Safra N, Owens SD, Pedersen NC, Burges J, Chew T, Wolf ZT, et al. ASCVP: Proceedings of the Mapping a chromosomal location for dog erythrocyte antigen 1.1. 49th. In: Annual Meeting American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2014. Atlanta:ASVCP; 2014.

5.2 ARTIGO 2 – Frequência do grupo sanguíneo DEA 1 por imunocromatografia e risco de transfusão incompatível em cães de diferentes raças e mestiços da cidade de Salvador – BA, Brasil

Suzana Claudia Spinola dos Santos¹; Mariane Melo dos Santos²;
³ Wellington Francisco Rodrigues; Roberto Meyer²; Maria de Fátima Dias Costa⁴

¹Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador – BA, Brasil; ²Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Salvador – BA, Brasil; ³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/Biologia Celular, Uberaba – MG, Brasil; ⁴Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Salvador – BA, Brasil

5.2.1 Resumo

O grupo DEA 1 é o mais imunogênico em cães, podendo as transfusões sanguíneas desencadear alguns efeitos indesejáveis nos pacientes veterinários. Estes estão diretamente associados à transfusões incompatíveis. Foram avaliados 203 cães de diversas raças, de ambos os sexos, com idade entre 1 e 8 anos, peso a partir de 28 kg, sem nenhum grau de parentesco originários de Salvador – BA, Brasil, para pesquisa da frequência do tipo sanguíneo DEA 1, por meio de testes de imunocromatografia para tipagem sanguínea. E calculado o risco de transfusão sanguínea incompatível tanto em uma primeira como em uma segunda transfusão. A frequência do grupo DEA 1 variou entre as raças estudadas de 0% a 100%, devido ao fator autossômico dominante desse grupo em cada uma, porém com uma positividade média de 62,07% (126/203). O menor risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo, dentro do grupo dos animais avaliados foi de 0,92% em uma primeira transfusão e o risco do mesmo animal receber sangue incompatível para o grupo DEA 1 na segunda transfusão foi de 0,008%. Quanto ao maior risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo destes animais foi de 69,12% e o risco do mesmo receber sangue incompatível para o DEA 1 foi de 47,77%. Esse risco pode ser anulado se sempre forem realizados os testes para tipagem sanguínea junto com a prova de reação cruzada para compatibilidade.

Palavras-chave: Tipagem sanguínea canina. DEA 1. Risco transfusional. Medicina transfusional veterinária.

5.2.2 Introdução

A transfusão sanguínea é uma forma de transplante, existindo, portanto, riscos associados aos seus procedimentos¹. Uma rigorosa seleção de doadores reduz ao máximo o risco de reações transfusionais.

Atualmente, em Medicina Veterinária, a prática segura das transfusões sanguíneas ganha cada vez mais destaque, estabelecendo-se normas pré-transfusionais de triagem para os animais doadores, o que representa uma tendência de padronização da avaliação pré-transfusional².

Sabe-se que, para uma transfusão de sangue segura, é importante que se faça uso do sangue tipificado e compatível^{3,4}. O reconhecimento dos tipos sanguíneos na imunohematologia em diferentes populações caninas de variadas raças tem sido estabelecido com vistas à manutenção de um arquivo de dados dos doadores⁵.

Transfusões sanguíneas podem desencadear alguns efeitos indesejáveis nos pacientes veterinários, desde febre a reações agudas imunomediadas e outras reações tardias que estão diretamente associadas à transfusões incompatíveis, que podem ser minimizadas pela prática da realização de provas de reação cruzada e de tipagem⁶.

O presente trabalho pesquisou, em Salvador – BA, a frequência do tipo sanguíneo DEA 1, por meio de testes de imunocromatografia para tipagem sanguínea, com amostras de sangue de cães doadores de distintas raças sem nenhum grau de parentesco. E calculou o risco de transfusão sanguínea incompatível tanto em uma primeira como em uma segunda transfusão.

5.2.3 Material e Métodos

Através dos resultados da imunocromatografia foi realizada uma pesquisa de prevalência do tipo sanguíneo canino DEA 1, com os animais tipados sem nenhum grau de parentesco com base nos registros de nascimento, em nosso meio. A imunocromatografia foi a técnica escolhida para o cálculo da prevalência por se tratar de técnica já padronizada, reconhecida e disponível mundialmente, onde foi usado o kit Alvedia[®] (Limonest-França). Foram testados 203 cães de diversas raças, de ambos os sexos, com idade variável de 1 a 8 anos e peso acima de 28 Kg. Dentre as raças estiveram no ato de doação sanguínea: 16 cães da raça Labrador Retriever; 31 cães da raça Golden Retriever; 12 cães da raça Afghan Hound; 14 cães da raça Pastor Belga Malinois; 14 cães da raça Pastor Alemão; 28 cães das

raças Bulldogs (Cães Bulldogs); 40 cães de raças definidas diversas (Raças Definidas Diversas); e 48 cães mestiços. Os quadros 5 e 6 a seguir quantificam respectivamente os animais dos grupos: Cães Bulldogs e cães de Raças Definidas Diversas.

Quadro 5 – Raças e número de animais incluídos no grupo Bulldogs

Bulldog Inglês (10), Old English Bulldog (6), American Bulldog (9), Bulldog Campeiro (3)

Fonte: Autoria própria

Quadro 6 – Raças e número de animais incluídos no grupo Raças Definidas Diversas

Akita (4), American Pitt Bull Terrier (6), American Staffordshire Terrier (7), Boxer (3), Bull Terrier (2), Chow Chow (2), Dobermann (3), Fila Brasileiro (2), Husky Siberiano (2), Kuvasz (1), Rottweiler (5), Samoieda (2), Weimaraner (1)

Fonte: Autoria própria

O risco de transfusão sanguínea incompatível foi determinado através de cálculos relativos ao risco de um animal negativo para o grupo DEA 1 receber sangue de um animal DEA 1 positivo na primeira e na segunda transfusão. As fórmulas usadas para o cálculo do risco após a primeira transfusão e após a segunda transfusão, de acordo com a prevalência encontrada de DEA 1 positivo neste estudo encontram-se nos quadros 7 e 8 segundo Spada et al.⁷.

Quadro 7 – Fórmula para cálculo de risco de sensibilização de cão com sangue não submetido à prova de compatibilidade e tipagem na primeira transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo

$$\frac{(\% \text{ DEA 1 negativo} \times \% \text{ DEA 1 positivo})}{100}$$

Fonte: Spada et al.⁷.

Quadro 8 – Fórmula para cálculo de risco do mesmo cão não submetido à prova de compatibilidade e tipagem desenvolver reação hemolítica aguda com a segunda transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo

$$\frac{(\% \text{ DEA 1 negativo} \times \% \text{ DEA 1 positivo}) \times \% \text{ sensibilização na primeira transfusão}}{10.000}$$

Fonte: Spada et al.⁷.

As frequências do grupo DEA 1 foram comparadas entre as raças, verificando através de teste de qui-quadrado a existência de associação entre as variáveis raça e grupo sanguíneo.

5.2.4 Resultados

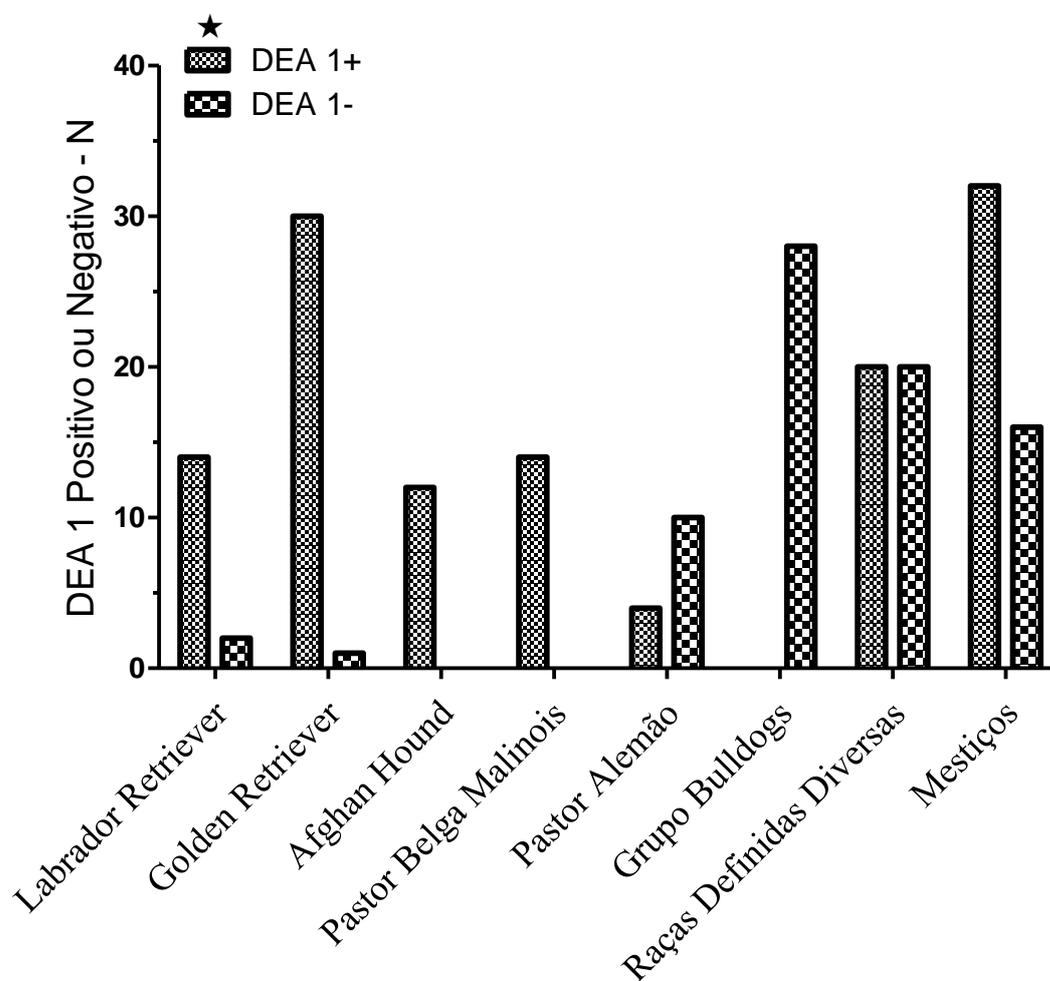
A amostragem deste estudo revelou uma frequência de 62,07% (126/203) do grupo sanguíneo DEA 1. Foi encontrado no grupo de Bulldogs a maior taxa de resultados DEA 1 negativo (28/28; 100%) enquanto que os grupos das raças de Pastor belga de Malinois (14/14; 100%) e Afghan Hound (12/12; 100%), a maior taxa de DEA 1 positivo. A tabela 4 apresenta as frequências nos grupos estudados. E a figura 5 apresenta a comparação entre a positividade e negatividade do grupo DEA 1 entre as raças estudadas.

Tabela 4 – Número total e frequência (%) do grupo sanguíneo DEA 1 dentre as diferentes raças estudadas – Salvador – 2017

Raças	Nº de animais	DEA 1+	%	DEA 1-	%
Labrador Retriever	16	14	87,5%	2	12,50%
Golden Retriever	31	30	96,77%	1	3,23%
Afghan Hound	12	12	100%	0	0%
Pastor Belga Malinois	14	14	100%	0	0%
Pastor Alemão	14	4	28,57%	10	71,43%
Grupo Bulldogs	28	0	0%	28	100%
Raças definidas diversas	40	20	50%	20	50%
Mestiços	48	32	66,67%	16	33,33%
Total	203	126	62,07%	77	37,93%

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 5 - Comparação entre a positividade e negatividade do grupo DEA 1 entre as raças estudadas com dependência estatisticamente positiva (qui-quadrado)



Fonte: Autoria própria

O menor risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo, dentro do grupo dos animais avaliados foi de 0,92% em uma primeira transfusão e o risco do mesmo animal receber sangue incompatível para o grupo DEA 1 na segunda transfusão foi de 0,008%. Quanto ao maior risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo, destes animais foi de 69,12% e o risco do mesmo receber sangue incompatível para o DEA 1 foi de 47,77%. Foram feitas análises de possíveis transfusões que poderiam sensibilizar os cães que apresentaram frequência para o grupo DEA 1 negativo de 33,33% a 71,43% com doadores de mais alta frequência do grupo DEA 1 positivo (Tabela 5). Analisou-se o risco entre os animais de mesma classificação por grupos de raças (Tabela 6 e Tabela 7) e o risco dos animais de maior frequência da presença do grupo DEA 1 de

receberem sangue do grupo DEA 1 positivo por parte dos animais que apresentaram as menores frequências do grupo DEA 1 positivo (Tabela 8).

Tabela 5 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram taxa entre 33,33 e 71,43% de DEA 1- dentre todos estudados: Pastor Alemão (P. A.), Raças Diversas Definidas (R. D. D.) e Mestiços (M.), com doador do grupo das raças de maior taxa de DEA 1+: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.) – Salvador – 2017

	Receptor P.A. -		Receptor R.D.D. -		Receptor M. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador L. +	62,5%	39,06%	43,75%	19,14%	29,16%	8,5%
Doador G.R. +	69,12%	47,77%	48,38%	23,4%	32,25%	10,4%

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 6 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram as menores taxas de DEA 1- dentre todos estudados: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.) – Salvador – 2017

	Receptor L. -		Receptor G.R. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador L. +	10,93%	1,19%	2,82%	0,07%
Doador G.R. +	12,09%	1,46%	3,12%	0,97%

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 7 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram taxa de DEA 1- entre 33,33 e 71,43% dentre todos estudados: Raça Pastor Alemão (P. A.), Raças Diversas Definidas (R. D. D.) e Mestiços (M.), entre eles próprios – Salvador – 2017

	Receptor P.A. -		Receptor R.D.D. -		Receptor M. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador P.A. +	20,4%	4,16%	14,28%	2,03%	9,52%	0,9%
Doador R.D.D. +	35,71%	12,75%	25%	6,25%	16,66%	2,77%
Doador M. +	47,62%	22,67%	16,66%	2,77%	22,22%	4,93%

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 8 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram menores taxas de DEA 1- dentre todos estudados: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.), com os animais com do grupo DEA 1+ entre 28,57 e 66,67%) – Salvador – 2017

	Receptor L. -		Receptor G.R. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador P.A. +	3,57%	0,12%	0,92%	0,008%
Doador R.D.D.+	6,25%	0,39%	1,61%	0,02%
Doador M. +	8,33%	0,69%	2,15%	0,46%

Fonte: Dados da pesquisa

5.2.5 Discussão

A amostragem deste estudo de 203 cães revelou uma frequência de 62,07% (126/203) em um grupo heterogêneo de raças, aproximando-se ao encontrado por Souza et al.⁸ em São Paulo, de 71% com uma amostragem de 300 cães, também composta por raças diversas. O grupo de Bulldogs apresentou a maior taxa de resultados DEA 1 negativo (100%) enquanto que os grupos das raças de Pastor belga de Malinois e Afghan Hound apresentaram a maior taxa de DEA 1 positivo (100%). Esses resultados encontrados estão relacionados ao fator genético de dominância como demonstrou Giger⁴ quando obteve em seus estudos com a raça São Bernardo 100% de positividade e a maioria dos cães da raça Golden Retriever, que também foram DEA 1 positivo, o que decorre de fatores como a área geográfica estudada, onde costuma-se não introduzir indivíduos de áreas distantes para reprodução, e também fatores genéticos de cada raça. Isso deve-se à característica autossômica dominante predominante em cães da mesma raça ou consanguinidade⁹⁻¹¹. A alta incidência de um grupo sanguíneo pode também estar relacionada às raças locais, pois essa influência foi evidente nos estudos realizados na Croácia com a raça Sheepdog Croata com incidência do tipo sanguíneo DEA 1.1 com 90% de positividade¹². E realizados também na Croácia com a raça Dálmata, raça oriunda deste país, evidenciando 95% de positividade¹³. Como também, Riond et al.¹⁴ encontraram na Suíça 100% de positividade do tipo DEA 1.1 nas raças Rottweiler e Boiadeiro Bernês e, 75% em cães da raça Labrador e, 77% em cães da raça Golden Retriever. Já em nosso estudo, as raças Labrador e Golden

Retriever apresentaram uma incidência de DEA 1 de 87,5% e 96,77% respectivamente. Os cães da raça Pastor Alemão apresentaram a incidência mais baixa do grupo DEA 1, logo após o grupo Bulldogs (100% DEA 1 -), que foi de 28,57% assemelhando-se ao encontrado por Riond et al.¹⁴ com DEA 1.1 que foi 25%. Souza et al.⁸ em São Paulo, encontraram em cães da raça Pastor Alemão 32% de positividade para o grupo DEA 1, enquanto que para o tipo DEA 1.1 20%. E Novais, Santana e Vincentin¹⁵ também em São Paulo, encontraram a mais alta frequência do tipo DEA 1.1 nesta raça, que foi de 36,84%. Ainda no cenário nacional Esteves et al.⁵ no Rio Grande do Sul encontrou uma frequência de 10% para o tipo DEA 1.1. Na Polônia, Milkzac et al.¹⁶ encontraram uma frequência do tipo DEA 1.1 de 15%. A frequência nula (0%) do tipo DEA 1.1 em cães da raça Pastor Alemão foi observada em Portugal por Ferreira, Gopegui e Matos¹⁷ e a segunda menor frequência encontrada foi 8% por Carli et al.¹⁸ testando o grupo DEA 1 na Itália, com a maior amostragem de cães dessa raça (65 animais) dentre os estudos já feitos.

Aqui, os grupos Raças definidas diversas e Mestiços apresentaram respectivamente uma frequência de 50% e 66,67%, aproximando-se do resultado médio em nosso meio, da frequência da amostragem total (62,07%). Comparando a outras localidades, as incidências do DEA 1 positivo em grupos raciais diversos, com percentuais próximos, foram encontrados por Carli et al.¹⁸ na Itália com 62%, Esteves et al.⁵ no Rio Grande do Sul - Brasil com 61 %, Costa¹⁹ em Portugal com 55%, Spada et al.²⁰ na Espanha com 54,6% e Riond et al.¹⁴ na Suíça com 53%. O percentual encontrado próximo ao grupo aqui descrito como Mestiços foi de 49% nos cães mestiços pesquisados por Riond et al.¹⁴.

As raças caninas em geral apresentam uma diversidade genética reduzida, devido à intensa consanguinidade para preservar e selecionar as características raciais^{11,24}. A alta frequência do grupo DEA 1 em algumas raças desse estudo pode ser explicada por esse fenômeno. Conhecer as frequências entre as raças de cães doadores de sangue gera uma maior eficiência na seleção dos mesmos, sugerindo uma possível identificação dos doadores DEA 1 negativos, como o que foi encontrado no grupo dos Bulldogs e Pastor Alemão.

Os cães DEA 1 positivo podem receber transfusão do próprio tipo, bem como do negativo. Já os animais DEA 1 negativo ao receberem o sangue DEA 1 positivo serão sensibilizados levando à produção de aloanticorpos. Na Medicina Veterinária, em situações emergenciais, os cães doadores de sangue não são muito numerosos, e é essa escassez de

doadores que leva à transfusões de sangue dos animais disponíveis sem sequer dar a atenção para seu tipo sanguíneo.

Uma transfusão sanguínea de um animal do grupo DEA 1 positivo para um DEA 1 negativo invariavelmente desenvolverá uma forte produção de aloanticorpos. Pois após uma primeira transfusão desta forma, anticorpos se desenvolvem logo após quatro dias, podendo levar a uma reação transfusional tardia. E mais intensamente, esse receptor poderá desenvolver uma reação hemolítica aguda após uma segunda transfusão com sangue DEA 1 positivo^{4,21}.

O risco de transfusão incompatível aqui estudado variou de 0,92% a 69,12% em uma primeira transfusão e, de 0,008% a 47,77% na segunda transfusão do mesmo animal que receber sangue incompatível. Esses achados assemelham-se aos encontrados por Souza et al.⁸ em São Paulo que variou de 0,6% a 66,6% numa primeira transfusão incompatível e de 0,21% a 65,3% deste mesmo animal numa segunda transfusão incompatível. Novais, Santana e Vincentin¹⁵ também em São Paulo encontraram um risco de incompatibilidade na primeira transfusão de 4,4% e na segunda transfusão do mesmo animal 2,2%, porém sem ter sido feito diferenciação entre as raças estudadas. Pesquisas anteriores revelaram um risco transfusional numa primeira e segunda transfusão que diferem dos achados deste estudo. Ekiz et al.²² encontraram risco de sensibilização na primeira transfusão de 20,5% a 25% dentro da mesma raça e numa segunda transfusão um risco de 12,5% a 14,8%. Ferreira, Gopegui e Matos¹⁷ encontraram um risco de sensibilização na primeira transfusão em diversas raças de 24,5%. Dhliwayo et al.²³ estudando a frequência do tipo DEA 1.1 em cães de raças mistas encontrou 78% de positividade e um risco de incompatibilidade entre eles na primeira transfusão de 17,2% e numa segunda transfusão incompatível risco de 2,95%. As variações encontradas neste estudo decorreram do fato de que existiram raças onde prevaleceram o grupo DEA 1 e outras apresentaram menor frequência do mesmo. Os menores índices de risco de incompatibilidade ocorreram nas prospecções de transfusões entre indivíduos da mesma raça, que foram os das raças Golden Retriever e Labrador. Os receptores destas raças aqui estudados foram os menos susceptíveis ao risco de transfusões incompatíveis, tanto numa primeira como numa segunda transfusão, devido ao fato deles serem os representantes da maior frequência do grupo DEA 1 fora das raças que apresentaram 100% de positividade ao grupo DEA 1. A variação quando eles eram receptores de doadores da mesma raça deles foi de 2,82 a 12,09 na primeira transfusão e de 0,07% a 1,46% na segunda transfusão. E se fossem receptores de cães que variaram a

frequência do grupo DEA 1 de 28,57% a 66,67% (Pastor Alemão, Raças Definidas Diversas e Mestiços) o risco transfusional numa primeira transfusão variou de 0,92% a 8,33% e numa segunda transfusão variou de 0,008% a 0,69%. E, as maiores taxas de risco de transfusões incompatíveis entre os animais aqui estudados foram dos que variaram a frequência do grupo DEA 1 de 28,57% a 66,67% (Pastor Alemão, Raças Definidas Diversas e Mestiços), se recebessem transfusão dos animais das raças Golden Retriever e Labrador, de 29,16% a 69,12% numa primeira transfusão e de 8,5% a 47,77% numa segunda transfusão. Para as raças Afghan Hound e Pastor Belga de Malinois não foram feitas prospecções de risco transfusional por estarem com 100% de positividade, o que geraria sensibilização já conhecida em indivíduos DEA 1 negativos e nenhum risco em transfusões entre eles pelo grupo DEA 1. O mesmo foi decidido para os animais 100% negativos, onde não geraria nenhum risco transfusional para indivíduos do grupo DEA 1 negativo ou positivo. Mesa-Sanchez, Gopegui-Fernandez, Granados-Machuca²⁴ estudando a prevalência do tipo DEA 1.1 em cães da raça Greyhound, na Espanha, encontraram um risco potencial de sensibilização dentro da mesma raça de 22,9% após a primeira transfusão sanguínea quando não tipados nem feita a prova de reação cruzada. De seus 206 cães estudados 53,4% foram positivos ao tipo DEA 1.1 e destes 51,7% eram da raça Greyhound, pois há uma tendência em bancos de sangue veterinários de países em que sua criação é fomentada, em utilizar essa raça como potencialmente doadora de sangue. Spada et al.²⁰ ao estudarem 205 cães desta raça encontraram 54,6% de positividade para o grupo DEA 1. A divergência genética nos ancestrais dessa raça e os diferentes graus de consanguinidade entre as diversas regiões geográficas podem explicar as diferenças encontradas na prevalência do tipo DEA 1.1, onde há predomínio desses animais serem DEA 1.1 negativos²⁴. Já em nosso estudo, risco transfusional próximo foi encontrado nos grupos Raças Diversas Definidas (66,67%) e Mestiços (50%), sendo que em nosso estudo não houve nenhum cão dessa raça. Segundo Giger⁴ a tipagem para o grupo DEA 1 e demais tipos sanguíneos não elimina a necessidade de ser feita a prova de reação cruzada antes da primeira transfusão, pois ela pode identificar incompatibilidades contra alguns tipos sanguíneos desconhecidos ainda hoje e, além das reações transfusionais mais raras serem as contra os tipos sanguíneos DEA 4 e Dal, pode-se ter um outro tipo clinicamente importante a ser descoberto no futuro. Os resultados dos artigos aqui citados, juntamente com os achados do presente estudo, reforçam a necessidade de se selecionar os doadores de sangue canino para o grupo DEA 1 positivo e negativo, bem como a prova de reação

cruzada antes de qualquer transfusão sanguínea como prática clínica e laboratorial para que a terapia transfusional seja segura para o receptor, especialmente para os cães que receberão mais de uma transfusão sanguínea.

5.2.6 Conclusões

A frequência do grupo DEA 1 variou entre as raças estudadas de 0% a 100%, devido ao fator autossômico dominante desse grupo em cada uma, porém com uma positividade média de 62,07%;

O risco de transfusões sanguíneas incompatíveis, com base na frequência do grupo DEA 1, varia de acordo com as raças dos doadores e receptores, porém este pode ser anulado se forem realizados os testes para tipagem sanguínea junto com a prova de reação cruzada para compatibilidade.

5.2.7 Referências

1. Lemos DAS, Novais AA, Nogueira AFS. Avaliação laboratorial de cães após transfusão de sangue total. *Vet e Zoot.* 2010; 17(supl. 1): 67.
2. Tocci LJ, Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: na overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg and Critical Care.* 2009; 19: 66-73.
3. Dodds WJ. Practical Veterinary Transfusion Medicine. In: *Anais do World Congress of the World Small Animal Animal Veterinary Association*; 2005. Mexico; 2005. p. 1-4.
4. Giger U. Blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility. In: Bonagura JD, Twedt DC, (eds.) *Kirk's Current Veterinary Therapy XV.* Philadelphia, United States: Saunders, Elsevier Inc; 2014: p. 143-8.
5. Esteves VS, Lacerda LA, Lasta CS, Pedralli V, González FHD. Frequencies of DEA blood types in a purebreed canine blood donor population in Porto Alegre, R.S., Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2011 Fev; 31(2): 178-81.
6. Vap LM. An update on blood typing, crossmatching, and doing no harm in transfusion dogs and cats. *Vet. Med.* 2010; 1: 447-53.
7. Spada E, Proverbio D, Florez LMV, Serna BSG, Chamizo MRP, Baggiani L, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4 and 7 in Podenco Ibicenco (Ibizan Hounds) from Ibiza Island. *Vet Med Internat.* 2017; 2016: 1-5.
8. Souza SL, Stopigli AJ, Gomes SGR, Ulata SK, Moroz LR, Fantoni DT. Estudo da frequência dos antígenos eritrocitários caninos 1, 1.1 e 7 e risco de transfusão incompatível em cães de diferentes raças e mestiços da região metropolitana da cidade de São Paulo-SP, Brasil. *Braz J V Res Anim Sci.* 2014; 51(4): 316-23.
9. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev.* 2004 Apr 2; 18: 117-26.
10. Iazbik MC, O'donnell M, Marin L, Zaldivar S, Hudson D, Couto CG. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing greyhounds. *Vet Clin Pathol.* 2010; 39(4): 433-5.
11. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analysed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med.* 2014; 28(2): 592-8.
12. Zubcic D, Bedrica L, Gracner D, Harapin I, Fury M, Jeremic J. Blood groups, haematology and clinicochemical indicators in indigenous breeds of dog. I. Croatian sheepdog. *Veterinarski Arhiv.* 2008; 78(2): 141-7.
13. Gracner D, Bedrica L, Potocnjak D, Sakar D, Samardzija M, Capak H, et al. Blood groups and haematology indicators in Croatian indigenous breeds of dog. II Dalmatian dog. *Veterinarski Arhiv.* 2011; 81(1): 111-7.

14. Riond B, Schuler E, Rogg E, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in dogs in Switzerland evaluated with the gel column technique. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2011; 153(8): 369-74.
15. Novais AA, Santana AE, Vincentin LA. Prevalência do grupo sanguíneo AEC 1 (subgrupos 1.1 e 1.2) em cães (*canis familiaris*, Linnaeus, 1758) criados no Brasil. *Braz Vet J Anim Sci.* 1999; 36(1): 1-8.
16. Milczak A, Abramowicz B, Madany J, Winiarczyk D, Wrzesniewska K, Bochynska D, et al. Frequency of DEA 1.1 antigen in German shepherds. *Scient Messen of Lviv Nation Univ Vet Med Biotechnol.* 2016; 18(3): 221-4.
17. Ferreira RRF, Gopegui RR, Matos AJF. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(2): 198-200.
18. Carli E, Carminato A, Ravagnan S, Capello K, Antognoni MT, Miglio A, et al. Frequency of DEA 1 antigen in 1037 mongrel and purebred dogs in Italy. *BMC Vet Res.* 2017; 13(364): 1-6.
19. Costa MAMM. Aplicação da citometria de fluxo em Medicina Transfusional de canídeos [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa; 2014.
20. Spada E, Proverbio D, Florez LMV, Chamizo MRP, Perego R, De Giorgi GB, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4 and 7 in galgos (Spanish Greyhounds). *J Vet Diag Invest.* 2015; 27(4): 558-61.
21. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Anim J Vet Res.* 2005; 66(8): 1386-92.
22. Ekiz EE, Arslan M, Ozcan M, Gultekin GI, Gulay OY, Kirmizibayrak T, et al. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 in 4 breeds native to different areas in Turkey. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(4): 518-23.
23. Dhliwayo S, Makonese TA, Whittall B, Chikerema SM, Pfukenyl DM, Tivapasi MT. A study on the prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 and detection of canine Babesia by polymerase chain reaction from apparently healthy dogs in a selected rural community in Zimbabwe. *J South African Vet Assoc.* 2016; 87(1):1-5.
24. Mesa-Sanchez I, Gopegui -Fernandez RR, Granados-Machuca MM. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish Greyhounds). *Vet Record.* 2014; 10: 1-3.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi utilizada a técnica da citometria de fluxo para detectar o tipo sanguíneo de cães DEA 1. E com isso confrontou-se os resultados encontrados com aqueles obtidos nas técnicas de imunocromatografia e da hemaglutinação. Na medicina transfusional veterinária ainda não é estabelecida a técnica padrão-ouro para tipagem sanguínea e busca-se contribuir para este fim.

Os resultados obtidos neste estudo, da análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação, se assemelharam aos encontrados por Acierno, Raj e Giger²⁰ quando tipificaram sessenta e seis cães pela imunocromatografia e citometria de fluxo, onde os resultados DEA 1 na imunocromatografia eram positivos também para DEA 1 na citometria de fluxo. Os mesmos utilizaram anticorpo monoclonal murino anti-DEA 1 como anticorpo primário, conjugando ao anticorpo secundário anti-murino policlonal de origem caprina. A diferença é que no presente estudo utilizou-se como anticorpo primário anti-DEA 1, anticorpo policlonal oriundo de cães aloimunizados pós-transfusão sanguínea com sangue do grupo DEA 1 positivo e como anticorpo secundário, policlonal ovino anti-canino, que era o disponível comercialmente, com igualdade funcional.

A tipagem sanguínea de cães, em geral, baseia-se na identificação sorológica por reações de aglutinação. Originalmente, o soro de cães sensibilizados vem sendo utilizado para a tipagem, através dos aloanticorpos polivalentes, que variam entre os grupos de animais devido à cada intensidade de antigênicidade individual dos mesmos^{27,69}. Bioquimicamente pouco se sabe acerca desse grupo e suas correlações moleculares com os grupos sanguíneos de humanos ou de outras espécies. Assim sendo, um ensaio utilizando anticorpos monoclonais alelo-específicos oriundos de sensibilização por aloantígenos caninos eritrocitários pode significar uma imensa fonte de resultados desejáveis para a medicina transfusional e se tornar possível a comparação bioquímica entre os aloantígenos. No entanto ainda é feito o reconhecimento do grupo sanguíneo DEA 1 através de anticorpos policlonais obtidos por aloimunização canina^{18,27}. O antissoro aqui utilizado como anticorpo primário na citometria de fluxo o qual apresentou alta concentração, foi de natureza policlonal, para ligar-se aos antígenos DEA 1 na prova de reação cruzada lenta em tubos cujo princípio é a hemaglutinação, o que permitiu gerar reação antígeno-

anticorpo sem utilização do reagente da anti-globulina canina de Coombs e assim, se obter uma melhor visualização da aglutinação. Blais et al.¹⁸ e Giger⁸ relataram que inicialmente o soro de cães sensibilizados era utilizado para tipagem, sabendo-se que tratava-se de soro policlonal, podendo haver variação entre os indivíduos, e requerer o reagente de Coombs para melhor visualização da aglutinação, mas nem sempre gerando uma ótima avaliação. Neste estudo não se observou, em nenhuma amostra, o escore de 4 cruces em aglutinação, mas, apenas a variação de 1 a 3 cruces, pois, neste método, os anticorpos produzidos apresentam fraca reação por não utilizar o reagente de Coombs. Dallabona, Kataoka e Novais⁶⁹ realizando estudos de provas de reação cruzada em 93 cães de variadas raças e sem raças definidas em Mato Grosso, em três temperaturas (30°C, 37°C e 4°C) também apenas encontrou escores de aglutinação de 1 a 3 cruces. Hara et al.⁵⁶ atestaram a especificidade dos anticorpos monoclonais, quando estudavam anticorpos contrários ao tipo DEA 3 confirmando, por aglutinação cruzada, usando eritrócitos positivos e negativos. No entanto, encontraram títulos muito baixos de 1:4 a 1:8 e com a reação desaparecendo muito rapidamente. No presente estudo a titulação máxima possível do antissoro policlonal para evidenciação de aglutinação foi 1:2 sem auxílio do reagente Coombs, igualmente como Hara et al.⁵⁶ o fizeram.

Os testes de imunocromatografia apresentaram resultados de ligações variáveis de fortes a fracas, o que é esperado nesta técnica, no entanto foi preferível não categorizar as reações em forte, moderada e fraca, por tratar-se de um teste onde a marcação de intensidade de positividade é visual, o que leva à subjetividade de interpretação. Diferentemente do método de imunocromatografia usado por Acierno, Raj e Giger²⁰, que foi possível quantificar um escore de intensidade de 0 a 4 cruces (0+, 1+, 2+, 3+, 4+) por meio de leitura das tiras do teste em densitômetro, onde 0+ e 1+ eram resultados negativos e os seguintes positivos aumentando por intensidade antigênica.

Segundo Giger⁸ o sistema DEA 1 representa uma exceção dentre os demais sistemas que se apresentam em positivo e negativo, como os DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 7 e Dal, sendo subdividido em DEA 1.1 (A1) e DEA 1.2 (A2) que são aparentemente alélicos, e um outro alelo que seria o DEA 1.3 (A3). No entanto estudos recentes indicaram que o grupo DEA 1 é mais adequado ser caracterizado como tipo negativo, fraco positivo, moderado positivo e forte positivo, do que ser subdividido em dois ou três subtipos^{30,31}. O que foi possível observar nos resultados encontrados nas comparações dos escores de 1+, 2+ e 3+ das hemaglutinações e as médias de fluorescências demonstradas na tabela 3.

Ao serem realizadas as análises de citometria de fluxo foi encontrada uma variação de reações de ligações, o que é revelado pelas médias de fluorescências, e quando foram comparadas aos resultados encontrados na hemaglutinação, que seguiu a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, foi possível fazer uma categorização em grupos de resultados de escore 1+, 2+ e 3+ que foram encontrados, correlacionando-os como ilustra a tabela 3. Acierno, Raj e Giger²⁰ preconizaram através dos resultados obtidos em seus estudos com a técnica da citometria de fluxo para o diagnóstico do grupo sanguíneo DEA 1, que é mais adequado que seja utilizado um esquema de tipagem em DEA 1 positivo e DEA 1 negativo, com a detecção de sua expressão antigênica em fraca, moderada e forte, com isso eliminando a padronização previamente definida dos tipos sanguíneos DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 1.3.

Polak et al.²⁹ avaliando o grupo sanguíneo DEA 1 tipificando 53 cães DEA 1 positivo, os subdividiram em DEA 1 positivo fraco, DEA 1 positivo moderado e DEA 1 positivo forte. Tornando consistente a informação de que esse modelo é dependente de uma dominância autossômica com 4 a 5 alelos: DEA 1 negativo (0), DEA 1 positivo fraco (1+), DEA 1 positivo moderado (2+) e DEA 1 positivo forte (3+ e 4+), comparando os achados das intensidades de reação de tiras cromatográficas aos valores médios de fluorescência, pela técnica de tipagem pela citometria de fluxo, que trata-se de técnica quantitativa. Euler et al.³⁰ também encontraram uma forte correlação entre os resultados semiquantitativos visual e densitométrico dos graus de positividade do grupo DEA 1 em fraco, moderado e forte.

Lucidi et al.⁶⁰ tipificando amostras de sangue pela citometria de fluxo com anticorpo anti-DEA 1.1 monoclonal em 62 cães DEA 1.1 negativos pela técnica de tipagem em tubo, encontraram intensidades médias de fluorescência (IMF) menores que 25 (média=16 e mediana=15) e, em 110 cães DEA 1.1 positivos também pela tipagem em tubo, encontraram intensidades médias de fluorescência maiores que 73 (média=407 e mediana=391). Goy-Thollot et al.³⁶ tipificando animais DEA 1 com antissoro monoclonal, encontraram uma expressão antigênica que designaram de DEA 1 negativo o que apresentava uma intensidade média de fluorescência menor que 10 ($IMF < 10$), em fraco positivo de $10 \leq IMF < 100$, moderado positivo de $100 \leq IMF < 300$ e em forte positivo com $IMF \geq 300$. No presente estudo os 30 animais negativos pela imunocromatografia e aglutinação apresentaram na citometria de fluxo com anticorpo anti-DEA 1 policlonal, médias de fluorescências menores que 71,46 (média=26,126 e mediana=19,055) e os 39

animais positivos também pelas mesmas duas técnicas apresentaram na citometria de fluxo média de fluorescências maiores que 77,65 (média=427,5492 e mediana=240,21). Ao serem comparadas as amostras de sangue tipadas pela imunocromatografia com as mesmas tipadas pela citometria de fluxo, utilizando o anticorpo primário anti-DEA 1 obtido por sensibilização pós-transfusional, encontrou-se uma correlação direta positiva, pois todos apresentaram resultados positivos. De forma semelhante, Euler et al.³⁰ tipificando amostras de sangue de cães com anticorpo monoclonal pelas técnicas de coluna gel, citometria de fluxo e imunocromatografia também obtiveram resultados de correlação direta positiva. Isso leva à conclusão que esse antissoro apresentava anticorpos em alta concentração específicos para o grupo DEA 1. Comparando, Polak et al.²⁹ realizaram a retipagem de animais considerados DEA 1.1 negativos, DEA 1.1 positivos e DEA 1.2 positivos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais paralelamente para determinar sua correlação e encontraram nos animais DEA 1.1 positivos uma reação forte quando utilizaram antissoro para tipificar DEA 1. No mesmo estudo, as amostras DEA 1.1 negativas testadas pelo anticorpo anti-DEA 1 monoclonal continuaram apresentando resultado negativo, porém quando testados com anticorpos policlonais foram encontrados DEA 1.1 positivos fraco a moderado. Surpreendentemente seis amostras antes tipadas como DEA 1.2 positivo apresentaram discordância de resultado, tendo reações de variações moderadas tanto com os reagentes monoclonais como com os policlonais, encontrando nestas amostras resultados de DEA 1 positivo moderado a forte e DEA 1 negativo.

Lee, Giger e Kim³¹ em estudo comparativo com os tipos de sangue Kai 1 e Kai 2 argumentaram que o grupo sanguíneo DEA 1 é composto por uma variação de tipos DEA 1 e não dividido em DEA 1.1 e DEA 1.2, visto que em seus ensaios de imunocromatografia e *immunoblotting* identificaram através do anticorpo monoclonal anti-Kai 1 que esse antígeno é uma proteína de 200 kDa e 50 kDa, enquanto que o anticorpo monoclonal anti-Kai 2 identificou que esse antígeno é uma proteína de 80 kDa. Essas mesmas proteínas de 200/50 kDa e 80 kDa dos tipos Kai 1 e Kai 2 respectivamente assemelham-se aos estudos anteriores para os tipos DEA 1.1 e DEA 1.2 onde Corato et al.²⁸ nos primeiros ensaios de *immunoblotting* visualizaram a corrida de 200/50 kDa no DEA 1.1 e 85 kDa no DEA 1.2. Para Polak et al.²⁹ é incomum que tenham-se duas proteínas diferentes para os tipos DEA 1.1 e DEA 1.2 como partes do mesmo sistema de grupo sanguíneo, pois ao utilizarem anticorpos monoclonais anti-DEA 1 não confirmaram

esses estudos prévios para essas duas proteínas. E simultaneamente, através de suas pesquisas pela citometria de fluxo demonstraram que o DEA 1.1 e o DEA 1.2 são o mesmo antígeno e não estando correlacionados a variações de expressão do grupo. É um antígeno DEA 1 positivo, como também foi encontrado neste estudo, com variações de intensidade fraca, moderada e intensa. Safra et al.⁷⁰, em estudos preliminares do genoma canino, encontraram apenas um nucleotídeo de polimorfismo para o DEA 1 na região do cromossomo CFA27, o que sugere um único tipo sanguíneo. Lee, Giger e Kim³¹, baseando-se nos achados da técnica por *immunoblotting* e reações com vários anticorpos monoclonais e policlonais, sugerem que os tipos sanguíneos Kai 1 e Kai 2 correspondam às proteínas originalmente descritas como DEA 1.1 e DEA 1.2 e o atual anticorpo monoclonal anti-DEA 1 reconheça um antígeno eritrocitário único, como foi observado várias intensidades de antigênicidade neste estudo. A técnica da citometria de fluxo é capaz de detectar concentrações de antígeno na superfície de eritrócitos que são insuficientes para identificação de resultados positivos pela aglutinação em tubo, ou seja tipificações em tubo por aglutinação estão mais sujeitas a erros devido à natureza subjetiva da interpretação da aglutinação e a citometria de fluxo é uma técnica de acurácia com diferenciação clara entre resultado positivo e negativo e reprodutível⁶¹.

A amostragem deste estudo revelou uma frequência de 62,07% (126/203) em um grupo heterogêneo de raças, aproximando-se ao encontrado por Souza et al.³⁸ em São Paulo, de 71% com uma amostragem de 300 cães, também composta por raças diversas. O grupo de Bulldogs apresentou a maior taxa de resultados DEA 1 negativo (28/28;100%) enquanto que os grupos das raças de Pastor belga de Malinois (14/14;100%) e Afghan Hound (12/12;100%) apresentaram a maior taxa de DEA 1 positivo. Esses resultados encontrados estão relacionados ao fator genético de dominância como demonstrou Giger⁸ quando obteve em seus estudos com a raça São Bernardo 100% de positividade e a maioria dos cães da raça Golden Retriever, que também foram DEA 1 positivo, o que decorre de fatores como a área geográfica estudada, onde costuma-se não introduzir indivíduos de áreas distantes para reprodução e também fatores genéticos de cada raça. Isso deve-se à característica autossômica dominante predominante em cães da mesma raça ou consanguinidade^{1,20,24}. A alta incidência de um grupo sanguíneo pode também estar relacionada às raças locais, pois essa influência foi evidente nos estudos realizados na Croácia com a raça Sheepdog Croata com incidência do tipo sanguíneo DEA 1.1 com 90% de positividade⁴⁵. E realizados também na Croácia com a raça Dálmata, raça oriunda deste

país, evidenciando 95% de positividade³⁷. Como também, Riond et al.⁴⁸ encontraram na Suíça 100% de positividade do tipo DEA 1.1 nas raças Rottweiler e Boiadeiro Bernês e, 75% em cães da raça Labrador e, 77% em cães da raça Golden Retriever. Já em nosso estudo, as raças Labrador e Golden Retriever apresentaram uma incidência de DEA 1 de 87,5% e 96,77% respectivamente. Os cães da raça Pastor Alemão apresentaram a incidência mais baixa do grupo DEA 1, após o grupo Bulldogs (100% DEA 1 -), que foi de 28,57% assemelhando-se ao encontrado por Riond et al.⁴⁸ com DEA 1.1 que foi 25%. Souza et al.³⁸ em São Paulo encontraram em cães da raça Pastor Alemão 32% de positividade para o grupo DEA 1, enquanto que para o tipo DEA 1.1 20%. E Novais, Santana e Vincentin¹⁷ também em São Paulo, encontraram a mais alta frequência do tipo DEA 1.1 nesta raça, que foi de 36,84%. Ainda no cenário nacional Esteves et al.⁹ no Rio Grande do Sul encontrou uma frequência de 10% para o tipo DEA 1.1. Na Polônia, Milkzacz et al.⁵³ encontraram uma frequência do tipo DEA 1.1 de 15%. A frequência nula (0%) do tipo DEA 1.1 em cães da raça Pastor Alemão foi observada em Portugal por Ferreira, Gopegui e Matos³² e a segunda menor frequência encontrada foi 8% por Carli et al.⁵⁵ testando o grupo DEA 1 na Itália, com a maior amostragem de cães dessa raça (65 animais) dentre os estudos já feitos.

Aqui, os grupos Raças definidas diversas e mestiços apresentaram respectivamente uma frequência de 50% e 66,67%, aproximando-se do resultado em nosso meio, da frequência da amostragem total (62,07%) e o encontrado por Santos¹² ao tipificar DEA 1.1 (60%) também na amostragem completa. Comparando a outras localidades, as incidências do DEA 1 positivo em grupos raciais diversos, com percentuais próximos, foram encontrados por Carli et al.⁵⁵ na Itália com 62%, Esteves et al.⁹ no Rio Grande do Sul - Brasil com 61 %, Costa⁴⁷ em Portugal com 55%, Spada et al.⁵¹ na Espanha com 54,6% e Riond et al.⁴⁸ na Suíça com 53%. O percentual encontrado mais próximo ao grupo aqui descrito como mestiços, foi de 49% nos cães mestiços pesquisados por Riond et al.⁴⁸.

As raças caninas em geral apresentam uma diversidade genética reduzida, devido à intensa consanguinidade para preservar e selecionar as características raciais^{20,25}. A alta frequência do grupo DEA 1 em algumas raças desse estudo pode ser explicada por esse fenômeno. Conhecer as frequências entre as raças de cães doadores de sangue gera uma maior eficiência na seleção dos mesmos, sugerindo uma possível identificação dos doadores DEA 1 negativos, como o que foi encontrado no grupo dos Bulldogs e Pastor Alemão.

Os cães DEA 1 positivo podem receber transfusão do próprio tipo, bem como do negativo. Já os animais DEA 1 negativo ao receberem o sangue DEA 1 positivo serão sensibilizados levando à produção de aloanticorpos. Na Medicina Veterinária, em situações emergenciais, os cães doadores de sangue não são muito numerosos, e é essa escassez de doadores que leva à transfusões de sangue dos animais disponíveis sem sequer dar a atenção para seu tipo sanguíneo.

Uma transfusão sanguínea de um animal do grupo DEA 1 positivo para um DEA 1 negativo invariavelmente desenvolverá uma forte produção de aloanticorpos. Pois após uma primeira transfusão desta forma, anticorpos se desenvolvem logo após quatro dias, podendo levar a uma reação transfusional tardia. E mais intensamente, esse receptor poderá desenvolver uma reação hemolítica aguda após uma segunda transfusão com sangue DEA 1 positivo^{8,68}.

A pesquisa de um escore da antigênicidade do tipo DEA 1 nesses animais teve relevância, pois os animais uma vez sensibilizados em uma primeira transfusão podem apresentar sua produção de aloanticorpos com intensidade correlacionada à intensidade antigênica do tipo DEA 1. Pois quanto mais intenso for o grau de positividade do tipo DEA 1, maior será o potencial de sensibilização em um receptor de sangue DEA 1 negativo. Já que estudos apontam uma frequência média de 28,49% de reações pós-transfusionais mesmo em transfusões feitas após prova de compatibilidade^{72,73}. Dentro da prática clínica transfusional é bem definido que o antígeno DEA 1 positivo sensibiliza o receptor DEA 1 negativo, no entanto ainda não se esclareceu o quanto de aloanticorpos que um receptor DEA 1 fraco ou moderado positivo pode produzir ao receber o antígeno DEA 1 forte positivo.

O risco de transfusão incompatível aqui estudado variou de 0,92% a 69,12% em uma primeira transfusão e, de 0,008% a 47,77% na segunda transfusão do mesmo animal que receber sangue incompatível. Esses achados assemelham-se aos encontrados por Souza et al.³⁸ em São Paulo que variou de 0,6% a 66,6% numa primeira transfusão incompatível e de 0,21% a 65,3% deste mesmo animal numa segunda transfusão incompatível. Novais, Santana, Vincentin¹⁷ também em São Paulo encontraram um risco de incompatibilidade na primeira transfusão de 4,4% e na segunda transfusão do mesmo animal 2,2%, porém sem ter sido feito diferenciação entre as raças estudadas. Pesquisas anteriores revelaram um risco transfusional numa primeira e segunda transfusão que diferem dos achados deste estudo. Ekiz et al.⁷³ encontraram risco de sensibilização na primeira transfusão de 20,5% a

25% dentro da mesma raça e numa segunda transfusão um risco de 12,5% a 14,8%. Ferreira, Gopegui e Matos³² encontraram um risco de sensibilização na primeira transfusão em diversas raças de 24,5%. Dhliwayo et al.⁵⁴ estudando a frequência do tipo DEA 1.1 em cães de raças mistas encontrou 78% de positividade e um risco de incompatibilidade entre eles na primeira transfusão de 17,2% e numa segunda transfusão incompatível risco de 2,95%. As variações encontradas neste estudo decorreram do fato de que existiram raças onde prevaleceram o grupo DEA 1 e outras apresentaram menor frequência do mesmo. Os menores índices de risco de incompatibilidade ocorreram nas prospecções de transfusões entre indivíduos da mesma raça, que foram os das raças Golden Retriever e Labrador. Os receptores destas raças aqui estudados foram os menos susceptíveis ao risco de transfusões incompatíveis, tanto numa primeira como numa segunda transfusão, devido ao fato deles serem os representantes da maior frequência do grupo DEA 1 fora das raças que apresentaram 100% de positividade ao grupo DEA 1. A variação quando eles eram receptores de doadores da mesma raça deles foi de 2,82 a 12,09 na primeira transfusão e de 0,07% a 1,46% na segunda transfusão. E se fossem receptores de cães que variaram a frequência do grupo DEA 1 de 28,57% a 66,67% (Pastor Alemão, Raças Definidas Diversas e Mestiços) o risco transfusional numa primeira transfusão variou de 0,92% a 8,33% e numa segunda transfusão variou de 0,008% a 0,69%. E, as maiores taxas de risco de transfusões incompatíveis entre os animais aqui estudados foram dos que variaram a frequência do grupo DEA 1 de 28,57% a 66,67% (Pastor Alemão, Raças Definidas Diversas e Mestiços), se recebessem transfusão dos animais das raças Golden Retriever e Labrador, de 29,16% a 69,12% numa primeira transfusão e de 8,5% a 47,77% numa segunda transfusão. Para as raças Afghan Hound e Pastor Belga de Malinois não foram feitas prospecções de risco transfusional por estarem com 100% de positividade, o que geraria sensibilização já conhecida em indivíduos DEA 1 negativos e nenhum risco em transfusões entre eles pelo grupo DEA 1. O mesmo foi decidido para os animais 100% negativos, onde não geraria nenhum risco transfusional para indivíduos do grupo DEA 1 negativo ou positivo. Mesa-Sanchez, Gopegui-Fernandez, Granados-Machuca²⁵ estudando a prevalência do tipo DEA 1.1 em cães da raça Greyhound, na Espanha, encontraram um risco potencial de sensibilização dentro da mesma raça de 22,9% após a primeira transfusão sanguínea quando não tipados nem feita a prova de reação cruzada. De seus 206 cães estudados 53,4% foram positivos ao tipo DEA 1.1 e destes 51,7% eram da raça Greyhound, pois há uma tendência em bancos de sangue veterinários de países em que sua

criação é fomentada, em utilizar essa raça como potencialmente doadora de sangue. Spada et al.⁵¹ ao estudarem 205 cães desta raça encontraram 54,6% de positividade para o grupo DEA 1. A divergência genética nos ancestrais dessa raça e os diferentes graus de consanguinidade entre as diversas regiões geográficas podem explicar as diferenças encontradas na prevalência do tipo DEA 1.1, onde há predomínio desses animais serem DEA 1.1 negativos²⁵. Já em nosso estudo, risco transfusional próximo foi encontrado nos grupos Raças Diversas Definidas (66,67%) e Mestiços (50%), sendo que em nosso estudo não houve nenhum cão dessa raça. Segundo Giger⁸ a tipagem para o grupo DEA 1 e demais tipos sanguíneos não elimina a necessidade de ser feita a prova de reação cruzada antes da primeira transfusão, pois ela pode identificar incompatibilidades contra alguns tipos sanguíneos desconhecidos ainda hoje e além das reações transfusionais mais raras serem as contra os tipos sanguíneos DEA 4 e Dal, pode-se ter um outro tipo clinicamente importante a ser descoberto no futuro. Os resultados dos estudos aqui citados, juntamente com os achados do presente estudo reforçam a necessidade de seleção dos doadores de sangue canino para o grupo DEA 1 positivo e negativo, bem como a prova de reação cruzada antes de qualquer transfusão sanguínea como prática clínica e laboratorial para que a terapia transfusional seja segura para o receptor, especialmente para os cães que receberão mais de uma transfusão sanguínea.

7 CONCLUSÕES

A citometria de fluxo, com uso de anticorpo policlonal, para a tipagem sanguínea do grupo DEA 1 é uma técnica precisa e de acurácia, com diferenciação clara entre os resultados positivo e negativo;

Dentre os indivíduos positivos para o grupo DEA 1, tipados pela citometria de fluxo, existem intensidades médias de fluorescência que são indicadoras de antigênicidade fraca, moderada e forte, podendo-se dividir o grupo DEA 1 em positivo fraco, positivo moderado e positivo forte;

As técnicas de tipagem sanguínea para o grupo DEA 1 por citometria de fluxo, aglutinação e imunocromatografia têm correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$);

A frequência do grupo DEA 1 variou entre as raças estudadas de 0% a 100%, devido ao fator autossômico dominante desse grupo em cada uma, porém com uma positividade média de 62,07%;

O risco de transfusões sanguíneas incompatíveis, com base na frequência do grupo DEA 1, varia de acordo com as raças dos doadores e receptores, porém este pode ser anulado se forem realizados os testes para tipagem sanguínea junto com a prova de reação cruzada para compatibilidade.

REFERÊNCIAS GERAIS

1. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev.* 2004 Apr 2; 18:117-26.
2. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Presença de animais no domicílio [Internet]. 2013 [acesso em 2014 jan 10]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>.
3. Reichmann P, Dearo ACO. Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais. *Ci Agr.* 2001; 22 (2): 223-8.
4. Bochio MN, Morikawa MK, Pincelli VA, Silva PFN, Balarin MRS, Pereira PM. Avaliação do volume globular antes e após a transfusão sanguínea: estudo retrospectivo. *Clín Vet.* 2010 Mai-Jun; XV(86): 68-70.
5. Lemos DAS, Novais AA, Nogueira AFS. Avaliação laboratorial de cães após transfusão de sangue total. *Vet e Zoot.* 2010; 17(supl. 1): 67.
6. Tocci LJ, Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg and Critical Care.* 2009; 19: 66-73.
7. Dodds WJ. Practical Veterinary Transfusion Medicine. In: *Anais do World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 2005; Mexico: World Small Animal Veterinary Association; 2005.* p. 1-4.
8. Giger U. Blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility. In: Bonagura JD, Twedt DC, (eds.) *Kirk's Current Veterinary Therapy XV.* Philadelphia, United States: Saunders, Elsevier Inc; 2014: p. 143-8.
9. Esteves VS, Lacerda LA, Lasta CS, Pedralli V, González, FHD. Frequencies of DEA blood types in a purebred canine blood donor population in Porto Alegre, R.S., Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2011 Fev; 31 (2): 178-81.
10. Santos SCS, Costa MFD, Meyer R. Variação de parâmetros hematológicos de cães doadores regulares de sangue. *Rev Ci Méd Biol.* 2013; 12: 475-7.
11. Santos SCS, Moroz LR. Variação de parâmetros hematológicos de cães doadores de sangue mensais no período de 12 meses. In: *Anais do Congresso Paulista das Especialidades, 2012.* São Paulo; 2012.
12. Santos SCS. Avaliação de parâmetros hematológicos e cinética da produção de anticorpos anti-DEA 1.1 em cães pós-transfundidos [dissertação]. Salvador: Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; 2014.
13. Vap LM. An update on blood typing, crossmatching, and doing no harm in transfusion dogs and cats. *Vet. Med.* 2010; 1: 447-53.

14. Swisher SL, Young NL. The blood system of dogs. *Physiol Rev.* 1961; 41: 495-520.
15. Lacerda LA. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: Anais do 2º Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 2005. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2005. p. 62-81.
16. Blais MC, Berman L, Oakley DA, Giger U. Lack of evidence of pregnancy - induced alloantibodies in dogs. *J. Vet Intern Med.* 2009; 23: 462-5.
17. Novais AA, Santana AE, Vincentin LA. Prevalência do grupo sanguíneo AEC 1 (subgrupos 1.1 e 1.2) em cães (*canis familiaris*, Linaeus, 1758) criados no Brasil. *Braz Vet J Anim Sci.* 1999; 36(1): 1-8.
18. Blais MC, Berman L, Donna A, Oakley DA, Giger U. Canine dal blood type: A red cell antigen lacking in some dalmatians. *J Vet Intern Med.* 2007; 21(2): 281-6.
19. Kohn B, Classe G, Weingart C. Clinical evaluation of the Quick Vet/ Rapid Vet canine dog erythrocyte antigen 1.1 blood-typing test. *J Vet Diag Invest.* 2012; 24(3): 539-45.
20. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analysed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med.* 2014; 28(2): 592-8.
21. Kessler RJ, Reese J, Chang D, Seth M, Hale AS, Giger U. Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and dal blood typing and cross-matching by gel column technique. *Vet Clin Pathol.* 2010; 39(3): 306-16.
22. Arıkan S, Guzel M, Mamak N, Ograk YZ. Frequency of blood types DEA 1.1, 3, 4, 5, and 7 in Kangal dog. *Rev Méd Veter.* 2009; 4(160): 180-3.
23. Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J.* 2001; 42(1): 447-5424.
24. Iazbik MC, O'donnell M, Marin L, Zaldivar S, Hudson D, Couto CG. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing greyhounds. *Vet Clin Pathol.* 2010; 39(4): 433-5.
25. Mesa-Sanchez I, Gopegui-Fernandez RR, Granados-Machuca MM. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish Greyhounds). *Vet Record.* 2014; 10: 1-3.
26. Wardrop KJ. New red blood cell antigens in dogs and cats – a welcome discovery. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 205-6.
27. Chang HW, Nguyen DD, Washington E, Walker ID, Holloway, SA. Phage display antibodies to allelic determinants of canine blood cells. *J Immunol Methods.* 2006; 311: 1-11.
28. Corato A, Mzza G, Hale AS, Barker RN, Day MJ. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification

of a dog erythrocyte membrane antigen homologous to human Rhesus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 59: 213-23.

29. Polak K, Acierno MM, Raj K, Mizukami K, Siegel DL, Giger U. Dog erythrocyte antigen 1: mode of inheritance and initial characterization. *Vet Clin Pathol.* 2015; 44(3):369-79.

30. Euler CC, Lee JH, Kim HY, Raj K, Mizukami K, Giger U. Survey of two new (Kai 1 and Kai 2) and other blood groups in dogs of North America. *J Vet Intern Med.* 2016; 30(5): 1642-7.

31. Lee JH, Giger U, Kim HY. Kai 1 and Kai 2: characterization of these dog erythrocyte antigens by monoclonal antibodies. *Plos One.* 2017;12(6):1-13.

32. Ferreira RRF, Gopegui RR, Matos AJF. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(2): 198-200.

33. Giger U, Gelens CJ, Oakley DA. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 206(9): 1358-62.

34. Novais AA. Prevalência dos antígenos eritrocitárias caninos em cães domésticos e investigação dos parâmetros hematológicos e da ocorrência de antígenos eritrocitários em lobos-guará e cachorros-do-mato [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Campus de Jaboticabal; 2003.

35. Spada E, Proverbio D, Baggiani L, Canzi I, Perego R. Activity, specificity and titer of naturally occurring canine anti-DEA 7 antibodies. *J Vet Diag Invest.* 2016; 28(6): 705-8.

36. Goy-Thollot I, Giger U, Boisvineau C, Perrin R, Guidetti M, Chaprier B, et al. Pre- and post-transfusion alloimmunization in dogs characterized by 2 antiglobulin-enhanced cross-match tests. *J Vet Intern Med.* 2017; 31(5): 1420-9.

37. Gracner D, Bedrica L, Potocnjak D, Sakar D, Samardzija AM, Capak H, et al. Blood groups and haematology indicators in Croatian indigenous breeds of dog. II Dalmatian dog. *Veterinarski Arhiv.* 2011; 81(1): 111-7.

38. Souza SL, Stopigli AJ, Gomes SGR, Ulata SK, Moroz LR, Fantoni DT. Estudo da frequência dos antígenos eritrocitários caninos 1, 1.1 e 7 e risco de transfusão incompatível em cães de diferentes raças e mestiços da região metropolitana da cidade de São Paulo-SP, Brasil. *Braz J V Res An Sci.* 2014; 51(4): 316-23.

39. Ejima J, Kurokawa K, Ikemoto S. Phenotype and gene frequency of red blood cell groups in dogs of various breeds reared in Japan. *Jap J Vet Sci.* 1986; 48(2): 363-8.

40. Van der Merwe LL, Jacobson LS, Pretorius GJ. The breed prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in the Onderstepoort area of South Africa and its significance in selection of canine blood donors. *J South African Vet Assoc.* 2002; 73(2): 53-6.

41. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Anim J Vet Res.* 2005; 66(8): 1386-92.
42. Deluca LA, Glass SG, Johnson RE, Burger M. Description and evaluation of a canine volunteer blood donor program. *J Appl. Anim Welf. Sci.* 2014; 9(2): 129-141.
43. Nottidge HO, Omobowale TO, Washio M, Ajadi RA, Toizumi SH, Takahashi K. The prevalence of the dog erythrocyte antigen 1 (DEA 1.1 and 1.2) in Nigerian indigenous dogs. *Folia Vet.* 2006; 50(2): 66-8.
44. Gracner D, Bedrica L, Labura C, Maticic D, Gracner GG, Samerdzija M. Blood groups and haematology in Istrian pointers. *Veterinarski Arhiv.* 2007; 77(2): 95-102.
45. Zubcic D, Bedrica L, Gracner D, Harapin I, Fury M, Jeremic J. Blood groups, haematology and clinicochemical indicators in indigenous breeds of dog. I. Croatian sheepdog. *Veterinarski Arhiv.* 2008; 78(2): 141-7.
46. Marques CFS. Frequência do antígeno eritrocitário DEA 1.1 em canídeos e dos antígenos eritrocitários A, B e AB em felídeos de Lisboa, Portugal [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa; 2010.
47. Costa MAMM. Aplicação da citometria de fluxo em medicina transfusional de canídeos [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa; 2014.
48. Riond B, Schuler E, Rogg E, Hofmann-Lehmann R, lutz H. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in dogs in Switzerland evaluated with the gel column technique. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2011; 153(8): 369-74.
49. Zivcic V, Bedrica L, Speranda M, Gracner D, Boskovic I, Florijancic T, et al. Prevalence of DEA 1.1 blood group in Croatian indigenous breeds of dogs: Posavaz Hound and Tornjak Hound. *Veterinarski Arhiv.* 2013; 83(6): 633-8.
50. Unny MN, Mathew MK, Pillai UN. Studies on the occurrence of dog erythrocyte antigen 1.1 in dog breeds of Kerala, India. *Malays J Vet Res.* 2014; 5(2): 11-3.
51. Spada E, Proverbio D, Florez LMV, Chamizo MRP, Perego R, De Giorgi GB, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4 and 7 in galgos (Spanish Greyhounds). *J Vet Diag Invest.* 2015; 27(4): 558-61.
52. Spada E, Proverbio D, Florez LMV, Serna BSG, Chamizo MRP, Baggiani L et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4 and 7 in Podenco Ibizenco (Ibizan Hounds) from Ibiza Island. *Vet Med Internat.* 2017; 2016: 1-5.
53. Milczak A, Abramowicz B, Madany J, Winiarczyk D, Wrzesniewska K, Bochynska D, et al. Frequency of DEA 1.1 antigen in german shepherds. *Scient Messen of Lviv Nation Univ Vet Med Biotechnol.* 2016; 18(3): 221-4.

54. Dhliwayo S, Makonese TA, Whittall B, Chikerema SM, Pfukenyl DM, Tivapasi MT. A study on the prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 and detection of canine Babesia by polymerase chain reaction from apparently healthy dogs in a selected rural community in Zimbabwe. *J South African Vet Assoc.* 2016; 87(1): 1-5.
55. Carli E, Carminato A, Ravagnan S, Capello K, Antognoni MT, Miglio, A et al. Frequency of DEA 1 antigen in 1037 mongrel and purebred dogs in Italy. *BMC Vet Res.* 2017; 13(364): 1-6.
56. Hara Y, Ejima H, Aoki S, Tagawa M, Motoyoshi S, Sugiyama M, et al. Preparation of monoclonal antibodies against Dog Erythrocyte Antigen D1 (DEA-3). *J Vet Med Sci.* 1991; 53(6): 1105-7.
57. Blois SL, Richardson DM, Abrams-Ogg ACG. Comparison of a gel column blood typing method and a point-of-care cartridge for dog erythrocyte antigen 1.1. *J Vet Emerg Crit Care.* 2013; 23(3): 340-3.
58. Weingart C, Giger U, Kohn B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. *J Fel Med Surg.* 2004; 6:139-48.
59. Davidow B. Transfusion medicine in small animals. *Vet Clin Small Anim.* 2013; 43: 735-56.
60. Lucidi CA, Takahira RK, Gerlach JÁ, Davis JM, Schwartz KA, Scott MA. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(4): 435-43.
61. Santos SCS, Moroz LR, Santos MM, Santos AS, Trindade SC, Meyer R, et al. Detection of canine anti-DEA 1 antibodies using flow cytometry in dogs following DEA 1-positive blood transfusion. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2018; 55(1):1-7.
62. Brainard BM. The bleeding patient: diagnosis and assessment. In: *Proceedings of the 14th International Veterinary Emergency And Critical Care Symposium, 2008.* Phoenix: Veterinary Emergency & Critical Care Society; 2008. p. 105-110.
63. Lacerda LA, Oliveira ST, Stein GG, Guerra TA, Gonzalez F. Titulação de aloanticorpos anti-a e anti-b em gatos domésticos sem raça definida em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Ceres.* 2011; 58(1): 51-5.
64. Seth M, Jackson KU, Giger U. Comparison of five blood typing methods for the feline AB blood group system. *Anim Vet Res.* 2011; 72(2): 203-9.
65. Nakage APM, Santana AE, Capua MLB, Coelho PS. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. *Cienc Rural.* 2005; 35(4): 377-80.
66. Gibson G. Transfusion Medicine. In: King LG, Boag A. *Manual of canine and feline emergency and critical care.* 2. ed. BSAVA; 2007. p. 2015-227.

67. Ramos-Vara JÁ, Avery AC, Avery PR. Técnicas avançadas de diagnóstico. In: Raskin RE, Meyer DJ. Citologia clínica de cães e gatos. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 395-437.
68. Giger U. Current canine and feline blood typing methods and issues. In: Proceedings of the 56th Annual Meeting Of The American College Of Veterinary Pathologists (ACVP) and 40th Annual Meeting Of The American Society For Veterinary Clinical Pathology, 2005. Boston: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology; 2005.
69. Dallabona D, Kataoka A, Novais AA. Ocorrência de anticorpos naturais contra antígenos eritrocitários em cães dos municípios de Sinop e Sorriso/MT, Brasil. *Scient Eletron Arch.* 2016; 3: 33-7.
70. Safra N, Owens SD, Pedersen NC, Burges J, Chew T, Wolf ZT, et al. ASCVP: Proceedings of the Mapping a chromosomal location for dog erythrocyte antigen 1.1. In: 49th American Society for Veterinary Clinical Pathology Annual Meeting, 2014. Atlanta: ASVCP; 2014.
71. Vieira J, Bognato RK, Gonçalves S. Hematocrit monitoring in blood-donor dogs. In: 34th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association: Proceedings of the 34th. São Paulo: Anclivepa São Paulo; 2009. p. 129-30.
72. Pincelli VA, Bochio MM, Morikawa MK, Pereira PM. Incidência e tratamento de cães com reações transfusionais agudas. *Clín Vet.* 2010; 86: 62-6.
73. Ekiz EE, Arslan M, Ozcan M, Gultekin GI, Gulay OY, Kirmizibayrak T, et al. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 in 4 breeds native to different areas in Turkey. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(4): 518-23.

ANEXO A – Certificado do CEUA



Universidade Federal da Bahia
 Instituto de Ciências da Saúde (ICS)
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICS)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Prevalência do tipo sanguíneo AEC 1.1 em cães: análise comparativa entre cromatografia, hemoaglutinação e citometria de fluxo, realizada no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA”, registrada com o nº 090/2016, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Maria de Fátima Dias Costa - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências da saúde (CEUA-ICS), em reunião de 12/08/2016.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2015 - 01/08/2016
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis lupus familiaris</i> (Canina) – sem determinação de raça
Número de animais	196
Peso/Idade	28 Kg/ adulto
Sexo	Macho/fêmea
Origem	Cães domiciliados doadores do banco de sangue da Clínica Veterinária Diagnose Animal – Salvador/Ba

Profª Dra. Tania Tavares Rodriguez

Coordenadora da CEUA-ICS
 Profa. Tânia Tavares Rodrigues
 Coordenadora da CEUA-ICS
 Instituto de Ciências da Saúde - UFBA

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Tipagem sanguínea em cães DEA 1 positivo: Análise comparativa entre citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação e avaliação da frequência e risco transfusional.

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar do trabalho científico: *Tipagem do grupo sanguíneo DEA 1 em cães: Análise comparativa entre citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação e avaliação da frequência e risco transfusional*, realizada no Instituto de Ciências da Saúde - UFBA.

O objetivo da pesquisa é identificar o tipo sanguíneo DEA 1 em animais que venham a se tornar doadores de sangue. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: será coletado uma amostra de 3 ml de sangue para serem realizados: exame de citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação para pesquisa do tipo sanguíneo DEA 1. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar ou mesmo desistir, a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Salientamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os benefícios esperados são: Tipar o sangue do cão, candidato a ser doador de sangue, que vive em Salvador – Bahia, para que auxilie outros cães em possíveis transfusões sanguíneas.

Informamos que o (a) senhor (a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Caso tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode contatar **Suzana Claudia Spínola dos Santos, à Rua dos Radialistas, 209, na Clínica Veterinária Diagnose Animal, nos telefones (71) 3351-2960 e (71) 9978-2188** ou procurar a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Bahia, na Avenida Reitor Miguel Calmon, s/nº, no telefone (71) 3283-8958, ou ceuaics@ufba.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida e assinada, entregue a você.

Salvador, ___ de _____ de _____.

Suzana Claudia Spínola dos Santos

RG: 02922748-82

CRMV: BA-1544

Eu, _____ (**nome por extenso**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE B - Cálculo amostral do estudo

$$X_{\text{máx}} = p + Z\sqrt{p(1-p)/N}, \text{ o que dá}$$

$$X_{\text{máx}} - p = Z\sqrt{p(1-p)/N}$$

$$(X_{\text{máx}} - p)^2 = Z^2 p(1-p)/N, \text{ o que resulta para N o valor:}$$

$$N = \frac{Z^2 p(1-p)}{(X_{\text{máx}} - p)^2} \text{ ou } N = \frac{Z^2 p(1-p)}{d^2}$$

Considerando-se:

p - Fração de sucesso

Z - O número de desvios-padrão

X_{máx} - O valor máximo do atributo quantificado

N - Tamanho da amostra

$$\mathbf{Z = 1,96}$$

$$\mathbf{p = 0,75}$$

$$\mathbf{d = X_{\text{máx}} - p = 0,90 - 0,85 = 0,05}$$

$\mathbf{N = 1,96^2 \cdot 0,85 (1 - 0,85)/0,05^2 = 195,9216}$, o que corresponde a um valor aproximado de 196 indivíduos.

APÊNDICE C – Protocolo Metodológico da Citometria de Fluxo

- 1º: Centrifugar sangue total com EDTA em 2200 x g por 3 minutos;
- 2º: Desprezar o plasma;
- 3º: Ressuspender o sedimento de eritrócitos com salina no mesmo volume do plasma desprezado;
- 4º: Pipetar 998 μL de salina com 2 μL dos eritrócitos ressuspensos (6.000.000 hemácias/ μL) e homogeneizar em vortex;
- 5º: Incubar os soros para testes a 56°C por 10 minutos (50 μL positivo e também 50 μL de negativo);
- 6º: Homogeneizar 40 μL da suspensão de eritrócitos com 50 μL dos soros positivo e negativo e incubar em temperatura ambiente por 30 minutos;
- 7º: Lavar 3 vezes os tubos contendo solução de eritrócitos e soros com salina a 2200 x g por 3 minutos. Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 1 ml de salina;
- 8º: Incubar a solução de eritrócitos e soro com 3 μL do anticorpo anti-canino em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos;
- 9º: Lavar os tubos testes 2 vezes com salina a 2200 x g por 3 minutos (Para retirar o excesso de anticorpo que não se ligou);
- 10º: Ressuspender os conteúdos dos tubos a serem testados em 300 μL de salina;
- 11º: Leitura no citômetro.

APÊNDICE D

ARTIGO 1: Tipagem sanguínea em cães DEA 1 positivo: Análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação

Suzana Cláudia Spinola dos Santos¹; Mariane Melo dos Santos²;
³Wellington Francisco Rodrigues; Roberto Meyer²; Maria de Fátima Dias Costa⁴

¹Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador – BA, Brasil

²Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Salvador – BA, Brasil

³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/Biologia Celular, Uberaba – MG, Brasil

⁴Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Salvador – BA, Brasil

Resumo

As técnicas de tipagem sanguínea vem sendo aperfeiçoadas para garantir maior segurança aos procedimentos transfusionais. A tipagem para o antígeno DEA 1 através da citometria de fluxo, deverá oferecer mais confiabilidade à rotina da imunohematologia em cães doadores e receptores. Na atualidade, o grupo DEA 1 passou a ser denominado como um sistema alélico autossômico dominante com o tipo DEA 1 negativo e suas variações de positividade. O presente estudo pesquisou o antígeno DEA 1, pela técnica da citometria de fluxo, imunocromatografia, hemaglutinação, comparando as três técnicas. Dentro dos indivíduos positivos para o grupo DEA 1, tipados pela citometria de fluxo, foram encontradas intensidades médias de fluorescência que são indicadoras de antigênicidade fraca, moderada e forte, podendo-se dividir o grupo DEA 1 em positivo fraco, positivo moderado e positivo forte. As técnicas de tipagem sanguínea para o grupo DEA 1 por citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação tiveram correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Palavras-chaves: Tipagem sanguínea em cães. Medicina Transfusional em cães. Antígeno eritrocitário canino 1. Citometria de fluxo.

INTRODUÇÃO

Atualmente, em Medicina Veterinária, a prática segura das transfusões sanguíneas ganha cada vez mais destaque, estabelecendo-se normas pré-transfusionais de triagem para os animais doadores, o que representa uma tendência de padronização da avaliação pré-

transfusional¹. Sabe-se que, para uma transfusão de sangue segura, é importante que se faça uso do sangue tipificado e compatível^{2,3}.

Recentemente, através da tipagem por anticorpos monoclonais anti-DEA 1, o grupo DEA 1 passou a ser denominado como um sistema alélico autossômico dominante com o tipo DEA 1 negativo e suas variações de positividade (fraca, média e intensa)⁴⁻⁷.

O presente estudo pesquisou o antígeno DEA 1, pela técnica da citometria de fluxo e aglutinação em 69 cães de diversas raças, com idade entre 1 e 8 anos, com peso a partir de 28 kg e de ambos os sexos, positivos pela imunocromatografia. Através da correlação entre as três técnicas pode-se identificar cada escore de positividade em animais DEA 1 positivos, e classificar em fraca, moderada e forte. As técnicas de tipagem sanguínea vem sendo aperfeiçoadas para garantir maior segurança aos procedimentos transfusionais. A tipagem para o antígeno DEA 1 através da citometria de fluxo, deverá oferecer mais confiabilidade à rotina da imunohematologia em cães doadores e receptores. Este método é então proposto como padrão-ouro dentro da tipagem sanguínea assegurando mais precisão e confiabilidade a tais procedimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização dos exames de hemaglutinação e da citometria de fluxo foram utilizadas amostras de antissoros caninos provenientes de cães pós-transfundidos com sangue tipo DEA 1 que foram submetidos à pesquisa de anticorpos por citometria de fluxo como acompanhamento de aloimunização dos mesmos, por Santos et al.⁸. Cada antissoro apresentou uma intensidade própria de média de fluorescência, que oscilou de 15 a 538,99 representando suas concentrações de anticorpos anti-DEA 1. E ao serem unificados formando um *pool* de antissoro, este apresentou uma intensidade média de fluorescência maior, que foi de 979,52 demonstrando uma potencialização do antissoro.

Este *pool* de antissoro foi diluído na proporção de 1:2 que foi a titulação que apresentou boa reação de hemaglutinação com sangue conhecido DEA 1, pois em diluição maior não foi encontrada hemaglutinação na prova de reação cruzada lenta em tubos e quando submetido à nova avaliação por citometria de fluxo apresentou média de fluorescência de 623,24. Esse procedimento adotado foi realizado para que não ocorresse efeito prozona, com uma concentração de anticorpos maior que a do antígeno como preconizado^{4,9-11}.

Para a realização da citometria de fluxo utilizou-se o citômetro Becton Dickinson FACSCalibur™ interligado a um PC Power Macintosh (Apple, Salvador, BA, Brasil, Laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia) com o software instrumento-específico (BD CellQuest Pro™ software, Becton, Dickinson and Company).

As provas de imunocromatografia foram realizadas através do *kit* comercial para detecção do grupo sanguíneo DEA 1 Alvedia® (Limonest-França), seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante. Onde eram colocadas três gotas da solução tampão, seguidas de 3µL de sangue total com EDTA a 5% e após homogeneização por sete segundos, as amostras eram depositadas nas tiras para ocorrer evidênciação ou não de reação, seguida da leitura.

As amostras testadas foram submetidas à três lavagens com salina e uma obtenção de concentrado de eritrócitos de 4%. Para uma gota do concentrado de eritrócitos foram acrescentadas duas gotas do antissoro policlonal anti-DEA 1. Essa metodologia seguiu o princípio da tipagem reversa, onde realiza-se a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, quando já é do conhecimento que o soro padrão trata-se de um antissoro conhecido anti-antígeno eritrocitário específico. Nesse caso contendo anticorpos anti-DEA 1¹². Os resultados foram determinados pelo escore de intensidade de cruces, segundo Gibson¹³.

A tipagem pela citometria de fluxo, seguiu técnica descrita por Santos et al.⁸ assim descrita: amostras de 2 mL de sangue total em EDTA, foram centrifugadas a 2200 x g por 3 minutos; o plasma foi desprezado e o sedimento de eritrócitos ressuspendido com solução NaCl 0,09% no mesmo volume do plasma desprezado. A seguir, 2 µL da suspensão foram misturados com 998 µL de solução NaCl 0,09%, homogeneizados em vortex e reservados para realização do teste. Foram utilizados 50 µL do antissoro com anticorpos anti-DEA 1 e 50 µL do soro sem aloanticorpos, incubados a 56°C por 10 minutos. A seguir, procedeu-se uma segunda incubação em temperatura ambiente por 30 minutos com 40 µL da suspensão de eritrócitos. As amostras foram 3 vezes com solução NaCl 0,09% a 2200 x g por 3 minutos e acrescentados aos controles positivo e negativo, 3µL do anticorpo IgG anti-cão incubados em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida as amostras foram lavadas com solução NaCl 0,09%, centrifugados 2 vezes a 2200 x g por 3 minutos e ressuspendidas em 300 µL de solução NaCl 0,09%, sendo por fim realizadas as leituras no citômetro.

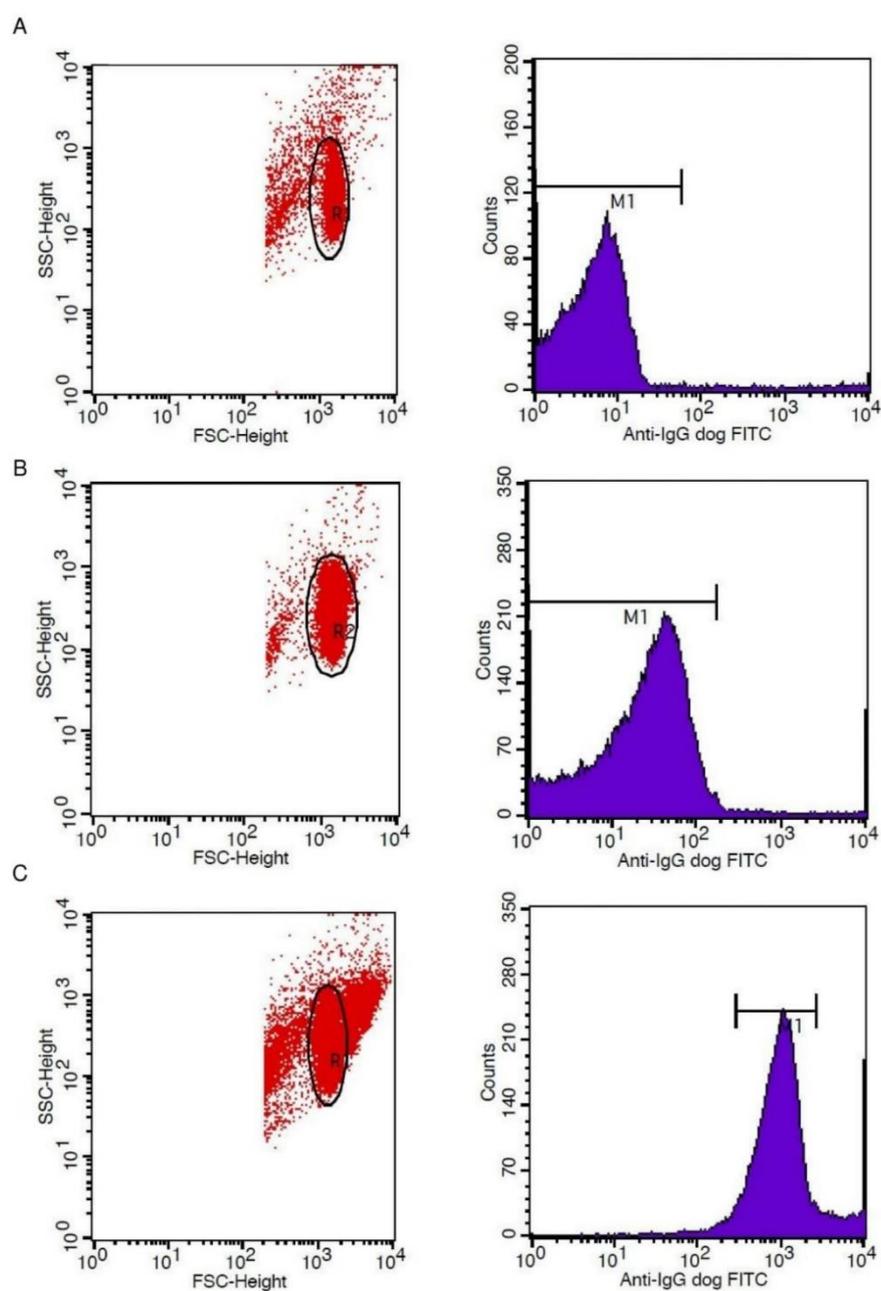
Para a análise comparativa entre as três técnicas foi realizado teste Spearman e todas as variáveis foram analisadas pelo teste qui-quadrado de Pearson. Para as tabelas foram aplicadas média, desvio-padrão, mediana, valor mínimo, valor máximo e variância pelo programa EXCEL versão 2013. Os gráficos foram realizados através do programa GRAPH PAD PRISM (<http://graphpad.com>).

RESULTADOS

Durante a padronização dos resultados positivo e negativo foram realizados testes de tipagem pela citometria de fluxo em animais já tipados pela imunocromatografia, onde o valor de média de fluorescência mais baixo foi 5,92 e o mais alto de 31,53 em nove animais negativos que estavam sendo testados. E para controle positivo foi também realizada a técnica da citometria de fluxo em soros de animais conhecidamente positivos pela imunocromatografia, encontrando o valor de média de fluorescência de 979,52 e de 623,24, onde foi escolhido como controle positivo o de maior valor. A figura 1 apresenta os histogramas dos controles negativo e positivo e a figura 2 apresenta os histogramas dos resultados de média de fluorescência mínimo e máximo dos animais negativos do estudo, bem como dos animais positivos.

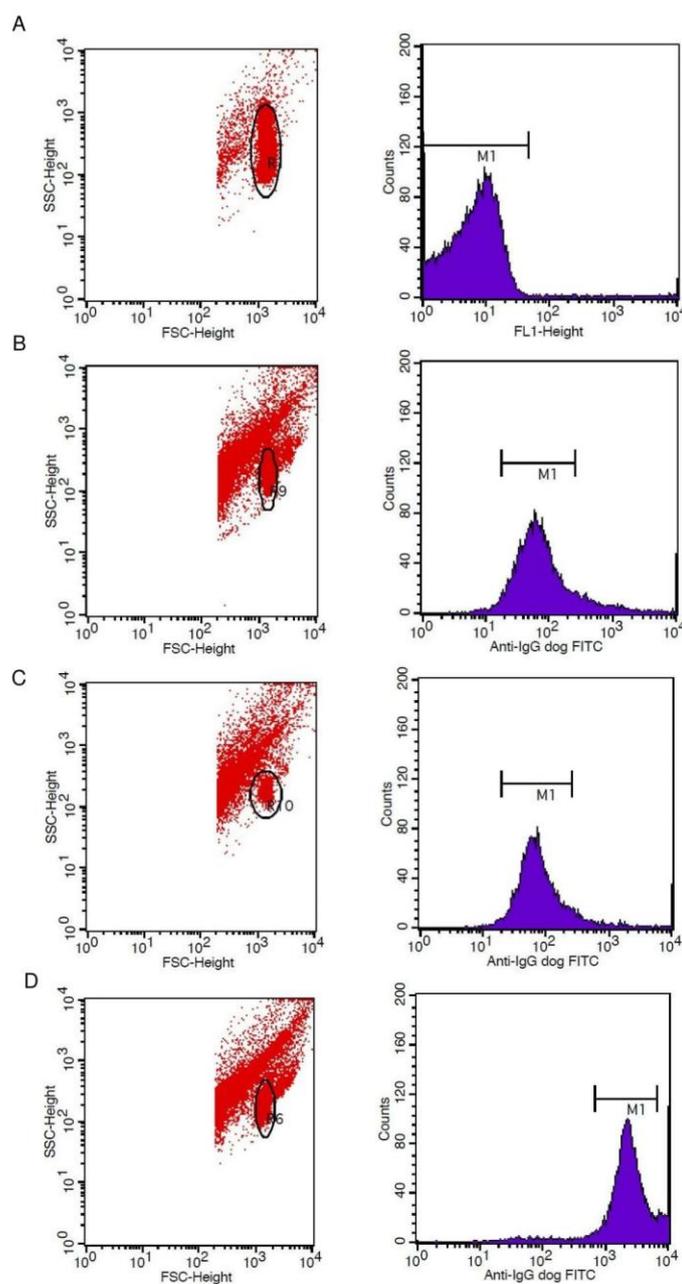
O grupo de 69 animais do estudo foram tipados pela técnica da imunocromatografia e foram feitas a tipagem pela citometria de fluxo e aglutinação, seguindo a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, com o antissoro já conhecidamente anti-DEA 1. Dos 69 animais desta análise tipados pela imunocromatografia, 30 foram negativos e 39 positivos para o grupo sanguíneo DEA 1. A tabela 1 apresenta o perfil das médias de fluorescência e hemaglutinação dos animais DEA 1 negativos, onde as médias de fluorescência oscilaram de 5,92 a 71,46 e todos apresentaram hemaglutinação negativa (Escore 0). A tabela 2 apresenta o perfil das médias de fluorescência dos animais DEA 1 positivos, cujos valores variaram de 77,65 a 2391,82 e, seus escores de aglutinação obtidos foram de 1 a 3 cruces (1+, 2+, 3+) não se observando nenhum com escore 4 cruces (4+). Os 39 animais DEA 1 positivos, na imunocromatografia e citometria de fluxo, tiveram seus resultados de médias de fluorescência confrontados com os escores da aglutinação, apresentando os valores da tabela 3.

Figura 1 – Sequência da análise dos controles negativo e positivo com os soros primários anti-DEA 1 negativo e positivo, em 10.000 eventos, em gráficos de tamanho e granulosidade de eritrócitos e histogramas individuais. (A) Controle negativo obtido com média de fluorescência mais baixa (5,92) oriundo de eritrócitos negativos para o grupo DEA 1. (B) Controle negativo obtido com média de fluorescência mais alta (31,53) oriundo de eritrócitos negativos para o grupo DEA 1. (C) Controle positivo obtido a partir de animal conhecidamente do grupo DEA 1 (979,52) representando eritrócitos positivos



Fonte: Autoria Própria

Figura 2 – Sequência dos gráficos em tamanho e granulidade de eritrócitos e histogramas individuais, dos eritrócitos dos animais estudados negativos e positivo para o grupo DEA 1, em 10.000 eventos, que apresentaram valores mínimo e máximo das fluorescências. (A) Animal negativo para o grupo DEA 1, apresentando a menor média de fluorescência do grupo dos animais negativos (7,67). (B) Animal negativo para o grupo DEA 1, apresentando a maior média de fluorescência do grupo dos animais negativos (71,46). (C) Animal positivo para o grupo DEA 1, apresentando a menor média de fluorescência do grupo dos animais positivos (77,65) representando a fluorescência mais próxima do ponto de corte estabelecido (71,47). (D) Animal positivo para o grupo DEA 1, apresentando a maior média de fluorescência do grupo dos animais positivos (2391,82)



Fonte: Autoria Própria

Tabela 1 – Comparação dos valores de intensidade média de fluorescência (IMF) obtidos na citometria de fluxo com a hemaglutinação (Escore de aglutinação 0, 1+, 2+, 3+, 4+) dos animais que apresentaram resultados negativos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1

Animal	Fluorescência	Aglutinação
1	31,53	0
2	12,77	0
3	5,92	0
4	8,24	0
5	9,44	0
6	9,76	0
7	7,67	0
8	8,37	0
9	8,35	0
10	28,51	0
11	71,46	0
12	43,26	0
13	20,49	0
14	14,11	0
15	13,45	0
16	9,41	0
17	9,87	0
18	17,62	0
19	36,49	0
20	15,25	0
21	52,8	0
22	43,1	0
23	61,8	0
24	68,32	0
25	30,21	0
26	49,47	0
27	23,35	0
28	16,13	0
29	30,39	0
30	26,24	0
Média		26,126
Desvio Padrão		19,23265
Mediana		19,055
Mínimo		5,92
Máximo		71,46
Variância		369,8949

(n)=30 animais. Média e Desvio Padrão (Pearson; $p < 0,0001$)

Fonte: Autoria Própria

Tabela 2 – Comparação dos valores de intensidade média fluorescência (IMF) obtidos na citometria de fluxo com a hemaglutinação (Escore de aglutinação 0, 1+, 2+, 3+, 4+) dos animais que apresentaram resultados positivos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1

Animal	IMF	Aglutinação
1	119,48	1
2	140,4	1
3	266,27	3
4	1421,43	1
5	250,54	1
6	240,21	1
7	91,51	1
8	174,01	1
9	316,11	2
10	127,54	1
11	226,52	3
12	293,4	3
13	270,91	3
14	123,96	1
15	187,83	1
16	2391,82	3
17	688,98	2
18	348,25	2
19	377,76	2
20	688,21	3
21	704,6	2
22	1592,5	3
23	1627,38	3
24	593,86	2
25	865,08	2
26	94,99	1
27	222,5	1
28	85,93	1
29	142,48	1
30	145,11	2
31	113,98	1
32	293,4	2
33	270,91	2
34	161,75	1
35	81,35	1
36	174,24	2
37	467,84	2
38	213,73	2
39	77,65	1

Média	427,5492
Desvio Padrão	509,4232
Mediana	240,21
Mínimo	77,65
Máximo	2391,82
Variância	259511,9

(n)=39 animais. Média e Desvio Padrão (Pearson; $p < 0,0001$)

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: Tratamento estatístico da tabela 2

Tabela 3 – Distribuição dos animais com resultados positivos na tipagem sanguínea pela imunocromatografia do grupo DEA 1, reunidos pelos escores de aglutinação obtidos (1+, 2+, 3+), comparados aos resultados de intensidade média de fluorescência (IMF) da citometria de fluxo – Salvador – 2017

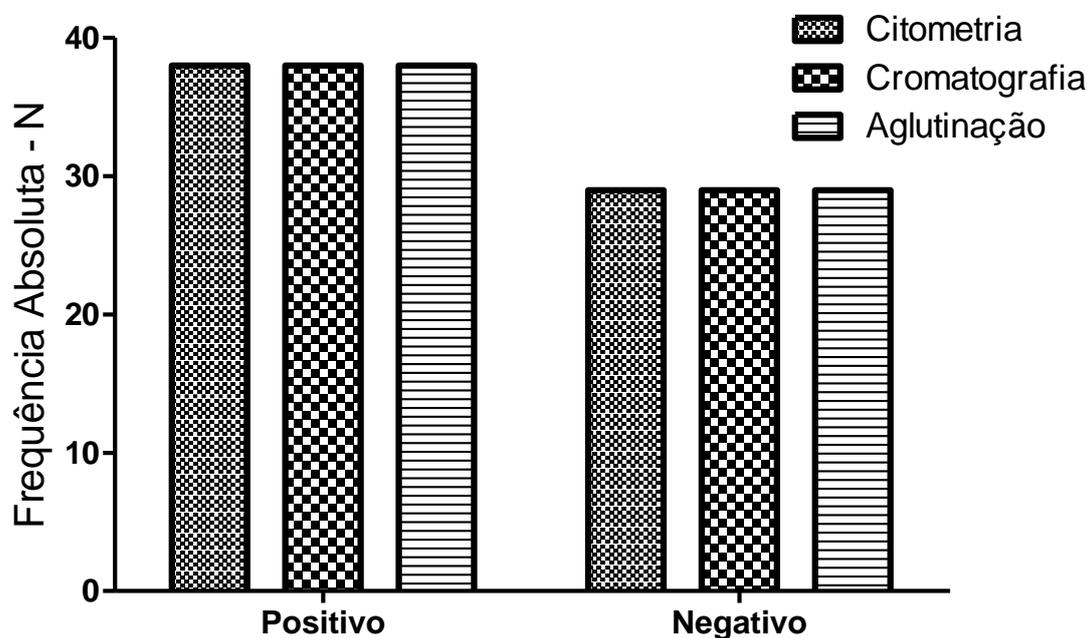
Nº de animais DEA 1+	Aglutinação	IMF					
		Mínimo	Máximo	Média	D. P.	Mediana	Variância
18	1+	77,65	1421,43	214,3078	305,9991	133,97	93635,48
13	2+	145,11	865,08	419,99	227,0188	348,25	51537,51
8	3+	226,52	2391,82	919,6263	836,2198	490,805	699263,6

(n) = 39 animais. Média e Desvio Padrão (Pearson; $p < 0,0001$)

Fonte: Dados da pesquisa

Após estabelecer os respectivos pontos de cortes para valores positivos e negativos, foram detectadas as positivities e negatividades utilizando os três distintos métodos: citometria de fluxo, imunocromatografia (cromatografia) e hemaglutinação (aglutinação), onde os mesmos foram comparados quanto à sensibilidade (Figura 1). Após avaliação dos dados não foram encontradas diferenças quanto à sensibilidade de detecção de soros positivos e negativos ($p > 0,05$).

Figura 1 – Análise comparativa entre os resultados positivos de cada técnica abordada quanto à sensibilidade

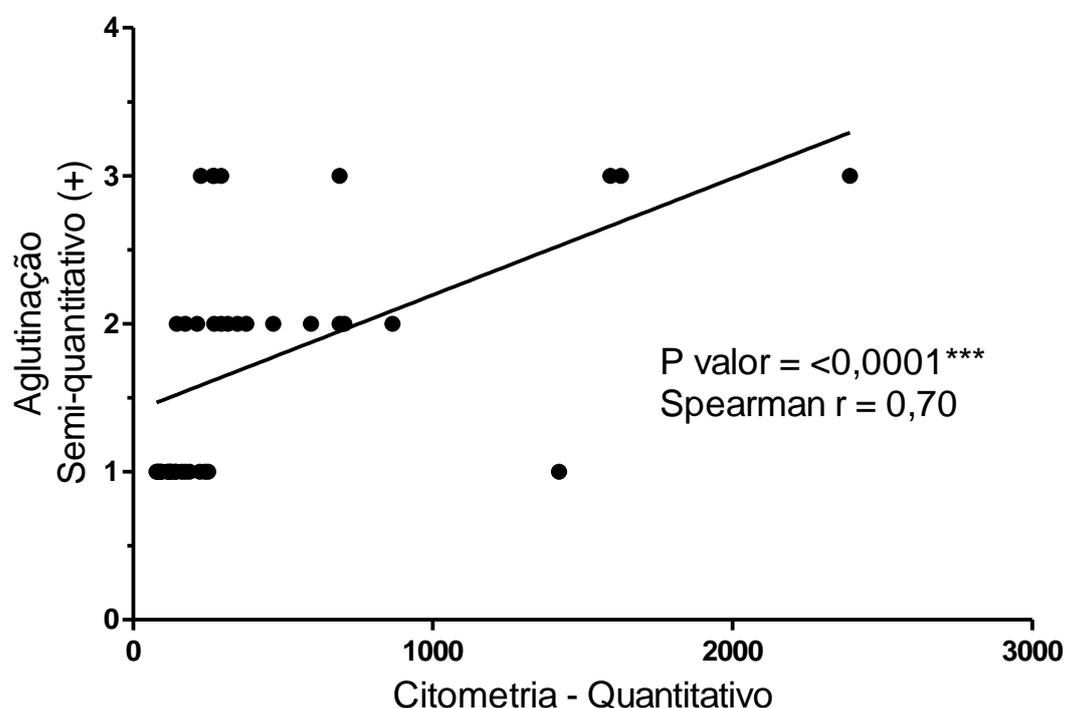


Nota: Após avaliação dos dados não foram encontradas diferenças quanto à sensibilidade de detecção de soros positivos e negativos ($p > 0,05$)

Fonte: Autoria própria

Devido à variabilidade da intensidade de aglutinação, bem como os valores encontrados na imunocromatografia, verificou-se existência de uma correlação para a positividade entre os diferentes métodos (Figura 2). Após as comparações, constata-se que há uma correlação positiva (Spearman $r = 0,70$), e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), quanto à sensibilidade dos testes.

Figura 2 – Análise comparativa dos valores quantitativos dos testes positivos das técnicas de hemaglutinação (aglutinação) e citometria de fluxo (citometria)



Nota: Após as comparações, constata-se que há uma correlação positiva (Spearman $r = 0,70$), e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), quanto à sensibilidade dos testes
 Fonte: Autoria própria

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi utilizada a técnica da citometria de fluxo para detectar o tipo sanguíneo de cães DEA 1. E, com isso confrontou-se os resultados com os da técnica de imunocromatografia e da hemaglutinação. Na medicina transfusional veterinária ainda não está estabelecida a técnica padrão-ouro para tipagem sanguínea e busca-se contribuir para este fim.

Os resultados obtidos neste estudo, da análise comparativa entre a citometria de fluxo, imunocromatografia e hemaglutinação se assemelharam aos encontrados por Acierno, Raj e Giger ⁴, quando tipificaram sessenta e seis cães pela imunocromatografia e citometria de fluxo, onde os resultados DEA 1 na imunocromatografia eram positivos também para DEA 1 na citometria de fluxo. Os mesmos utilizaram anticorpo monoclonal

murino anti-DEA 1 como anticorpo primário, conjugando ao anticorpo secundário anti-murino policlonal de origem caprina. Enquanto que neste estudo utilizou-se como anticorpo primário anti-DEA 1, anticorpo policlonal oriundo de cães aloimunizados pós-transfusão sanguínea com sangue do grupo DEA 1 positivo e como anticorpo secundário, policlonal anti-canino de origem ovina.

A tipagem sanguínea de cães, em geral, baseia-se na identificação sorológica por reações de aglutinação. Originalmente, o soro de cães sensibilizados vem sendo utilizado para a tipagem, através dos aloanticorpos polivalentes, que variam entre os grupos de animais devido à cada intensidade de antigênicidade individual dos mesmos^{14,15}. Bioquimicamente pouco sabe-se a cerca desse grupo e suas correlações moleculares com os grupos sanguíneos de humanos ou de outras espécies, então um ensaio de anticorpos monoclonais alelo-específicos oriundos de sensibilização por aloantígenos caninos eritrocitários pode significar uma imensa fonte de resultados desejáveis para a medicina transfusional e se tornar possível a comparação bioquímica entre os aloantígenos. No entanto ainda é feito o reconhecimento do grupo sanguíneo DEA 1 através de anticorpos policlonais obtidos por aloimunização canina^{15,16}. O antissoro aqui utilizado como anticorpo primário na citometria de fluxo, que apresentou alta concentração, foi utilizado como anticorpo policlonal para ligar-se aos antígenos DEA 1 na prova de reação cruzada lenta em tubos, cujo princípio é a hemaglutinação, o que permitiu gerar reação antígeno-anticorpo sem utilização do reagente da antiglobulina canina de Coombs para se obter uma melhor visualização da aglutinação. Blais et al.¹⁶ e Giger³ relataram que inicialmente o soro de cães sensibilizados era utilizado para tipagem, sabendo-se que tratava-se de soro policlonal, podendo haver variação entre os indivíduos, e requerer o reagente de Coombs para melhor visualização da aglutinação, mas nem sempre gerando uma ótima avaliação. Neste estudo não observou-se em nenhuma amostra o escore de 4 cruces em aglutinação, apenas a variação de 1 a 3 cruces, pois neste método os anticorpos produzidos apresentam fraca reação por não utilizar o reagente de Coombs. Hara et al.¹⁷ atestaram a especificidade dos anticorpos monoclonais, quando estudavam anticorpos contrários ao tipo DEA 3 confirmando por aglutinação cruzada, usando eritrócitos positivos e negativos. No entanto, encontraram títulos muito baixos de 1:4 a 1:8 e com a reação desaparecendo muito rapidamente. No presente estudo a titulação máxima possível do antissoro policlonal para evidenciação de aglutinação foi 1:2 sem auxílio do reagente Coombs.

Os testes de imunocromatografia apresentaram resultados de ligações variáveis de fortes a fracas, o que é esperado nesta técnica, no entanto foi preferível não categorizar as reações em fraca, moderada e forte, por tratar-se de um teste onde a marcação de intensidade de positividade é visual, o que leva à subjetividade de interpretação. Diferentemente do método de imunocromatografia usado por Acierno Raj e Giger⁴, que foi possível quantificar um escore de intensidade de 0 a 4 cruces (0+, 1+, 2+, 3+, 4+) por meio de leitura das tiras do teste em densitômetro, onde 0+ e 1+ eram resultados negativos e os seguintes positivos aumentando por intensidade antigênica.

Segundo Giger³ o sistema DEA 1 representa uma exceção dentre os demais sistemas que se apresentam em positivo e negativo, como os DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 7 e Dal, sendo subdividido em DEA 1.1 (A1) e DEA 1.2 (A2) que são aparentemente alélicos, e um outro alelo que seria o DEA 1.3 (A3). No entanto estudos recentes indicaram que o grupo DEA 1 é mais adequado ser caracterizado como tipo negativo, fraco positivo, moderado positivo e forte positivo, do que ser subdividido em dois ou três subtipos^{6,7}. O que também foi observado nos resultados encontrados nos escores 1+, 2+ e 3+ da hemaglutinação e as médias de fluorescências nos animais conforme a tabela 3.

Ao serem realizadas as análises de citometria de fluxo foi encontrada uma variação de reações de ligações, o que é revelado pelas médias de fluorescências e, quando foram comparadas aos resultados encontrados na hemaglutinação, que seguiu a metodologia da prova de reação cruzada lenta em tubos, foi possível fazer uma categorização em grupos de resultados de escore 1+, 2+ e 3+ que foram encontrados, correlacionando-os como ilustra a tabela 3. Acierno, Raj e Giger⁴ preconizaram através dos resultados obtidos em seus estudos com a técnica da citometria de fluxo para o diagnóstico do grupo sanguíneo DEA 1, que é mais adequado que seja utilizado um esquema de tipagem em DEA 1 positivo e DEA 1 negativo, com a detecção de sua expressão antigênica em fraca, moderada e forte, com isso eliminando a padronização previamente definida dos tipos sanguíneos DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 1.3.

Polak et al.⁵ avaliando o grupo sanguíneo DEA 1 tipificando 53 cães DEA 1 positivo, os subdividiram em DEA 1 positivo fraco, DEA 1 positivo moderado e DEA 1 positivo forte. Tornando consistente a informação de que esse modelo é dependente de uma dominância autossômica com 4 a 5 alelos: DEA 1 negativo (0), DEA 1 positivo fraco (1+), DEA 1 positivo moderado (2+) e DEA 1 positivo forte (3+ e 4+) comparando os achados das intensidades de reação de tiras cromatográficas aos valores médios de

fluorescência pela técnica de tipagem pela citometria de fluxo que trata-se de técnica quantitativa. Euler et al.⁶ também encontraram uma forte correlação entre os resultados semiquantitativos visual e densitométrico dos graus de positividade do grupo DEA 1 em fraco, moderado e forte.

Lucidi et al.¹⁸ tipificando amostras de sangue, pela citometria de fluxo com anticorpo anti-DEA 1.1 monoclonal em 62 cães DEA 1.1 negativos pela técnica de tipagem em tubo, encontraram intensidades médias de fluorescência (IMF) menores que 25 (média=16 e mediana=15) e em 110 cães DEA 1.1 positivos também pela tipagem em tubo encontraram médias de fluorescência maiores que 73 (média=407 e mediana=391). Goy-Thollot et al.¹⁹ tipificando animais DEA 1 com antissoro monoclonal, encontraram uma expressão antigênica que designaram de DEA 1 negativo o que apresentava uma intensidade média de fluorescência menor que 10 ($IMF < 10$), em fraco positivo de $10 \leq IMF < 100$, moderado positivo de $100 \leq IMF < 300$ e em forte positivo com $IMF \geq 300$. No presente estudo os 30 animais negativos pela imunocromatografia e aglutinação apresentaram na citometria de fluxo com anticorpo anti-DEA 1 policlonal intensidades médias de fluorescências menores que 71,46 (média=26,126 e mediana=19,055) e os 39 animais positivos também pelas mesmas duas técnicas apresentaram na citometria de fluxo intensidades médias de fluorescências maiores que 77,65 (média=427,5492 e mediana=240,21). Ao serem comparadas as amostras de sangue tipadas pela imunocromatografia com as mesmas tipadas pela citometria de fluxo, utilizando o anticorpo primário anti-DEA 1 obtido por sensibilização pós-transfusional, encontrou-se uma correlação direta positiva, pois todos apresentaram resultados positivos. De forma semelhante, Euler et al.⁶ tipificando amostras de sangue de cães com anticorpo monoclonal pelas técnicas de coluna gel, citometria de fluxo e imunocromatografia também obteve resultados de correlação direta positiva. Isso leva à conclusão que esse antissoro apresentava anticorpos em alta concentração específicos para o grupo DEA 1. Comparando, Polak et al.⁵ realizaram a retipagem de animais considerados DEA 1.1 negativos, DEA 1.1 positivos e DEA 1.2 positivos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais paralelamente para determinar sua correlação e, encontraram nos animais DEA 1.1 positivos uma reação forte quando utilizaram antissoro para tipificar DEA 1. No mesmo estudo, as amostras DEA 1.1 negativas testadas pelo anticorpo anti-DEA 1 monoclonal continuaram apresentando resultado negativo, porém quando testados com anticorpos policlonais foram encontrados DEA 1.1 positivos fraco a moderado.

Surpreendentemente seis amostras antes tipadas como DEA 1.2 positivo apresentaram discordância de resultado, tendo reações de variações moderadas tanto com os reagentes monoclonais como com os policlonais, encontrando nestas amostras resultados de DEA 1 positivo moderado a forte e DEA 1 negativo.

Lee, Giger e Kim⁷ em estudo comparativo com os tipos de sangue Kai 1 e Kai 2 argumentaram que o grupo sanguíneo DEA 1 é composto por uma variação de tipos DEA 1 e não dividido em DEA 1.1 e DEA 1.2, visto que em seus ensaios de imunocromatografia e *immunoblotting* identificaram através do anticorpo monoclonal anti-Kai 1 que esse antígeno é uma proteína de 200 kDa e 50 kDa, enquanto que o anticorpo monoclonal anti-Kai 2 identificou que esse antígeno é uma proteína de 80 kDa. Essas mesmas proteínas de 200/50 kDa e 80 kDa dos tipos Kai 1 e Kai 2 respectivamente assemelham-se aos estudos anteriores para os tipos DEA 1.1 e DEA 1.2 onde Corato et al.²⁰ nos primeiros ensaios de *immunoblotting* visualizaram a corrida de 200/50 kDa no DEA 1.1 e 85 kDa no DEA 1.2. Para Polak et al.⁵ é incomum que tenham-se duas proteínas diferentes para os tipos DEA 1.1 e DEA 1.2 como partes do mesmo sistema de grupo sanguíneo, pois ao utilizarem anticorpos monoclonais anti-DEA 1 não confirmaram esses estudos prévios para essas duas proteínas. E simultaneamente, através de suas pesquisas pela citometria de fluxo demonstraram que o DEA 1.1 e o DEA 1.2 são o mesmo antígeno e não estando correlacionados a variações de expressão do grupo. É um antígeno DEA 1 positivo, como também foi encontrado neste estudo, com variações de intensidade fraca, moderada e forte. Safra et al.²¹ em estudos preliminares do genoma canino, encontraram apenas um nucleotídeo de polimorfismo para o DEA 1 na região do cromossomo CFA27. Lee, Giger e Kim⁷, baseando-se nos achados da técnica por *immunoblotting* e reações com vários anticorpos monoclonais e policlonais, sugerem que os tipos sanguíneos Kai 1 e Kai 2 correspondam às proteínas originalmente descritas como DEA 1.1 e DEA 1.2 e o atual anticorpo monoclonal anti-DEA 1 reconheça um antígeno eritrocitário único, como foram encontradas as variações antigênicas do DEA 1 igualmente neste estudo. A técnica da citometria de fluxo é capaz de detectar concentrações de antígeno na superfície de eritrócitos que são insuficientes para identificação de resultados positivos pela aglutinação em tubo, ou seja tipificações em tubo por aglutinação estão mais sujeitas a erros devido à natureza subjetiva da interpretação da aglutinação e, a citometria de fluxo é uma técnica de acurácia com diferenciação clara entre resultado positivo e negativo e reproduzível.

CONCLUSÕES

A citometria de fluxo, com uso de anticorpo policlonal, para a tipagem sanguínea do grupo DEA 1 é uma técnica precisa e de acurácia, com diferenciação clara entre os resultados positivo e negativo;

Dentro dos indivíduos positivos para o grupo DEA 1, tipados pela citometria de fluxo, existem intensidades médias de fluorescência que são indicadoras de antigênicidade fraca, moderada e forte, podendo-se dividir o grupo DEA 1 em positivo fraco, positivo moderado e positivo forte;

As técnicas de tipagem sanguínea para o grupo DEA 1 por citometria de fluxo, aglutinação e imunocromatografia têm correlação positiva (Spearman $r = 0,70$) e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

REFERÊNCIAS

1. Tocci LJ, Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg and Critical Care*. 2009; 19: 66-73.
2. Dodds WJ. Practical Veterinary Transfusion Medicine. In: Anais do World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 2005. Mexico: World Small Animal Veterinary Association; 2005. p. 1-4.
3. Giger U. Blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility. In: Bonagura JD, Twedt DC, eds. *Kirk's Current Veterinary Therapy XV*. Philadelphia, United States: Saunders, Elsevier Inc; 2014:143-8.
4. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analysed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med*. 2014; 28(2): 592-8.
5. Polak K, Acierno MM, Raj K, Mizukami K, Siegel DL, Giger U. Dog erythrocyte antigen 1: mode of inheritance and initial characterization. *Vet Clin Pathol*. 2015; 44(3): 369-79.
6. Euler CC, Lee JH, Kim HY, Raj K, Mizukami K, Giger U. Survey of two new (Kai 1 and Kai 2) and other blood groups in dogs of North America. *J Vet Intern Med*. 2016; 30(5): 1642-7.
7. Lee JH, Giger U, Kim HY. Kai 1 and Kai 2: characterization of these dog erythrocyte antigens by monoclonal antibodies. *Plos One*. 2017; 12(6): 1-13.

8. Santos SCS, Moroz LR, Santos MM, Santos AS, Trindade SC, Meyer R, et al. Detection of canine anti-DEA 1 antibodies using flow cytometry in dogs following DEA 1-positive blood transfusion. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2018; 55(1): 1-7.
9. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev.* 2004 Apr 2; 18: 117-26.
10. Stieger K, Palos H, Giger U. Comparison of various blood-typing methods for the feline AB blood group system. *Am J Vet Res.* 2005; 8(66): 1393-9.
11. Vap LM. An update on blood typing, crossmatching, and doing no harm in transfusion dogs and cats. *Vet. Med.* 2010; 1: 447-53.
12. Lacerda LA. Transfusão sanguínea em veterinária: desafios a vencer. In: Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Anais do 2º Simposio De Patologia Clínica Veterinária Da Região Sul do Brasil; 2005; Porto Alegre; 2005. p. 62-81.
13. Gibson G. Transfusion Medicine. In: King LG, Boag A. *Manual of canine and feline emergency and critical care.* 2. ed. BSAVA; 2007. p. 2015-227.
14. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Am J Vet Res.* 2005; 66(8): 1386-92.
15. Chang HW, Nguyen DD, Washington E, Walker ID, Holloway SA. Phage display antibodies to allelic determinants of canine blood cells. *J Immunol Methods.* 2006; 311: 1-11.
16. Blais MC, Berman L, Donna A, Oakley DA, Giger U. Canine dal blood type: A red cell antigen lacking in some dalmatians. *J Vet Intern Med.* 2007; 21(2): 281-6.
17. Hara Y, Ejima H, Aoki S, Tagawa M, Motoyoshi S, Sugiyama M, et al. Preparation of monoclonal antibodies against Dog Erythrocyte Antigen D1 (DEA-3). *J Vet Med Sci.* 1991; 53(6):1105-7.
18. Lucidi CA, Takahira RK, Gerlach JÁ, Davis JM, Schwartz KA, Scott MA. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(4): 435-43.
19. Goy-thollot I, Giger U, Boisvineau C, Perrin R, Guidetti M, Chaprier B, et al. Pre- and post-transfusion alloimmunization in dogs characterized by 2 antiglobulin-enhanced cross-match tests. *J Vet Intern Med.* 2017; 31(5): 1420-9.
20. Corato A, Mazza G, Hale AS, Barker RN, Day MJ. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification of a dog erythrocyte membrane antigen homologous to human Rhesus. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 59: 213-23.

21. Safra N, Owens SD, Pedersen NC, Burges J, Chew T, Wolf ZT, et al. ASCVP: Proceedings of the Mapping a chromosomal location for dog erythrocyte antigen 1.1. 49th In: Annual Meeting American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2014. Atlanta: ASVCP; 2014.

APÊNDICE E

ARTIGO 2: Frequência do grupo sanguíneo DEA 1 e risco de transfusão incompatível em cães de diferentes raças e mestiços da cidade de Salvador – BA, Brasil

Suzana Claudia Spinola dos Santos¹; Mariane Melo dos Santos²;
³Wellington Francisco Rodrigues; Roberto Meyer²; Maria de Fátima Dias Costa⁴

¹Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador – BA, Brasil; ²Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Salvador – BA, Brasil; ³Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/Biologia Celular, Uberaba – MG, Brasil; ⁴Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Salvador – BA, Brasil

Resumo

O grupo DEA 1 é o mais imunogênico em cães, podendo as transfusões sanguíneas desencadear alguns efeitos indesejáveis nos pacientes veterinários. Estes estão diretamente associados à transfusões incompatíveis. Foram avaliados 203 cães de diversas raças, com idade entre 1 e 8 anos, com peso a partir de 28 kg, sem nenhum grau de parentesco e de ambos os sexos em Salvador – BA, Brasil para pesquisa da frequência do tipo sanguíneo DEA 1, por meio de testes de imunocromatografia para tipagem sanguínea. E calculado o risco de transfusão sanguínea incompatível tanto em uma primeira como em uma segunda transfusão. A frequência do grupo DEA 1 variou entre as raças estudadas de 0% a 100%, devido ao fator autossômico dominante desse grupo em cada uma, porém com uma positividade média de 62,07% (126/203). O menor risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo, dentro do grupo dos animais avaliados foi de 0,92% em uma primeira transfusão e o risco do mesmo animal receber sangue incompatível para o grupo DEA 1 na segunda transfusão foi de 0,008%. Quanto ao maior risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo destes animais foi de 69,12% e o risco do mesmo receber sangue incompatível para o DEA 1 foi de 47,77%. Esse risco pode ser anulado se sempre forem realizados os testes para tipagem sanguínea junto com a prova de reação cruzada para compatibilidade.

Palavras-chave: Tipagem sanguínea canina. DEA 1. Risco transfusional. Medicina transfusional veterinária.

INTRODUÇÃO

A transfusão sanguínea é uma forma de transplante, existindo, portanto, riscos associados aos seus procedimentos¹. Uma rigorosa seleção de doadores reduz ao máximo o risco de reações transfusionais.

Atualmente, em Medicina Veterinária, a prática segura das transfusões sanguíneas ganha cada vez mais destaque, estabelecendo-se normas pré-transfusionais de triagem para os animais doadores, o que representa uma tendência de padronização da avaliação pré-transfusional².

Sabe-se que, para uma transfusão de sangue segura, é importante que se faça uso do sangue tipificado e compatível^{3,4}. O reconhecimento dos tipos sanguíneos na imunohematologia em diferentes populações caninas de variadas raças tem sido estabelecido com vistas à manutenção de um arquivo de dados dos doadores⁵.

Transfusões sanguíneas podem desencadear alguns efeitos indesejáveis nos pacientes veterinários, desde febre a reações agudas imunomediadas e outras reações tardias que estão diretamente associadas à transfusões incompatíveis, que podem ser minimizadas pela prática da realização de provas de reação cruzada e de tipagem⁶.

O presente trabalho pesquisou, em Salvador – BA, a frequência do tipo sanguíneo DEA 1, por meio de testes de imunocromatografia para tipagem sanguínea, com amostras de sangue de cães doadores de distintas raças sem nenhum grau de parentesco. E calculou o risco de transfusão sanguínea incompatível tanto em uma primeira como em uma segunda transfusão.

MATERIAL E MÉTODOS

Através dos resultados da imunocromatografia foi realizada uma pesquisa de prevalência do tipo sanguíneo canino DEA 1, com os animais tipados sem nenhum grau de parentesco com base nos registros de nascimento, em nosso meio. A imunocromatografia foi a técnica escolhida para o cálculo da prevalência por se tratar de técnica já padronizada, reconhecida e disponível mundialmente, onde foi usado o kit Alvedia[®] (Limonest-França). Foram testados 203 cães de diversas raças com idade variável de 1 a 8 anos e peso acima de 28 Kg, de ambos os sexos. Dentre as raças estiveram no ato de doação sanguínea: 16 cães da raça Labrador Retriever; 31 cães da raça Golden Retriever; 12 cães da raça Afghan Hound; 14 cães da raça Pastor Belga Malinois; 14 cães da raça Pastor Alemão; 28 cães das

raças Bulldogs (Cães Bulldogs); 40 cães de raças definidas diversas (Raças Definidas Diversas); e 48 cães mestiços. Os quadros 1 e 2 a seguir quantificam respectivamente os animais dos grupos: Cães Bulldogs e cães de Raças Definidas Diversas.

Quadro 1 – Raças e número de animais incluídos no grupo Bulldogs

Bulldog Inglês (10), Old English Bulldog (6), American Bulldog (9), Bulldog Campeiro (3)

Fonte: Autora própria.

Quadro 2 – Raças e número de animais incluídos no grupo Raças Definidas Diversas

Akita (4), American Pitt Bull Terrier (6), American Staffordshire Terrier (7), Boxer (3), Bull Terrier (2), Chow Chow (2), Dobermann (3), Fila Brasileiro (2), Husky Siberiano (2), Kuvasz (1), Rottweiler (5), Samoieda (2), Weimaraner (1)

Fonte: Autoria própria.

O risco de transfusão sanguínea incompatível foi determinado através de cálculos relativos ao risco de um animal negativo para o grupo DEA 1 receber sangue de um animal DEA 1 positivo na primeira e na segunda transfusão. As fórmulas usadas para o cálculo do risco após a primeira transfusão e após a segunda transfusão, de acordo com a prevalência encontrada de DEA 1 positivo neste estudo encontram-se nos quadros 3 e 4 segundo Spada et al.⁷.

Quadro 3 – Fórmula para cálculo de risco de sensibilização de cão com sangue não submetido à prova de compatibilidade e tipagem na primeira transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo

$$\frac{(\% \text{ DEA 1 negativo} \times \% \text{ DEA 1 positivo})}{100}$$

Fonte: Spada et al.⁷

Quadro 4 – Fórmula para cálculo de risco do mesmo cão não submetido à prova de compatibilidade e tipagem desenvolver reação hemolítica aguda com a segunda transfusão, de acordo com a prevalência de DEA 1 positivo

$$\frac{(\% \text{ DEA 1 negativo} \times \% \text{ DEA 1 positivo}) \times \% \text{ sensibilização na primeira transfusão}}{10.000}$$

Fonte: Spada et al.⁷.

As frequências do grupo DEA 1 foram comparadas entre as raças, verificando através de teste de qui-quadrado a existência de associação entre as variáveis raça e grupo sanguíneo.

RESULTADOS

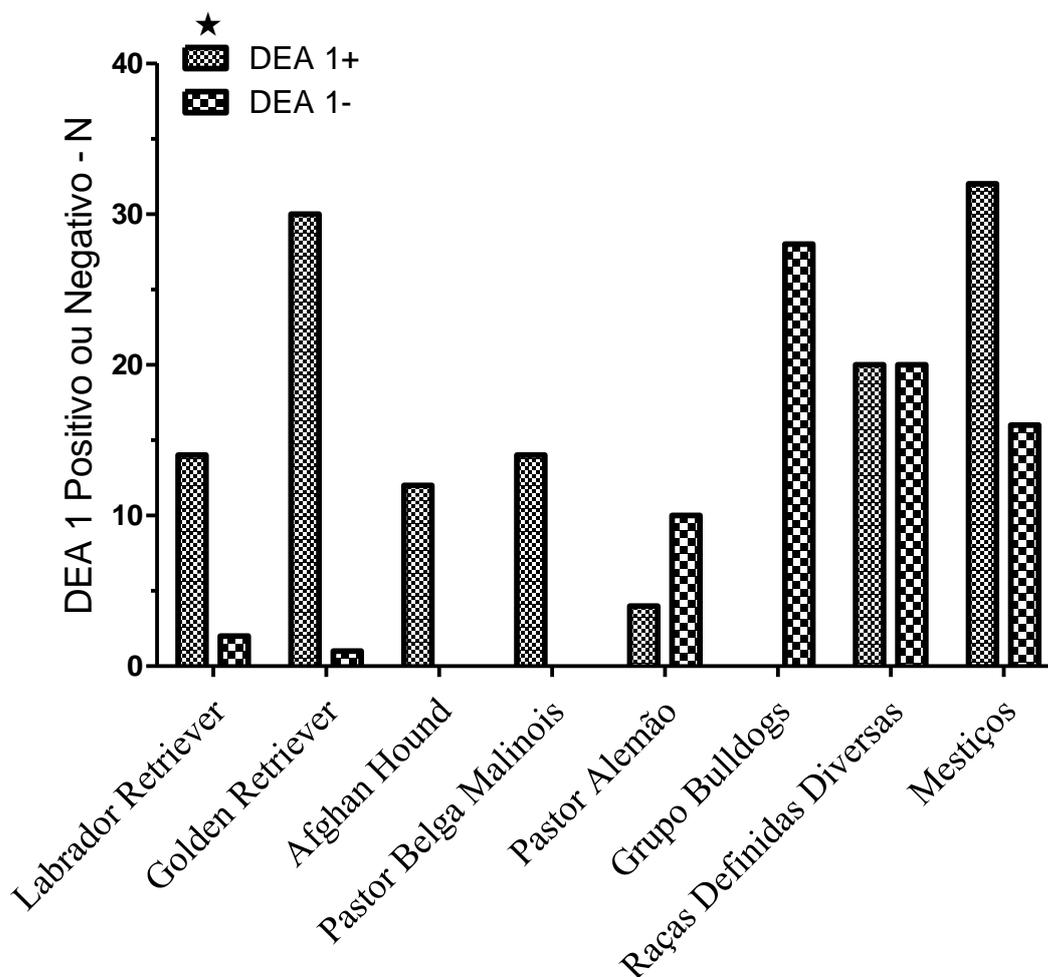
A amostragem deste estudo revelou uma frequência de 62,07% (126/203) do grupo sanguíneo DEA 1. Foi encontrado no grupo de Bulldogs a maior taxa de resultados DEA 1 negativo (28/28; 100%) enquanto que os grupos das raças de Pastor belga de Malinois (14/14; 100%) e Afghan Hound (12/12; 100%), a maior taxa de DEA 1 positivo. A tabela 1 apresenta as frequências nos grupos estudados. E a figura 1 apresenta a comparação entre a positividade e negatividade do grupo DEA 1 entre as raças estudadas.

Tabela 1 – Número total e frequência (%) do grupo sanguíneo DEA 1 dentre as diferentes raças estudadas – Salvador – 2017

Raças	Nº de animais	DEA 1+	%	DEA 1-	%
Labrador Retriever	16	14	87,5%	2	12,50%
Golden Retriever	31	30	96,77%	1	3,23%
Afghan Hound	12	12	100%	0	0%
Pastor Belga Malinois	14	14	100%	0	0%
Pastor Alemão	14	4	28,57%	10	71,43%
Grupo Bulldogs	28	0	0%	28	100%
Raças definidas diversas	40	20	50%	20	50%
Mestiços	48	32	66,67%	16	33,33%
Total	203	126	62,07%	77	37,93%

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 1 - Comparação entre a positividade e negatividade do grupo DEA 1 entre as raças estudadas com dependência estatisticamente positiva (qui-quadrado)



Fonte: Autoria própria

O menor risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo, dentro do grupo dos animais avaliados foi de 0,92% em uma primeira transfusão e o risco do mesmo animal receber sangue incompatível para o grupo DEA 1 na segunda transfusão foi de 0,008%. Quanto ao maior risco de um animal DEA 1 negativo receber sangue DEA 1 positivo, destes animais foi de 69,12% e o risco do mesmo receber sangue incompatível para o DEA 1 foi de 47,77%. Foram feitas análises de possíveis transfusões que poderiam sensibilizar os cães que apresentaram frequência para o grupo DEA 1 negativo de 33,33% a 71,43% com doadores de mais alta frequência do grupo DEA 1 positivo (Tabela 2). Analisou-se o risco entre os animais de mesma classificação por grupos de raças (Tabela 3

e Tabela 4) e o risco dos animais de maior frequência da presença do grupo DEA 1 de receberem sangue do grupo DEA 1 positivo por parte dos animais que apresentaram as menores frequências do grupo DEA 1 positivo (Tabela 5).

Tabela 2 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram taxa entre 33,33 e 71,43% de DEA 1- dentre todos estudados: Pastor Alemão (P. A.), Raças Diversas Definidas (R. D. D.) e mestiços (M.), com doador do grupo das raças de maior taxa de DEA 1+: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.) – Salvador – 2017

	Receptor P.A. -		Receptor R.D.D. -		Receptor M. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador L. +	62,5%	39,06%	43,75%	19,14%	29,16%	8,5%
Doador G.R. +	69,12%	47,77%	48,38%	23,4%	32,25%	10,4%

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 3 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram as menores taxas de DEA 1- dentre todos estudados: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.) – Salvador – 2017

	Receptor L. -		Receptor G.R. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador L. +	10,93%	1,19%	2,82%	0,07%
Doador G.R. +	12,09%	1,46%	3,12%	0,97%

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram taxa de DEA 1- entre 33,33 e 71,43% dentre todos estudados: Raça Pastor Alemão (P. A.), Raças Diversas Definidas (R. D. D.) e mestiços (M.), entre eles próprios – Salvador – 2017

	Receptor P.A. -		Receptor R.D.D. -		Receptor M. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador P.A. +	20,4%	4,16%	14,28%	2,03%	9,52%	0,9%
Doador R.D.D. +	35,71%	12,75%	25%	6,25%	16,66%	2,77%
Doador M. +	47,62%	22,67%	16,66%	2,77%	22,22%	4,93%

Fonte: Datas da pesquisa

Tabela 5 – Risco (%) de um receptor negativo (-) receber sangue positivo (+) para o grupo DEA 1 na 1ª e na 2ª transfusão de acordo com os animais que apresentaram menores taxas de DEA 1- dentre todos estudados: Labrador (L.) e Golden Retriever (G.R.), com os animais com do grupo DEA 1+ entre 28,57 e 66,67% – Salvador – 2017

	Receptor L. -		Receptor G.R. -	
	1ª	2ª	1ª	2ª
Doador P.A. +	3,57%	0,12%	0,92%	0,008%
Doador R.D.D.+	6,25%	0,39%	1,61%	0,02%
Doador M. +	8,33%	0,69%	2,15%	0,46%

Fonte: Dados da pesquisa

DISCUSSÃO

A amostragem deste estudo de 203 cães revelou uma frequência de 62,07% (126/203) em um grupo heterogêneo de raças, aproximando-se ao encontrado por Souza et al.⁸ em São Paulo, de 71% com uma amostragem de 300 cães, também composta por raças diversas. O grupo de Bulldogs apresentou a maior taxa de resultados DEA 1 negativo (100%) enquanto que os grupos das raças de Pastor belga de Malinois e Afghan Hound

apresentaram a maior taxa de DEA 1 positivo (100%). Esses resultados encontrados estão relacionados ao fator genético de dominância como demonstrou Giger⁴ quando obteve em seus estudos com a raça São Bernardo 100% de positividade e a maioria dos cães da raça Golden Retriever, que também foram DEA 1 positivo, o que decorre de fatores como a área geográfica estudada, onde costuma-se não introduzir indivíduos de áreas distantes para reprodução, e também fatores genéticos de cada raça. Isso deve-se à característica autossômica dominante predominante em cães da mesma raça ou consanguinidade⁹⁻¹¹. A alta incidência de um grupo sanguíneo pode também estar relacionada às raças locais, pois essa influência foi evidente nos estudos realizados na Croácia com a raça Sheepdog Croata com incidência do tipo sanguíneo DEA 1.1 com 90% de positividade¹². E realizados também na Croácia com a raça Dálmata, raça oriunda deste país, evidenciando 95% de positividade¹³. Como também, Riond et al.¹⁴ encontraram na Suíça 100% de positividade do tipo DEA 1.1 nas raças Rottweiler e Boiadeiro Bernês e, 75% em cães da raça Labrador e, 77% em cães da raça Golden Retriever. Já em nosso estudo, as raças Labrador e Golden Retriever apresentaram uma incidência de DEA 1 de 87,5% e 96,77% respectivamente. Os cães da raça Pastor Alemão apresentaram a incidência mais baixa do grupo DEA 1, logo após o grupo Bulldogs (100% DEA 1 -), que foi de 28,57% assemelhando-se ao encontrado por Riond et al.¹⁴ com DEA 1.1 que foi 25%. Souza et al.⁸ em São Paulo, encontraram em cães da raça Pastor Alemão 32% de positividade para o grupo DEA 1, enquanto que para o tipo DEA 1.1 20%. E Novais, Santana e Vincentin¹⁵ também em São Paulo, encontraram a mais alta frequência do tipo DEA 1.1 nesta raça, que foi de 36,84%. Ainda no cenário nacional Esteves et al.⁵ no Rio Grande do Sul encontrou uma frequência de 10% para o tipo DEA 1.1. Na Polônia, Milkzac et al.¹⁶ encontraram uma frequência do tipo DEA 1.1 de 15%. A frequência nula (0%) do tipo DEA 1.1 em cães da raça Pastor Alemão foi observada em Portugal por Ferreira, Gopegui e Matos¹⁷ e a segunda menor frequência encontrada foi 8% por Carli et al.¹⁸ testando o grupo DEA 1 na Itália, com a maior amostragem de cães dessa raça (65 animais) dentre os estudos já feitos.

Aqui, os grupos Raças definidas diversas e Mestiços apresentaram respectivamente uma frequência de 50% e 66,67%, aproximando-se do resultado médio em nosso meio, da frequência da amostragem total (62,07%). Comparando a outras localidades, as incidências do DEA 1 positivo em grupos raciais diversos, com percentuais próximos, foram encontrados por Carli et al.¹⁸ na Itália com 62%, Esteves et al.⁵ no Rio Grande do Sul - Brasil com 61 %, Costa¹⁹ em Portugal com 55%, Spada et al.²⁰ na Espanha com 54,6% e

Riond et al.¹⁴ na Suíça com 53%. O percentual encontrado próximo ao grupo aqui descrito como Mestiços foi de 49% nos cães mestiços pesquisados por Riond et al.¹⁴.

As raças caninas em geral apresentam uma diversidade genética reduzida, devido à intensa consanguinidade para preservar e selecionar as características raciais^{11,24}. A alta frequência do grupo DEA 1 em algumas raças desse estudo pode ser explicada por esse fenômeno. Conhecer as frequências entre as raças de cães doadores de sangue gera uma maior eficiência na seleção dos mesmos, sugerindo uma possível identificação dos doadores DEA 1 negativos, como o que foi encontrado no grupo dos Bulldogs e Pastor Alemão.

Os cães DEA 1 positivo podem receber transfusão do próprio tipo, bem como do negativo. Já os animais DEA 1 negativo ao receberem o sangue DEA 1 positivo serão sensibilizados levando à produção de aloanticorpos. Na Medicina Veterinária, em situações emergenciais, os cães doadores de sangue não são muito numerosos, e é essa escassez de doadores que leva à transfusões de sangue dos animais disponíveis sem sequer dar a atenção para seu tipo sanguíneo.

Uma transfusão sanguínea de um animal do grupo DEA 1 positivo para um DEA 1 negativo invariavelmente desenvolverá uma forte produção de aloanticorpos. Pois após uma primeira transfusão desta forma, anticorpos se desenvolvem logo após quatro dias, podendo levar a uma reação transfusional tardia. E mais intensamente, esse receptor poderá desenvolver uma reação hemolítica aguda após uma segunda transfusão com sangue DEA 1 positivo^{4,21}.

O risco de transfusão incompatível aqui estudado variou de 0,92% a 69,12% em uma primeira transfusão e, de 0,008% a 47,77% na segunda transfusão do mesmo animal que receber sangue incompatível. Esses achados assemelham-se aos encontrados por Souza et al.⁸ em São Paulo que variou de 0,6% a 66,6% numa primeira transfusão incompatível e de 0,21% a 65,3% deste mesmo animal numa segunda transfusão incompatível. Novais, Santana, Vincentin¹⁵ também em São Paulo encontraram um risco de incompatibilidade na primeira transfusão de 4,4% e na segunda transfusão do mesmo animal 2,2%, porém sem ter sido feito diferenciação entre as raças estudadas. Pesquisas anteriores revelaram um risco transfusional numa primeira e segunda transfusão que diferem dos achados deste estudo. Ekiz et al.²² encontraram risco de sensibilização na primeira transfusão de 20,5% a 25% dentro da mesma raça e numa segunda transfusão um risco de 12,5% a 14,8%. Ferreira, Gopegui e Matos¹⁷ encontraram um risco de sensibilização na primeira transfusão

em diversas raças de 24,5%. Dhliwayo et al.²³ estudando a frequência do tipo DEA 1.1 em cães de raças mistas encontrou 78% de positividade e um risco de incompatibilidade entre eles na primeira transfusão de 17,2% e numa segunda transfusão incompatível risco de 2,95%. As variações encontradas neste estudo decorreram do fato de que existiram raças onde prevaleceram o grupo DEA 1 e outras apresentaram menor frequência do mesmo. Os menores índices de risco de incompatibilidade ocorreram nas prospecções de transfusões entre indivíduos da mesma raça, que foram os das raças Golden Retriever e Labrador. Os receptores destas raças aqui estudados foram os menos susceptíveis ao risco de transfusões incompatíveis, tanto numa primeira como numa segunda transfusão, devido ao fato deles serem os representantes da maior frequência do grupo DEA 1 fora das raças que apresentaram 100% de positividade ao grupo DEA 1. A variação quando eles eram receptores de doadores da mesma raça deles foi de 2,82 a 12,09 na primeira transfusão e de 0,07% a 1,46% na segunda transfusão. E se fossem receptores de cães que variaram a frequência do grupo DEA 1 de 28,57% a 66,67% (Pastor Alemão, Raças Definidas Diversas e Mestiços) o risco transfusional numa primeira transfusão variou de 0,92% a 8,33% e numa segunda transfusão variou de 0,008% a 0,69%. E, as maiores taxas de risco de transfusões incompatíveis entre os animais aqui estudados foram dos que variaram a frequência do grupo DEA 1 de 28,57% a 66,67% (Pastor Alemão, Raças Definidas Diversas e Mestiços), se recebessem transfusão dos animais das raças Golden Retriever e Labrador, de 29,16% a 69,12% numa primeira transfusão e de 8,5% a 47,77% numa segunda transfusão. Para as raças Afghan Hound e Pastor Belga de Malinois não foram feitas prospecções de risco transfusional por estarem com 100% de positividade, o que geraria sensibilização já conhecida em indivíduos DEA 1 negativos e nenhum risco em transfusões entre eles pelo grupo DEA 1. O mesmo foi decidido para os animais 100% negativos, onde não geraria nenhum risco transfusional para indivíduos do grupo DEA 1 negativo ou positivo. Mesa-Sanchez, Gopegui-Fernandez, Granados-Machuca²⁴ estudando a prevalência do tipo DEA 1.1 em cães da raça Greyhound, na Espanha, encontraram um risco potencial de sensibilização dentro da mesma raça de 22,9% após a primeira transfusão sanguínea quando não tipados nem feita a prova de reação cruzada. De seus 206 cães estudados 53,4% foram positivos ao tipo DEA 1.1 e destes 51,7% eram da raça Greyhound, pois há uma tendência em bancos de sangue veterinários de países em que sua criação é fomentada, em utilizar essa raça como potencialmente doadora de sangue. Spada et al.²⁰ ao estudarem 205 cães desta raça encontraram 54,6% de positividade para o grupo

DEA 1. A divergência genética nos ancestrais dessa raça e os diferentes graus de consanguinidade entre as diversas regiões geográficas podem explicar as diferenças encontradas na prevalência do tipo DEA 1.1, onde há predomínio desses animais serem DEA 1.1 negativos²⁴. Já em nosso estudo, risco transfusional próximo foi encontrado nos grupos Raças Diversas Definidas (66,67%) e Mestiços (50%), sendo que em nosso estudo não houve nenhum cão dessa raça. Segundo Giger⁴ a tipagem para o grupo DEA 1 e demais tipos sanguíneos não elimina a necessidade de ser feita a prova de reação cruzada antes da primeira transfusão, pois ela pode identificar incompatibilidades contra alguns tipos sanguíneos desconhecidos ainda hoje e, além das reações transfusionais mais raras serem as contra os tipos sanguíneos DEA 4 e Dal, pode-se ter um outro tipo clinicamente importante a ser descoberto no futuro. Os resultados dos artigos aqui citados, juntamente com os achados do presente estudo, reforçam a necessidade de seleção dos doadores de sangue canino para o grupo DEA 1 positivo e negativo, bem como a prova de reação cruzada antes de qualquer transfusão sanguínea como prática clínica e laboratorial para que a terapia transfusional seja segura para o receptor, especialmente para os cães que receberão mais de uma transfusão sanguínea.

CONCLUSÕES

A frequência do grupo DEA 1 variou entre as raças estudadas de 0% a 100%, devido ao fator autossômico dominante desse grupo em cada uma, porém com uma positividade média de 62,07%;

O risco de transfusões sanguíneas incompatíveis, com base na frequência do grupo DEA 1, varia de acordo com as raças dos doadores e receptores, porém este pode ser anulado se forem realizados os testes para tipagem sanguínea junto com a prova de reação cruzada para compatibilidade.

REFERÊNCIAS

1. Lemos DAS, Novais AA, Nogueira AFS. Avaliação laboratorial de cães após transfusão de sangue total. *Vet e Zoot.* 2010; 17(supl. 1): 67.
2. Tocci LJ, Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg and Critical Care.* 2009; 19: 66-73.
3. Dodds WJ. Practical Veterinary Transfusion Medicine. In: *Anais do World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 2005.* Mexico: World Small Animal Veterinary Association; 2005. p. 1-4.
4. Giger U. Blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility. In: Bonagura JD, Twedt DC, (eds.) *Kirk's Current Veterinary Therapy XV.* Philadelphia, United States: Saunders, Elsevier Inc; 2014. p. 143-8.
5. Esteves VS, Lacerda LA, Lasta CS, Pedralli V, González FHD. Frequencies of DEA blood types in a purebred canine blood donor population in Porto Alegre, R.S., Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2011 Fev; 31(2): 178-81.
6. Vap LM. An update on blood typing, crossmatching, and doing no harm in transfusion dogs and cats. *Vet. Med.* 2010; 1: 447-53.
7. Spada E, Proverbio D, Florez LMV, Serna BSG, Chamizo MRP, Baggiani L, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4 and 7 in Podenco Ibicenco (Ibizan Hounds) from Ibiza Island. *Vet Med Internat.* 2017; 2016: 1-5.
8. Souza SL, Stopigli AJ, Gomes SGR, Ulata SK, Moroz LR, Fantoni DT. Estudo da frequência dos antígenos eritrocitários caninos 1, 1.1 e 7 e risco de transfusão incompatível em cães de diferentes raças e mestiços da região metropolitana da cidade de São Paulo-SP, Brasil. *Braz J V Res Anim Sci.* 2014; 51(4): 316-23.
9. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev.* 2004 Apr 2; 18: 117-26.
10. Iazbik MC, O'donnell M, Marin L, Zaldivar S, Hudson D, Couto CG. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing greyhounds. *Vet Clin Pathol.* 2010; 39(4): 433-5.
11. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analysed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med.* 2014; 28(2): 592-8.
12. Zubcic D, Bedrica L, Gracner D, Harapin I, Fury M, Jeremic J. Blood groups, haematology and clinicochemical indicators in indigenous breeds of dog. I. Croatian sheepdog. *Veterinarski Arhiv.* 2008; 78(2): 141-7.

13. Gracner D, Bedrica L, Potocnjak D, Sakar D, Samardzija M, Capak H, et al. Blood groups and haematology indicators in Croatian indigenous breeds of dog. II Dalmatian dog. *Veterinarski Arhiv*. 2011; 81(1): 111-7.
14. Riond B, Schuler E, Rogg E, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in dogs in Switzerland evaluated with the gel column technique. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2011; 153(8): 369-74.
15. Novais AA, Santana AE, Vincentin LA. Prevalência do grupo sanguíneo AEC 1 (subgrupos 1.1 e 1.2) em cães (*canis familiaris*, Linnaeus, 1758) criados no Brasil. *Braz Vet J Anim Sci*. 1999; 36(1): 1-8.
16. Milczak A, Abramowicz B, Madany J, Winiarczyk D, Wrzesniewska K, Bochynska D, et al. Frequency of DEA 1.1 antigen in German shepherds. *Scient Messen of Lviv Nation Univ Vet Med Biotechnol*. 2016; 18(3): 221-4.
17. Ferreira RRF, Gopegui RR, Matos AJF. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Vet Clin Pathol*. 2011; 40(2): 198-200.
18. Carli E, Carminato A, Ravagnan S, Capello K, Antognoni MT, Miglio A, et al. Frequency of DEA 1 antigen in 1037 mongrel and purebred dogs in Italy. *BMC Vet Res*. 2017; 13(364): 1-6.
19. Costa MAMM. Aplicação da citometria de fluxo em medicina transfusional de canídeos [dissertação]. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa; 2014.
20. Spada E, Proverbio D, Florez LMV, Chamizo MRP, Perego R, De Giorgi GB, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4 and 7 in galgos (Spanish Greyhounds). *J Vet Diag Invest*. 2015; 27(4): 558-61.
21. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Anim J Vet Res*. 2005; 66(8): 1386-92.
22. Ekiz EE, Arslan M, Ozcan M, Gultekin GI, Gulay OY, Kirmizibayrak T, et al. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 in 4 breeds native to different areas in Turkey. *Vet Clin Pathol*. 2011; 40(4): 518-23.
23. Dhliwayo S, Makonese TA, Whittall B, Chikerema SM, Pfukenyl DM, Tivapasi MT. A study on the prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 and detection of canine Babesia by polymerase chain reaction from apparently healthy dogs in a selected rural community in Zimbabwe. *J South African Vet Assoc*. 2016; 87(1):1-5.
24. Mesa-Sanchez I, Gopegui -Fernandez RR, Granados-Machuca MM. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish Greyhounds). *Vet Record*. 2014; 10: 1-3.



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>