Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Marcia Regina Dezan

Sistema Vel: Triagem molecular utilizando DNA obtido de *pools* de plasma de doadores de sangue

Versão Corrigida

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo
2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Dezan, Marcia Regina
Sistema Vel: triagem molecular utilizando DNA obtido de Pools de plasma de doadores de sangue / Marcia Regina Dezan. – São Paulo, 2019.
Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: José Eduardo Levi

Descritores: 1. BIOLOGIA MOLECULAR. 2. GENÓTIPOS. 3. HERANÇA GENÉTICA. 4. ÁCIDOS NUCLEICOS - TESTES. 5. GRUPOS SANGUÍNEOS. 6. FENÓTIPOS.

USP/IMTSP/BIB-01/2019.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Antônio Celso Dezan** e **Regina Maria Modenese Dezan** pelo amor, dedicação e exemplo de coragem e trabalho.

À minha irmã, **Lúcia Cristina Dezan** pela força e incentivo nos momentos certos.

À meu orientador **Dr. José Eduardo Levi** pelos ensinamentos aos longo destes anos que contribuíram e ainda contribuem para o meu crescimento profissional.

À minha amiga e gestora **Dra. Carla Luana Dinardo**, eu agradeço imensamente pelo imenso auxílio na elaboração dos artigos científicos e pelos ensinamentos ao longo destes anos que contribuíram e ainda contribuem para o meu crescimento profissional.

Ao **Dr. Alfredo Mendrone-Junior** e ao **Prof Dr. Vanderson Rocha,** eu agradeço imensamente pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

À minha amiga **Dra. Mariza Mota**, pelos ensinamentos durante anos, exemplo de coragem e trabalho.

À minha Equipe do **Laboratório de Imuno-hematologia Avançada**, **Imuno-hematologia de Doadores**, **Imuno-hematologia Clínica**, **CQ Imuno-hematologia** e **Agência Central**, pelo apoio, paciência e pelas amizades que nasceram durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Carolina Nunes Gomes** pela grande ajuda na parte prática da tese.

Ao **Dr. Abel Costa Neto**, eu agradeço imensamente pelo grande auxílio na análise estatística.

À **Nanci Salles, Silvia Bosi e equipe do laboratório NAT**, pela ajuda na separação das placas com material genético e amostras.

À **Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**, por possibilitar a realização do estudo e a todos os doadores que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

À **Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, processo 2015/09540-3 pelo auxílio financeiro, tornando possível a realização desta tese.

MARCIA REGINA DEZAN

RESUMO

Dezan MD. Sistema Vel: Triagem molecular utilizando DNA obtido de *Pools* de plasma de doadores de sangue. [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Os métodos sorológicos para determinar o fenótipo Vel– requerem o uso de antissoros humanos raros e não permitem o rastreamento de muitas amostras ao mesmo tempo, limitando sua aplicação como ferramenta para busca de doadores raros. Neste estudo, desenvolvemos uma estratégia de triagem molecular de baixo custo, usando PCR em tempo real e reciclagem do DNA extraído de *pools* de plasma da rotina viral NAT (Teste de Ácido Nucleico) para identificar doadores Vel– e Vel+^{W}. Um total de 25.322 doadores de sangue do Sudeste Brasileiro foram genotipados por PCR em tempo real para detectar a deleção de 17nt (*c.64_80del17*) no gene *SMIM*1, que determina o fenótipo Vel-, utilizando DNA extraído de *pools* de plasma de seis doadores rotineiramente descartados após a liberação dos resultados NAT para HBV, HCV e HIV. Cento e oitenta e oito (188) de 4.220 *pools* foram reativos para deleção. A deleção *SMIM1*64_80del17* estava presente em 210 doadores sendo em 208 (0,4%) em heterozigose e em apenas dois (0,008%), em homozigose. A estratégia de genotipagem de *pools* de DNA, usando o ensaio de PCR em tempo real, desenhado para a identificação da deleção de 17 nucleotídeos no gene *SMIM*1, mostrou-se eficaz e acurada na identificação de doadores com fenótipo Vel– e Vel+^{W}. A reciclagem do DNA da rotina NAT a torna uma técnica economicamente atrativa e definitivamente superior às técnicas sorológicas para o rastreamento deste fenótipo raro.

Palavra-chave: Biologia Molecular, Genótipos, Herança Genética, Ácidos Nucleicos – Testes, Grupos sanguíneos, Fenótipos.

Abstract

Dezan MD. Vel System: Molecular screening using DNA obtained from plasma pools of blood donors (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2019.

Serologic methods to determine the Vel– phenotype require the use of rare human antisera and do not allow for many samples to be tested simultaneously, which limits their application as a tool to search for rare donors. This study developed a low-cost molecular screening strategy using the real-time polymerase chain reaction (PCR) with DNA extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test (NAT) screening, to identify Vel– and Vel+^{W} donors. A total of 25,322 blood donors from the Brazilian southeast region were genotyped through real-time PCR targeting the 17-nucleotide (*c.64_80del17*) deletion in the *SMIM*1 gene, which determines the Vel– phenotype, by using leftover nucleic acid from plasma pools of six donors, routinely discarded after the release of viral NAT results. One hundred and eighty eight from 4,220 pools tested were reactive. The *SMIM1*64_80del17* deletion was present in 210 donors, 208 (0.4%) in heterozygosity and only 2 in homozygosis (0.008%). The DNA pool genotyping strategy using real-time PCR designed to detect the deletion in the *SMIM*1 gene proved effective and accurate in identifying donors with the Vel– and Vel+^{W} phenotypes. The fact that residual nucleic acid from routine viral NAT screening was successfully employed renders this technique economically attractive and definitely superior to the serologic techniques available to search for this rare phenotype.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 DESENVOLVIMENTO 7

2.1 Amostras 7

2.2 Local 7

2.3 Aspectos Éticos 7

2.4 Métodos Moleculares 8

2.4.1 Preparo do *Pool* 8

2.4.2 Extração do Ácido Nucleico 8

2.4.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real com sondas de hidrólise (TaqMan) 9

2.4.4 *Primers* e Sonda 10

2.4.5 Validação 11

2.4.6 Genotipagem 12

2.4.7 Sequenciamento Sanger 13

2.5 Métodos Sorológicos 14

2.5.1 Fenotipagem 14

2.5.2 Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI) 15

2.6 Custos Parciais 16

2.7 Análise Estatística 17

2.8 Resultados 17

2.8.1 Análise Sorológica 19

2.8.2 Novo Polimorfismo 19

2.8.3 Análise Intron 2 do Gene *SMIM*1 20

2.8.4 Análise rs1175550 21

2.8.5 Análise rs143702418 22

2.8.6 Análise rs6673829 22

2.8.7 Análise rs1181893, rs9424296 e rs191041962 22

2.8.8 Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes *SMIM*1 Intron 2 25

2.8.9 Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes rs6673829 e rs1175550 25

2.8.10 Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes rs143702418 e rs1175550 26

2.8.11 Correlação genotípica das variantes do Intron 2 do Gene *SMIM*1 28

2.8.12 Frequência Alélica e a Frequência Genotípica das Variantes do Intron 2 do Gene *SMIM*1 29
2.8.13 Análise de equilíbrio *Hardy-Weinberg* e desequilíbrio de ligação 31
2.9 Discussão 32
3 CONCLUSÃO 38
REFERÊNCIAS 39
APÊNDICES 41
APÊNDICE A - Artigo publicado pela Transfusion 2016 42
APÊNDICE B - Artigo publicado pela Transfusion Medicine 47
APÊNDICE C - Artigo publicado pela Transfusion 2019 52
APÊNDICE D - Artigo publicado pela Blood Cells, Molecules and Diseases 53
ANEXOS 59
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue 60
ANEXO B - Resultados da PCR em tempo real 61
ANEXO C - Resultados sorológicos e moleculares 65

1 INTRODUÇÃO

Os antígenos eritrocitários têm um importante papel na medicina transfusional, na incompatibilidade materno-fetal, nas anemias autoimunes e nos transplantes de órgãos[1] e também têm sido utilizados em estudos genéticos, de medicina forense e em investigações antropológicas. Além disto, a presença ou ausência desses antígenos tem sido implicadas na suscetibilidade ou resistência para certas doenças.[2]

Pacientes que recebem transfusão de componentes sanguíneos podem desenvolver anticorpos a uma centena de antígenos eritrocitários e apresentar reações adversas.[1] A variedade de antígenos nas hemácias é bastante ampla. Estes antígenos são responsáveis por diversas funções fisiológicas e funcionam como alvo para um anticorpo e podem eventualmente desencadear um processo de destruição celular imune.[3]

Assim, o estudo dos polimorfismos de grupos sanguíneos torna-se importante do ponto de vista clínico. Aloanticorpos eritrocitários causam reação transfusional hemolítica e doença hemolítica do feto e do recém-nascido, enquanto que os autoanticorpos participam da destruição imune das hemácias na anemia hemolítica autoimune.[4]

A aloimunização contra antígenos eritrocitários é uma complicação transfusional tardia que sensibiliza entre 8 e 12% dos receptores de transfusão.[5] Esta porcentagem aumenta significativamente no caso de pacientes em regime crônico de transfusão, principalmente aqueles com diagnósticos de anemia falciforme, talassemia e síndrome mielodisplásica.[6, 7] Aproximadamente 15% desses pacientes desenvolvem anticorpos contra um ou mais antígenos eritrocitários.[6] A presença de aloanticorpos no soro dos pacientes está associada a atrasos na liberação de futuras transfusões dada a

complexidade dos testes pré-transfusionais, à dificuldade para encontrar doadores compatíveis e à possibilidade de reações hemolíticas graves no caso de liberação emergencial de unidades não compatíveis.[8]

Existem antígenos polimórficos, que são comuns à maior parte dos indivíduos, antígenos de baixa frequência (0,1%) e os que são altamente frequentes em todas as populações (frequência >99%). O suporte transfusional em pacientes com aloanticorpos contra antígenos de alta frequência é particularmente desafiador devido à raridade em encontrar sangue compatível, principalmente pela indisponibilidade de reagentes para a triagem sorológica dos doadores e custo elevado.[9]

O Brasil representa uma das mais heterogêneas populações do mundo, resultado de séculos de cruzamento inter-étnicos dos povos de três continentes: colonizadores europeus, principalmente portugueses, escravos africanos e ameríndios autóctones. Um estudo realizado por Pena et al.[10] caracterizou o genoma dos ancestrais brasileiros através da análise do DNA de indivíduos das 4 principais regiões. Na região norte (Amazonas) a linhagem indígena, na costa do nordeste a linhagem africana, equilíbrio entre as linhagens africanas e europeias, no sudeste e no sul predomínio europeu. Marcadores característicos da população asiática estão presentes nos estados de São Paulo e Paraná. Esta diversidade populacional é um fator preponderante ao risco de aloimunização devido à prevalência de diferentes fenótipos de grupos sanguíneos.

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental para a inserção de novas metodologias na rotina laboratorial da Imuno-hematologia, aumentando a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos. Isto pode ser facilmente visualizado durante os procedimentos de genotipagem de grupos sanguíneos, em que as técnicas moleculares suprem as deficiências das técnicas de

sorológicas, principalmente na fenotipagem de pacientes com transfusão recente, em pacientes com autoanticorpos e na busca de doadores negativos para antígenos de alta frequência na população.[11, 12]

O antígeno Vel foi descoberto há 60 anos. Sussman e Miller[13] descreveram o anticorpo anti-Vel em 1952 e o antígeno Vel tornou-se o primeiro antígeno de alta frequência relatado que não fazia parte de nenhum sistema de grupo sanguíneo estabelecido. Inicialmente, este antígeno foi incluso pela Sociedade Internacional de Transfusão de Sangue (*International Society of Blood Transfusion*) na Serie 901 e, em 2008, tornou-se parte de uma coleção quando determinou que, hemácias ABTI negativo eram Vel+^{W}.[14] Recentemente, em 2013, as bases moleculares do antígeno Vel foram identificadas e o sistema de grupo sanguíneo VEL foi oficialmente reorganizado.[15-18] Estudos populacionais estimam a frequência de indivíduos Vel negativo de 1 indivíduo em 4.000 na Europa sendo ligeiramente mais elevada no norte da Escandinávia (Suécia, Noruega e Dinamarca), 1 em 1.700.[16]

O sistema de grupo sanguíneo Vel é definido pela presença do antígeno Vel nos eritrócitos. O fenótipo Vel negativo é transmitido por herança autossômica recessiva e é normalmente revelado quando os indivíduos Vel negativos desenvolvem anticorpos anti-Vel após transfusão ou grvidez. Anticorpos anti-Vel nunca são 'naturais'. Indivíduos com anticorpos anti-Vel podem desenvolver graves reações transfusionais hemolíticas agudas graves por transfusão com sangue Vel+ e Vel+^{W}. Os indivíduos negativos para o antígeno Vel são raros e necessários para a segurança transfusional de pacientes com anticorpo anti-Vel.[16-19]

O antígeno Vel é complexo devido à grande variação na expressão em diferentes indivíduos e pode ocorrer dificuldade na identificação do anticorpo e do antígeno quando há fraca expressão antigênica denominado de Vel+^{W}.[19]

O mecanismo molecular responsável pelo fenótipo Vel negativo é a deleção de 17 nucleótidos em homozigose no éxon 3 do gene *SMIM*1.[20, 21] *SMIM*1 é um gene pequeno de 97 kb (kilobases) localizado no cromossomo 1, constituido de 4 éxons (figura 1).[16] Entretanto, existem outros mecanismos moleculares que alteram a expressão do antígeno Vel como pequenas inserções e/ou mutações de único nucleotídeo no intron 2. Esta região no gene *SMIM*1, é uma região regulatória que modula a expressão do antígeno Vel. O principal mecanismo envolvendo esta região é a presença do alelo A (rs1175550) em trans a deleção *c.64_80del17*.[22] Christophersen et al.[23] afirmam que outra variante rs143702418, inserção de 3 nucleotídeos (GCA) no intron 2, e a variante rs1175550, modulam de forma independente a expressão do antígeno Vel e que as 2 variantes estão fortemente ligadas em caucasianos, mas nos afroamericanos, os efeitos são independentes. Em estudo brasileiro, Arnoni et al.[24] sugere que outra variante rs6673829 pode ter efeito na expressão do antígeno Vel.

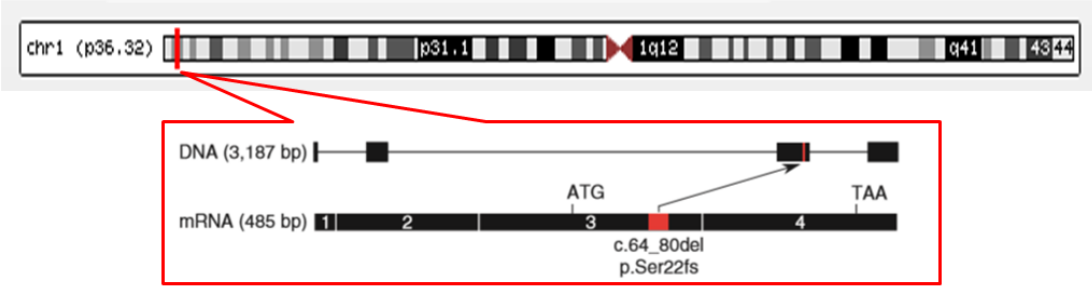

Figura 1 – Ilustração da localização cromossômica (GRCh37) e genômica dos quatro éxons do gene *SMIM*1 onde a deleção *c.64_80del17* (vermelho) está indicada no éxon 3 (referencia NM_001163724.1). Adaptado de Storry et al.[16]

A evolução dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos tem permitido a massificação destas técnicas, tornando possível o rastreio molecular em grande escala, seja para agentes infecciosos ou mesmo para mutações de implicação na saúde e na busca de polimorfismos de grupos sanguíneos raros.

Atualmente no Brasil, 14 hemocentros públicos tem implantado uma plataforma NAT (Teste do Ácido Nucleico) para a detecção do RNA dos vírus da hepatite C (HCV), e da imunodeficiência humana (HIV) em forma de *pool* de plasma de 6 doadores. Estes *pools* passam por processo automatizado de extração de ácidos nucleicos (Qiagen, MDx) e em seguida os extratos são submetidos à reação de PCR em tempo real em passo único, ou seja, faz-se a síntese de cDNA e a amplificação dos vírus em um mesmo tubo. No entanto, menos da metade do volume total eluído é utilizado na reação, sendo o restante desprezado após a liberação dos resultados. A partir de 2015, com a introdução do teste NAT na rotina para vírus da hepatite B (HBV), todo material genético (ácido nucleico) passou a ser utilizado. Entretanto, validamos a retirada do residual de ácido nucleico da placa de sílica por centrifugação. Desta forma, nossa proposta foi utilizar este subproduto da plataforma de extração, para este projeto, que demanda a triagem de um grande número de indivíduos, dada a baixa prevalência estimada da deleção de 17 nucleótidos (*c.64_80del17*) no éxon 3 do gene *SMIM*1.

Não encontramos estudos que tenham utilizado a genotipagem como triagem para detectar a deleção de 17 nucleotídeos em homozigose, que caracteriza o fenótipo Vel negativo. Além disto, acreditamos que a utilização da técnica poderá facilitar a busca de doadores raros e terá um grande impacto financeiro positivo na rotina imunohematológica de doadores de sangue.

Atualmente, a busca de doadores raros em bancos de sangue é realizada por métodos sorológicos com antissoros raros, quando disponíveis.

Nestes casos, a identificação dos anticorpos contra antígeno de alta frequência é muito trabalhosa, necessita de recursos técnico-cientifico e reagentes para a conclusão do estudo. Os antígenos de alta frequência estão presentes em mais de

99% dos indivíduos, portanto a aloimunização a estes antígenos é de ocorrência isolada, mas em contrapartida o suporte transfusional é um grande desafio. Nossos objetivos foram:

A. Desenvolver uma estratégia de baixo custo para identificar doadores de sangue raros por triagem molecular utilizando DNA, obtido de *Pools* de plasma de doadores de sangue;
B. Propor um protocolo viável para rotina na prática transfusional;
C. Determinar a prevalência da deleção de 17 nucleotídeos que caracteriza o fenótipo Vel- e Vel+^{W} na população brasileira.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Amostras

Foram triadas 25.322 amostras de DNA extraídas de *pool* de plasmas dos doadores de sangue.

Não houve critério de exclusão.

Para calcular o tamanho da amostra populacional foi utilizado a formula $N = (1,96)^2 \times p \times q / E^2$, onde q é a frequência suposta da alteração, p = 1 – q e E (erro tolerado) = q x precisão da estimativa em percentual.[25]

E = 0,004 x 0,2 = 0,0008

$N = (1.96)^2 \times 0,996 \times 0,004 / (0,0008)^2 = 23.913,96$ indivíduos.

2.2 Local

Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPS).

2.3 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa e Ética (CPE-IMT) e pelo Centro de treinamento em DST/AIDS, São Paulo, Brasil (CAAE 45481715.6.0000.5375). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado durante o processo de triagem dos doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo (anexo 1). Todo este procedimento é realizado no primeiro contato com todos os doadores da Fundação Pró-Sangue. Após a assinatura do TCLE foi coletado a bolsa de sangue do doador e os tubos para realização dos testes sorológicos e moleculares.

2.4 Métodos Moleculares

2.4.1 Preparo do *Pool*

A plataforma automática denominada Janus (Perkin Elmer, USA, Inc.) foi utilizada para a composição de *pools* constituídos por seis doadores, perfazendo um total de 600µL (6 x 100 µL) de plasma por *pool*. Os *pools* foram previamente utilizados para determinar a presença do material genético do HIV/HCV/HBV nas amostras de doadores de sangue da rotina da triagem molecular.[26] Após sua utilização, o material genético extraído destes *pools* foi cedido para realizarmos a pesquisa molecular para deleção de 17 nucleotídeos no éxon 3 do gene *SMIM*1. Os *pools* e o material genético de interesse foram obtidos conforme protocolo do fabricante.

2.4.2 Extração do ácido nucleico

A etapa de extração do material genético dos doadores é totalmente automatizada, através do Biorobot MDx (QiaGen) que é um dos três componentes da Plataforma NAT/Biomanguinhos.[26] Através do protocolo do "kit" de extração, o material genético foi adsorvido a um sistema constituído por partículas magnéticas recobertas com sílica que permitem aumentar a pureza e o rendimento do material obtido. Ao final da extração, o material genético estará eluído em 60µL do tampão de eluição, conforme preconizado pelo fabricante. No entanto, após 2015, com o início do teste NAT para HBV, o volume total de 60µL passou a ser utilizado e para dar continuidade à busca de doadores Vel-, retiramos o restante de DNA da placa de vácuo acoplada a uma placa de PCR 96 poços adicionando 20µL de tampão de eluição com pipeta

multicanal e centrifugação da placa na velocidade máxima (4.000 RPM) por 10 minutos (figura 2).

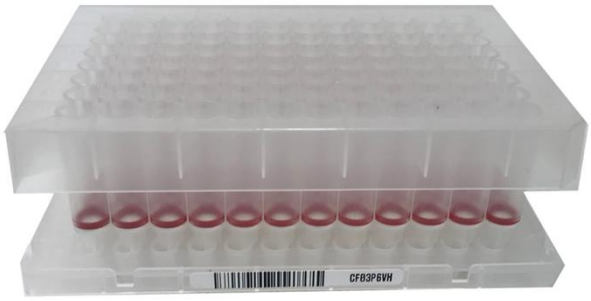

Figura 2 - Placa de vácuo acoplada a uma placa de PCR para retirada do ácido nucleico residual aderido às partículas de sílica. Criado por Dezan, M.R.

2.4.3 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real com sondas de hidrólise (TaqMan)

A PCR em tempo real apresenta características relevantes como rapidez, especificidade, sensibilidade e com reduzido potencial de contaminação quando comparado com as PCR convencionais. TaqMan é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que recebe energia do fluoróforo na forma de luz ou calor) e os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5' $\rightarrow$ 3' da *taq* DNA polimerase.[27]

2.4.4 *Primers* e Sonda

Os *primers* para PCR foram desenhados abrangendo 127pb do éxon 3 do gene *SMIM*1 (tabela 1) através do *software* online primer3 (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgipara) e a sonda interna para esse *amplicon* foi desenhada propositalmente para hibridizar a extremidade 3' e reconhecer a sequência de nucleotídeos existentes apenas nos indivíduos portadores da deleção de 17 nucleotídeos (figura 3) já mencionada (GenBank NM_001163724).[28]

Tabela 1 - Sequências *primers* e sonda do gene *SMIM*1

Nome/tipo	Sequências (5' – 3')
*SMIM*1_Vel sense/*primer*	CCACTATAGTAGGTGGGAGGA
*SMIM*1_Vel antissense/*primer*	TCTCTGGAGGGAGACACC
*SMIM*1_Velneg/FAM/sonda	AGCAGGGACGGAGTCCAG

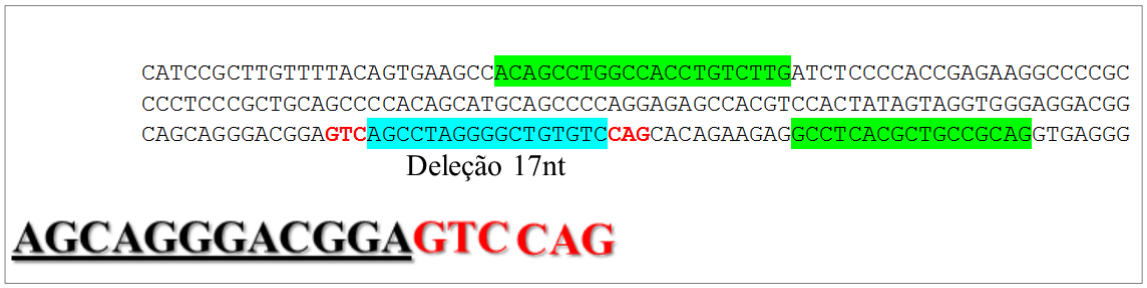

Figura 3 – Ilustração do desenho da sonda utilizada para triar os doadores com a presença da deleção *c.64_80del17* em heterozigose. Os *primers* estão destacados em verde, a deleção *c.64_80del17* em azul e abaixo em preto e vermelho a sonda sem a sequência da deleção *c.64_80del17*.

2.4.5 Validação

Inicialmente foi realizada uma PCR em tempo real com o objetivo de validar o desenho dos *primers* e sonda utilizando DNA genômico Vel negativo de referência, cedido pelo Hospital Albert Einstein, São Paulo-SP, Brasil. Em seguida os testes foram realizados com plasma de referência, cedido pelo Hemocentro de Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brasil, de um paciente Vel negativo com anti-Vel e anti-K, extraído em *single* na plataforma NAT/Biomanguinhos. O processo de extração em *pool* foi validado pelo procedimento abaixo descrito, sendo realizado por 3 vezes em cada uma das 3 plataformas NAT/Biomanguinhos existentes na Fundação Pró-Sangue. Os *pools* foram montados com 5 amostras de plasma de doadores da rotina NAT e 1 amostra de plasma Vel negativo de paciente Vel negativo com anti-Vel e anti-K. Os *pools* com amostra Vel negativo foram validados durante a atribuição dos resultados da PCR em tempo real (tabela 2, figura 4).

Tabela 2 - Validação PCR em tempo real

Teste	*Pool* DNA plasmático (C_T)	DNA plasmático (C_T)	DNA genômico 1 (C_T)	DNA genômico 2 (C_T)	**Controle Negativo**
1	-	-	26,31/26,52 (duplicata)	28,88/28,65 (duplicata)	**Não detectado**
2	40,92	37,39	26,48	26,74	**Não detectado**

C_T - Cycle Threshold

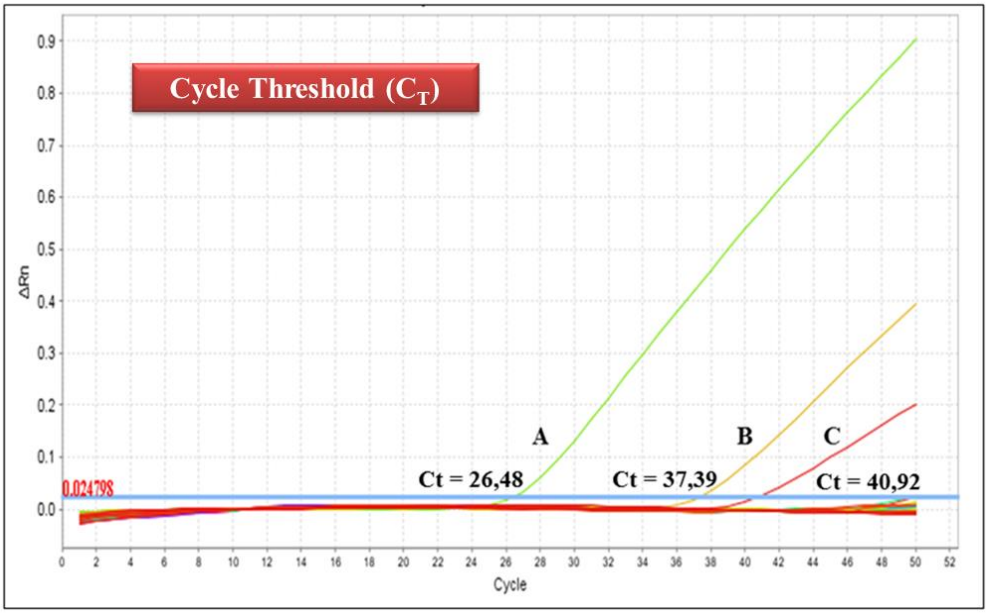

Figura 4 - PCR em tempo real utilizada para detectar a deleção de 17 nucleotídeos no éxon 3 do gene *SMIM*1. **A.** DNA genômico Vel-; **B.** DNA de plasma Vel-; **C.** DNA em *pool* de plasma com 1 amostra Vel- e 5 Vel+.

2.4.6 Genotipagem

Na reação de amplificação por PCR em tempo real foram adicionados no mix: 10µL de TaqMan (Applied Biosystems), 0,5µL (250nM) de primer sense, 0,5µL (250nM) de primer antissense (Invitrogen), 0,5µL (250nM) de sonda marcada pelo o fluoróforo FAM (Applied Biosystems) e 8,5µL do DNA extraído do *pool* de plasma de doadores de sangue. A reação foi colocada no equipamento StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com programação a 95ºC por 10 minutos e 50 ciclos de 95ºC por 15 segundos e 62ºC por 1 minuto. As amostras dos *pools* identificados como positivos foram extraídas manualmente pelo kit PureLink Genomic DNA (Invitrogen) e genotipadas novamente por PCR em tempo real nas mesmas condições.[28] Quando identificada a amostra positiva do *pool*, foi realizado o PCR convencional (figura 5) para

classificar os doadores em homozigotos ou heterozigotos para a deleção, empregando digestão por enzimas de restrição, conforme o protocolo descrito por Storry e Ballif.[16, 18]

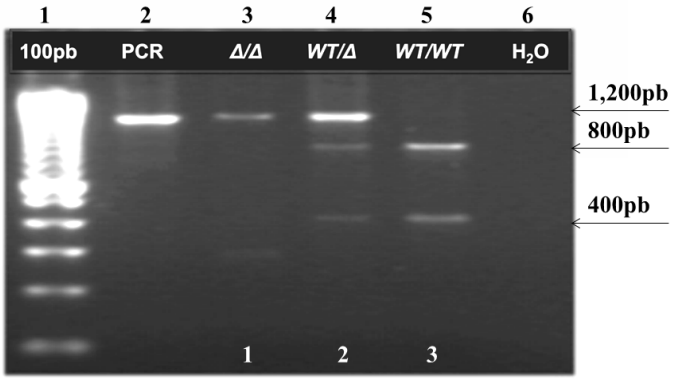

Figura 5 - Genotipagem PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) para verificar a zigosidade da deleção de 17 nucleotídeos. 1 – marcador molecular de 100pb, 2 – PCR, 3 – amostra Vel negativo, 4 – amostra Vel+^{W}, 5 – amostra Vel positiva e 6 – controle negativo.

2.4.7 Sequenciamento Sanger

As 2 amostras com a deleção de 17 nucleotídeos em homozigose e as 200 em heterozigose foram sequenciadas por Sanger com *primers* (tabela 3) desenhados apenas para região do Intron 2 do gene *SMIM*1 no programa online (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgipara).

Tabela 3 - Sequências *primers* intron 2 do gene *SMIM*1

Nome/tipo	Sequências (5' – 3')
*SMIM*1_128F	AGTCATTTGCCCAGGGTCAG
*SMIM*1_472R	CAGGGACCGGTCTAGCTGTA
INTRON_2_VEL_F	GCAAAGATGAGTCCCAGGTC
INTRON_2_VEL_R	GCCGTCCTCCCACCTACTAT

Intron 2 do gene *SMIM*1 foi sequenciado para identificar as seguintes variantes: rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 e rs9424296[29] nos 200 doadores com a presença da deleção *c.64_80del17*. A PCR foi realizada utilizando os seguintes *primers*: 128_F e 472_R; Intron_2_VEL_F e Intron_2_VEL_R (tabela 3) desenhados *online* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgipara). A PCR foi realizada no termociclador (Eppendorf) em volume total de 50 µL, contendo 50 a 150 ng/µL DNA e 10 pmol/µL dos *primers* sense e antissense. As programações das 2 PCRs foram as seguintes: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 64°C, e 60 segundos a 72°C, seguido por 3 minutos a 72°C e 30 segundos a 98°C, 40 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 60°C, e 30 segundos a 72°C, seguido por 5 minutos a 72°C, respectivamente. Os produtos das PCRs foram purificadas com ExoSap IT e sequenciadas utilizando a metodologia Sanger padrão com kit de sequenciamento BigDye (ABI BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems) no sequenciador (ABI 310, Applied Biosystems).

2.5 Métodos Sorológicos

2.5.1 Fenotipagem

A expressão do antígeno Vel foi avaliada em 118 de 210 amostras identificadas como homozigotas ou heterozigotas para a deleção *c.64_80del17*, no gene *SMIM*1. Não foi possível fenotipar 92 doadores com ABO A e AB e/ou K1, pois o antissoro anti-Vel utilizado apresentava anti-A e anti-K. Brevemente, 50µL *da* suspensão de hemácias a 0.8% foi adicionada ao cartão gel teste LISS/Coombs (Grifols) e,

posteriormente, 25µL de soro humano anti-Vel (título 8, score 23)[28] foi acrescentado (figura 6). Controles positivos e negativos foram realizados paralelamente. A análise macroscópica de aglutinação foi realizada seguindo protocolos previamente estabelecidos pelo fabricante.

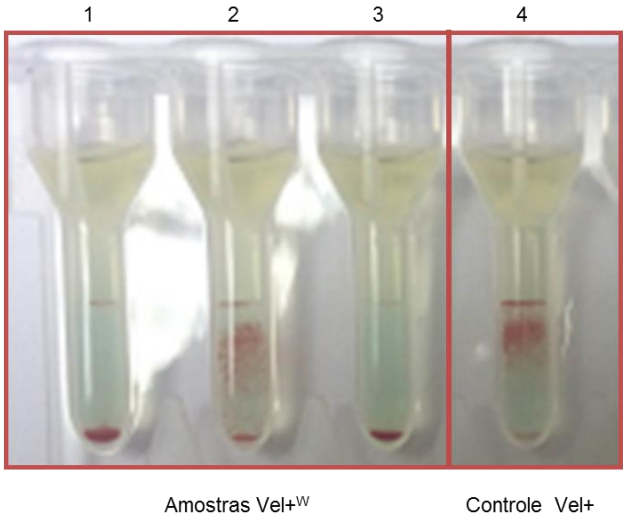

Figura 6 - Ilustração do grau de aglutinação da fenotipagem para o antígeno Vel dos doadores com a deleção de 17nucleotídeos em heterozigose. 1 – fraco (+), 2 – 2+, 3 – negativo e 4 – 3+.

2.5.2 Pesquisa de anticorpos irregulares (PAI)

A pesquisa de anticorpos irregulares foi realizada em todos os 210 doadores, testando o soro dos doadores identificados como homozigotos ou heterozigotos para a deleção de 17nt (*c.64_80del17*) éxon 3 do gene *SMIM*1, em cartão gel teste LISS/Coombs (Bio-Rad), contra duas suspensões de hemácias comercialmente preparadas (Bio-Rad), conforme protocolos previamente estabelecidos pelo fabricante.

2.6 Custos Parciais

Atualmente no Brasil, a busca de doadores raros em bancos de sangue é realizada por métodos sorológicos com antissoros raros, quando disponíveis ou soros raros de pacientes aloimunizados. Entretanto, existem muitas dificuldades de realizar esta busca com antissoro anti-Vel devido à indisponibilidade para triagem sorológica, e principalmente, a variação na expressão do antígeno Vel. O custo para fenotipar 25.000 doadores para um único antígeno raro com antissoro comercial, seria de aproximadamente 1.875.000,00 reais (tabela 4).

Tabela 4 - Custo Sorológico para 25.000 amostras

Antissoro raro	N° teste	Custo Total (R$)	Custo/Amostra (R$)
Frasco de 1mL (1 antígeno)	20	1.500,00	75,00
Custo total ≅ R$ 1.875.000,00			

A utilização das ferramentas de biologia molecular tem sido fundamental na rotina laboratorial da Imuno-hematologia, principalmente na busca de doadores raros, aumentando a segurança e eficácia transfusional de pacientes politransfundidos. Dito isso, teriamos 25.000 doadores genotipados para a deleção de 17 nucleotídeos por PCR em tempo real pelo custo de aproximadamente 20.000,00 reais (tabela 5), e mais além, economizamos 250.000,00 reais na extração do DNA com a reciclagem do ácido nucleico da rotina NAT (tabela 6).

Tabela 5 - Custo genotipagem PCR em tempo real para 25.000 amostras

Reagentes	Custo Total	Nº testes	Custo/Amostra	Custo *Pool*
Frasco TaqMan 5mL	1.469,00	416	3,53	0,59
Primers/Sondas	1.500,00	500	3,00	0,50
Total	1.640,00	416	3,94	0,64
Custo total ≅ R$ 20.000,00				

Tabela 6 - Custo Extração DNA para 25.000 amostras

Qiagen	Custo Total	Nº testes	Custo/Amostra
1 Kit	2.500,00	250	10,00
Custo total ≅ R$ 250.000,00			

2.7 Análises estatísticas

As frequências alélicas e genotípicas das variantes presentes no intron 2 do gene *SMIM*1 em doadores de sangue (n=200) com a presença da deleção em heterozigose foram determinadas por contagem direta. Diferenças entre frequência genotípica com as reatividades do antígeno Vel foram comparadas utilizando o teste U de *Mann-Whitney*. O teste *Chi-square* ou teste exato de *Fisher's* foram utilizados para comparar a distribuição entre diferentes genótipos variantes no intron 2 do gene *SMIM*1. Modelos de regressão logística (LR) corrigidos e não corrigidos foram realizados para determinar a associação de co-variáveis com resultado binário. Para obter uma estimativa mais precisa da associação genética, os *odds ratios* (ORs) foram ajustados para o fenótipo ABO. Os resultados da regressão logística foram apresentados como *odds ratios* (OR) com intervalo de confiança (CI) de 95% e p-valores. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS software, Chicago, IL, USA)* versão *22.0* e *software GraphPad Prism,* versão *8.00 (GraphPad software, San Diego CA, USA).* O p-valor <0.05 foi considerado estatisticamente significativo, e todos p-valores reportados foram bi-caudais. As análises do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) e desequilíbrio de ligação foram determinadas para todos os polimorfismos através do software Haploview (https://www.broadinstitute.org/haploview/downloads).

2.8 Resultados

A triagem molecular para deleção *c.64_80del17* no gene *SMIM*1 foi realizada em 25.322 doadores de sangue. A média e mediana do *Cycle Thresholds* (C_T) dos *pools* reativos para deleção de 17 nucleotídeos foram de 40.7 e 42.3, respectivamente (anexo 2). As 25.322 amostras constituíram 4.220 *pools* e, destes, 188 *pools*

apresentaram a deleção *c.64_80del17* no gene *SMIM*1. Todos os *pools* positivos foram desmembrados e as amostras foram estudadas individualmente. Havia 21 *pools* com mais de uma amostra positiva (anexo B).

Das 25.322 amostras estudadas, 208 (0,4%; 1:122) foram caracterizadas como heterozigotas e 2 (0,008%; 1:12.661) homozigotas para a deleção *c.64_80del17* no gene *SMIM*1.[30]

As principais características demográficas e fenotípicas desta população estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 - Características demográficas e fenotípicas dos doadores de sangue

Variáveis	no./total no. (%)
Etnia	
Branco	70/208 (33.7)
Negro	62/208 (29.8)
Ignorado	76/208 (36.5)
Fenótipo ABO	
O	100/206 (48.5)
A	80/206 (38.8)
B	20/206 (9.6)
AB	6/206 (2.9)
Fenótipo K1	
Negativo	145/154 (94.2)
Positivo	9/154 (5.8)
Fenótipo Vel	
Negativo	46/116 (39.7)
Positivo	70/116 (60.3)
Fenótipo Vel	
Negativo	46/116 (39.7)
Fraco	22/116 (19.0)
1+	22/116 (19.0)
2+	24/116 (20.7)
3+	2/116 (1.7)

2.8.1 Análise Sorológica

A análise sorológica do antígeno Vel foi realizada utilizando um antissoro humano policlonal do grupo sanguíneo B, com anti-Vel e anti-K1 em 116/208 amostras com a presença da deleção em heterozigose. Em 46 (39,7%) doadores a reatividade para o antígeno Vel não foi detectada e em 70 (60,3%) doadores as reatividades variaram de fraco a 3+ (tabela 7). Em 92 doadores não foi possível realizar a fenotipagem, porque as hemácias dos doadores eram incompatíveis para o sistema ABO ou Kell ou não foram obtidas. Os 2 doadores que apresentaram a deleção em homozigose (Vel-negativo) são do grupo sanguíneo A e confirmaram ser fenotipicamente negativos para o antígeno Vel com antissoro do *SCARF* (*Serum, Cells and Rare Fluids Exchange).* *http://scarfex.jove.prohosting.com/*.

A pesquisa de anticorpos irregulares foi realizada nos 210 doadores com a presença da deleção *c.64_80del17*. Um dos 2 doadores confirmados como Vel– apresentou anti-Vel no plasma com título 32 e score 43.[28]

2.8.2 Novo polimorfismo

Uma nova deleção de 6 nucleotídeos (chr1:3691245_3691250delGCCCCG)[29] no intron 2 de *SMIM*1 foi identificada em 3 doadores utilizando o *software* Geneious versão 10.2.3 (tabela 8, figura 7).

Tabela 8 - Novo polimorfismo no Intron 2 do gene *SMIM*1.

ID	Fenótipo Vel	Genótipo Vel	*g.1894_1899delGCCCCG*	Etnia
	Reatividade	Storry et al.		
86.66	Negativo	*WT/Δ*	G/GCCCCG	Negro
92.72	Não testado	*WT/Δ*	G/GCCCCG	Negro
150.130	1+	*WT/Δ*	G/GCCCCG	Negro

WT – Tipo selvagem*; Δ* - Deleção

Figura 7 – Novo polimorfismo detectado no intron 2 do gene *SMIM*1 (chr1:3691245_3691250delGCCCCG).

2.8.3 Análise do Intron 2 do Gene *SMIM*1

Dos 210 doadores com a presença da deleção (*c.64_80del17*), 200 heterozigotos foram sequenciados utilizando o *buffy-coat* obtido do tubo de sangue da rotina NAT para as seguintes variantes presentes no intron 2 do gene *SMIM*1: rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 e rs9424296 (tabela 9, anexo 3).[29]

Quatro doadores não compareceram para coleta de nova amostra e em 4 o DNA estava degradado.

Tabela 9 - Frequência genotípica das variantes no intron 2 do gene *SMIM*1	
Variáveis	**no./total no. (%)**
rs143702418	
CC	132/200 (66.0)
CGCA/CGCA	68/200 (34)
rs1181893	
CC	194/200 (97.0)
AC	5/200 (2.5)
AA	1/200 (0.5)
rs191041962	
CC	200/200 (100.0)
rs6673829	
GG	165/200 (82.5)
GA	30/200 (15.0)
AA	5/200 (2.5)
rs1175550	
AA	149/200 (74.5)
AG	12/200 (6.0)
GG	39/200 (19.5)
rs9424296	
CC	186/200 (93.0)
CA	13/200 (6.5)
AA	1/200 (0.5)

2.8.4 Análise rs1175550

Dos 200 doadores sequenciados para o Intron 2 do gene *SMIM*1, 149 (74,5%) apresentaram o genótipo AA, 39 (19,5%) GG e 12 (6%) AG para variante rs1175550 (tabela 9).

Dos 149 doadores com o genótipo AA, 41 (47,7%) apresentaram ausência de reatividade para o antígeno Vel, 45 (52,3%) presença da reatividade e para os doadores com genótipo AG/GG, 4 (15,4%) apresentaram ausência na reatividade e 22 (84,6%) presença da reatividade (tabela 10).

2.8.5 Análise rs143702418

Dos 200 doadores sequenciados para o Intron 2 do gene *SMIM*1, 132 (66%) apresentaram o genótipo CC, 68 (34%) CGCA/CGCA (tabela 9).

Os 74 doadores com o genótipo CC, 30 (40,5%) apresentaram ausência na reatividade do antígeno Vel, 44 (59,5%) com presença da reatividade e para os 38 doadores com genótipo CGCA/CGCA, 15 (39,5%) apresentaram ausência na reatividade e 23 (60,5%) presença da reatividade (tabela 10).

2.8.6 Análise rs6673829

Em relação à variante rs6673829, encontramos 165/200 (82,5%) doadores com genótipo GG, 30 (15%) AG e 5 (2,5%) AA (tabela 9).

Dos 93 doadores com o genótipo GG, 34 (36,6%) apresentaram ausência na reatividade do antígeno Vel e 59 (63,4%) com presença da reatividade, e para os doadores com genótipo GA/AA, 11 (57,9%) apresentaram ausência na reatividade do antígeno Vel e 8 (42,1%) presença da reatividade (tabela 10).

2.8.7 Análises rs1181893, rs9424296 e rs191041962

Em relação às variantes rs1181893 e rs9424296 encontramos, 194/200 (97%) doadores CC, 5 (2,5%) AC, 1 (0,5%) AA e 186/200 (93%) doadores CC, 13 (6,5%) CA, 1 (0,5%) AA, respectivamente (tabela 9). No entanto, 100% dos doadores com a presença da deleção *c.64_80del17* em heterozigose apresentaram o genótipo CC para variante rs191041962 (tabela 10).

Tabela 10 - Análises de regressão logística da associação da reatividade Vel em doadores de sangue com variantes *SMIM*1 Intron 2 (n=112)[29]

	Reatividade Vel		*Univariada*		*Multivariada**	
Variáveis	**Negativo (n=45)**	**Positivo (n=67)**	**OR (IC95%)**	**p**	**OR (IC95%)**	**p**
rs143702418 - no. (%)						
CC	30 (40.5)	44 (59.5)	1.0 (ref.)			
CGCA/CGCA	15 (39.5)	23 (60.5)	1.045 (0.470-2.324)	0.913		
rs1181893 - no. (%)						
CC	44 (41.5)	62 (58.5)	1.0 (ref.)			
AC/AA	1 (16.7)	5 (83.3)	3.548 (0.401-31.438)	0.255		
rs191041962 - no. (%)						
CC	45 (40.2)	67 (59.8)	NA	NA		
rs6673829 - no. (%)						
GG	34 (36.6)	59 (63.4)	1.0 (ref.)			
GA/AA	11 (57.9)	8(42.1)	0.419 (0.154-1.144)	0.089	0.591 (0.210-1.661)	0.319
rs1175550 - no. (%)						
AA	41 (47.7)	45 (52.3)	1.0 (ref.)			
AG/GG	4 (15.4)	22 (84.6)	5.011 (1.593-15.768)	0.006	4.466 (1.385-14.396)	0.012
rs9424296 - no. (%)						
CC	44 (40.4)	65 (59.6)	1.0 (ref.)			
CA	1 (33.3)	2 (66.7)	1.354 (0.119-15.390)	0.807		

*Ajustado para fenótipo ABO. OR, *odds ratio*. IC, Intervalo de confiança.

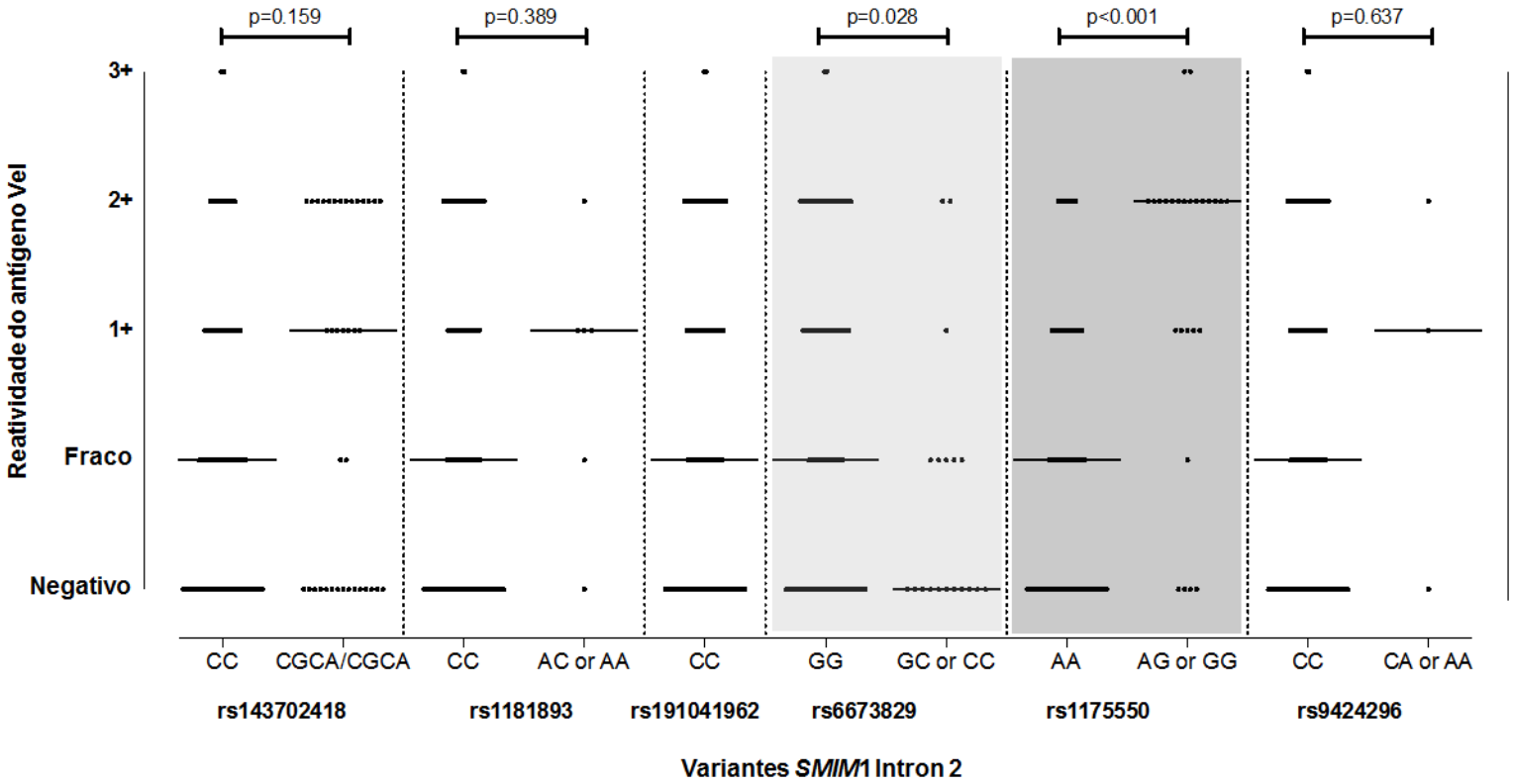

Figura 8 - Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes *SMIM*1 Intron 2 (rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 e rs9424296)[29] em 112 doadores de sangue com a presença da deleção *c.64_80del17*. O eixo vertical do gráfico mostra os níveis de expressão do antígeno Vel e o eixo horizontal mostra o genótipo das variantes de *SMIM*1 Intron 2. As barras e pontos representam o numero de indivíduos para cada variante. Na análise individual das variantes rs6673829 (quadrante cinza claro) e rs1175550 (quadrante cinza escuro), o p-valor foi significativo (p<0.5). Teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as médias das reatividades do fenótipo Vel entre os genótipos variantes do intron 2 do gene *SMIM*1.

2.8.8 Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes *SMIM*1 Intron 2

Os níveis de expressão do antígeno Vel foram maiores (p=0,028) em doadores com genótipo GG comparado aos heterozigotos ou homozigotos (GC/CC) da variante rs6673829 (quadrante cinza claro), em contraste com rs1175550 (quadrante cinza escuro), em que os níveis de expressão do antígeno Vel foram significativamente menores (p<0,001) em doadores com genótipo AA, em comparação aos heterozigotos ou homozigotos (AG/GG). Não houve significado estatístico nas outras variantes analisadas individualmente (figura 8).

2.8.9 Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes rs6673829 e rs1175550

Os níveis de expressão do antígeno Vel foram menores quando há correlação entre os genótipos GG (rs6673829) / AA (rs1175550) e GC/CC (rs6673829) / AA (rs1175550). Em contraste, a correlação entre os genótipos GG (rs6673829) e AG/GG (rs1175550) a expressão do antígeno Vel apresentou reatividades mais altas. Entretanto, houve significado estatístico (p<0,001) quando comparamos a associação GG (rs6673829) / AA (rs1175550) com GG (rs6673829) AG/GG (rs1175550) e GG (rs6673829) AG/GG (rs1175550) com GC/CC (rs6673829) / AA (rs1175550) (figura 9).

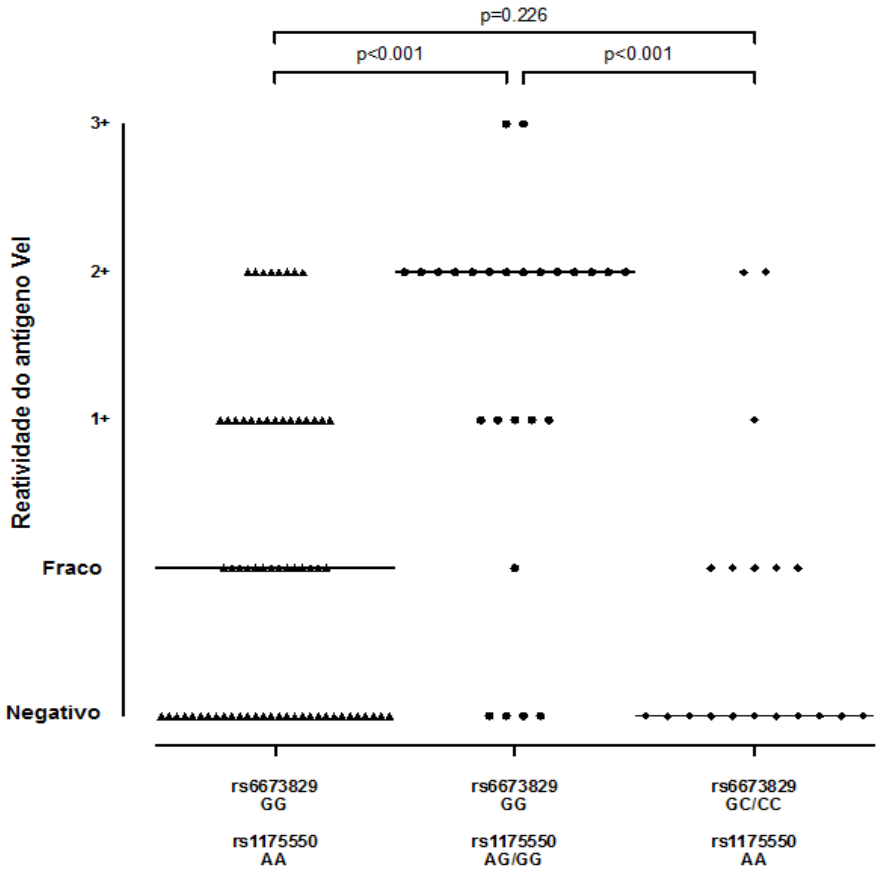

Figura 9 – Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e os genótipos possíveis com associação das variantes *SMIM*1 Intron 2 rs6673829 e rs1175550 em 112 doadores de sangue com a presença da deleção *c.64_80del17*.

2.8.10 Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e as variantes rs143702418 e rs1175550

Os níveis de expressão do antígeno Vel foram menores quando há correlação entre os genótipos CC (rs143702418) / AA (rs1175550) e CGCA/CGCAC (rs143702418) / AA (rs1175550). Em contraste, a correlação entre os genótipos CC (rs143702418) / AG/GG (rs1175550) e CGCA/CGCAC (rs143702418) / AG/GG (rs1175550), a expressão do antígeno Vel apresentou reatividades mais altas. Entretanto, houve significado estatístico (p<0,001) quando comparamos a associação

dos genótipos CC (rs143702418) / AA (rs1175550) com CC (rs143702418) / AG/GG (rs1175550), CC (rs143702418) / AG/GG (rs1175550) com CGCA/CGCAC (rs143702418) / AA (rs1175550) e CGCA/CGCAC (rs143702418) / AA (rs1175550) com CGCA/CGCAC (rs143702418) / AG/GG (rs1175550) (figura 10).

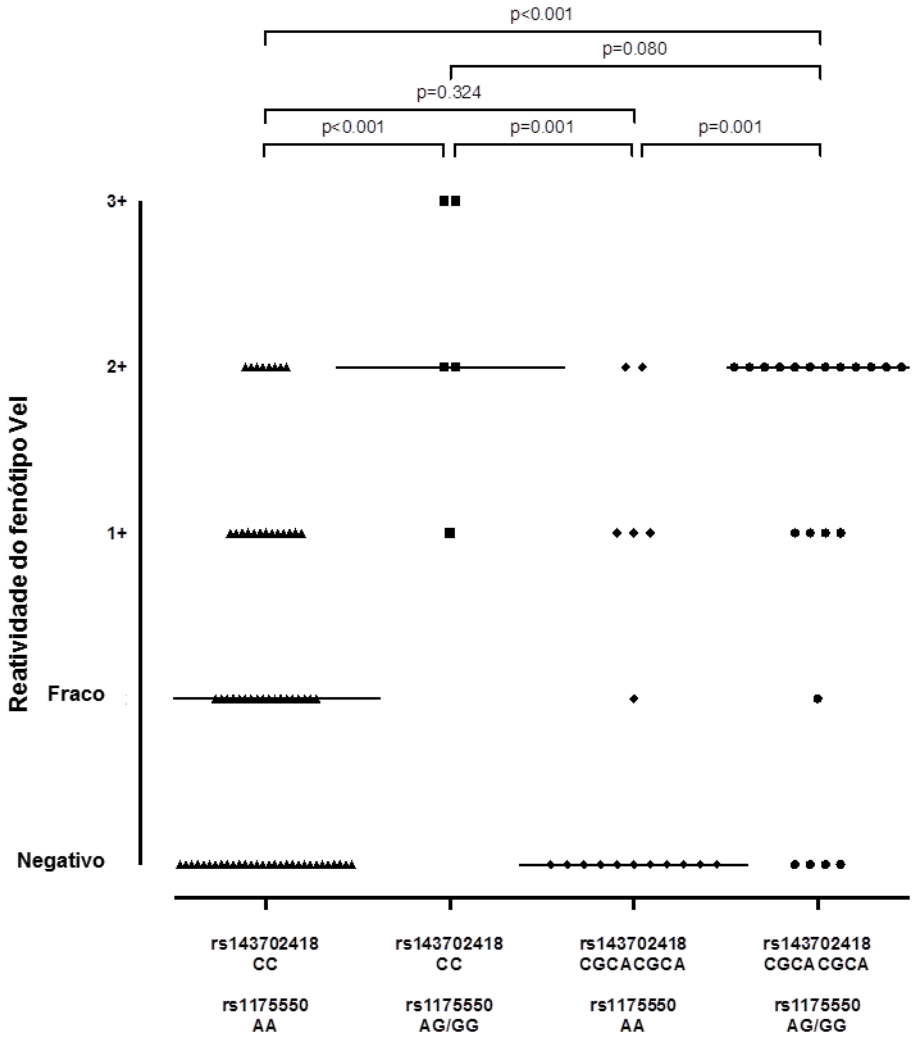

Figura 10 - Correlação entre os níveis de expressão do antígeno de Vel e os genótipos possíveis com associação das variantes *SMIM*1 Intron 2 rs143702418 e rs1175550 em 112 doadores de sangue com a presença da deleção *c.64_80del17*.

2.8.11 Correlação genotípica das variantes do Intron 2 do Gene *SMIM*1

A análise de correlação genotípica entre as variantes estudadas no intron 2 do gene *SMIM*1 mostrou que algumas combinações geram p-valores estatisticamente significativo (quadrante cinza), como a variante rs143702418 em associação com as variantes rs6673829 (p<0.001), rs1175550 (p<0.001) e rs9424296 (p=0.003) e a variante rs1175550 em associação com a variante rs6673829 (p<0.001) (figura 11).

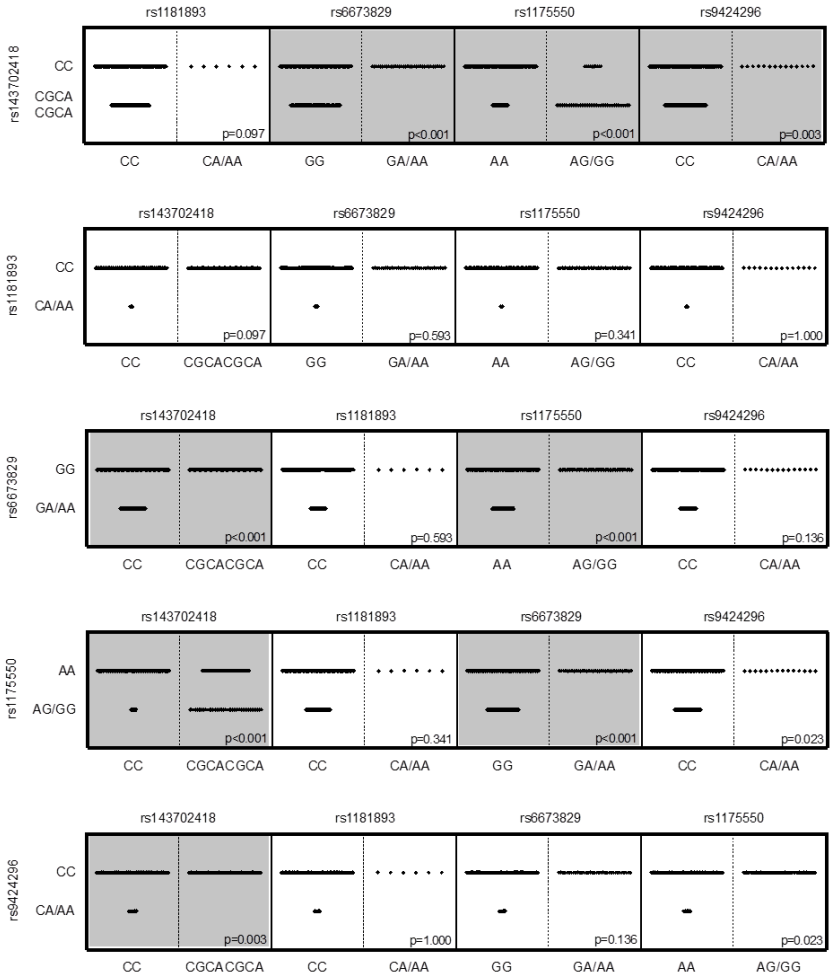

Figura 11 - Correlação genotípica das variantes no intron 2 do gene *SMIM*1 analisadas (rs143702418, rs1181893, rs6673829, rs1175550 e rs9424296) e as possíveis combinações entre elas em 200 doadores de sangue com a presença da deleção *c.64_80del17 em heterozigose.*

2.8.12 Frequência Alélica e a Frequência Genotípica das Variantes do Intron 2 do Gene *SMIM*1

A frequência alélica e a frequência genotípica do Sudeste do Brasil e mundial das variantes rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 e rs9424296 presentes no Intron 2 do gene *SMIM*1 com a presença da deleção *c.64_80del17* em homozigose e heterozigose (n=202) estão descritas nas tabelas 11 e 12. A frequência alélica das variantes neste estudo são: 66% do alelo C e 34% da inserção CGCA para variante rs143702418; 2% do alelo A e 98% do alelo C para variante rs1181893; 100% do alelo C para variante rs191041962; 90% do alelo G e 10% do alelo A para variante rs6673829; 78% do alelo A e 22% do alelo G para variante rs1175550; 96% do alelo C e 4% do alelo A para variante rs9424296 (tabela 11) e para as frequências genotípicas são: 0,663% do genótipo CC e 0,337% do genótipo CGCA para variante rs143702418; 0,004% do genótipo AA, 0,024% do genótipo AC e 0,970% do genótipo CC para variante rs1181893; 1,00% do genótipo CC para variante rs191041962; 0,826% do genótipo GG, 0,148% do genótipo GA e 0,024% do genótipo AA para variante rs6673829; 0,747% do genótipo AA, 0,059% do genótipo AG e 0,193% do genótipo GG para variante rs1175550; 0,930% do genótipo CC, 0,064% do genótipo CA e 0,004% do genótipo AA para variante rs9424296 (tabela 12).

Tabela 11 - Frequência alélica

	rs143702418		rs1181893		rs191041962		rs6673829		rs1175550		rs9424296	
	C	CGCA	A	C	C	T	G	A	A	G	C	A
Geral*	84%	16%	5%	95%	100%	0%	87%	13%	75%	25%	80%	20%
Africanos*	74%	26%	0%	100%	100%	0%	95%	5%	40%	60%	99%	1%
Americanos*	85%	15%	10%	90%	100%	0%	79%	21%	85%	15%	87%	13%
Leste da Ásia*	100%	0%	11%	89%	100%	0%	100%	0%	100%	0%	44%	56%
Europeus*	78%	22%	1%	99%	100%	0%	69%	31%	78%	22%	94%	6%
Sul da Ásia*	86%	14%	6%	94%	100%	0%	85%	15%	86%	14%	72%	28%
*https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation												
Sudeste do Brasil	**66%**	**34%**	**2%**	**98%**	**100%**	**0%**	**90%**	**10%**	**78%**	**22%**	**96%**	**4%**

Tabela 12 - Frequência Genotípica

	rs143702418			rs1181893			rs191041962			rs6673829			rs1175550			rs9424296		
	C/C	C/CGCA	CGCA/CGCA	A/A	A/C	C/C	C/C	C/T	T/T	G/G	G/A	A/A	A/A	A/G	G/G	C/C	C/A	A/A
Geral*	-	-	-	0,004	0,087	0,908	0,999	0,001	-	0,768	0,198	0,035	0,611	0,274	0,115	0,685	0,230	0,085
Africanos*	-	-	-	0,002	0,998	-	1,00	-	-	0,911	0,085	0,005	0,160	0,478	0,362	0,985	0,015	-
Americanos*	-	-	-	0,012	0,17	0,818	1,00	-	-	0,631	0,326	0,043	0,726	0,239	0,035	0,767	0,205	0,029
Leste da Ásia*	-	-	-	0,01	0,194	0,796	0,996	0,004	-	1,00	-	-	0,996	0,004	-	0,196	0,494	0,310
Europeus*	-	-	-	0,022	0,978	-	1,00	-	-	0,481	0,412	0,107	0,614	0,334	0,052	0,875	0,121	0,004
Sul da Ásia*	-	-	-	0,004	0,102	0,894	1,00	-	-	0,726	0,243	0,031	0,736	0,241	0,022	0,532	0,376	0,092
Suecos[23]	0,57	0,36	0,07	-	0,03	0,97	-	-	-	0,48	0,4	0,12	0,56	0,37	0,07	0,88	0,12	0,01
Americanos Africanos[23]	0,59	0,35	0,06	-	0,02	0,98	-	-	-	0,85	0,13	0,01	0,23	0,49	0,28	0,94	0,06	-
Americanos de ascendência Africana do Sudoeste EUA[23]	0,54	0,39	0,07	-	-	1,00	-	-	-	0,67	0,31	0,02	0,25	0,46	0,30	0,96	0,03	-
*https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation																		
Sudeste do Brasil	**0,663**	**-**	**0,337**	**0,004**	**0,024**	**0,970**	**1,00**	**-**	-	**0,826**	**0,148**	**0,024**	**0,747**	**0,059**	**0,193**	**0,930**	**0,064**	**0,004**

2.8.13 Análises de equilíbrio *Hardy-Weinberg* e desequilíbrio de ligação

A distribuição genotípica para os polimorfismos rs1181893, rs191041962, rs6673829 e rs9424296 estava de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE), exceto para o rs143702418 e rs1175550 (HW*p*val<0.05). A análise de desequilíbrio de ligação (figura 12) mostrou que os polimorfismos rs143702418/rs6673829 (LD=100), rs143702418/rs1175550 (LD=81), rs143702418/rs9424296 (LD=100) e rs6673829/rs1175550 (LD=100) estavam em forte desequilíbrio de ligação (n=200).

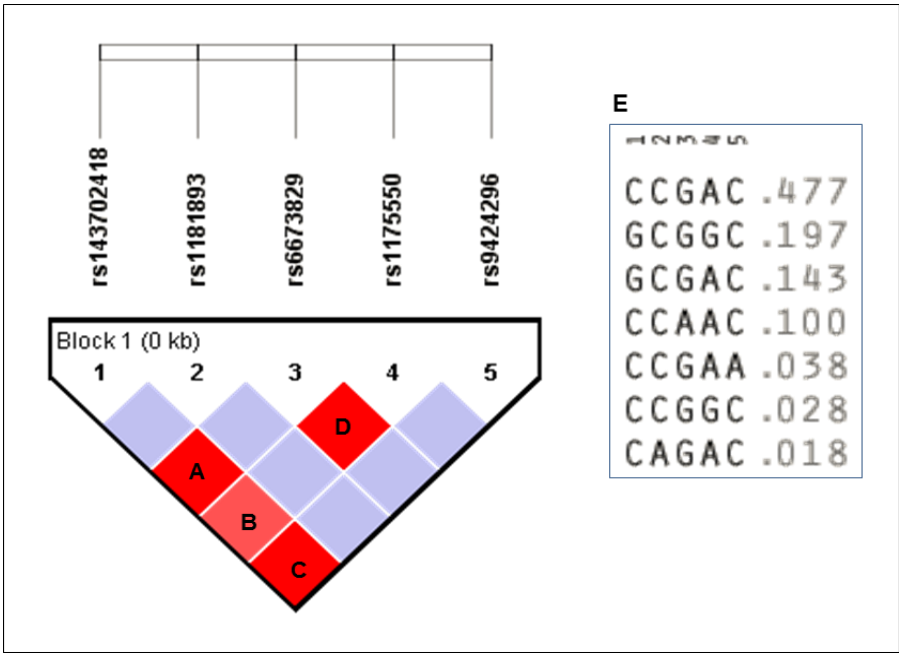

Figura 12 - Análise de desequilíbrio de ligação (LD) e frequência de haplótipos para os polimorfismos em *SMIM*1 Intron 2. **A.** rs143702418/rs6673829 (LD=100), **B.** rs143702418/rs1175550 (LD=81), **C.** rs143702418/rs9424296 (LD=100) e **D.** rs6673829/rs1175550 (LD=100). **E.** Frequência da associação dos haplótipos compartilhados no intron 2 do gene *SMIM*1. A inserção GCA (rs143702418) esta representada pelo nucleotídeo G.

2.9 Discussão

As estratégias de microarranjos são atualmente as mais apropriadas na busca genética de doadores raros, uma vez que permitem vários genes serem analisados em uma única reação, enquanto que, as técnicas de PCR convencionais analisam pouquíssimos alvos no mesmo ensaio. Em relação ao antígeno Vel, apenas técnicas de PCR convencionais e SNaPshot foram descritas[31] e, até o momento, o antígeno Vel não está incluso em nenhuma plataforma comercial de microarranjo, sendo que a identificação de doadores com fenótipo Vel– é crucial para os pacientes sensibilizados com anti-Vel. Entretanto, na maioria dos bancos de sangue do Brasil, a busca de doadores raros é realizada utilizando antissoros humanos policlonais, quando disponíveis. As técnicas sorológicas são trabalhosas com possíveis erros de interpretação dos resultados, principalmente para o antígeno Vel que tem uma grande variação na expressão antigênica. Diante do exposto, este estudo apresenta uma alternativa molecular para identificar doadores Vel– utilizando uma estratégia de alto rendimento e, mais além, é a primeira descrição do uso de ácido nucleico residual. A estratégia de genotipagem em *pool* utilizada no ensaio da PCR em tempo real para identificar a deleção *c.64_80del17* no gene *SMIM*1 demonstrou ser eficaz e precisa na identificação de doadores com os fenótipos Vel– e Vel+^{W}. A estratégia de reciclar o ácido nucleico da rotina NAT torna esta técnica economicamente atrativa e definitivamente superior às técnicas sorológicas para busca de doadores com fenótipo raro. O uso de ferramentas moleculares tem sido essencial na rotina dos laboratórios de Imuno-hematologia, aumentando a segurança e a eficácia transfusional em pacientes politransfundidos.[11]

Anteriormente a 2013, vários estudos avaliaram a prevalência do fenótipo Vel– utilizando métodos sorológicos. Em 2005, Haer-Wigman et al.[22] triaram 10.500 doadores para o fenótipo Vel com soro humano e 141 (1,3%) foram classificados como Vel+^{W}, majoritariamente pela presença da deleção de 17 nucleotídeos (*c.64_80del17*) em heterozigose e do SNP rs1175550 no haplótipo não deletado, como a análise molecular posterior revelou. Os autores identificaram dois doadores Vel– e confirmaram os resultados por sequenciamento. Em um estudo semelhante, realizado por Ballif et al.[18] estudou 70 indivíduos inicialmente sorologicamente classificados como Vel– foram genotipados e 2 casos eram na verdade falso-negativos (Vel+^{W}). Em ambos estudos, a avaliação do antígeno Vel pelas técnicas sorológicas, evidenciaram variações na interpretação dos resultados e, portanto, podem levar a resultados falsos negativos, principalmente devido à grande variação na expressão do antígeno, associado com o SNP rs1175550.[22] No presente estudo, a análise molecular comprovou a deleção *c.64_80del17* em heterozigose em 83 doadores classificados sorologicamente como Vel–. A variação da expressão do antígeno Vel nos doadores com a presença da deleção *c.64_80del17* em heterozigose neste estudo está de acordo com a literatura e possivelmente está relacionada com a presença de outros polimorfismos no alelo não deletado.[22]

A prevalência dos indivíduos Vel– foi de 1/12.661 (0.008%) e está discordante com estudos europeus (1/4.000). Por outro lado, a frequência de heterozigotos para a deleção (*c.64-80del17*;1/122) foi menor que a descrita na Suécia (1/17), Sudeste da Alemanha (1/55), Americanos Europeus (1/50) e em Santa Catarina (1/45).[16, 32, 33] A frequência global do alelo com a deleção (*c.64-80del*) em heterozigose entre os doadores testados foi de 0.41% (212/50.644).[30] Levando em consideração a área geográfica do banco de sangue onde foi realizado o estudo, esses resultados refletem

a frequência fenotípica da região sudeste do Brasil.[30] Os 2 doadores de sangue classificados como Vel negativo foram informados sobre a raridade do fenótipo e registrados no inventário da Fundação Pró-Sangue. Receberam explicações e orientações médicas sobre as implicações deste fenótipo tanto para um doador sangue quanto para o receptor. Familiares foram convidados a participar da pesquisa, pois, têm maior probabilidade de serem portadores deste fenótipo raro. Um dos 2 doadores identificado como Vel–, desenvolveu anti-Vel atribuído a uma transfusão sanguínea realizada no passado em uma cirurgia ortopédica.[28]

Outro ponto importante dos nossos achados foi a variação da expressão do antígeno Vel correlacionada com polimorfismos no Intron 2 do gene *SMIM*1. [17, 22, 23, 29] Analisamos a expressão do antígeno Vel em 116 doadores com a deleção *c.64_80del17* em heterozigose. A reatividade do antígeno Vel não foi detectada em 46 doadores, 41 apresentaram o genótipo AA (rs1175550) e 4 GG (rs1175550), entretanto, estes 4 doadores GG (rs1175550) apresentaram a inserção GCA (rs143702418) em homozigose, podendo explicar a não detecção do antígeno Vel, como relatado anteriormente por Christophersen et al.[23] No entanto, 16 (14%) doadores com a presença do genótipo GG apresentaram reatividades com variações de fraco a 2+ e a possível explicação que justifica este fato é a presença da inserção GCA (rs143702418) em homozigose em todos, confirmando a importância do rs143702418.[23] Nossos resultados confirmam a tese proposta por Christophersen et al.[23] que as variantes rs1175550 e rs143702418 modulam de forma independente a expressão do antígeno Vel em Africanos Americanos e inseparáveis nos Suecos. No entanto, em 27 (13,5%) dos 200 doadores sequenciados encontramos o genótipo AA (rs1175550) juntamente com a inserção GCA (rs143702418) em homozigose. Outro fato interessante foi a ausência da inserção GCA (rs143702418) em heterozigose em

12 doadores heterozigotos para o rs1175550 (AG). Todos os 116 doadores heterozigotos para deleção *c.64_80del17* fenotipados para o antígeno Vel, no qual a reatividade da aglutinação variou de negativo a 3+, em 110 destes, (94,8%) doadores com reatividade de negativo a 2+, confirma que a expressão do antígeno Vel está fortemente associada com as alterações moleculares no intron 2 do gene *SMIM*1.[17, 22-24] Controles Vel-positivo genotipados foram utilizados para comparar as reatividades do antígeno Vel (anexo C).

Analisamos o efeito individual do rs1175550 principal e nossos resultados mostram que de 114 amostras fenotipadas com variação de negativo a 2+, encontramos 86 (75,4%) doadores com genótipo AA e 4 (3,5%) com genótipo AG. No mesmo contexto, 2 doadores com a presença do rs1175550 em heterozigose (AG) apresentaram maior expressão (3+) do antígeno Vel. Entretanto, estes 2 doadores apresentaram o genótipo GG (rs6673829), o qual pode justificar o aumento da expressão do antígeno Vel.

Na análise estatística univariada, os níveis de expressão do antígeno Vel foram significativamente menores nos doadores AA (rs1175550) em comparação aos doadores AG/GG ($p<0.01$) (figura 8) e a diferença persistiu na analise multivariada ($p=0.012$) (tabela 10). Igualmente a Arnoni et al.[24] encontramos um p-valor significativo na expressão do antígeno Vel na análise individual do rs6673829 (figura 8). A expressão do antígeno Vel foi significativamente alta nos doadores com genótipo GG (rs6673829) comparada com os doadores GA/AA ($p=0.028$), entretanto esta diferença não persistiu com relevância estatística após análise multivariada ($p=0.319$) (tabela 10).

As outras variantes estudadas, rs1181893 (AC e AA) e rs9424296 (CA e AA) com alterações foram encontradas apenas nos doadores com o genótipo AA

(rs1175550) e CC (rs143702418) e o genótipo CC da variante rs191041962 estava presente em todos 200 doadores sequenciados.

Encontramos um novo polimorfismo não descrito em intron 2 do gene *SMIM*1 chr1:3691245_3691250delGCCCCG[29] (figura 7) em 3 doadores com reatividades distintas (tabela 8) e genótipos Idênticos para as variantes rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829 e rs1175550 exceto para o rs9424296 (anexo C).

A análise da frequência fenotípica (tabela 11) do Sudeste do Brasil comparada com a frequência geral e principalmente com a frequência da população africana mostrou-se muito similar, exceto para o rs1175550, no qual a população africana apresenta 40% contra 78% do alelo A e 60% contra 22% do alelo G. (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation).

Entretanto, houve uma maior discordância entre a frequência genotípica (tabela 12) em varias populações. A frequência genotípica descrita por Christophersen et al.[23] em Suecos, Americanos Africanos e Americanos de ascendência Africana do Sudeste dos EUA foi discordante para inserção CGCA (rs143702418). Neste mesmo contexto, outro dado importante foi a ausência da inserção CGCA em heterozigose na nossa população. A frequência da variante rs1181893 foi discordante nas populações Africana e Europeia publicadas no site https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation apenas para o genótipo em heterozigose (A/C), entretanto foi concordante com os dados publicados por Christophersen et al.[23] Em relação à frequência da variante rs6673829 descrita na população Europeia e Sueca, ela foi menor que nossos achados para os três genótipos (GG, GA e AA).

Surpreendentemente, considerando a miscigenação do Brasil, a variante principal (rs1175550), na qual a expressão do antígeno Vel foi pertinente, a frequência

genotípica foi discordante com nossos achados em relação a todas as populações africanas descritas anteriormente (tabela 9).

Este estudo apresentou algumas limitações. A mais importante foi não realizar a fenotipagem da expressão do antígeno Vel por citometria de fluxo em paralelo com a técnica de gel aglutinação. No entanto, a avaliação utilizando a fenotipagem em gel aglutinação para obter a expressão do Vel foi adequada e os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

3 CONCLUSÃO

Nossa estratégia foi validada e mostrou-se um método rápido, preciso, economicamente atrativo e definitivamente superior às técnicas sorológicas. A utilização da reciclagem do ácido nucleico pode ser utilizada no rastreamento em outros hemocentros do Brasil que utilizam a plataforma NAT Bio-Manguinhos ou outras plataformas similares, inclusive para outros genótipos raros de importância transfusional.

Determinamos a prevalência do fenótipo Vel-negativo e Vel+^{W} no Brasil. Dois doadores raros com fenótipo Vel-negativo foram registrados no inventário da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo.

Novo polimorfismo foi detectado em três doadores de sangue no intron 2 do gene *SMIM*1 e submetido na plataforma *online National Center for Biotechnology Information* (NCBI) no qual o registro gerado foi MH923240 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/home/submit).

REFERÊNCIAS

[1] Issitt PD, Anstee DJ: Applied blood group serology: Montgomery Scientific Publications Durham, NC, 1998.
[2] Garratty G: Blood groups and disease: a historical perspective. Transfusion medicine reviews 2000, 14:291-301.
[3] Reid ME, Yazdanbakhsh K: Molecular insights into blood groups and implications for blood transfusion. Current opinion in hematology 1998, 5:93-102.
[4] Poole J, Daniels G: Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. Transfusion medicine reviews 2007, 21:58-71.
[5] Rosse W, Gallagher D, Kinney T, Castro O, Dosik H, Moohr J, Wang W, Levy P: Transfusion and alloimmunization in sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood 1990, 76:1431-7.
[6] Matteocci A, Pierelli L: Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease and in thalassaemia: current status, future perspectives and potential role of molecular typing. Vox sanguinis 2014, 106:197-208.
[7] Sanz C, Nomdedeu M, Belkaid M, Martinez I, Nomdedeu B, Pereira A: Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. Transfusion 2013, 53:710-5.
[8] Noizat-Pirenne F: Relevance of alloimmunization in haemolytic transfusion reaction in sickle cell disease. Transfusion clinique et biologique 2012, 19:132-8.
[9] Seltsam A, Wagner FF, Salama A, Flegel WA: Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. Transfusion 2003, 43:1563-6.
[10] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD: Color and genomic ancestry in Brazilians. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003, 100:177-82.
[11] Rožman P, Dovč T, Gassner C: Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. Transfusion 2000, 40:936-42.
[12] Reid M: From DNA to blood groups. Immunohematology 2008, 24:166-9.
[13] Sussman L, Miller E: New blood factor: Vel. Revue d'hematologie 1952, 7:368-71.
[14] Storry J, Akerstrom B, Olsson M: investigation into the Carrier Molecule of the Vel Blood Group Antigen: s60-030e. Transfusion 2010, 50:29A.
[15] Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML: The blood group antigen factsbook: Academic press, 2012.
[16] Storry JR, Jöud M, Christophersen MK, Thuresson B, Åkerström B, Sojka BN, Nilsson B, Olsson ML: Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. Nature genetics 2013, 45:537.
[17] Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC, Kostadima M, Smethurst PA, Frontini M, van den Akker E, Bertone P, Bielczyk-Maczyńska E, Farrow S: SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. Nature genetics 2013, 45:542.
[18] Ballif BA, Helias V, Peyrard T, Menanteau C, Saison C, Lucien N, Bourgouin S, Le Gall M, Cartron JP, Arnaud L: Disruption of SMIM1 causes the Vel− blood type. EMBO molecular medicine 2013, 5:751-61.
[19] Daniels G: Human blood groups: John Wiley & Sons, 2008.
[20] Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC, Kostadima M, Smethurst PA, Frontini M, van den Akker E, Bertone P, Bielczyk-Maczynska E, Farrow S, Fehrmann RS, Gray A,

de Haas M, Haver VG, Jordan G, Karjalainen J, Kerstens HH, Kiddle G, Lloyd-Jones H, Needs M, Poole J, Soussan AA, Rendon A, Rieneck K, Sambrook JG, Schepers H, Sillje HHW, Sipos B, Swinkels D, Tamuri AU, Verweij N, Watkins NA, Westra HJ, Stemple D, Franke L, Soranzo N, Stunnenberg HG, Goldman N, van der Harst P, van der Schoot CE, Ouwehand WH, Albers CA: SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. Nat Genet 2013, 45:542-5.
[21] Storry JR, Joud M, Christophersen MK, Thuresson B, Akerstrom B, Sojka BN, Nilsson B, Olsson ML: Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. Nat Genet 2013, 45:537-41.
[22] Haer-Wigman L, Stegmann TC, Solati S, Ait Soussan A, Beckers E, van der Harst P, van Hulst-Sundermeijer M, Ligthart P, van Rhenen D, Schepers H: Impact of genetic variation in the SMIM1 gene on Vel expression levels. Transfusion 2015, 55:1457-66.
[23] Christophersen MK, Jöud M, Ajore R, Vege S, Ljungdahl KW, Westhoff CM, Olsson ML, Storry JR, Nilsson B: SMIM1 variants rs1175550 and rs143702418 independently modulate Vel blood group antigen expression. Scientific reports 2017, 7:40451.
[24] Arnoni CP, de Paula Vendrame TA, Muniz JG, Gazito D, de Medeiros Person RD, Cortez AJP, Latini FR, Castilho L: SMIM1 polymorphisms in a donor population from southeast Brazil and their correlation with VEL expression. Blood Transfusion 2019, 17:60.
[25] Beiguelman B: Curso prático de bioestatística: Revista Brasileira de Genética Ribeirão Preto, 1994.
[26] Andrea P, Kupek E, Genovez G, Martins J, Barban G: NAT yield for human immunodeficiency and hepatitis C viruses in Brazilian blood donors: preliminary results. Transfusion Medicine 2015, 25:125-7.
[27] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. Genome research 1996, 6:986-94.
[28] Dezan MR, Dinardo CL, Bosi SR, Vega S, Salles NA, Mendrone-Júnior A, Levi JE: High-throughput strategy for molecular identification of Vel–blood donors employing nucleic acids extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test screening. Transfusion 2016, 56:1430-4.
[29] Dezan MR, Neto AC, Gomes CN, Ribeiro IH, Oliveira VB, Conrado MC, Oliveira TGM, de Carvalho MLP, Aranha AF, Bosi SR: SMIM1 intron 2 gene variations leading to variability in Vel antigen expression among Brazilian blood donors. Blood Cells, Molecules, and Diseases 2019.
[30] Dezan MR, Dinardo CL, Rocha V, Mendrone-Junior A, Levi JE: Prevalence of SMIM1 c. 64_80del17 homozygotes in southeastern Brazil: the Vel-negative phenotype. Transfusion 2019, 59:428-.
[31] Latini FRM, Gazito D, Arnoni CP, Muniz JG, de Medeiros Person R, Carvalho FO, Baleotti Jr W, Castilho L, Barreto JA: A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. Blood Transfusion 2014, 12:s256.
[32] Costa D, Dezan M, Santos T, Schinaider A, Schörner E, Levi J, Santos-Silva M: Screening for the SMIM1* 64_80 del Allele in blood donors in a population from Southern Brazil. Transfusion Medicine 2016, 26:355-9.
[33] Wieckhusen C, Rink G, Scharberg EA, Rothenberger S, Kömürcü N, Bugert P: Molecular screening for Vel-blood donors in Southwestern Germany. Transfusion Medicine and Hemotherapy 2015, 42:356-60.

APÊNDICES

Apêndice A: Artigo publicado na Transfusion 2016.

High-throughput strategy for molecular identification of Vel– blood donors employing nucleic acids extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test screening

Marcia R. Dezan, Carla L. Dinardo, Silvia R.A. Bosi, Sileni Vega, Nanci A. Salles, Alfredo Mendrone-Júnior, and José E. Levi

BACKGROUND: Serologic methods to determine the Vel– phenotype require the use of rare human antisera and do not allow for many samples to be tested simultaneously, which limits their application as a tool to search for rare donors. This study developed a low-cost molecular screening strategy using real-time polymerase chain reaction (PCR) and DNA, extracted from plasma pools for viral nucleic acid test (NAT) screening, to identify Vel– and Vel+^{W} donors.

STUDY DESIGN AND METHODS: A total of 4680 blood donors from the Brazilian southeast region were genotyped through real-time PCR targeting the 17-nucleotide (c.64_80del) deletion in the *SMIM1* gene, which determines the Vel– phenotype, by using remaining nucleic acid from plasma pools of six donors, routinely discarded after the release of viral NAT results.

RESULTS: Twenty pools tested reactive and individual testing of samples from reactive pools identified 19 heterozygous donors with the *SMIM1*64_80del* deletion (0.40%) and one homozygous donor (0.02%). Fourteen of the 19 donors were confirmed as Vel– or Vel+^{W} using anti-Vel human antiserum.

CONCLUSION: The DNA pool genotyping strategy using real-time PCR designed to detect the deletion in the *SMIM1* gene proved effective and accurate in identifying donors with the Vel– and Vel+^{W} phenotypes. The fact that remaining nucleic acid from routine viral NAT screening was used makes this technique economically attractive and definitely superior to the serologic techniques available to search for this rare phenotype.

The high-frequency Vel antigen was described in 1952,[1] but its molecular bases were only identified recently.[2-4] The Vel– phenotype is transmitted through recessive autosomal inheritance and is normally revealed when the Vel– individuals develop anti-Vel after transfusion or pregnancy.[2,3] Individuals with anti-Vel may suffer severe acute hemolytic transfusion reactions after transfusion of incompatible blood, which confirms the clinical importance of this antibody. Donors of Vel– phenotype are rare (1/4000 in Europe), but their identification is necessary for the safe transfusion in sensitized patients.[2-5] Transfusion support in patients with anti-Vel is challenging not only due to the rarity of compatible donors, but also mainly due to the unavailability of commercial reagents for serologic screening.[6]

The main molecular mechanism responsible for the Vel– phenotype is the deletion of 17 nucleotides in Exon 3 of *SMIM1* gene, which codes for the Vel blood group system.[3] *SMIM1* is a small, 97-kb gene located on Chromosome 1, made up of four exons.[2-4] Currently, no commercial large-scale blood group genotyping platform includes Vel typing. This study aimed to develop a low-cost, high-throughput strategy, to identify rare donors carrying the Vel– phenotype through molecular screening on a real-time polymerase chain reaction (PCR) platform,

From the Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Address reprint requests to: José E. Levi, Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar 155, 1o andar B4, CEP 05403-000, São Paulo-SP, Brazil; e-mail: jelevi@prosangue.sp.gov.br.

Supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant 2015/095403 (to MRD).

Received for publication June 17, 2015; revision received January 11, 2016; and accepted January 21, 2016.

doi:10.1111/trf.13572

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;56;1430–1434

TABLE 1. Primers and probe sequences for real-time PCR

Name/type	Sequence
*SMIM1*_Vel-F/primer	5′-CCACTATAGTAGGTGGGAGGA-3′
*SMIM1*_Vel-R/primer	5′-TCTCTGGAGGGAGACACC-3′
*SMIM1*_Vel/probe	5′-/56-FAM/AGCAGGGAC/ZEN/GGAGTCCAG/31ABkFQ/-3′

using DNA remaining from plasma pools submitted to viral nucleic acid testing (NAT).

MATERIALS AND METHODS

Samples

This study included 4680 blood donors from Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, enrolled in between August 21, 2014, and December 8, 2014. Blood samples were collected in EDTA tubes with gel separator (Vacutainer PPT Plasma Preparation Tube, Becton Dickinson), centrifuged in 2 to 24 hours for 5 minutes at 1192 × *g* and stored at 4°C until DNA extraction. No exclusion criteria were applied. The protocol was approved by the ethical committee from the Reference and Training Center in DST/AIDS, São Paulo, Brazil (CAAE 45481715.6.0000.5375).

Since 2013, pools consisting of plasma from six blood donors have been screened at the serology lab from Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, for hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus RNA.[7] Each donation contributes 100 μL of plasma to the 600-μL pool. After homogenization, 265 μL is taken by the fully automated nucleic acid extraction system (MDx, Qiagen). Nucleic acids are eluted in 60 μL and approximately 20 μL is not used. After NAT results are released, this excess nucleic acid solution is normally discarded. However, for this study, the remaining nucleic acid was transferred to another microplate containing reagents for *SMIM1* analysis as described below.

Vel– specific real-time PCR assay design

PCR primers were designed spanning 127 bp from the Exon 3 of the *SMIM1* gene (Table 1). An internal probe to this amplicon was designed to hybridize specifically to the nucleotide sequence existing only in individuals carrying the 17-bp deletion (*GenBank* NM_001163724). Primers were designed using computer software (Primer 3).[8]

For simplicity, primers and probe were synthesized and packaged together as a quantitative PCR assay (PrimeTime, IDT). Real-time PCR conditions were as follows: 10 μL of 2× TaqMan universal master mix (Applied Biosystems), 1 μL of primers-probe solution (final concentration, 500 nmol/L primers and 250 nmol/L probe) in addition to 9 μL of DNA extracted from the plasma pool, giving a final reaction volume of 20 μL. The reaction was run on real-time PCR system equipment (StepOne, Applied Biosystems) programmed for an incubation of 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 50 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

Validation

The procedure was validated by pooling plasma samples previously recognized as Vel– with five samples from routine donors, to make a six-member pool. The pool containing the Vel– sample was blinded until assignment of the real-time PCR results.

Individual testing of positive pools

After validation, DNA from the viral NAT pools was amplified by the real-time PCR method described above on the day after the issue of NAT results. Corresponding primary tubes (EDTA-anticoagulated whole blood tubes) were kept at +4°C. The six donations from a reactive pool were individually extracted using a genomic DNA manual kit (PureLink, Invitrogen) using 200 μL of whole blood and genotyped using real-time PCR under the same conditions. Samples that were identified as reactive were subjected to conventional PCR to check for Vel zygosity using a PCR-restriction enzyme protocol.[4]

Serologic testing

Expression of the Vel antigen was evaluated in 14 samples by gel-IAT (Grifols). Antibody screening[9] was performed on plasma from all samples harboring a *SMIM1*del allele.

rs1175550 SNP genotyping (DNA sequencing)

SMIM1 Intron 2 was sequenced to identify rs1175550 variation in all samples classified as heterozygous for c.64_80del. PCR was performed using the following primers: 128_F 5′-AGTCATTTGCCCAGGGTCAG-3′ and 472_R 5′-CAGGGACCGGTCTAGCTGTA-3′ designed with the software Primer 3.[8] PCR was run on a thermocycler (Eppendorf) in a total volume of 50 μL, containing 50 to 150 ng/μL DNA and 10 pmol/μL forward and reverse primers. PCR conditions were as follows: 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 64°C, and 60 seconds at 72°C, followed by 3 minutes at 72°C. PCR products were purified and sequenced using standard Sanger methodology and a cycle sequencing kit (ABI BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems) subsequently run on automated sequencer equipment (ABI 310, Applied Biosystems).

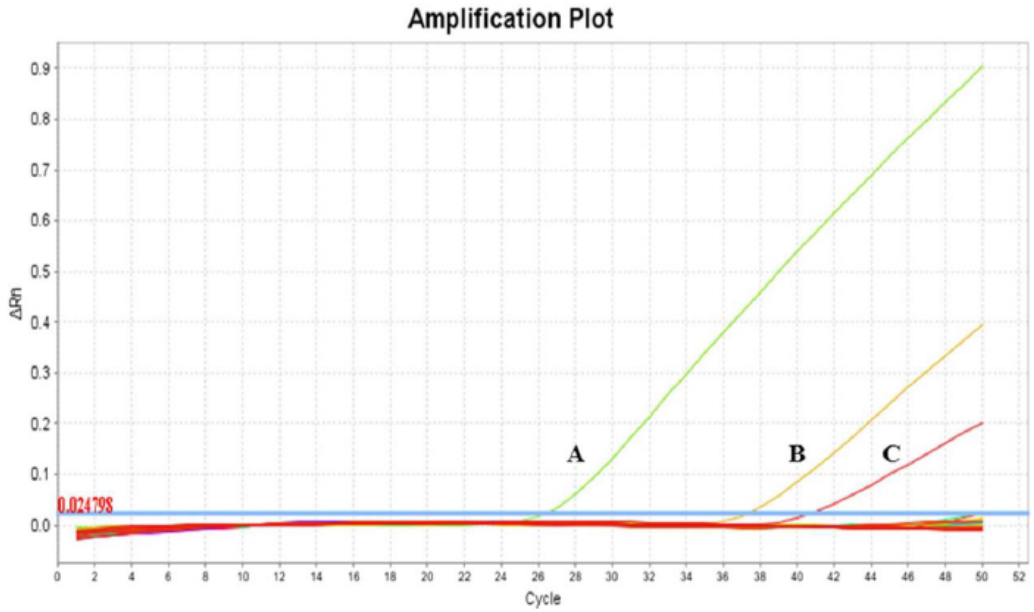

Fig. 1. Real-time PCR genotyping used to detect the deletion of 17 nucleotides in Exon 3 of *SMIM1*. (A) Genomic DNA Vel–; (B) plasma DNA single-donor Vel–; (C) plasma DNA pool containing one donor Vel–.

RESULTS

The *SMIM1*del real-time PCR genotyping assay was used to identify the presence of *SMIM1* c.64_80del. During validation, all three pools containing the Vel– samples were correctly identified. No false-reactive pool results were obtained, giving a 100% sensitivity and specificity for this test. The mean and median cycle thresholds of the reactive pools were 41.0 and 41.6, respectively (Fig. 1).

Nucleic acid extracts from 4680 donors were combined into 780 pools of six samples. Seventeen pools were reactive for the 17-nucleotide deletion *SMIM1* c.64_80del. Samples from all reactive pools were studied individually. Three pools had more than one sample with the relevant allele, resulting in 20 reactive samples (20/4680, 0.42%).

Nineteen (0.40%) of the reactive samples were further characterized as heterozygotes and one (0.02%) was a homozygote. The serologic analysis of the Vel antigen was carried out using a single polyclonal human antiserum containing immune anti-Vel in 13 of the 19 heterozygous samples that contained the deletion. RBCs from four donors were nonreactive, which were classified as false-negative results, and nine donors presented weak expression of the Vel antigen (Table 2). There was a significant variation of reaction intensity among the heterozygous donors.

Phenotyping could not be performed for six donors since RBC samples were not available. The sample homozygous for the deletion was shown to be Vel–. The irregular antibody assay was performed for the 20 donors and only the homozygous Vel– donor contained the anti-Vel with a titer of 32 and a score of 43 (Table 2).

From the 19 heterozygous samples, we were able to evaluate the rs1175550 SNP on 13 while four donors did not attend our recall, preventing their genotyping, since this reaction can only be performed with a DNA input typically obtained from whole blood. We could not obtain an amplicon from the other two donors. SNP analysis of rs1175550 on 13 of 19 heterozygous *SMIM1*del samples and the Vel– sample is shown in Table 2.

DISCUSSION

The DNA pool genotyping strategy using real-time PCR assay designed to identify deletion c.64_80del in the *SMIM1* gene proved effective and accurate in identifying donors with the Vel– and Vel+^{W} phenotypes. The fact that remaining DNA from the NAT routine testing was used makes this technique economically attractive and definitely superior to the serologic techniques to search for this rare phenotype.

The use of molecular biology tools has been essential for the laboratory routine in immunohematology and has increased transfusion safety and efficacy in polytransfused patients.[10] The array strategies are currently the most

TABLE 2. Serologic and molecular results

Sample number	ABO	Vel phenotype reactivity	IAT	*SMIM1* genotype PCR + RFLP	Sequencing, rs1175550
1	A	(+)	Negative	*WT*/Δ	AA
2	O	(+)	Negative	*WT*/Δ	AA
3	O	++	Negative	*WT*/Δ	GG
4	O	Negative	Negative	*WT*/Δ	NT
5	AB	NT	Negative	*WT*/Δ	AA
6	A	(+)	Negative	*WT*/Δ	AA
7	A	NT	Negative	*WT*/Δ	AA
8	A	(+)	Negative	*WT*/Δ	AA
9	A	(+)	Negative	*WT*/Δ	AA
10	O	++	Negative	*WT*/Δ	AA
11	A	Negative	Anti-Vel	Δ/Δ	AA
12	O	++	Negative	*WT*/Δ	AA
13	A	NT	Negative	*WT*/Δ	NT
14	O	NT	Negative	*WT*/Δ	NT
15	O	Negative	Negative	*WT*/Δ	AA
16	O	Negative	Negative	*WT*/Δ	AA
17	O	Negative	Negative	*WT*/Δ	AA
18	A	NT	Negative	*WT*/Δ	NT
19	A	(+)	Negative	*WT*/Δ	NT
20	O	NT	Negative	*WT*/Δ	NT
Control Vel+ donor	O	+++	Negative	*WT*/*WT*	GG

Δ = deletion; NT = not tested; RFLP = restriction fragment length polymorphism; *WT* = wide type.

appropriate to search for rare donors since they allow multiple antigens to be analyzed in a single reaction while the conventional PCR techniques analyze few antigens and few samples in the same assay. In the case of the Vel antigen, only the conventional PCR technique has been described and it has not been included in any commercial array platform. Identifying donors with the Vel– phenotype is crucial for sensitized recipients given the importance of the anti-Vel in transfusions. In most blood banks, the search is carried out using human antisera, which has limited availability, while demanding a laborious approach with potential errors when interpreting the results. This study presents a molecular alternative to identify Vel– donors using a high-throughput strategy and, furthermore, is the first description of the use of DNA remaining from the viral NAT routine testing resulting in cost efficiency.

Other studies have assessed the prevalence of the Vel– phenotype using serologic methods, which is barely applicable as a screening strategy. In 2005, Haer-Wigman and coworkers[11] investigated 10,500 donors for the Vel phenotype using human serum and 141 (1.3%) were classified as Vel+^{W}, mostly due to the presence of the deletion of 17 nucleotides (c.64_80del) in heterozygosis and of the A SNP rs1175550 in nondeleted haplotypes, as later shown by molecular analysis. The authors identified two Vel– donors and confirmed the results by DNA sequencing. In a similar study,[4] 70 individuals initially classified serologically as Vel– were genotyped and two cases were in fact serology false-negative. In both studies, the serologic techniques to assess the Vel antigen were prone to variation in the interpretation of results and thus may lead to false-negative results, mainly due to the large variation in the expression of the antigen, associated to the rs1175550 SNP.[11] In the present study, four donors serologically classified as Vel– who were shown by molecular analysis to be heterozygous for deletion c.64_80del were identified. The Vel antigen expression variation exhibited by the c.64_80del heterozygous donors in our study is in accordance with a previous report and is probably related to the presence of other polymorphisms in the nondeleted haplotype.[11]

In this study, we have confirmed the role played by rs1175550 on the expression of Vel antigen among 13 Vel+^{w} donors harboring the c.64_80del in heterozygosis. Donors who presented the deletion of 17 nucleotides (c.64_80del) in heterozygosis and the rs1175550 SNP in homozygosis for the major A allele showed variable intensity of Vel expression, as depicted in Table 2. A trend for A allele carriers to display lower expression of Vel when compared to the G allele was observed, as described previously.[3] The only donor with the rs1175550 SNP in homozygosis for the minor G allele had the highest Vel expression. The Vel– donor with the presence of the deletion of 17 nucleotides (c.64_80del) in homozygosis was associated with the rs1175550 SNP in homozygosis for the major A allele. We did not find any heterozygous A/G donor for rs1175550 SNP in this small group of Vel+^{w} as reported recently for a larger group of 88 subjects also heterozygous for the c.64_80del.[11]

The prevalence of Vel– individuals, based on homozygosity for SMIM1c.64-80del, in our population is one in 4680 (0.02%) and is in agreement with European

studies (approx. 1/4000). The Vel+^{w} phenotype due to heterozygosity for c.64-80del was observed to be 0.4% (19/4680). The overall allele frequency of the 17-bp deletion among the donors tested was shown to be 0.22% (21/9,360). Taking into consideration the geographical area of the blood bank where the study was carried out, these results reflect the phenotypic frequency of the southeast region of Brazil.

Since, at Fundação Pró-Sangue, São Paulo, NAT routine is performed for all blood donors, the use of remaining DNA to check for the Vel– phenotype would hypothetically allow identification of, on average, one Vel– donor per week, which represents 5 days of collection (1000 donors/day). These rare donors are registered and informed about their rare phenotype and the importance of their blood components for recipients who need them is explained. Relatives are invited to be tested as well, since they have a higher chance to be carriers of this rare phenotype. Noticeably, the single Vel– donor identified in this investigation presented anti-Vel, attributable to a blood transfusion received in an orthopedic surgery.

In conclusion, the real-time PCR method using DNA extracted from plasma pools, which would otherwise be discarded, has been validated and proved to be a quick and precise method to detect the deletion of 17 nucleotides (c.64_80del) in Exon 3 of gene *SMIM1*. It can, hence, be used for the same purpose to identify other rare blood group donors and also implemented at other blood banks that use NAT platforms allowing the nucleic acid extracts to be retrieved.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Mariza Mota, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil, and Dr Rodolfo Ramos, Hemocentro de Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, for providing Vel– control samples and Dr John Saldanha (Immucor, Norcross, GA) for reviewing the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Sussman LN, Miller EB. New blood factor: Vel. Rev Hematol 1952;7:368-71.
2. Storry JR, Jöud M, Christophersen MK, et al. Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. Nat Genet 2013;45:537-41.
3. Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens JC, et al. SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. Nat Genet 2013;45:542-5.
4. Ballif BA, Helias V, Peyrard T, et al. Disruption of SMIM1 causes the Vel- blood type. EMBO Mol Med 2013;5:751-61.
5. Daniels G. Human blood groups. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 2013.
6. Seltsam A, Wagner FF, Salama A, et al. Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. Transfusion 2003;43:1563-6.
7. Andrea P, Kupek E, Genovez G, et al. NAT yield for human immunodeficiency and hepatitis C viruses in Brazilian blood donors: preliminary results. Transfus Med 2015;25:125-7.
8. Primer 3: WWW primer tool [Internet]. Cambridge: Whitehead Institute for Biomedical Research; c1996,1997,1998 [cited 2015 Dec 20]. Available from: http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi.
9. Brecher M, editor. Technical manual. 15th ed. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 2005.
10. Rozman P, Dovc T, Gassner C. Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. Transfusion 2000;40:936-42.
11. Haer-Wigman L, Stegmann TC, Solati S, et al. Impact of genetic variation in the SMIM1 gene on Vel expression levels. Transfusion 2015;55:1457-66.

Apêndice B: Artigo publicado na Transfusion Medicine.

Screening for the *SMIM1*64_80 del* Allele in blood donors in a population from Southern Brazil

D. C. Costa,[1] M. Dezan,[2] T. Santos,[3] A. A. Schinaider,[3] E. J. Schörner,[4] J. E. Levi[2] & M. C. Santos-Silva[3]

[1]*Graduate Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brazil,* [2]*Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, Rua Dr. Enéas Carvalho Aguiar, São Paulo, Brazil,* [3]*Department of Clinical Analyses, Federal University of Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brazil, and* [4]*Immunohematology Laboratory, Santa Catarina Blood Bank, HEMOSC, Avenida Professor Othon Gama D'Eça, Florianópolis, Brazil*

Received 7 February 2016; accepted for publication 31 May 2016

SUMMARY

Background and Objectives Serological screening for the Vel– phenotype is complex given the large individual variation in the levels of expression of the Vel antigen, and the polyclonal anti-human sera of immunised persons, when available, show heterogeneous reactivity levels. Studies of the *SMIM1* gene have enabled the development of several molecular methodologies that will be crucially important for the screening of different populations, including Brazilians. To evaluate the deletion of 17 bp in the *SMIM1* gene in a population from the south of Brazil, 448 unrelated blood donors from 7 regions comprising the haemotherapy network in the state of Santa Catarina were evaluated between August 2011 and March 2014.

Materials and Methods DNA samples from these donors were analysed employing a 5′ nuclease real-time polymerase chain reaction (PCR) assay targeting the 17 bp deletion in the *SMIM1* gene.

Results Among the 448 samples analysed, 10 (2·23%) harboured the 17 bp deletion of the gene *SMIM1*, and all were heterozygote for the *SMIM1*64_80 del* allele.

Conclusion The allelic frequency found differed from those observed in other Caucasian populations. This difference can be explained by the ethnic make-up of each Caucasian population. The data obtained are important to characterise the correct phenotype of the donor as the serological assay results are not reliable due to variations in the expression intensity of the Vel antigen in heterozygote donors for the *SMIM1*64_80 del* allele. Moreover, the tool used in this study is of great value for identifying a donor Vel– phenotype and supplying a possible need for transfusion.

Correspondence: Maria Claudia Santos-Silva, Department of Clinical Analyses, Center of Healthcare Sciences, Federal University of Santa Catarina, UFSC, Campus Trindade, CEP 88040-000, Florianópolis, SC, Brazil.

Tel.: +55 48 37218146; fax: +55 48 37219542; e-mail: maclau@ccs.ufsc.br

Key words: blood groups, donors, genotyping, transfusion.

The Vel antigen was described by Sussman & Miller (1952) and is restricted to the erythroid lineage. It is a high-frequency antigen expressed in the red blood cells of most people, but it may be missing in rare cases (Sussman & Miller, 1952). The overall frequency of the Vel– phenotype in the Caucasian population is approximately 0·025%, and it has been described in other populations such as Black, Asian and Canadian Indian populations (Reid *et al.*, 2012; Daniels, 2013).

The Vel– phenotype is one of the most difficult blood types to supply in many countries. This is partly due to the low frequency of the Vel– blood type but also to the lack of systematic screening for Vel in blood donors (Ballif *et al.*, 2013). Few donor screenings have been carried out as the serological screening for the Vel– phenotype is complex due to the large individual variation in Vel expression levels and polyclonal anti-human sera of immunised (anti-Vel) persons available that show heterogeneous reactivity levels. While the Vel– phenotype is rare, many examples of anti-Vel developed after transfusion or pregnancy have been reported (Sussman & Miller, 1952; Van Gammeren *et al.*, 2008; Linz *et al.*, 2010; Reid *et al.*, 2012). Anti-Vel is well known for its aggressive haemolytic activity. Due to the clinical significance of anti-Vel and the limitations of serological tests for the Vel antigen, researches have been made to identify the genetic basis of the Vel blood type, and the results have been successful (Ballif *et al.*, 2013; Storry *et al.*, 2013; Haer-Wigman *et al.*, 2015).

Recent investigations on the molecular mechanism responsible for the Vel – phenotype, that is, the deletion of 17 nucleotides in exon 3 of *SMIM1* gene, which codes for the Vel blood group system, resulted in the transfer of the Vel antigen from collection 212 to a new blood group system: number 34 (Ballif *et al.*, 2013; Cvejic *et al.*, 2013; Storry *et al.*, 2013; Storry, 2014; Haer-Wigman *et al.*, 2015). Such knowledge allowed several molecular methodologies to be developed, which will be

© 2016 British Blood Transfusion Society

First published online 21 June 2016
doi: 10.1111/tme.12328

important to screen various populations, such as Brazilians, that have large racial heterogeneity. Knowing the molecular bases of the genes responsible for coding antigens, besides being important to develop molecular biology methods, identify mutations, understand polymorphisms and find new alleles and new systems, also works as a tool to search for rare donors (Reid, 2003; Reid & Denomme, 2011).

Thus, this study aimed to genotype the deletion of 17 bp in the *SMIM1* gene in samples of voluntary blood donors in the state of Santa Catarina, southern Brazil, and identify possible donors with the Vel– phenotype often misidentified by serological methods due to the weak expression of the antigen in the erythrocytes.

MATERIALS AND METHODS

A total of 448 blood donors were selected from the Center of Hematology and Hemotherapy of Santa Catarina (HEMOSC). All participants provided written informed consent before sample collection. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Catarina and HEMOSC (no. 2270/2011). Next, aliquots of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated peripheral venous blood were collected from healthy blood donors between August 2011 and March 2014.

Genomic DNA Extraction

A total of 5 mL of peripheral blood were collected in EDTA tubes and centrifuged (2500 × *g* for 10 min). Buffy coat was transferred to a clean tube, and DNA was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Chattlesworth, CA, USA) following the manufacturer's protocol. DNA concentration and quality were evaluated in a NanoVue™ Plus spectrophotometer (GE Healthcare Life, Uppsala, Suécia).

Specific Real-time PCR Analysis for Vel– Negative Genotype

PCR primers were designed spanning 127 base pairs from exon 3 of the *SMIM1* gene, using the software Prime 3[8]. An internal probe to this amplicon was synthesised, and its 3′ end was designed to hybridise specifically to the nucleotide sequence existing only in individuals carrying the 17-bp deletion (GenBank NM_001163724).

The primers and probe were synthesised and packaged together as a PrimeTime qPCR assay (IDT, Skokie, Il, USA). The real-time PCR was performed in accordance to a protocol previously described by Dezan *et al.* (2016) as follows: 10 µL of TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL of primers/probe solution (final concentration = 500 nM of primers and 250 nm of probe, labelled with the FAM fluorofore) in addition to 9 µL of DNA (40 ng µL^{-1}) extracted from the buffy coat, yielding a final reaction volume of 20 µL (Dinardo *et al.*, 2014). PCR analysis was performed using the StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems) programmed for an incubation of 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 50 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min (Fig. 1).

PCR-RFLP Vel Genotyping

Samples found positive for the 17-bp deletion were further submitted to a conventional PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, aiming to verify the zygosity of the reactive blood donors. A fragment encompassing exons 3 and 4 of the *SMIM1* gene was amplified from genomic DNA by PCR based on primers previously described (Ballif *et al.*, 2013). PCR amplification was carried out in a Mastercycler personal thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in 50-µL final volume reactions containing 200 ng of genomic DNA, 50 pmol of each primer, 2 nmol of each dNTP and 1·0 U of Taq DNA Polimerase (Invitrogen Life Technologies®, Grand Island, NY, USA). The amplification programme consisted of an initial step at 95 °C for 5 min, 35 cycles at 95 °C for 1 min, 62 °C for 1 min and 72 °C for 1 min and a final extension step at 72 °C for 7 min. RFLP analysis was carried out with 2 µL from the PCR reaction amplicon in a 10-µL reaction containing 3 U of *Sty* I restriction endonuclease (New England Biolabs Beverly, MA, USA) in 1 NE Buffer 3 at 37 °C for 12 h, and revealed by 3·0% agarose gel electrophoresis in 1 TBE buffer.

The PCR fragment products observed in agarose gel electrophoresis were 1200, 800 and 400 bp corresponding, respectively, to heterozygote of the *SMIM1***64_80 del allele* (*Wild type/SMIM1***64_80 del* genotype), 1200 bp for homozygote of the *SMIM1***64_80 del allele* (*SMIM1***64_80 del/ SMIM1***64_80 del*) and 800 and 400 bp for homozygote of the *Wild type allele* (*Wild type/Wild type genotype*). PCR fragments products indicating heterozygous and homozygous *SMIM1***64_80 del allele* were determined using reference samples.

Serology Analysis

Expression levels of the Vel antigen in samples that were positive (heterozygous) for 17-bp deletion were evaluated by serology. All donors with positive real-time PCR results were tested using 50 µL of 0·8% red blood cell suspension added to the LISS/Coombs (Grifols S.A.) test gel card, to which 25 µL of anti-Vel human serum were then added. Positive and negative controls were performed in parallel. The macroscopic agglutination analysis was performed following previously established protocols (Dinardo *et al.*, 2014).

rs1175550 SNP genotyping

Genotyping to identify rs1175550 SNP in *SMIM1* that was reported to be associated with expression levels of the Vel antigen was performed in all samples classified as heterozygous for c.64_80del. PCR-SSP was performed using the following primers: rs1175550-R1 5′-CTCAGGCCAAGCCCTGACC-3′ (antisense), rs1175550-F1g 5′-TCAGGGGCTGCAGCCT

© 2016 British Blood Transfusion Society

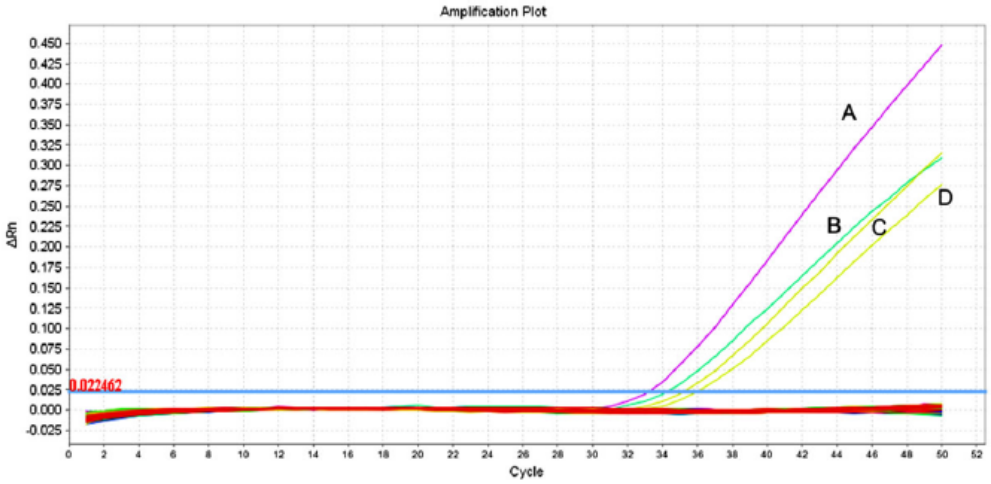

Fig. 1. Real-time PCR genotyping used to detect the deletion of 17 nt in exon 3 of SMIM1. (a) Control DNA genomic Vel–. (b – d) Donors DNA samples positive for the SMIM1*64_80 del allele.

AGG -3′ (sense) and rs1175550-F1a 5′-TCAGGGGCTGCAGC CTAGA-3′ (sense), designed and previously described (Wieckhusen *et al.*, 2015). PCR amplification was carried out in a Mastercycler personal thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) in 50-μL final volume reactions containing 50 – 150 ng mL^{-1} of genomic DNA, 10 pmol of forward and reverse primers, 2 nmol of each dNTP and 1·0 U of Taq DNA Polimerase (Platinum Invitrogen Life Technologies®, Grand Island, NY, USA). PCR conditions were as follows: 10 min at 95 °C, 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 65 °C and 60 s at 72 °C, followed by 3 min at 72 °C. Amplification product (160 bp) was identified on 2% agarose gels containing GelRed DNA stain (Biotium, Hayward, CA, USA). Results were documented using a gel documentation (ImageQuant LAS 500, Piscataway, NJ, USA).

RESULTS

Real-time PCR Analysis

Among the 448 blood donor DNA samples analysed, 10 (2·23%) were positive for the 17-bp deletion (64_80 del) of the *SMIM1* gene in at least one allele (10/448 = 2·23%). All positive samples were repeated in triplicate to confirm the results, and the observed average Ct was 32·97.

A total of 10 (2·23%) positive samples were characterised as heterozygotes for the *SMIM1*64_80 del* allele using RFLP-PCR as described above.

Serological analysis of the Vel antigen for the 10 positive samples characterised as heterozygotes by RFLP-PCR showed reactivity for the Vel antigen ranging from one to three crosses (Table 1).

Table 1. Vel phenotyping in heterozygous samples

Samples	ABO	Vel phenotyping Reactivity	Vel genotyping	rs1175550 SNP
1	O	1+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
2	O	1+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
3	O	2+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
4	O	3+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
5	O	3+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	NT
6	O	1+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
7	O	2+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
8	O	2+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
9	O	3+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AG*
10	O	2+	*Wild type/SMIM1*64_80 del*	*AA*
Control	O	4+	*Wild type/Wild type*	*GG*

NT, not tested.

From the 10 positive samples characterised as heterozygotes for the *SMIM1*64_80 del* allele, 9 were able to be evaluated for the rs1175550 SNP, while 1 donor did not attend our recall, preventing its genotyping. SNP analysis of rs1175550 on 9 heterozygous *SMIM1*64_80 del* samples is shown in Table 1.

DISCUSSION

The *SMIM1* gene codes for the protein SMIM1, which is responsible for expressing the Vel antigen of the new Vel Blood Group System, has been recently described and has been the target of studies by several researchers. Knowing the genetic bases responsible for expression of the Vel antigen allowed

© 2016 British Blood Transfusion Society

molecular assays to be applied for the first time to determine the frequency of the *SMIM1*64_80 del* allele – which corresponds to the Vel– phenotype in homozygosity or for Vel+ when in heterozygosity. In this study, a cohort of 448 blood donors of seven regions that represent the state of Santa Catarina were tested for the *SMIM1*64_80 del* allele. The frequency obtained for the *SMIM1*64_80 del* allele was 1·12%, of the Wild type/*SMIM1*64_80 del* genotype was 2·23%, and no sample was found homozygous for the deletion. According to the literature, the frequency of the Vel– phenotype or homozygosity for *SMIM1*64_80 del* in Caucasians is 0·025% (Reid *et al.*, 2012). It is estimated that, to find this phenotype, 5000 blood donor samples would have to be analysed (Reid *et al.*, 2012; Daniels, 2013). Dezan *et al.* (2016) showed it is possible to find a donor with Vel– phenotype in a study with 4680 blood donors through a strategy developed to identify the *SMIM1*64_80 del* allele in blood donors from viral NAT screening plasma pools.

As for the frequency of the *SMIM1*64_80 del* allele in Brazil, this study found a frequency of 1·12%, i.e. higher than the frequency of 0·22% found among blood donors in the state of São Paulo, southeast Brazil. This difference could be explained by the strong influence of immigration in that state, which continuously receives Afro-descendant immigrants. Studies carried out on African Blacks showed a frequency of 0·56% of the allele (Haer-Wigman *et al.*, 2015).

Caucasian populations from the Netherlands who were also studied present a frequency of 1·46%, which is similar to the one found in the present study (Haer-Wigman *et al.*, 2015). These frequencies can be explained by the similarity of the ethnic make-up of the Caucasian populations studied. The Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world, being composed of ethnicities from three continents over a period of five centuries: the European colonisers, mainly from Portugal and Italy; African slaves; and local Amerindian populations (Carvalho-Silva *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2003; Guelsin *et al.*, 2010). The present study evaluated samples from the State of Santa Catarina in the southern region of Brazil, which represents an interracial mixture of European, African and Amerindian genes. According to Manta *et al.* (2013), the population of the state of Santa Catarina is predominantly of European origin (79·7%), with a contribution from Africans (11·4%) and Amerindians (8·9%) (Manta *et al.*, 2013).

The frequency of the *SMIM1*64_80 del* allele in the population studied was higher than those observed in other populations who reported frequencies of 0·09 in African Americans, 0·56 in African Blacks and 0·60 in Chinese populations (Storry *et al.*, 2013, Haer-Wigman *et al.*, 2015). In this study, the role played by rs1175550 on the expression of Vel antigen among nine Vel^{+w} donors with the *SMIM1*84 del* in heterozygosis was also confirmed. Donors who presented the deletion of 17 nucleotides (c.64_80del) in heterozygosis and the rs1175550 SNP in homozygosis for the major A allele showed variable intensity of Vel expression, as shown in Table 1. One heterozygous A/G donor for rs1175550 SNP was found in this small group of Vel^{+w} as reported for a larger group of 88 subjects also heterozygous for the c.64_80del (Haer-Wigman *et al.*, 2015). Although this study has shown specific differences in the Vel antigen expression in donors heterozygous for the 64–80del allele ranging from 1+ to 4+, the phenotyping is very dependent on the quality of anti-Vel serum and on the sensitivity of the test technique that can be variable in accordance with commercial technique (Wieckhusen *et al.*, 2015).

The data obtained in the present study greatly contribute to characterising the Vel phenotype in a population in Brazil, but further studies with a larger number of samples are required to determine the frequency in other states, mainly of the Vel– phenotype, which were not found in this study. These studies are very important for the supply of blood units compatible to rare phenotype patients. These patients require units of blood phenotype compatible once the anti-Vel, developed against the Vel antigen, has clinical importance and is regularly responsible for acute severe reactions or delayed haemolytic transfusion (HTR) that may induce life-threatening kidney failure and be associated with haemolytic disease of the foetus and newborn (Van Gammeren *et al.*, 2008; Daniels, 2013). Patients with antibodies directed to the Vel antigen and who are in need of a blood transfusion have a transfusion hazard in an emergency situation. When a patient with anti-Vel is transfused with Vel red blood cells (RBCs), a severe immediate haemolytic transfusion reaction can occur due to intravascular haemolysis of Vel RBCs (Haer-Wigman *et al.*, 2015).

The difficulties encountered are that such patients are characterised by their phenotype after prior contact with Vel antigen and development of associated antibody to the high-prevalence Vel antigen. Co-authors of our study lived this experience, in this case with a happy ending. Due to the patient's favourable clinical conditions, it was possible to receive autologous transfusion. When this is not possible, intense efforts are necessary because the supply of blood Vel must be managed with help from national or international rare blood banks (Nance, 2009).

These problems can be foreseen or prevented with the introduction of donor screening blood bank services for rare phenotypes as well as the study of potential families identified as heterozygous donors, using molecular tools. The knowledge of the molecular mechanisms of the Vel blood group system will enable this type of studies, which were previously limited as serological assays did not yield reliable results due to variations in the expression intensity of the Vel antigen and to the unavailability of commercial reagents.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge and thank the Laboratory of Molecular Biology and Mycobacteria (Maria Luiza Bazzo, PhD UFSC, Department of Clinical Analyses) for the technical support. This research was supported by a scholarship for D. C. C. from Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (www.capes.gov.br). This study was done with

© 2016 British Blood Transfusion Society

partial financial support by the Graduate Program in Pharmacy from the Federal University of Santa Catarina. D. C. C. defined the study, collected and analysed the data and wrote the manuscript. J. E. L. and M. D analysed the data, reviewed the manuscript and provided technical support. A. A. S. and T. S. performed the laboratory experiments. E. J. S. defined the study and provided technical support. M. C. S.-S. defined the study, collected and analysed the data and reviewed the manuscript. All authors approved the final version of the article, including the authorship list.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interests.

REFERENCES

Ballif, B.A., Helias, V., Peyrard, T. *et al.* (2013) Disruption of SMIM1 causes the Vel blood type. *EMBO Molecular Medicine*, **5**, 751–761.

Carvalho-Silva, D.R., Santos, F.R., Rocha, J. & Pena, S.D. (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *The American Journal of Human Genetics*, **68**, 281–286.

Cvejic, A., Haer-Wigman, L., Stephens, J. *et al.* (2013) SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. *Nature Genetics*, **45**, 542–545.

Daniels, G. (2013) *Human Blood Groups* (2nd edn). Blackwell Science, Oxford.

Dezan, M.R., Dinardo, C.L., Bonifacio, S.L., Vega, S., Salles, N.A., Mendrone, A.J. & Levi, J.E. (2016) High-throughput strategy for molecular identification of Vel– blood donors employing nucleic acids extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test screening. *Transfusion*, **56**, 1430–1434.

Dinardo, C.L., Bonifacio, S.L. & Mendrone, A. Jr. (2014) Indirect antiglobulin test-crossmatch using low-ionic-strength saline-albumin enhancement medium and reduced incubation time: effectiveness in the detection of most clinically significant antibodies and impact on blood utilization. *Immunohematology*, **30**, 1–5.

Guelsin, G.A., Sell, A.M., Castilho, L., Masaki, V.L., Melo, F.C., Hashimoto, M.N., Hirle, L.S. & Visentainer, J.E.L. (2010) Genetic polymorphisms of Rh, Kell, Duffy and Kidd systems in a population from the State of Parana, southern Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, **33**, 21–25.

Haer-Wigman, L., Stegmann, T.C., Solati, S. *et al.* (2015) Impact of genetic variation in the SMIM1 gene on Vel expression levels. *Transfusion*, **55**, 1457–1466.

Linz, W.J., Fueger, J.T., Allen, S. & Johnson, S.T. (2010) Role for serial prenatal anti-Vel quantitative serologic monitoring with 2-ME serum treatment during pregnancy: case report. *Immunohematology*, **26**, 8–10.

Manta, F.S.N., Pereira, R., Vianna, R., Beutten-müller De Araújo, A.R., Gitaí, D.L.G., Silva, D.A. *et al.* (2013) Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One*, **9**, e75145.

Nance, S.T. (2009) How to find, recruit and maintain rare blood donors. *Current Opinion in Hematology*, **16**, 503–508.

Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M. & Pena, S.D.J. (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1**, 177–182.

Reid, M.E. (2003) Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*, **43**, 1748–1757.

Reid, M.E. & Denomme, G.A. (2011) DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfusion and Apheresis Science*, **44**, 65–72.

Reid, M.E., Lomas-Francis, C. & Olsson, M.L. (2012) *The Blood Group Antigen Facts Book* (3rd edn). Academic Press, San Diego, California.

Storry, J.R. (2014) International society of blood transfusion. *ISBT Science Series*, **9**, 136–140.

Storry, J.R., Jöud, M., Christophersen, M.K. *et al.* (2013) Homozygosity for a null allele of *SMIM1* defines the Vel- negative blood group phenotype. *Nature Genetics*, **45**, 537–541.

Sussman, L.N. & Miller, E.B. (1952) Un nouveau facteur sanguin "Vel". *Revue Hématology*, **7**, 368–371.

Van Gammeren, A.J., Overbeeke, M.A., Idema, R.N., van, Beek, R.H., Ten Kate-Booij, M.J. & Ermens, A.A. (2008) Haemolytic disease of the newborn because of rare anti-Vel. *Transfusion Medicine*, **18**, 197–198.

Wieckhusen, C., Rink, G., Scharberg, E.A., Rothenberger, S., Kömürcü, N. & Bugert, P. (2015) Molecular screening for Vel-blood donors in Southwestern Germany. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **42**, 356–360.

© 2016 British Blood Transfusion Society

Apêndice C: Artigo publicado na Transfusion 2019.

Prevalence of *SMIM1* c.64_80del17 homozygotes in southeastern Brazil: the Vel-negative phenotype

Vel is a high-incidence antigen of transfusion relevance, which was first described in 1952 by Sussman and Miller. Initially, this antigen was included by the International Society of Blood Transfusion in the 901 series and, in 2008, it became part of a collection when it was determined that ABTI-negative RBCs were Vel + [W.1]. Recently, in 2013, the molecular bases of Vel antigen were identified and the VEL blood group system was officially recognized.[2–4] It was also demonstrated that the Vel-negative phenotype is inherited as a 17-nucleotide deletion (hg19, chr.1: g.3691998_3692014delGTCAGCCTAGGGGCTGT) homozygote in Exon 3 of the *SMIM*1 gene. The Vel-negative phenotype is usually suspected when Vel-negative individuals develop anti-Vel following transfusions or pregnancies.[2–4] Donors of Vel-negative phenotype are considered rare, with variable prevalence throughout the world: 1 in 1700 in northern Scandinavia, 1 in 4000 in Europe, 1 in 2500 in North America, and 1 in 2120 in southwestern Germany.[2–5] The identification of Vel-negative donors is required for safe transfusion of patients exhibiting anti-Vel.

The need for cost-effective molecular methods to screen for Vel-negative donors has been recently brought to light. Therefore, we have standardized a molecular strategy to identify Vel-negative donors using pooled DNA recovered from the viral nucleic acid test routine, which proved effective and accurate.[6] We decided to use this methodology to calculate the southeastern Brazilian frequency of Vel-negative phenotype, as these data were lacking in literature and are of relevance, considering the intense admixture of the referred population. The null allele c.64_80del17 was investigated in 25,322 blood donors from Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo (São Paulo, Brazil). Two donors had the c.64_80del17 allele in homozygosis (0.008%), while 208 had the same allele in heterozygosis to a wild-type allele. Heterozygotes and homozygotes were further confirmed by conventional molecular methods and serologic testing. The frequency of donors with predicted Vel-negative phenotype was 1 in 12,661 and the overall frequency of the studied null allele was 0.4% (q = 0.004), while the wild allele had a frequency of 99.6% (p = 0.996). Considering that two homozygotes represent a very low number of events, the 95% confidence interval for the calculated frequency of Vel-negative donors varied between 1 in 3448 and 1 in 100,000.

This study was the first to address the frequency of Vel-negative donors in Brazil. The observed frequency of Vel+/Vel+, Vel−/Vel+, Vel−/Vel− was 99.171%, 0.821%, and 0.008%, respectively. The importance of this information relies on the fact that, previously, the frequency of Vel-negative donors had been determined only by screening a high number of individuals among people of European descent.

doi:10.1111/trf.15059
© 2019 AABB

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

Marcia R. Dezan [1,2]
e-mail: dezan.marcia@gmail.com
Carla L. Dinardo [1,2]
Vanderson Rocha, [1,3,4]
Alfredo Mendrone-Junior [1]
Jose E. Levi [2]
[1]*Immunohematology, Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, São Paulo, Brazil*
[2]*Institute of Tropical Medicine, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*
[3]*Discipline of Hematology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil*
[4]*Churchill Hospital, NHSBT, Oxford University, Oxford, UK*

REFERENCES

1. Storry JR, Åkerström B, Olsson ML. Investigation into the carrier molecule of the Vel blood group system [abstract]. Transfusion 2010;50:28A.
2. Storry J, Jöud M, Christophersen M, et al. Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype. Nat Genet 2013;45:537-41.
3. Cvejic A, Haer-Wigman L, Stephens J, et al. *SMIM1* underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits. Nat Genet 2013;45:542-5.
4. Ballif BA, Helias V, Peyrard T, et al. Disruption of SMIM1 causes the Vel-blood type. EMBO Mol Med 2013;5:751-61.
5. Wieckhusen C, Rink G, Scharberg EA, et al. Molecular screening for Vel-blood donors in Southwestern Germany. Transfus Med Hemother 2015;42:356-60.
6. Dezan MR, Dinardo CL, Bosi SR, et al. High-throughput strategy for molecular identification of Vel-blood donors employing nucleic acids extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test screening. Transfusion 2016;56:1430-4.

Corporate scientific integrity and partnership

In the Original Research article titled "The contribution of the individual blood elements to the variability of thromboelastographic measures" recently published online in this journal, Femke Noorman and John R. Hess present their results from

Apêndice D: Artigo publicado na Blood Cells, Molecules and Diseases 2019.

Blood Cells, Molecules and Diseases 77 (2019) 23–28

Contents lists available at ScienceDirect

Blood Cells, Molecules and Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bcmd

*SMIM*1 intron 2 gene variations leading to variability in Vel antigen expression among Brazilian blood donors

Marcia Regina Dezan[a,b,*], Abel Costa-Neto[c], Carolina Nunes Gomes[a], Ingrid Helena Ribeiro[a], Valéria Brito Oliveira[a], Marina C.A.V. Conrado[a], Théo Gremen M. Oliveira[a,e], Mariana L.P. Carvalho[e], Aline Fernanda Aranha[e], Silvia R.A. Bosi[a], Nanci A. Salles[a], José Eduardo Krieger[e], Alexandre Costa Pereira[e], Ester Cerdeira Sabino[b], Vanderson Rocha[a,c,d], Alfredo Mendrone-Junior[a], Carla Luana Dinardo[a,b,*,1], José Eduardo Levi[b,1]

[a] Fundação Pro-Sangue Hemocentro de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
[b] Instituto de Medicina Tropical, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
[c] Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Disciplina de Hematologia, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil
[d] Churchill Hospital, NHSBT, Oxford University, Oxford, UK
[e] Laboratory of Genetics and Molecular Cardiology, Heart Institute (InCor), University of Sao Paulo School of Medicine, Brazil

ARTICLE INFO

Editor: Mohandas Narla

ABSTRACT

Background: There is a significant inter-individual heterogeneity of Vel antigen expression which can lead to inaccuracies on Vel phenotyping of blood donors and, potentially, to hemolytic post-transfusion reactions. Our aim was to evaluate the impact of genetic variants in the *SMIM*1 intron 2 on the expression of Vel antigen among Brazilian blood donors harboring the *c.64_80del17* deletion in heterozygosity.
Methods: Donors presenting the *SMIM1 c.64_80del17* in heterozygosity were included in the study and subjected to *SMIM1* intron 2 direct sequencing aiming to genotype the following polymorphisms: rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 and rs9424296.
Results: SMIM1 intron 2 sequencing was performed on two hundred donors presenting one *c.64_80del17* allele. The rs1175550 polymorphism significantly impacted on Vel antigen expression. Variations in the strength of agglutination on Vel phenotyping were also observed according to the rs6673829 genotype, but this difference did not persist with statistical relevance after multivariate analysis.
Conclusion: The presence of the rs1175550A allele of *SMIM1* is significantly and independently associated with a decrease in Vel antigen expression. Even though the population in Brazil is intensely mixed, the allele frequencies obtained in the current study were very similar to that reported for Europeans.

1. Introduction

The molecular basis of the Vel blood group system was recently elucidated [1–3]. The rare Vel− phenotype is inherited as a 17 nucleotide- deletion (hg19, chr.1: *g.3691998_3692014delGTCAGCCTAGG GGCTGT*) in homozygosity in the *SMIM*1 exon 3 [1–3], whose frequency varies from 0 to 0,057% depending on the ethnic background of the studied population [1–6]. There is a significant variability in the Vel antigen expression among Vel+ individuals, which is partly explained by the presence of one *SMIM1***64_80del* allele [2,3]. This inter-individual expression variability is of great importance for transfusion practice, because it may result in false negative results on Vel antigen phenotyping of blood donors, potentially causing hemolytic transfusion reactions in patients sensitized with anti-Vel [4].

It has been demonstrated that the *SMIM*1 intron 2 is an important regulatory region for Vel antigen expression [2,4,7]. A strong correlation was observed between the expression of Vel antigen and the presence of the *SMIM*1 variant rs1175550, whose major allele rs1175550A was associated with significant decrease in *SMIM*1 expression in a gene expression quantitative trait locus (e-QTL) study [8]. The role played by rs1175550A on reducing Vel expression was reproduced by many other studies [4,7,9]. Another gene variation of *SMIM*1 intron 2, rs143702418 (C > CGCA), was also associated with a small but independent effect on Vel expression [4]. This variant is in linkage

* Corresponding authors at: Rua Dr Enéas de Carvalho Aguiar 155, 1°andar, 05403-000, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail addresses: mrdezan@prosangue.sp.gov.br (M.R. Dezan), cldinardo@prosangue.sp.gov.br (C.L. Dinardo).
[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.03.006
Received 11 February 2019; Received in revised form 22 March 2019; Accepted 23 March 2019
Available online 25 March 2019
1079-9796/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

disequilibrium with rs1175550 in Caucasians, but has separate effects in African Americans [4]. Recently, one study suggested that the *SMIM*1 intron 2 variant rs6673829 may also be related to the reduction of Vel antigen expression [10], but it was not confirmed by other studies.

Characterization of the *SMIM*1 intron 2 has already been performed in different populations [11]. However, information about the distribution of SMIM1 intron2 polymorphisms in admixed population such as Brazilian is still incomplete. In this context, our aim was to characterize genetic variations in *SMIM*1 intron 2 among Brazilian blood donors presenting the *c.64_80del17* in heterozygosity correlating to the Vel antigen expression.

2. Materials and methods

2.1. Overall description of the study

A total of 208 blood donors presenting one *SMIM1*64_80del* allele (WT/Δ) from Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo, Brazil, were selected for the study between August 2014, and July 2018. These donors were genotyped using an *in house* validated TaqMan protocol, which was described in details elsewhere [12]. Among all WT/Δ donors selected for the study ($n = 208$), serological Vel phenotyping was performed in 116 participants and conventional PCR to check for Vel zygosity together with *SMIM*1 intron 2 direct sequencing in 200 participants, as described below. The protocol was approved by the ethical committee from the Reference and Training Center in DST/AIDS, São Paulo, Brazil (CAAE 45481715.6.0000.5375).

2.2. Nucleic acid purification

Buffy-coat DNA was individually extracted from all selected samples using the PureLink Genomic Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Purity and concentration of the material were evaluated by spectrophotometry (Nanodrop 1000 Spectrophotometer, Wilmington, DE, USA). DNA samples were diluted to a final concentration of 100 ng/μL for genotyping.

2.3. Determination of Vel zygosity

All donors carrying the *SMIM1*64_80del17* allele were subjected to conventional PCR to check for Vel zygosity using a PCR-restriction enzyme protocol, as previously described [1,3]. PCR conditions are described in the Supplementary data.

2.4. Serological testing

The expression of Vel antigen was quantified through serological phenotyping using gel-method. A polyclonal human antiserum of blood group B containing immune anti-Vel and anti-K was used for the tests. It is important to highlight, at this point, that no standard reagent antibody exists for Vel phenotyping and that Vel phenotyping results will depend on the specific laboratory single source antibody used. In brief, 25 μL of the anti-serum was added to DG Gel anti-IgG cards (Grifols, Barcelona, Spain) together with a 1% suspension of the red blood cells (RBCs). After incubation at 37 °C and centrifugation at 990 rpm (6220.4 rad·min^{-1}) for 9 min, the reactivity was graded as negative, weak, 1+, 2+ or 3+ [13]. Antibody screening was performed on plasma from all samples in which the deletion was detected.

2.5. SMIM1 Intron 2 sequencing

All samples of blood donors classified as WT/Δ were subjected to *SMIM*1 intron 2 direct sequencing through Sanger method. Initially, conventional PCR was performed using the following primers: *SMIM*1_128_F/*SMIM*1_472_R and INTRON_2_VEL_F/INTRON_2_VEL_R (Supplementary data), designed using the Primer3 software (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). PCR conditions are described in the Supplementary data.

2.6. Statistical analysis

Allelic and genotypic frequencies of the *SMIM*1 intron 2 gene in donors with deletion *c.64_80del17* in homozygous and heterozygous were determined by direct counting. Differences between allelic frequencies among samples with distinct antigen strengths were compared by using Mann-Whitney *U* test. Chi-square test or Fisher's exact test were used to compare the distribution among different genotypes of *SMIM*1 intron 2 gene. Unadjusted and adjusted analyses were conducted by using Logistic Regression (LR) models to determine the association of covariates with binary outcome. The logistic regression results were presented as odds ratios (OR) with Wald 95% confidence interval (CI) and *p*-values. All statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS software, Chicago, IL, USA) version 22.0 and GraphPad Prism software, version 8.00 (GraphPad software, San Diego CA, USA). A p-value of < 0.05 was considered to be statistically significant, and all reported *p*-values were two-sided. The Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium analysis for all polymorphisms were determined through Haploview (https://www.broadinstitute.org/haploview/downloads).

3. Results

3.1. Study population

Two hundred and eight blood donors presenting the *SMIM*1 *c.64_80del17* in heterozygosity (*WT/Δ*) were selected for the study. These donors were identified within a group of > 25,000 donors, as published elsewhere [5]. *SMIM1* intron 2 was genotyped through direct sequencing for 200 of the *WT/Δ* samples, as in eight samples there was no DNA left for the tests. The main demographic and serological characteristics of this studied donor population is described in Table 1.

3.2. Serological analysis

Vel antigen phenotyping was performed using polyclonal anti-Vel (human origin) in 116 samples exhibiting the *c.64_80del17* in heterozygosity, but *SMIM1* intron2 genotyping was performed in only 112 phenotyped donors because no DNA was available for the tests of the

Table 1
Demographic and serological characteristics of the studied blood donors.

Variables	No./total no. (%)
Self-declared race	
White	70/208 (33.7)
Black	62/208 (29.8)
Ignored	76/208 (36.5)
ABO type	
O	100/206 (48.5)
A	80/206 (38.8)
B	20/206 (9.6)
AB	6/206 (2.9)
K1 phenotype	
Negative	145/154 (94.2)
Positive	9/154 (5.8)
Vel phenotype	
Negative	46/116 (39.7)
Positive	70/116 (60.3)
Vel phenotyping reactivity	
Negative	46/116 (39.7)
Weak	22/116 (19.0)
1+	22/116 (19.0)
2+	24/116 (20.7)
3+	2/116 (1.7)

Table 2
Analysis of the linkage disequilibrium of the studied SMIM1 intron2 polymorphisms.

rs143702418, rs1181893, rs6673829, rs1175550 and rs9424296			
Haplotype associations	Frequency	Chi square	*p* value
CCGAC	0.477	1.033	0.3095
GCGGC	0.197	0.672	0.4124
GCGAC	0.143	0.788	0.3748
CCAAC	0.100	0.221	0.6383
CCGAA	0.038	8.197	0.0042
CCGGC	0.028	0.51	0.4749
CAGAC	0.018	5.598	0.018

Table 3
Frequency *SMIM*1 Intron 2 genotype (n = 200).

Variables	No. (%)
rs143702418	
CC	132 (66.0)
CGCA/CGCA	68 (34)
rs1181893	
CC	194 (97.0)
AC	5 (2.5)
AA	1 (0.5)
rs191041962	
CC	200 (100.0)
rs6673829	
GG	165 (82.5)
GA	30 (15.0)
AA	5 (2.5)
rs1175550	
AA	149 (74.5)
AG	12 (6.0)
GG	39 (19.5)
rs9424296	
CC	186 (93.0)
CA	13 (6.5)
AA	(0.5)

remaining four. Phenotyping resulted negative in 46 donors (39.7%) and positive in the remainder 70 donors (60.3%), with strength of agglutination varying from weak to 3+. It was not possible to perform Vel phenotyping in 86 donors because RBCs were ABO-incompatible with the selected anti-Vel serum and in 6 donors because they phenotyped as K+ and the selected serum had anti-K. All donors exhibiting *c.64_80del17* in homozygosity (n = 2) phenotyped as Vel− and one of them had anti-Vel (titer = 32/score = 43).

3.3. *SMIM1 intron 2 genotyping*

3.3.1. *Linkage disequilibrium and haplotype frequency analysis*

The genotypic and allele distribution of the polymorphisms rs1181893, rs191041962, rs6673829 and rs9424296 were in agreement with *Hardy-Weinberg* equilibrium (HWE). Rs143702418 and rs1175550 were in disequilibrium (HWpval < 0.05). Haplotype linkage disequilibrium analysis (Fig. 2, Table 2) showed the following situations of strong linkage disequilibrium: rs143702418 and rs6673829 (LD = 100); rs143702418 and rs1175550 (LD = 81); rs143702418 and rs9424296 (LD = 100); rs6673829 and rs1175550 (LD = 100). The data were processed in Haploview (https://www.broadinstitute.org/haploview/downloads).

3.3.2. *Correlation between SMIM1 intron 2 genotype and phenotype data*

Two hundred donors presenting one *c.64_80del17* allele were genotyped for the following SNPs: rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 and rs9424296, all located in the intron 2 of *SMIM*1.

3.3.3. *rs1175550*

Among the two hundred genotyped donors, 149 (74,5%) presented the AA genotype, 39 (19,5%) the GG genotype and 12 (6%) the AG genotype (Table 3). Among the donors with AA genotype (n = 149), 86 were phenotyped for Vel antigen. Of these, 41 (47.7%) were phenotypically Vel− and 45 (52.3%) typed as Vel-positive with the following strength of agglutination: weak (n = 19), 1 + (n = 16) and 2+ (n = 10). Among the donors with GG genotype (n = 39), 20 were

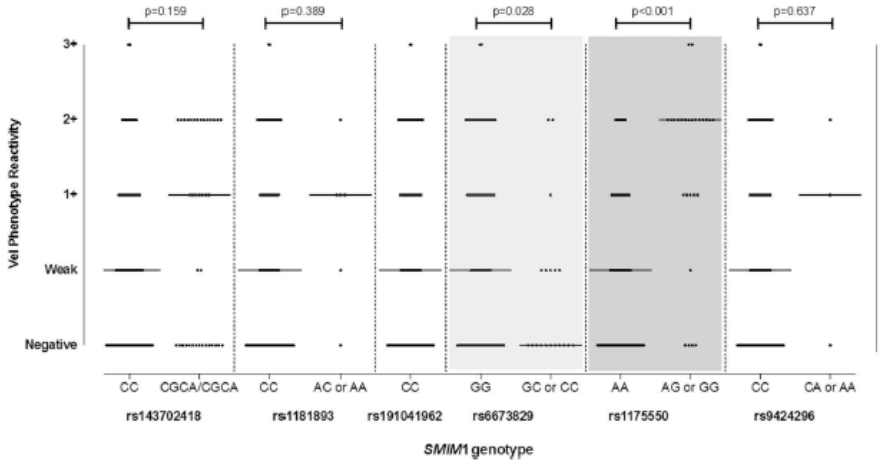

Fig. 1. Correlation between the levels of Vel antigen expression and *SMIM1* intron 2 genotypes (rs143702418, rs1181893, rs191041962, rs6673829, rs1175550 e rs9424296) in 112 blood donors with the presence of the *c.64_80del17* deletion. The vertical axis of the graph shows the levels of Vel antigen expression and the horizontal axis shows the genotype of the rs variants in *SMIM1* intron 2. In the individual analysis of variants rs6673829 (light gray quadrant) and rs1175550 (dark gray quadrant) the *p*-value was significant. Mann-Whitney *U* test was used to compare the means of Vel phenotype reactivity between the *SMIM1* genotypes.

Table 4
Logistic regression analyses predicting association of Vel reactivity in blood donors with *SMIM*1 Intron 2 genotype (n = 112).

	Vel reactivity		Unadjusted		Adjusted[a]	
SNP	Negative (n = 45)	Positive (n = 67)	OR (CI95%)	p	OR (CI95%)	p
rs143702418 - no. (%)						
CC	30 (40.5)	44 (59.5)	1.0 (ref.)			
CGCA/CGCA	15 (39.5)	23 (60.5)	1.045 (0.470–2.324)	0.913		
rs1181893 - no. (%)						
CC	44 (41.5)	62 (58.5)	1.0 (ref.)			
AC/AA	1 (16.7)	5 (83.3)	3.548 (0.401–31.438)	0.255		
rs191041962 - no. (%)						
CC	45 (40.2)	67 (59.8)	NA	NA		
rs6673829 - no. (%)						
GG	34 (36.6)	59 (63.4)	1.0 (ref.)			
GA/AA	11 (57.9)	8(42.1)	0.419 (0.154–1.144)	0.089	0.591 (0.210–1.661)	0.319
rs1175550 - no. (%)						
AA	41 (47.7)	45 (52.3)	1.0 (ref.)			
AG/GG	4 (15.4)	22 (84.6)	5.011 (1.593–15.768)	0.006	4.466 (1.385–14.396)	0.012
rs9424296 - no. (%)						
CC	44 (40.4)	65 (59.6)	1.0 (ref.)			
CA	1 (33.3)	2 (66.7)	1.354 (0.119–15.390)	0.807		

OR, odds ratio. CI, confidence interval.
[a] The adjustment was performed because the self-declared race of the included donors was not available and the distribution of ABO types could reflect the racial distribution of the studied population.

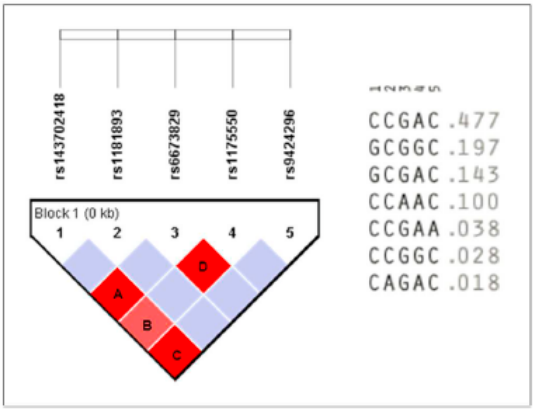

Fig. 2. Linkage disequilibrium (LD) and haplotype frequency analysis of the polymorphisms in *SMIM1* intron 2. The GCA insertion (rs143702418) is represented as the G nucleotide. Linkage disequilibrium was detected in four situations (red boxes): A. rs143702418 and rs6673829 (LD = 100), B. rs143702418 and rs1175550 (LD = 81), C. rs143702418 and rs9424296 (LD = 100) and D. rs6673829 and rs1175550 (LD = 100). Blue boxes represent situations of linkage equilibrium. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

phenotyped for Vel antigen. Of these, 4 (20%) typed as Vel-negative and 16 (80%) as Vel-positive with the following strength of agglutination: weak (n = 1), 1+ (n = 4) and 2+ (n = 11). In the group of donors with AG genotype (n = 12), 6 (50%) were phenotyped and the resulting Vel expression varied between 1+ and 3+. In the statistical analyses, the levels of Vel antigen expression were significantly lower in donors homozygotes for the A allele compared to donors heterozygous and homozygotes for the G allele (p < 0.01) in univariate analysis (Fig. 1) and the difference persisted in multivariate analysis (p = 0.012) (Table 4).

In the studied sample, 97.4% (38/39) of the donors with GG genotype and all donors with AG genotype had the GCA insertion in homozygosity (rs143702418). One donor with GG genotype was genotyped as CC for rs143702418.

3.3.4. rs6673829, rs143702418, rs1181893, rs9424296 and rs191041962

The genotype frequencies of rs6673829, rs143702418, rs1181893, rs9424296 and rs191041962 are summarized in Table 3.

Vel antigen expression was compared between the different genotypes of the studied SNPs (Fig. 1). Variations in the strength of agglutination were observed only for rs6673829, depending on the genotype. Vel antigen expression was significantly higher in donors homozygotes for the G allele compared to donors heterozygous and homozygotes for the A allele (p = 0.028). However, this difference did not persist with statistical relevance after multivariate analysis (p = 0.319).

Table 5
New polymorphism in *SMIM*1 intron 2.

ID	Vel phenotype	Vel genotype	g.1894_1899delGCCCCG	rs1175550	Self-declared race
	Reactivity	Storry et al.			
Donor1	Negative	*WT/Δ*	G/GCCCCG	AA	Black
Donor2	Not tested	*WT/Δ*	G/GCCCCG	AA	Black
Donor3	1+	*WT/Δ*	G/GCCCCG	AA	Black

WT - wild type.
Δ - deleted.

3.4. Never-described SMIM1 allele

A novel allele exhibiting the deletion of six nucleotides in the *SMIM*1 intron 2 (chr1:3691245_3691250delGCCCCG) was identified in three donors (Table 5, Supplementary data). Vel phenotyping was performed in two of these donors: one resulted negative and the other resulted positive (1 +).

4. Discussion

This study evaluated the impact of gene variations in the *SMIM*1 intron 2 on the expression of Vel antigen among donors harboring the *c.64_80del17* deletion in heterozygosity (WT/Δ). It was observed that the expression of the Vel antigen was significantly heterogeneous among WT/Δ individuals and that, in 39.7% of the cases (46/116), donors exhibited false-negative results on Vel phenotyping. The rs1175550 was independently associated with Vel antigen expression, which was significantly lower in donors homozygous for the A allele compared to donors heterozygous and homozygous for the G allele. The other studied gene variations (rs6673829, rs143702418, rs1181893, rs9424296 and rs191041962) did not correlate significantly with Vel antigen expression, except for rs6673829 and rs143702418, which were both in strong linkage disequilibrium with rs1175550. This is the first study that targeted the c.64_80del17 allele and selected a large group of WT/Δ donors to extensively investigate the *SMIM1* intron2. This allowed the study to evaluate the additional role played by intron2 polymorphisms on Vel expression, besides the effect of *SMIM1 c.64_80del17* in heterozygosity. Also, most of what has been previously published referring to the allele frequency of rs1175550 derived from Caucasian population and the present study focused on Brazilian population, which is highly admixed.

Our results confirm previous evidences that *SMIM*1 variant rs1175550 independently modulates Vel antigen expression [2,4,7]. The AA genotype of rs1175550 was significantly associated with lower strength of agglutination as well as with higher rates of false-negative results on Vel phenotyping of *WT/Δ* donors. There were 45 *WT/Δ* donors in the studied cohort presenting with Vel-negative phenotype. Of these, 41 (91.1%) were homozygous for the major allele rs1175550A. The other four donors had the GG genotype, but they also presented the GCA insertion (rs143702418) in homozygosis, what may have justified the low antigen density on erythroid membrane, based on the evidences described by Christophersen et al. [4] This author has evaluated the molecular basis of the inter-individual heterogeneity of Vel antigen expression stating that both rs1175550 and rs143702418 impact on Vel expression [4]. In the specific case of rs143702418, the linkage disequilibrium with rs1175550A is intense, especially among Caucasians [4]. This may explain why a statistically relevant association between rs143702418 and Vel expression could not be observed from the multivariate statistical analysis, as, in this study, a mixed population (of both Caucasian and African descent) was in focus.

We have found a significant association between Vel antigen expression and the rs6673829 genotype in univariate statistical analysis, in accordance to a previous Brazilian report [10]. However, all donors presenting the rs6673829 AA and GA genotypes, which were associated with lower strengths of agglutination on Vel phenotyping, also genotyped as AA for rs1175550. This confirmed the linkage disequilibrium between rs6673829 and rs1175550, weakening the hypothesis of an independent association between rs6673829 and Vel expression. The other studied polymorphisms of *SMIM*1 intron 2 (rs1181893, rs9424296, rs191041962) did not associate with Vel expression, also in accordance with previous literature reports [4]. A novel 6 bp-deletion in *SMIM1* intron 2 (chr1:*3691245_3691250delGCCCCG*) was detected in three WT/Δ donors with strengths of agglutination on Vel phenotyping varying from negative to 1 + . Further studies are needed in order to confirm if this variant decreases *SMIM1* transcript levels.

The allele frequencies of the studied gene variations, representing the Brazilian population, were compared to that of African, American, East Asian, European and South Asian populations (Supplementary Table S1). Even though the population in Brazil is intensely admixed, the allele frequencies obtained in the present study were very similar to that found in Europeans. The most important example is the rs1175550, in which the frequency of rs1175550G is 60% among Africans against 22% in our studied population. This may reflect the fact that the prevalence of people of Caucasian-descent among blood donors is higher than in general Brazilian population [10].

This study has some limitations. The fact that Vel phenotyping was performed only in part of the samples restricted the number of individuals available for statistical comparisons. Also, Vel antigen expression was not quantified through flow cytometry. However, the assessment using intensity of agglutination obtained from Vel phenotyping was suitable for the proposed statistical comparisons and the results obtained were in agreement with the supporting literature.

In conclusion, there is a wide variability of Vel antigen expression among individuals exhibiting the *c.64_80del17* deletion in heterozygosity and the presence of the rs1175550A allele of *SMIM1* intron 2 is significantly and independently associated with a decrease in this expression.

Author contribution

Designed the study: MRD, CLD, JEL, AMJ; Performed the experiments: MRD, CNG, IHR, VBO, MCAVC, MLPC, AFA, SRAB, NAS; Analyzed the data: MRD, TGMO, MLPC; Statistical analysis: MRD, ACN and CLD; Wrote the manuscript: MRD, ACN and CLD; Reviewed the data and the paper: JEK, ACP, ECS, VR, AMJ, CLD and JEL. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

Supported by the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant 2015/095403 (to MRD).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2019.03.006.

References

[1] B.A. Ballif, V. Helias, T. Peyrard, C. Menanteau, C. Saison, N. Lucien, S. Bourgouin, M. Le Gall, J.P. Cartron, L. Arnaud, Disruption of SMIM1 causes the Vel-blood type, EMBO Mol. Med. 5 (2013) 751–761.

[2] A. Cvejic, L. Haer-Wigman, J.C. Stephens, M. Kostadima, P.A. Smethurst, M. Frontini, E. van den Akker, P. Bertone, E. Bielczyk-Maczynska, S. Farrow, R.S. Fehrmann, A. Gray, M. de Haas, V.G. Haver, G. Jordan, J. Karjalainen, H.H. Kerstens, G. Kiddle, H. Lloyd-Jones, M. Needs, J. Poole, A.A. Soussan, A. Rendon, K. Rieneck, J.G. Sambrook, H. Schepers, H.H.W. Sillje, B. Sipos, D. Swinkels, A.U. Tamuri, N. Verweij, N.A. Watkins, H.J. Westra, D. Stemple, L. Franke, N. Soranzo, H.G. Stunnenberg, N. Goldman, P. van der Harst, C.E. van der Schoot, W.H. Ouwehand, C.A. Albers, SMIM1 underlies the Vel blood group and influences red blood cell traits, Nat. Genet. 45 (2013) 542–545.

[3] J.R. Storry, M. Joud, M.K. Christophersen, B. Thuresson, B. Akerstrom, B.N. Sojka, B. Nilsson, M.L. Olsson, Homozygosity for a null allele of SMIM1 defines the Vel-negative blood group phenotype, Nat. Genet. 45 (2013) 537–541.

[4] M.K. Christophersen, M. Joud, R. Ajore, S. Vege, K.W. Ljungdahl, C.M. Westhoff, M.L. Olsson, J.R. Storry, B. Nilsson, SMIM1 variants rs1175550 and rs143702418 independently modulate Vel blood group antigen expression, Sci. Rep. 7 (2017) 40451.

[5] M.R. Dezan, C.L. Dinardo, V. Rocha, A. Mendrone-Junior, J.E. Levi, Prevalence of SMIM1 c. 64_80del17 homozygotes in southeastern Brazil: the Vel-negative phenotype, Transfusion 59 (2019) 428.

[6] C. Wieckhusen, G. Rink, E.A. Scharberg, S. Rothenberger, N. Kömürcü, P. Bugert, Molecular screening for Vel-blood donors in Southwestern Germany, Transfus. Med.

Hemother. 42 (2015) 356–360.
[7] L. Haer-Wigman, T.C. Stegmann, S. Solati, A. Ait Soussan, E. Beckers, P. van der Harst, M. van Hulst-Sundermeijer, P. Ligthart, D. van Rhenen, H. Schepers, Impact of genetic variation in the SMIM1 gene on Vel expression levels, Transfusion 55 (2015) 1457–1466.
[8] R.S. Fehrmann, R.C. Jansen, J.H. Veldink, H.-J. Westra, D. Arends, M.J. Bonder, J. Fu, P. Deelen, H.J. Groen, A. Smolonska, Trans-eQTLs reveal that independent genetic variants associated with a complex phenotype converge on intermediate genes, with a major role for the HLA, PLoS Genet. 7 (2011) e1002197.
[9] P. Jongruamklang, C. Gassner, S. Meyer, A. Kummasook, M. Darlison, C. Boonlum, S. Chanta, B.M. Frey, M.L. Olsson, J.R. Storry, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of 36 blood group alleles among 396 Thai samples reveals region-specific variants, Transfusion 58 (2018) 1752–1762.
[10] C.P. Arnoni, T.A. De Paula Vendrame, J.G. Muniz, D. Gazito, R.D. De Medeiros Person, A.J. Pereira Cortez, F.R.M. Latini, L. Castilho, SMIM1 polymorphisms in a donor population from southeast Brazil and their correlation with VEL expression, Blood Transfus. 17 (2019) 60–65.
[11] P. Jongruamklang, C. Gassner, S. Meyer, A. Kummasook, M. Darlison, C. Boonlum, S. Chanta, B.M. Frey, M.L. Olsson, J.R. Storry, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of 36 blood group alleles among 396 T hai samples reveals region-specific variants, Transfusion 58 (2018) 1752–1762.
[12] M.R. Dezan, C.L. Dinardo, S.R. Bosi, S. Vega, N.A. Salles, A. Mendrone-Júnior, J.E. Levi, High-throughput strategy for molecular identification of Vel–blood donors employing nucleic acids extracted from plasma pools used for viral nucleic acid test screening, Transfusion 56 (2016) 1430–1434.
[13] B. Grossman, C. Hillyer, C. Westhoff, Technical Manual, AABB, Bethesda (MD), 2014.

ANEXOS

Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Doação de Sangue

PRÓ SANGUE

Declaro que

- Entendi as questões formuladas e que as informações por mim prestadas são verdadeiras;
- Recebi informações verbais e por escrito sobre todo o processo de doação, seus efeitos adversos e orientações de como proceder;
- Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas pertinentes;
- Fui informado que no meu sangue serão realizados testes laboratoriais exigidos por lei para triagem de doenças infecto-contagiosas. Eventualmente, esses testes poderão ter resultados falso-positivos. Em caso de resultados alterados nos meus exames ou nos do receptor do meu sangue, estou ciente que serei convocado para repetição dos testes. Caso não retorne, sei que minha ausência poderá ser informada à autoridade sanitária competente. Existem situações onde os exames não serão realizados, como amostra inadequada e bolsa de sangue cuja coleta não foi completada.

Fui informado também que no meu sangue poderão ser realizados testes laboratoriais adicionais para investigação de novas doenças transmissíveis pela doação.

Permito que meu nome seja incorporado a arquivo local ou nacional de potenciais doadores e que sejam retirados até 460 ml do meu sangue para uso em qualquer paciente que dele necessite.

Caso meu sangue não seja utilizado para transfusão, permito sua utilização na produção, autorizada legalmente, de insumos e/ou hemoderivados.

Data	Código de Triagem	Assinatura do Doador

Anexo B: Resultados da PCR em tempo real.

Placa	Quantidade de doadores por placa	Nº de *pool* (s) + por placa	Cт *pool*	Posições do *pool* +	quantidade de amostras + p/ pool	Nº do doador +	Cт da amostra +
20/10/2014	552	1	38,08	D5	2	0502564609-0	39
						0502565263-4	40,09
21/10/2014	552	1	43,00	F6	1	0068010014555540	PCR CONVENCIONAL
22/10/2014	552	3	38,99	A2	2	0502562171-2	39,81
						0502566787-9	40,49
			40,13	G6	1	0502564893-9	35,83
			37,91	E8	1	0210365444-7	38,02
23/10/2014	552	4	37,58	B7	1	0502573759-1	31,98
			39,86	C3	1	6800018781-7	28,66
			39,95	D8	1	4014295-032	28,51
			48,41	F4	1	6100074726-3	33,84
12/11/2014	552	0	-	-	0	-	-
13/11/2014	552	1	44,28	G1	1	4800046472-1	35,51
14/11/2014	300	1	41,34	G2	1	4800046530-2	44,87
27/11/2014	552	1	40,27	E4	2	0502580368-3	39,52
						0502580373-0	39,58
28/11/2014	516	5	37,15	A7	1	00680100132760-8	PCR CONVENCIONAL
			39,89	A10	1	0502581666-1	27,01
			40,49	B5	1	0502581637-8	36,37
			39,97	C8	1	0300415790-0	33,42
			41,01	E9	1	0502581690-4	35,66
09/02/2017	402	0	-	-	0	-	-
16/05/2017	552	4	45,62	B3	1	=B34091700764709	28,13
			44,73	C6	1	=B34161790187209	28,91
			47,62	D4	1	=B34071703078409	28,35
			44,39	E2	2	=B34141790625309	27,86
						=B34141790626509	28,85
30/05/2017	552	2	49,03	D3	1	=B34071703455909	28,71
			44,64	D4	1	=B34411701457509	27,96
07/06/2017	426		45,68	H6	1	=B34141790752509	28,99
			42,63	H7	1	=B34111700685509	27,88
22/06/2017	500	5	45,65	D6	1	=B34071703972109	35,95
			45,21	E1	1	=B34111700713709	32,56
			46,19	F4	1	=B34141790923709	27,45
			42,02	F12	1	=B34071703860109	29,46
			43,78	H2	2	=B34071703975509	30,51
						=B34071703862009	27,40
11/07/2017	552	6	47,05	A9	1	=B34341719105609	34,24
			44,38	D7	1	=B34071704563809	31,64
			42,77	E1	2	=B34071704395609	29,67
						=B34071704399609	30,23
			43,15	G10	1	=B34101700523409	34,71
			44,17	H1	1	=B34361719100209	27,97
			42,25	H11	1	=B34141790996509	28,99
10/08/2017	552	1	41,36	A5	1	=B34141791142309	29,12
22/08/2017	552	8	44,13	A2	1	=B34771723308509	35,01
			46,38	D5	1	=B34101700074609	23,54
			44,70	D7	1	=B34141791227309	33,58
			46,73	E2	1	=B34091701256109	38,96
			39,01	E10	1	=B34081700786309	27,28
			45,06	F11	1	=B34101700075609	33,97
			39,96	H2	1	=B34771723300409	32,81
			38,02	H10	1	=B34771723306709	31,19

Placa	Quantidade de doadores por placa	Nº de *pool* (s) + por placa	Cт *pool*	Posições do *pool* +	quantidade de amostras + p/ pool	Nº do doador +	Cт da amostra +
19/09/2017	552	6	42,55	A11	1	=B34341726104409	25,32
			41,98	B5	1	=B34121726100609	28,64
			40,54	C4	1	=B34121726100409	24,88
			38,57	C7	1	=B34141791340109	26,52
			37,98	C11	1	=B34111701041309	27,34
			41,66	F11	2	=B34071705955409	27,91
03/10/2017	552	2	47,83	B8		=B34071705950409	27,93
			43,95	D5	1	=B34081700989509	26,01
04/10/2017	552	6	43,10	B8	1	=B34291727602809	25,18
			39,22	C12	1	=B34071706410409	25,39
			41,00	E9	1	=B34071706341609	24,71
			44,06	G3	1	=B34141791409909	26,05
			43,52	G7	1	=B34141791406209	26,54
			47,61	G8	1	=B34071706351909	26,55
17/10/2017	552	1	47,86	C6	2	=B34141791455509	PCR CONVENCIONAL
						=B34141791455709	PCR CONVENCIONAL
19/10/2017	552	0	-	-	0	-	-
24/10/2017	552	0	-	-	0	-	-
26/10/2017	552	1	36,33	G3	1	=B34411702844409	PCR CONVENCIONAL
31/10/2017	552	3	39,80	D9	1	=B34091701803609	26,99
			43,62	F3	1	=B34071707052109	25,23
			40,01	H9	1	=B34071706888109	25,55
01/11/2017	552	4	41,90	B3	1	=B34341730405409	24,40
			41,18	C4	1	=B34461730401709	24,14
			38,00	C10	1	=B34091701829709	26,23
			42,08	D6	1	=B34071707095409	26,96
14/11/2017	552	3	39,93	D12	1	=B34291731701509	28,83
			48,90	F3	1	=B34091701909609	34,86
			47,89	H8	1	=B34071707406209	31,36
22/11/2017	552	1	37,96	A11	2	=B34141791624009	29,12
						=B34141791625009	30,25
23/11/2017	552	5	38,96	A3	1	=B34141791636709	31,98
			37,96	A6	1	=B34161790421309	32,21
			38,67	B3	1	=B34161790421909	31,46
			39,48	B7	1	=B34111701254409	30,77
			38,54	H5	1	=B34071707644409	32,97
06/12/2017	552	7	39,15	A3	1	=B34091702022609	26,35
			39,24	A10	1	=B34071707441209	27,86
			39,92	D4	1	=B34111701302309	25,24
			39,21	E5	1	=B34111701303909	26,67
			41,56	F7	1	=B34141791714009	28,73
			39,41	G5	2	=B34101700869309	28,01
						=B34101700868809	25,44
			39,48	H8	1	=B34071708012209	26,53
23/01/2018	552	2	39,96	C4	1	=B34141890088809	28,23
			42,50	C6	1	=B34091800101409	36,42
01/02/2018	552	4	39,57	A8	1	=B34071890185509	29,67
			39,95	B7	1	=B34141890169509	34,99
			39,31	B11	1	=B34071800742509	28,81
			42,47	E1	1	=B34341803103209	37,46
06/03/2018	552	3	44,42	B10	1	=B34281806406709	27,75
			40,62	F2	1	=B34091800307909	27,00
			43,00	F9	1	=B34101800108409	24,74

Placa	Quantidade de doadores por placa	Nº de *pool* (s) + por placa	Cт *pool*	Posições do *pool* +	quantidade de amostras + p/ pool	Nº do doador +	Cт da amostra +
08/03/2018	552	3	39,20	B5	1	=B34141890316809	30,90
			44,60	F5	1	=B34141890308609	27,65
			42,03	H2	1	=B34071860099309	30,54
20/03/2018	552	8	40,64	B4	1	=B34371807801309	29,08
			42,02	C11	1	=B34461807600909	24,90
			38,66	E3	1	=B34461807606409	33,64
			40,95	E5	1	=B34091800380509	25,57
			44,49	F1	1	=B34111800287509	29,10
			42,72	F5	1	=B34141890386609	26,00
			38,60	F10	1	=B34141890383609	29,09
			40,85	H6	1	=B34111800283209	31,66
22/03/2018	552	9	38,47	A2	1	=B34091800496809	32,05
			37,78	A12	1	=B34111800288209	38,41
			41,00	B4	1	=B34071801237509	26,44
			40,49	B7	1	=B34071860166509	31,80
			39,74	C2	1	=B34071802093609	26,76
			42,32	D9	1	=B34161890095709	25,06
			45,69	E6	1	=B34141890403609	27,09
			40,28	F1	2	=B34081800384509	26,14
						=B34081800387709	27,75
			44,97	H6	1	=B34341808002409	25,23
27/03/2018	552	3	46,35	B6	1	=B34071802746409	25,26
			40,23	G9	1	=B34091800504309	27,39
			42,40	H9	1	=B34071802755309	33,71
03/04/2018	552	9	39,98	A12	1	=B34291809203709	27,45
			39,42	B6	1	=B34341809201009	27,97
			39,19	C4	1	=B34071802126409	31,35
			40,33	E5	1	=B34141890484909	26,73
			37,86	E8	1	=B34151890015909	28,29
			39,81	E11	1	=B34111800339409	26,02
			38,73	H2	1	=B34071801922209	27,96
			38,28	H4	1	=B34111800340709	28,19
			40,82	H6	2	=B34091800459009	32,09
						=B34081800411909	28,57
20/04/2018	552	3	41,02	C5	1	=B34071802878409	24,66
			41,16	E5	1	=B34071803098409	23,24
			37,25	F3	1	=B34141890549609	23,72
10/05/2018	552	5	38,69	B3	1	=B34361812903709	23,55
			39,02	B6	1	=B34071803032409	24,97
			41,39	F3	1	=B34111800461609	26,97
			43,97	H3	1	=B34111800451309	29,32
			42,26	H8	2	=B34071803241109	26,53
						=B34071803510209	25,06
11/05/2018	552	7	38,89	A3	1	=B34091800735509	29,27
			37,44	A5	1	=B34081800567609	22,31
			38,03	B9	2	=B34091800806509	26,28
						=B34091800621909	25,15
			38,02	E9	1	=B34071803562009	27,44
			35,68	G7	1	=B34071803575109	22,32
			36,50	G11	1	=B34081800569509	25,15
			38,53	H2	1	=B34361813001409	22,53

Placa	Quantidade de doadores por placa	N° de *pool* (s) + por placa	CT *pool*	Posições do *pool* +	quantidade de amostras + p/ pool	N° do doador +	CT da amostra +
24/05/2018	552	6	37,26	B8	1	=B34341814304909	24,95
			37,77	B10	1	=B34341814300709	27,72
			37,53	C3	1	=B34111800517209	35,58
			45,53	C6	1	=B34101800268909	24,27
			37,97	F4	1	=B34071803400909	27,80
			38,37	H10	1	=B34111800515909	23,94
05/06/2018	552	7	38,94	A7	1	=B34071803843009	30,26
			36,96	C3	1	=B34111800580709	23,33
			37,27	C5	1	=B34081800633409	28,63
			38,24	E5	2	=B34141890731609	31,46
						=B34071804161209	30,96
			36,11	F5	1	=B34141890731209	24,26
			39,40	G7	1	=B34141890723409	24,27
			39,00	H9	1	=B34071803771409	31,90
08/06/2018	552	10	38,47	A12	1	=B34771815806709	25,97
			43,45	B2	1	=B34081800654509	25,29
			39,45	B4	1	=B34071804204609	25,71
			37,32	C10	1	=B34071804033309	32,56
			37,00	D4	2	=B34141890745809	28,02
						=B34141890745609	23,89
			39,00	F9	1	=B34141890746209	24,82
			36,89	G6	1	B34191801049709	34,54
			37,95	H1	1	=B34071860106009	30,96
			36,35	H6	2	=B34081800655209	26,92
						=B34091801011209	27,64
			38,38	H7	1	=B34071804024209	24,77
15/06/2018	552	10	39,19	A9	1	=B34071804427309	26,91
			40,22	B10	1	=B34071860197709	26,84
			39,73	C2	1	=B34081800688609	26,50
			36,42	D2	1	=B34161890204309	24,30
			35,65	D8	2	=B34141890794509	24,10
						=B34141890794709	25,97
			36,47	E2	1	=B34111800653609	27,07
			39,00	E3	1	=B34071803745009	29,87
			38,11	F6	1	=B34071803721209	23,27
			42,06	G8	2	=B34071803696409	27,53
						=B34071804458609	24,72
			39,72	H4	1	=B34091800854509	23,64
19/06/2018	552	7	39,06	A4	1	=B34161890208709	23,53
			43,95	A8	1	=B34141890811509	24,93
			37,82	B8	1	=B34141890807809	24,68
			37,92	E7	1	=B34141890813909	25,90
			37,41	G4	1	=B34101800241009	26,51
			39,74	G5	1	=B34071804241909	24,26
			37,30	G7	2	=B34081800729609	24,64
						=B34081800730609	25,93
20/06/2018	546	10	43,44	A4	1	=B34121817002709	25,12
			40,80	A5	1	=B34121817000909	24,26
			36,99	A9	1	=B34071804328109	24,64
			40,14	B11	1	=B34111800671909	27,01
			42,09	D3	2	=B34101800341909	32,31
						=B34071804401909	26,96
			40,05	D11	1	=B34161890213309	25,93
			38,84	F1	1	=B34071804402309	24,59
			37,94	G5	1	=B34071860258109	26,95
			38,34	G9	1	=B34081800725709	28,97
Total de amostras	**25.322**	**Mediana**	42,34		**210**		**33,59**
		Media	40,77				**28,65**

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
1	A	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
2	O	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
3	O	Negativo	2+	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
4	O	Negativo	Negativo	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Ignorado
5	AB	Negativo	Não testado	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
6	A	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
7	A	Negativo	Não testado	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	AA	AA	CC	Negro
8	A	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
9	A	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
10	O	Negativo	2+	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
11	A	Negativo	Negativo	Anti-Vel	*Δ/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
12	O	Negativo	2+	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	AA	AA	CC	Negro
13	A	Negativo	Não testado	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Negro
14	O	Negativo	Não testado	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Branco
15	O	Negativo	Negativo	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
16	O	Negativo	Negativo	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
17	O	Negativo	Negativo	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
18	A	Positive	Não testado	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Branco
19	A	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Ignorado
20	O	Negativo	(+)	Negativo	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Ignorado
21	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Branco
22.2	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
23	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
24	B	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
25	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
26	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Branco
27	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	AC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
28	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
29	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	AA	AA	CC	Negro
30	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Negro
31	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
32	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
33	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
34	AB	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
35	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
36	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
37.17	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
38	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
39	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
40	O	Negativo	3+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Branco
41	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
42	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AG	CC	Ignorado
43	B	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
44	Não testado	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
45	O	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
46	Não testado	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Ignorado
47	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Negro
48	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
49	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
50	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
51	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
52	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
53	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
54	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
55.35	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
56	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Negro
57	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
58	B	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
59	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
60	B	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AG	CC	Negro
61	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Ignorado
62	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
63	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
64	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
65	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
66.46	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
67	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
68.48	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	AC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
69	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Ignorado
70	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Negro
71	O	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
72	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
73	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
74	AB	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
75	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
76	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
77.57	AB	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Ignorado
78	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
79	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
80	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
81	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
82	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
83	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
84	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
85	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AG	CC	Branco
86.66	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Branco
87	A	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
88	B	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
89	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
90	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Negro
91	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
92.72	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Negro
93	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
94	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
95	A	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*Δ/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
96	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Negro

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
97	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
98	B	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
99	O	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
100	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
101	B	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
102	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
103	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
104	A	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
105	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Ignorado
106	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
107	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
108	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
109	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Ignorado
110	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
111.91	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Não testado	Negro
112	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
113	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
114	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
115	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
116	O	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
117.97	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
118	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
119	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
120	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
121	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
122	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
123	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
124	B	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
125	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
126	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Negro
127.107	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
128	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
129	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
130.110	O	Negativo	3+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Negro
131	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
132	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
133	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
134.114	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
135	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
136	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	AA	Branco
137	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	AC	CC	GG	AA	CC	Negro
138	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
139	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
140	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	AC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
141	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
142	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
143	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
144	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
145	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
146	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
147	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	AA	AA	CC	Branco
148	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	AA	CC	GG	AA	CC	Negro
149	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
150.130	O	Negativo	1+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
151	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
152	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
153	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
154.134	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
155	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
156	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
157	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
158	B	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
159	B	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
160	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AG	CC	Branco

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
161	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
162	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
163.143	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
164.144	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
165	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
166	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
167	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
168	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Negro
169	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
170.150	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
171	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
172	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
173	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
174	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
175	O	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
176	O	Positive	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	AA	AA	CC	Ignorado
177	A	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
178	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
179	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
180	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
181	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
182	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
183	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
184	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
185	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Ignorado
186	O	Negativo	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
187	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Negro
188	O	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	AC	CC	GG	AA	CC	Branco
189	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
190	O	Negativo	(+)	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
191	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Negro
192	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Negro

Anexo C: Resultados sorológicos e moleculares													
ID	ABO	K1	Fenótipo Vel	PAI	Genótipo Vel	Genótipo Vel	rs143702418	rs1181893	rs191041962	rs6673829	rs1175550	rs9424296	Etnia
	Fenótipo	Fenótipo	Reatividade		Ballif et al.	Storry et al.							
193	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
194	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
195	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
196	AB	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
197.177	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
198	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
199	AB	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
200	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Negro
201	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Ignorado
202	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
203	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
204	B	Negativo	Negativo	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
205	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GA	AA	CC	Branco
206	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
207	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CC	Branco
208	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	AA	CC	Ignorado
209	A	Não testado	Não testado	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CC	CC	CC	GG	AA	CA	Branco
210	O	Negativo	2+	Negativo	Não testado	*WT/Δ*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Branco
Controle	O	Negativo	3+	Negativo	*WT/WT*	*WT/WT*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado
Controle	O	Negativo	3+	Negativo	*WT/WT*	*WT/WT*	CGCA/CGCA	CC	CC	GG	GG	CC	Ignorado

WT - Selvagem

Δ - Deletado