

Como citar este artigo:

Santis LP, Garcia PC, Secco VN, Ferreira RR, Deffune E. Aplicabilidade de soluções de papaína em imuno-hematologia. *einstein* (São Paulo). 2019;17(2):eAO4328. http://dx.doi.org/10.31744/einstein_journal/2019AO4328

Autor correspondente:

Laís Priscila De Santis
Laboratório de Engenharia Celular,
Hemocentro de Botucatu,
Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina
de Botucatu, Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho"
Avenida Professor Mário Rubens
Guimarães Montenegro, s/n
CEP: 18618-687 – Botucatu, SP, Brasil
Tel.: (14) 3811-6041, ramal 242
E-mail: laisdesantis@gmail.com

Data de submissão:

5/11/2017

Data de aceite:

21/8/2018

Conflitos de interesse:

não há.

Copyright 2019

Esta obra está licenciada sob
uma Licença *Creative Commons*
Atribuição 4.0 Internacional.

ARTIGO ORIGINAL

Aplicabilidade de soluções de papaína em imuno-hematologia

Applicability of papain solutions in immunohematology

Laís Priscila De Santis¹, Patrícia Carvalho Garcia¹, Valéria Nogueira Dias Paes Secco¹,
Rosana Rossi Ferreira², Elenice Deffune¹

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Bauru, SP, Brasil.

DOI: 10.31744/einstein_journal/2019AO4328

RESUMO

Objetivo: Comparar a atividade enzimática de diferentes apresentações de solução de papaína para validação de preparados *in-house*. **Métodos:** Foram preparadas duas soluções de papaína, e a terceira apresentação tratou-se de uma solução comercial. Os testes comparativos das reações enzimáticas foram realizados com amostras de hemácias tipadas como RhD fraco. **Resultados:** As soluções de papaína preparadas *in-house* apresentaram reatividade enzimática semelhante e estatisticamente sem diferenças em comparação com a atividade enzimática da solução comercial. **Conclusão:** Avaliando-se a relação entre custo e benefício, as soluções de papaína preparadas *in-house* são economicamente vantajosas, podendo ser incorporadas às rotinas imuno-hematológicas como forma de enfrentamento em períodos de crise financeira e em políticas de retenção de gastos.

Descritores: Antígenos; Alergia e imunologia; Papaína; Enzimas

ABSTRACT

Objective: To compare the enzyme activity of different presentations of papain solution to validate in-house preparations. **Methods:** Two papain solutions were prepared, and the third presentation was a commercial solution. Tests were carried out with samples of red cells typed as weak RhD. **Results:** In-house prepared papain solutions showed similar enzyme reactivity, and statistically no differences compared to the enzyme activity of the commercial solution. **Conclusion:** Evaluating the cost-benefit ratio, the in-house prepared papain solutions present more economic advantages, and can be incorporated into immunohematological routines as a way to cope with periods of financial crisis and cost-containment policies.

Keywords: Antigens; Allergy and immunology; Papain; Enzymes

INTRODUÇÃO

A membrana dos glóbulos vermelhos é composta por uma variedade de proteínas que se ancoram ou atravessam a bicamada lipídica. Muitas são polimórficas e definem vários grupos sanguíneos pela diferenciação dos antígenos ligados a elas.⁽¹⁻³⁾ De acordo com a *International Society of Blood Transfusion* (ISBT), os antígenos que caracterizam os grupos sanguíneos se enquadram em uma das quatro classificações. Atualmente, existem 36 sistemas de grupos sanguíneos, 38 antígenos que ainda não foram atribuídos a nenhum sistema, 15 antígenos distribuídos em 6 coleções, 17 antígenos de baixa frequência e 6 antígenos de alta frequência.⁽⁴⁻⁸⁾

Diante do importante polimorfismo genético dos grupos sanguíneos, da heterogeneidade de apresentações dos antígenos sobre a membrana das hemácias e da complexidade de cada caso para identificar anticorpos irregulares de doadores e receptores de sangue, a imuno-hematologia recorre a insumos laboratoriais que reconheçam estruturas específicas de membrana ou técnicas que aumentem a aglutinação das hemácias, ou alterem/eliminam a expressão de antígenos ou estruturas proteicas das hemácias.⁽⁹⁾ A união dessas técnicas auxilia na correta identificação dos anticorpos em exames de rotina imuno-hematológica, ou na identificação de antígenos, raros ou não, na membrana das hemácias de doadores e receptores. Dentre estas técnicas, pode-se listar o uso de anticorpos monoclonais, reagentes como

ditiotreitol (DTT), difosfato de cloroquina, soluções de baixa força iônica (LISS - *low ionic strength solutions*) e enzimas proteolíticas.⁽⁹⁾

Ação das enzimas proteolíticas sobre a membrana das hemácias

A atividade de cada reagente ou enzima proteolítica é diferente sobre cada antígeno (Tabela 1). Levando em consideração o fato da expressão de um antígeno de grupo sanguíneo ser determinada por sua estrutura bioquímica e pela posição relativa à bicamada lipídica, frente a um tratamento enzimático prévio de hemácias, por exemplo, alguns antígenos sensíveis podem ser destruídos ou se tornar pouco reativos, ou, ainda, podem passar a ter a interação com anticorpos específicos mais intensa.⁽¹⁰⁾

Tabela 1. Efeitos das enzimas e soluções químicas sobre alguns dos principais antígenos e proteínas da membrana eritrocitária

Antígenos/proteínas	Enzimas/soluções químicas					
	Papaína	Bromelina	Tripsina	Alfaquimotripsina	Ficina	DTT
A	+	+	+	+	+	0
B	+	+	+	+	+	0
H	+	+	+	+	+	0
D	+	+	+	+	+	0
C	+	+	+	+	+	0
C	+	+	+	+	+	0
E	+	+	+	+	+	0
E	+	+	+	+	+	0
K	0	0	0*	0*	0	-
K	0	0	0*	0*	0	-
Fy ^a	-	-	0	-	-	0
Fy ^b	-	-	0	-	-	0
Fy ^c	-	-	0	-	-	0
Fy ^d	-	-	0	-	-	0
Jk ^a	+	+	+	+	+	0
Jk ^b	+	+	+	+	+	0
Jk ^c	+	+	+	+	+	0
Le ^a	+	+	+	+	+	0
Le ^b	+	+	+	+	+	0
M	-	-	-	0	-	0
N	-	-	0	-/0	-	0
S	-/0	-	0	-	-/0	0
S	-/0	-	0	-	-/0	0
Dj ^a	0	+	0	0	0	0
Dj ^b	0	+	0	0	0	0
P	+	+	+		+	0
I	+	+	+	+	+	0
Lu ^a	0	0	-	-	0	W/-
Lu ^b	0	0	-	-	0	W/-
Do ^a	+	+	-	W	+	-
Do ^b	+	+	-	W	+	-
Vel	0	0	0	0	0	0/-

Fonte: Antibody detection, identification, and compatibility testing — introduction. Method 3-11. Evaluating enzyme-treated red cells. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. American Association of Blood Banks (AABB). Technical Manual. 19th ed. EUA: AABB; 2017;⁽¹¹⁾ Girello AL, Kuhn TI. Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares. In: Girello AL, Kuhn TI. Fundamentos da Imuno-hematologia eritrocitária. 3a ed. São Paulo: Senac; 2011. p. 101-26;⁽¹²⁾ Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid ME. Fundamentos de imuno-hematologia. São Paulo: Atheneu; 2015. Sistemas de grupos sanguíneos com base em proteínas de passagem única. p. 45-15.⁽¹³⁾

* Antígenos do sistema Kell são sensíveis a tratamento com mistura de tripsina e alfaquimotripsina. + antígenos com reatividade intensificada; 0: antígenos que não sofrem interferência; - antígenos sensíveis, que podem ser destruídos; -/0 alguns antígenos são destruídos ou não sofrem interferência.

DTT: ditiotreitol; W: antígenos enfraquecidos.

Os grupos carboxílicos das sialoglicoproteínas integrantes da membrana das hemácias são os principais responsáveis pela carga negativa na superfície da hemácia e, quando em solução, criam um potencial elétrico (potencial zeta).⁽¹⁴⁾ O tratamento enzimático com papaína (proveniente do mamão), bromelina (proveniente do abacaxi), tripsina, alfaquimiotripsina (ambas de origem animal) ou ficina (proveniente do figo), além de outras técnicas, altera a eletronegatividade e permite que os glóbulos vermelhos se tornem aglutináveis.^(13,14) O uso de enzimas proteolíticas é uma ferramenta útil para caracterizar um antígeno de membrana da hemácia, pois têm a ação de fragmentar ligações peptídicas específicas entre os aminoácidos que compõem as proteínas.^(13,14)

Existem protocolos bem definidos que permitem aos serviços de imunohematologia o preparo *in-house* dos reagentes e soluções enzimáticas para aplicação na rotina laboratorial. A papaína, por exemplo, enzima muito utilizada em bancada e que exerce importante atividade sobre um amplo grupo de antígenos de membrana, pode ter a solução preparada no próprio serviço laboratorial, mediante a consulta de protocolos, como o apresentado pelo Manual Técnico da *American Association of Blood Banks (AABB)*.⁽¹⁵⁾ Para as soluções de papaína preparadas *in-house*, deve-se padronizar seu uso (tempo de incubação com as hemácias, concentração, volume a ser utilizado, dentre outros parâmetros), bem como validar a atividade enzimática em comparação a produtos comerciais semelhantes. Os custos de aquisição e preparo, e o tempo dispensado na manipulação também devem ser considerados em toda a avaliação.

Como consequência da diversidade fenotípica das hemácias humanas, dos desafios laboratoriais para identificação de antígenos e anticorpos eritrocitários de doadores de sangue e pacientes, e da constante necessidade de uso de insumos laboratoriais de valores mais acessíveis e com equivalente desempenho, este estudo propôs a validação de preparos *in house* de soluções de papaína para aplicação na rotina laboratorial imunohematológica.

OBJETIVO

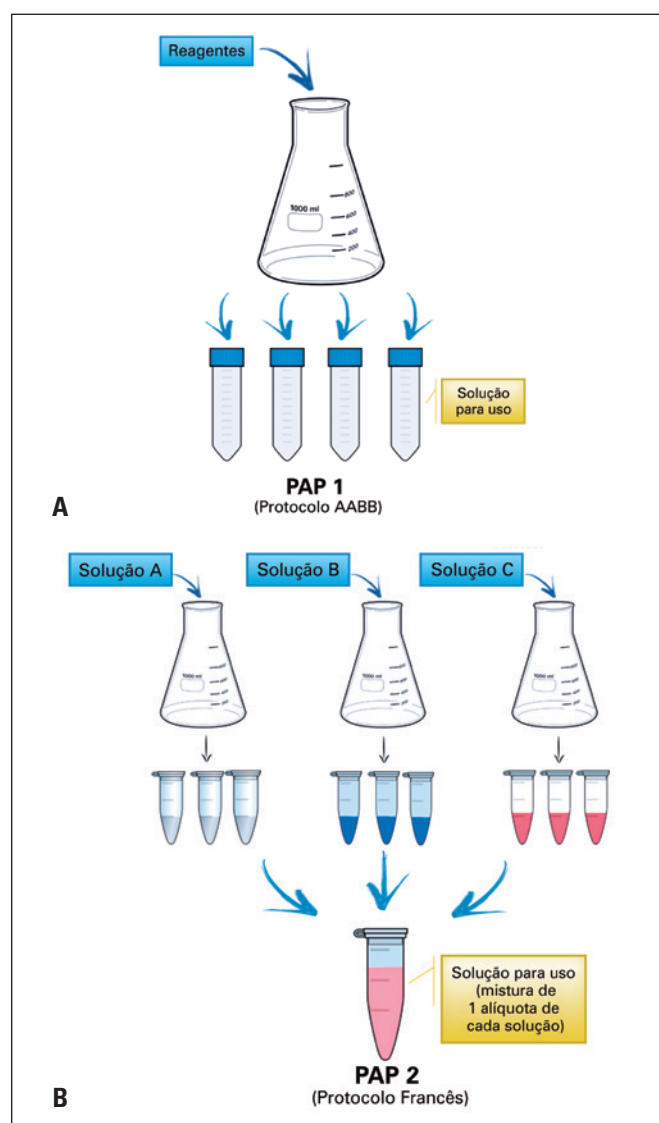
Validar os preparos *in-house* de soluções de papaína para aplicação na rotina laboratorial imunohematológica.

MÉTODOS

Preparo das soluções e padronização do tempo de incubação

As soluções da enzima papaína utilizadas foram um produto comercial ID-Papain, Bio-Rad™ (PAP3) e duas

preparadas *in house* com base em dois protocolos distintos. A solução de papaína a 1% (PAP1) foi preparada conforme descrito no Manual Técnico da AABB.⁽¹⁵⁾ A PAP1 teve a enzima ativada no momento de sua preparação, sendo mantida congelada, e sua utilização pôde ser realizada após seu descongelamento. O método de preparo da solução de papaína a 0,125% (PAP2) baseou-se em protocolos franceses. São preparadas três soluções distintas e a ativação da enzima é realizada no momento de seu uso, após o descongelamento e mistura de um alíquota de cada solução. A figura 1 apresenta o esquema do preparo das duas soluções de papaína.



Fonte: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRSh37a69QbHIWx8rjc_P2y49-6f-1l1mCHtyUp982kkzSgSVBNjibSyw; <http://www.cikler.com/clipart-closed-ependorf-tube-white.html>; <http://www.cikler.com/clipart-centrifuge-falcon-tube.html#>; <https://images.comunidades.net/ond/ondecomeremcamacari/setabaixo.png>; https://3.bp.blogspot.com/-1uGF8vCHtUU/WMp3XT8mwBI/AAAAAAAAUx8/5cqmpc3xeQkx9-3136eLuhFP4hQmcsYQCLcB/s1600/seta_red.png

(A) Preparo da PAP1, segundo protocolo da *American Association of Blood Banks*; (B) preparo da PAP2, segundo protocolos franceses.

Figura 1. Esquemática do preparo das soluções de papaína

Para a padronização do tempo de incubação das hemácias com papaína, foi utilizada uma amostra de hemácias RhD positivo fraco, obtida no Serviço de Imuno-Hematologia do Doador do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. A escolha desse fenótipo se deu pelo fato de as reações de aglutinação envolvendo antígenos do grupo sanguíneo Rh serem intensificadas após o tratamento das hemácias com papaína. A amostra de sangue foi lavada por três vezes em solução salina isotônica (SSI) 0,9%; foi preparada uma suspensão a 5% em SSI; e foi realizado, em tubo, um teste prévio para verificação da intensidade de aglutinação com anticorpo anti-D na amostra não tratada. A análise de todas as reações de aglutinação realizadas neste estudo foi visual, observando-se a consistência dos grumos formados pela aglutinação das hemácias, segundo o critério determinado por Race et al.,⁽¹⁶⁾ modificado por Marsh.⁽¹⁷⁾

A padronização do tempo de incubação foi realizada, volume a volume, de PAP1 e PAP2 com o concentrado de hemácias RhD fraco lavadas, seguida de incubação em banho-maria a 37°C. Cada tubo de cada solução de papaína+hemácias foi incubado durante tempos diferentes (3, 5, 7 e 10 minutos). Após a incubação, a solução foi lavada por três vezes com SSI, e foram realizados testes com anti-D. Para testes comparativos, preparou-se uma amostra das hemácias em solução a 5% em SSI, e procedeu-se ao tratamento com a papaína comercial, seguindo orientações do fabricante. Após o tratamento das hemácias, verificou-se a reação utilizando anticorpo monoclonal anti-D.

Testes comparativos da atividade enzimática das soluções de papaína

Para verificar se as soluções de papaína possuíam a mesma atividade enzimática sobre a membrana das hemácias, testes entre as soluções de papaína foram realizados utilizando amostras de hemácias RhD fraco (n=6). As hemácias foram lavadas por três vezes com SSI, tendo sido realizadas incubações das hemácias com PAP1 e PAP2, conforme os parâmetros da padronização, e PAP3, seguindo orientações do fabricante, e posterior teste com anticorpo anti-D nas hemácias tratadas e não tratadas. A partir da classificação das intensidades de aglutinação, foi realizada análise estatística por teste *t* de Student, para avaliar se a atividade enzimática de cada preparo de papaína possui diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) e pode ter suas atividades equiparadas.

O artigo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), número do parecer 1.622.156, CAAE: 56511116.5.0000.5411.

RESULTADOS

Nas reações observadas na padronização do tempo de incubação, a intensidade de aglutinação das hemácias RhD fraco que não sofreram tratamento enzimático foi menor do que a das hemácias que foram previamente tratadas com a enzima (Tabela 2). Em análise decrescente para definir melhor tratamento neste teste, analisando a solidez e a intensidade das aglutinações, pôde-se estabelecer que PAP3 > PAP2 > PAP1.

Tabela 2. Avaliação do desempenho das três diferentes apresentações de papaína para uso em imuno-hematologia nos testes de padronização do tempo de incubação

Tipo de tratamento	Intensidade da reação				Escore			
	Tempo				3'	5'	7'	10'
	3'	5'	7'	10'				
Sem tratamento	1+2+				5/8			
PAP1	3+	3+*	2+/3+	2+/3+	10	10	8/10	8/10
PAP2	3+	3+	3+/4+*	2+/3+	10	10	10/12	8/10
PAP3	4+				12			

Intensidade da aglutinação classificada em cruzes e escore. * Botão mais sólido comparando com as demais (melhor tempo para a amostra).

PAP1: protocolo American Association of Blood Banks; PAP2: protocolo francês (três alíquotas com ativação da enzima no momento de seu uso); PAP3: comercial Bio-Rad™.

O tempo ideal de incubação entre a solução de papaína e as hemácias, à temperatura de 37°C, para tratamento de hemácias com PAP1, foi de 5 minutos, enquanto que, para a PAP2 o tempo ideal foi de 7 minutos.

Para a verificação da equivalência de atividade enzimática entre PAP1, PAP2 e PAP3, os tratamentos realizados em seis amostras de hemácias RhD fraco, com as três apresentações de solução de papaína, foram considerados e resultaram em reações que foram consideradas equivalentes, como podem ser observadas na figura 2.

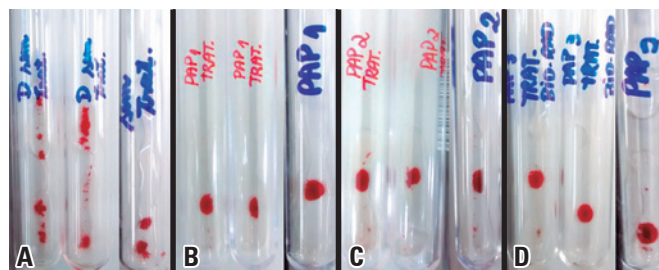


Figura 2. Algumas reações de aglutinação observadas com hemácias RhD fraco não tratadas e tratadas com diferentes soluções de papaína. (A) reatividade de amostras RhD fraco sem tratamento; (B) reatividade de amostras RhD fraco tratadas com PAP1; (C) reatividade de amostras RhD fraco tratadas com PAP2; (D) reatividade de amostras RhD fraco tratadas com PAP3

A análise estatística dos resultados por teste *t* de Student mostrou que existe diferença estatisticamente significativa entre as amostras que não sofreram tratamento enzimático, e as que foram tratadas com qualquer uma das apresentações de papaína (Tabela 3). No entanto, entre as papaínas produzidas *in-house* (PAP1 e PAP2) e a papaína comercial, não existem diferenças estatísticas, demonstrando que, frente ao antígeno D da membrana das hemácias, a atividade enzimática de qualquer uma das apresentações de papaína tem o mesmo desempenho.

A tabela 4 apresenta informações sobre cada preparo de papaína. O levantamento dos custos de preparo e aquisição levou em consideração valores dos reagentes e horas de trabalho de um biomédico. Levou-se em consideração um teste de coluna de aglutinação (gel-teste), no qual foram preparadas suspensões de hemácias a 1% e que seria necessário um volume de solução de papaína proporcional à essa quantidade de hemácias para tratá-las com a enzima.

Tabela 3. Análise estatística de acordo com o teste *t* de Student entre os tratamentos enzimáticos

Parâmetros	Sem tratamento versus PAP1	Sem tratamento versus PAP2	Sem tratamento versus PAP3	PAP1 Versus PAP2	PAP1 Versus PAP3	PAP2 Versus PAP3
Valor de p	0,0009	0,0027	0,0121	0,3632	0,2353	0,2480

Tabela 4. Características de cada apresentação de solução de papaína

Características	Tipo de apresentação		
Papaína	PAP1	PAP2	PAP3
Apresentação	Preparação de solução a partir da enzima liofilizada. Pronta para uso após descongelamento	Preparação de soluções tampão e preparo de alíquotas I, II e III. Para uso, é misturada cada alíquota após descongelamento	Líquida – pronta para uso
Estocagem	-80°C	-80°C	+4°C
Tempo de preparo	2 horas	1 hora	-
Validade	5 anos	5 anos	7 semanas
Equipamentos necessários para o preparo	Centrífuga, agitador, banho-maria, freezer -80°C	Agitador, freezer -80°C	-
Custos	200mL=R\$ 126,00 10mL=R\$ 6,30	400mL=R\$ 355,47 10mL=R\$ 8,89	10mL=R\$ 81,40*

* Consulta aos dados de compras do Hemocentro de Botucatu (SP) em janeiro de 2017.

DISCUSSÃO

Cada protocolo de preparação apresenta características distintas, que podem ser interpretadas como vantagens e/ou desvantagens em cada metodologia.

Com relação à durabilidade das soluções, a solução PAP3 possui prazo curto de validade. O *data sheet* do produto informa que a validade, a partir da data de fabricação, é de 7 semanas, pois é apresentado na forma líquida. Este fato pode ser considerado um limitante para o uso deste reagente, pois exige compra programada e entrega mensal. Já as soluções PAP1 e PAP2, armazenadas a -80°C, mantêm reatividade eficiente por até 5 anos.

A legislação vigente permite que os serviços de hemoterapia produzam reagentes para uso em bancada. Segundo o Art. 21 da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, Anexo IV, “É permitida ao serviço de hemoterapia a produção e utilização de reagentes para testes imuno-hematológicos, desde que exista autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, conforme dispõe o art. 6º da Lei nº 10.205, de 2001”.⁽¹⁸⁾

A lei 10.205⁽¹⁹⁾ regulamenta o parágrafo 4º do Art. 199 da Constituição Federal e dispõe em seu sexto artigo que:

“Todos os materiais e substâncias ou correlatos que entrem diretamente em contato com o sangue coletado para fins transfusionais, bem como os reagentes e insumos para laboratório utilizados para o cumprimento das Normas Técnicas, devem ser registrados ou autorizados pelo Órgão de Vigilância Sanitária competente do Ministério da Saúde (Presidência da República, 2001).

A análise dos custos no preparo das soluções PAP1 e PAP2 revela que seria viável a implantação dessas soluções na rotina laboratorial, uma vez que 10mL da PAP3 apresenta alto custo para aquisição, comparado com os custos de 10mL das soluções de PAP1 ou PAP2. Deve-se, no entanto, levar em consideração o tempo necessário para preparo da enzima para uso em bancada, uma vez que o profissional do laboratório deve dedicar-se a essa atividade, além de requerer, por parte do serviço, autorização dos órgãos de Vigilância Sanitária, tomando sempre por objetivo a qualidade máxima dos reagentes, insumos e serviços prestados.

CONCLUSÃO

A existência de protocolos para preparação *in house* de insumos possibilita diminuição dos gastos do serviço de saúde, em especial os que prestam assistência na área

da imuno-hematologia e garantem a mesma qualidade que aqueles comercialmente disponíveis, com respaldo nos marcos regulatórios. O tempo de preparo das soluções de papaína foi, em média, de 2 horas de trabalho para produção de até 400mL da solução, a qual tinha prazo de validade de 5 anos. Além disso, a partir dos testes realizados, com reação ao antígeno D, pode-se afirmar que as papaínas *home made* têm a mesma eficiência enzimática, podendo ser adotada na rotina laboratorial com segurança e garantia de qualidade.

A diminuição dos custos também pode ser alcançada com a montagem *in house* de painéis de hemácias fenotipadas para pesquisa e identificação de anticorpos irregulares, testes rotineiros dos laboratórios de imuno-hematologia e hemoterapia.

Portanto, a diminuição dos custos dos testes laboratoriais depende da iniciativa de cada serviço em validar a possível troca com métodos estatísticos e avaliar custos e benefícios da troca do produto comercial para um produto preparado *in house*. Os valores economizados poderiam ser aplicados na aquisição de novos equipamentos, implantação de novos ensaios, capacitação técnica e, principalmente, reverter essa melhora para a população que depende do serviço público de saúde.

AGRADECIMENTOS

Às equipes da Agência Transfusional e do Laboratório de Imuno-Hematologia do Doador e Controle de Qualidade do Hemocentro de Botucatu, pelo auxílio técnico prestado.

INFORMAÇÃO DOS AUTORES

Santis LP: <http://orcid.org/0000-0001-7636-6808>

Garcia PC: <http://orcid.org/0000-0001-8826-3646>

Secco VN: <http://orcid.org/0000-0003-0850-8573>

Ferreira RR: <http://orcid.org/0000-0001-8349-8841>

Deffune E: <http://orcid.org/0000-0002-0533-3248>

REFERÊNCIAS

- Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008;112(10):3939-48. Review.
- Murador P, Deffune E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(2):168-78. Review.
- Lux SE 4th. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *Blood*. 2016;127(2):187-99. Review.
- International Society of Blood Transfusion (ISBT). Table of blood group antigens [Internet]. Amsterdam: ISBT; 2014 [cited 2016 Nov 2]. Available from: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20antigens%20within%20systems%20v4.0%20141124.pdf
- International Society of Blood Transfusion (ISBT). Table of blood group collections [Internet]. Amsterdam: ISBT; 2014 [cited 2016 Nov 2]. Available from: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20collections%20v4.0%20141120.pdf
- International Society of Blood Transfusion (ISBT). Table of low incidence antigens [Internet]. Amsterdam: ISBT; 2014 [cited 2016 Nov 2]. Available from: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20low%20incidence%20antigens%20700%20series%20v4.0%20141120.pdf
- International Society of Blood Transfusion (ISBT). Table of High Incidence Antigens [901 Series] [Internet]. Amsterdam: ISBT; 2014 [cited 2016 Nov 2]. Available from: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Table_of_high_incidence_antigens_901_series_v5.0_150828.pdf
- Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid ME. Fundamentos de imuno-hematologia. São Paulo: Atheneu; 2015. Anticorpos, antígenos e sistemas. p. 1-24.
- Lewis VN, Martin S. Fundamentos de imuno-hematologia. In: Harmening DM. Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão. 6a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2015. p. 37-70.
- Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid ME. Técnicas para detectar antígenos, anticorpos e suas aplicações. In: Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid ME. Fundamentos de imuno-hematologia. São Paulo: Atheneu; 2015. p. 137-53.
- Antibody detection, identification, and compatibility testing — introduction. Method 3-11. Evaluating enzyme-treated red cells. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. American Association of Blood Banks (AABB). Technical Manual. 19th ed. EUA: AABB; 2017.
- Girello AL, Kuhn TI. Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares. In: Girello AL, Kuhn TI. Fundamentos da Imuno-hematologia eritrocitária. 3a ed. São Paulo: Senac; 2011. p.101-26.
- Castilho L, Pellegrino Júnior J, Reid ME. Fundamentos de imuno-hematologia. São Paulo: Atheneu; 2015. Sistemas de grupos sanguíneos com base em proteínas de passagem única. p. 45-15.
- Salmazi KIL. Bases imuno-hematológicas. In: Girello AL, Kuhn TI. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. 3a ed. São Paulo: Senac; 2011. p. 21-58.
- Antibody detection, identification, and compatibility testing — introduction. Method 3-9. Preparing papain enzyme stock, 1% w/v. In: Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM, editors. American Association of Blood Banks (AABB). Technical Manual. 19th ed. EUA: AABB; 2017.
- Race RR, Sanger R. Blood groups in man. 3rd ed. Oxford: Blackwell; 1958. p. 249-50.
- Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion*. 1972;12(5):352-3.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de Setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde [Internet]. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2017 [citado 2018 Ago 20]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html
- Brasil. Presidência da República. Subchefia para assuntos jurídicos. Lei nº 10.205, de 21 de Março de 2001. Regulamenta o § 4o do art. 199 da Constituição Federal, relativo à coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, estabelece o ordenamento institucional indispensável à execução adequada dessas atividades, e dá outras providências [Internet]. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 2001 [citado 2017 Jan 2]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/leis_2001/10205.htm