

Débora Castilho Credidio

***Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e
molecular***

Orientadora: Profa.Dra. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2010

Débora Castilho Credidio

***Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e
molecular***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de Ciências Básicas.*

Orientadora: Profa.Dra. Lilian Maria de Castilho

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C88v	Credidio, Débora Castilho Variantes do antígeno RhD: estudo sorológico e molecular / Débora Castilho Credidio. Campinas, SP : [s.n.], 2010. Orientador: Lilian Maria de Castilho Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Antígenos. 2. Imunohematologia. 3. Genotipagem. 4. Polimorfismo de um único nucleotídeo. I. Castilho, Lilian Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
------	---

Título em inglês : RHD variants: serological and molecular analysis

Keywords: • Antigenes
• Immunohematology
• Genotyping, single nucleotide polymorphism

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho
Profa. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro
Prof. Dr. Dante Mario Langhi Junior

Data da defesa: 30-08-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Débora Castilho Credidio

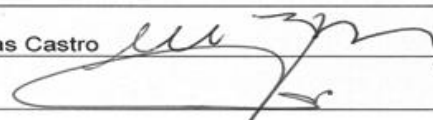
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lilian Maria de Castilho

Membros:

1. Prof^ª. Dr^ª. Lilian Maria de Castilho



2. Prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro



3. Prof. Dr. Dante Mario Longhi Júnior

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço a ***Deus***, pela minha vida e pela família maravilhosa que tenho.

À minha querida mãe, ***Lygia (in memoriam)***, pelo amor, dedicação e exemplo de bondade, coragem e humanidade.

Ao meu pai, ***Orlando***, pelo apoio, amizade e exemplo de honestidade e trabalho.

À minha orientadora, ***Profa.Dra.Lilian Castilho***, pelos ensinamentos, pelo carinho e atenção e por acreditar em mim.

Ao ***Dr.JordãoPellegrino Junior***, pela paciência e disposição em me ajudar nas horas que mais precisei.

À ***Dra.Simone*** e ao ***Dr.Marcelo***, pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao meu irmão ***Rodrigo*** e minha cunhada ***Paula***, pela força e incentivo nos momentos certos.

Ao ***Júlio***, meu companheiro, pelo amor e confiança.

Aos meus tios ***Eliane e Edson***, pela presença na minha vida, pelo conforto nos momentos difíceis e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus primos, ***Thiago, Thalia e Hugo***, que como irmãos sempre me incentivaram com muito carinho.

Às amigas do laboratório, ***Karina, Daphne, Daiane e Glaucia***, por formarmos uma equipe, que com alegria compartilha aprendizado, respeito e disposição em ajudarmos umas às outras.

À ***Roseli***, pela amizade, carinho e dedicação em me ajudar quando precisei.

Aos ***funcionários do Hemocentro*** que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho .

À ***todos aqueles*** que gentilmente enviaram amostras necessárias para a realização deste trabalho.

Débora.

RESUMO

Discrepâncias na tipagem Rh ocorrem devido à presença de variantes do antígeno RhD, em especial D fraco e D parcial. Diferentes reagentes anti-D monoclonais tem sido desenvolvidos para identificar estas variantes, mas a caracterização molecular pode garantir um resultado mais específico com melhor definição do tipo de variante presente. O fenótipo D fraco ocorre por alterações de nucleotídeos que levam a substituição de aminoácidos na região transmembranar e intracelular da proteína Rh enquanto que o fenótipo D parcial ocorre por alterações de nucleotídeos ou rearranjos gênicos que levam a substituição de aminoácidos na região extracelular da proteína Rh, resultando em fenótipos sorológicos distintos e aloimunização anti-D. Nossos objetivos foram avaliar reagentes anti-D e métodos sorológicos e moleculares na detecção e identificação destas variantes. Foram estudadas 335 amostras de sangue e DNA de doadores e pacientes fenotipados previamente como RhD fraco, ou que apresentaram resultados discrepantes na tipagem RhD. Das 335 amostras estudadas, 215 (64,1%) foram identificadas como D fraco, 89 (26,5%) como D parcial, 3 (1%) como DEL, 11 como RhD-positivo e 17 como RhD-negativo. Entre as amostras D fraco, 76 eram DF1 (35,3%); 75 DF2 (34,9%); 13 DF3 (6,1%); 49 DF4 (22,8%) e 2 DF5 (0,9%). Entre as amostras D parcial, 9 (10,1%) eram DAR, 25 (28,1%) DFR, 6 (6,7%) DBT, 1 (1,1%) DHMi, 1(1,1%) RoHAR, 26 (29,2%) DVI, 14 (15,8%) DVa, 5 DIVb (6,6%) e 2 (2,3%) DVII . Nas amostras DEL, duas foram identificadas molecularmente como *RHD(IVS5-38DEL4)* e uma como *RHD(K409K)*. Nossos resultados demonstram que a utilização de diferentes reagentes anti-D e métodos na rotina sorológica pode indicar a presença de uma variante do antígeno RhD que deve ser investigada por análise molecular. Esta estratégia pode auxiliar na diferenciação entre D fraco e D parcial e caracterizar as variantes que levam a aloimunização anti-D. Esta distinção é importante na seleção de sangue para pacientes e na prevenção da doença hemolítica do feto e recém-nascido.

ABSTRACT

Rh discrepancies are becoming a problem during routine testing due to partial D or weak D phenotypes. Panels of monoclonal antibodies (MoAb) are being developed in order to identify D variants such as partial D and weak D when there are anomalous RhD typing results but molecular characterization offers a more specific grouping of weak and partial D. The weak D phenotype is caused by many different *RHD* alleles encoding aberrant RhD proteins, resulting in distinct serologic phenotypes and anti-D immunizations. We evaluated currently used serologic methods and reagents to detect and identify D variants and correlated the results with molecular analyses. A total of 335 blood samples from Brazilian blood donors and patients with discrepant results of D typing in routine were analyzed. In total, 215 (64.1%) weak D, 89 (26.5%) partial D, 3 (1%) DEL, 11 RhD-positive and 17 RhD-negative were identified. Among weak D samples, 76 weak D Type 1 (35.3%); 75 weak D Type 2 (34.9%); 13 weak D Type 3 (6.1%); 49 weak D Type 4 (22.8%) and 2 weak D Type 5 (0.9%) alleles were found. Among the partial D samples, 9 (10.1%) DAR, 25 (28.1%) DFR, 6 (6.7%) DBT, 1 (1.1%) DHMi, 1(1.1%) RoHAR, 26 (29.2%) DVI, 14 (15.8%) DVa, 5 DIVb (6.6%) and 2 (2.3%) DVII were observed. Two samples identified as DEL by adsorption/elution were characterized by molecular analyses as *RHD(IVS5-38DEL4)* and one sample as *RHD(K409K)*. Our results showed that the use of different methods and anti-D reagents in the serologic routine reveal some D variants that can be further investigated. Molecular methods can help to differentiate between partial D and weak D and characterize the weak D types providing additional information of value in the RhD typing. This distinction is important for selection of blood products and to prevent anti-D hemolytic disease of the fetus and newborn.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
RhC	Antígeno RhC
Rhc	Antígeno Rhc
RhE	Antígeno RhE
Rhe	Antígeno Rhe
<i>RH</i>	Gene <i>RH</i>
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
<i>RHD-CE-D^s</i>	Gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>
<i>RHDψ</i>	Pseudogene <i>RHD</i>
<i>RH CE* C/c</i>	Genes alelos Cc
<i>RHCE* E/e</i>	Genes alelos Ee
RhD+	Fenótipo RhD-positivo
RhD-	Fenótipo RhD-negativo
R0r	Fenótipo RhDccee
R1r	Fenótipo RhDCcee
R2r	Fenótipo RhDccEe
rr	Fenótipo dccee
DIVb	Antígeno RhD parcial categoria IVb
DVa	Antígeno RhD parcial categoria Va
DVI	Antígeno RhD parcial categoria VI
DVII	Antígeno RhD parcial categoria VII

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (cont.)

Sigla	Descrição
DBT	Antígeno RhD parcial DBT
DAR	Antígeno RhD parcial DAR
DFR	Antígeno RhD parcial DFR
DHAR	Antígeno RhD parcial DHAR
DHMi	Antígeno RhD parcial DHMi
DEL	Antígeno DEL
µl	Microlitro
ml	Mililitro
rpm	Rotações por minuto
ng	Nanogramas
pmol	Picomol
nmol	Nanomol
pb	Pares de base
AGH	Teste da antiglobulina humana
LISS	Tampão de baixa força iônica
GEL	Técnica de hemaglutinação em gel
DNA	Fita de nucleotídeos
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácidos
EXON	Região do gene que codifica aminoácidos
PCR	Reação de cadeia da polimerase / Polymerase Chain Reaction
AS-PCR	Técnica de PCR alelo-específico
RFLP	Técnica de PCR seguida por análise dos fragmentos
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfisms
primers	Sequência de oligonucleotídios sintéticos
nt	Nucleotídeo

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1 : Variações de temperatura de anelamento e número de ciclos das técnicas de PCR utilizadas.....	43
TABELA 2 : Sequência dos primers utilizados nas genotipagens <i>D</i> , <i>RHCE*</i> <i>C/c</i> , <i>RHCE*</i> <i>E/e</i>	49
TABELA 3 : <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR alelo-específico para RhD fraco e RhD parcial Hmi.....	50
TABELA 4 : Sequência dos <i>primers</i> utilizados na caracterização Molecular das variantes <i>RHD</i> híbridas.....	51
TABELA 5 : <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR para a determinação da Variante DAR.....	51
TABELA 6 : <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR para a determinação da Variante D categoria VII.....	52
TABELA 7 : Correlação entre tipos de D fraco e haplótipos Rh em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes previamente fenotipados como D fraco.....	59
TABELA 8: Correlação entre variantes D parciais e haplótipos Rh em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes previamente fenotipados como D fraco.....	60
TABELA 9: Correlação entre variantes <i>DEL</i> e haplótipos <i>RH</i> em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes previamente fenotipados como D fraco.....	60
TABELA 10: Correlação entre os resultados <i>RHD</i> e haplótipos <i>RH</i> em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes com resultados sorológicos discordantes.....	62

LISTA DE TABELAS (cont.)

Pág

TABELA 11:	Correlação entre as variantes de D e a reatividade sorológica com a utilização de diferentes clones de reagentes anti-D monoclonais pelas técnicas de Tubo e Gel, em amostras de doadores voluntários de sangue previamente fenotipados como D fraco.....	63
TABELA 12	Correlação entre as variantes de D e a reatividade sorológica com a utilização de diferentes clones de reagentes anti-D monoclonais pelas técnicas de Tubo e Gel em amostras de pacientes previamente fenotipados como D fraco.....	64
TABELA 13:	Resultados da genotipagem em amostras de doadores voluntários de sangue com a presença de autoanti-D e de pacientes com a presença de aloanti-D.....	65
TABELA 14:	Frequência dos tipos do antígeno D fraco em diferentes regiões da Europa e no Brasil.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1 : Família de proteínas Rh.....	21
FIGURA 2 : Proteínas Rh.....	22
FIGURA 3 : Modelo do locus Rh proposto por Wagner e Flegel (2000).....	24
FIGURA 4 : Categorias do antígeno RhD parcial definidas por Tippet.(1996).....	25
FIGURA 5 : Proteína RhD parcial	26
FIGURA 6 : Densidades antigênicas de antígenos RhD parciais.....	27
FIGURA 7 : Proteína RhD fraco.....	28
FIGURA 8 : Densidades antigênicas de antígenos RhD fraco mais comuns.....	29
FIGURA 9 : Densidades antigênicas de antígenos RhD fraco e DEL.....	30
FIGURA 10 : Proteína DEL.....	31
FIGURA 11 : Árvore filogenética <i>RHD</i> idealizada por Wagner e Flegel, 2000....	32
FIGURA 12: PCR para a genotipagem <i>RHD</i>	45
FIGURA 13: PCR-RFLP para a genotipagem <i>RHCE*Ee</i>	45
FIGURA 14: PCR multiplex para as genotipagens <i>RHD</i> , <i>RHCE*Cc</i> e Pseudogene <i>RHD</i>	46
FIGURA 15: AS-PCR para caracterização dos tipos de D fraco mais comuns e D parcial DHMi.....	47

LISTA DE FIGURAS (cont)

	Pág
FIGURA 16: AS-PCR para caracterização de D parcial categoria VII, PCR-RFLP para DAR e multiplex para D parciais que ocorrem por genes híbridos.....	48
FIGURA 17: Resultado molecular nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D fraco.....	54
FIGURA 18: Caracterização Molecular dos tipos de D fraco encontrados nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D Fraco.....	55
FIGURA 19: Caracterização Molecular das variantes de D Parciais encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D Fraco.....	56
FIGURA 20: Caracterização Molecular das variantes <i>DEL</i> encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como Del.....	57
FIGURA 21: Caracterização Molecular das amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes com resultados sorológicos discrepantes.....	58
FIGURA 22: Fluxograma proposto para a rotina de doadores.....	74
FIGURA 23: Fluxograma proposto para a rotina de pacientes.....	75

	<i>Pág</i>
RESUMO	<i>vi</i>
ABSTRACT	<i>viii</i>
INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	34
MATERIAL E MÉTODOS	36
A. Material.....	37
1. Amostras de sangue.....	37
2. Cartões Gel (ID-Micro Typing Cards).....	37
3. Cartões DG Gel.....	37
4. Tampão LISS modificado (Diluyente 2 e DG Sol).....	37
5. Suspensão de hemácias a 0,8%.....	37
6. Suspensão de hemácias a 3%.....	38
7. Suspensão de hemácias a 5%.....	38
8. Anti-soros.....	38
9. Extração de DNA.....	38
10. dNTP 10mM.....	39
11. Taq DNA polymerase.....	39
12. Tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) 10x.....	39
13. Tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) 1x.....	39
14. Gel de agarose a 1.5%.....	39
15. Gel de agarose a 2%.....	39
16. Gel de poliacrilamida a 12%.....	40
17. Marcador Molecular.....	40
18. Enzimas de Restrição.....	40

	Pág
B. Métodos.....	41
1. Fenotipagem RhD.....	41
1.1. Fenotipagem RhD em tubo.....	41
1.2. Fenotipagem RhD em gel (Diamed).....	41
1.3. Fenotipagem RhD em gel (Grifols).....	41
2. Pesquisa do antígeno RhD fraco.....	41
2.1. Pesquisa do antígeno RhD fraco em tubo.....	42
2.2. Pesquisa do antígeno RhD fraco em gel (Diamed).....	42
2.3. Pesquisa do antígeno RhD fraco em gel (Grifols).....	42
3. Extração de DNA.....	42
4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	43
5. Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP).....	44
6. Genotipagem <i>RHD</i>	44
7. Genotipagem <i>RHCE*E/e</i>	44
8. Genotipagem <i>RHCE*C/c</i>	46
9. Caracterização molecular dos antígenos RhD Fraco e RhD Parcial HMi	46
10. Caracterização molecular das variantes <i>RHD</i> híbridas e alelos <i>RHD</i> parciais que ocorrem pela presença de genes híbridos.....	47
11. Caracterização molecular do antígeno RhD Parcial DAR.....	48
12. Caracterização molecular do antígeno RhD categoria VII.....	48
RESULTADOS.....	53
A. Resultado molecular nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D fraco ou que apresentaram discrepâncias na tipagem RhD.....	54
1. Caracterização molecular dos tipos de D fraco.....	55

SUMÁRIO (cont.)

	Pág
2. Caracterização molecular das variantes de D parcial.....	55
3. Caracterização molecular das variantes de <i>DEL</i>	56
4. Análise molecular em amostras que apresentaram resultados discrepantes na tipagem RhD.....	57
B. Associação dos tipos de alelos <i>RHD</i> Fraco com os haplótipos <i>RH</i>	58
C. Associação dos tipos e categorias de alelos <i>RHD</i> Parcial com os haplótipos <i>RH</i>	59
D. Associação dos tipos de alelos <i>RHD DEL</i> com os haplótipos <i>RH</i>	60
E. Associação dos alelos <i>RHD+</i> e <i>RHD-</i> encontrados com os haplótipos <i>RH</i> .	61
F. Variantes <i>RHD</i> encontradas e reatividade sorológica.....	63
G. Resultados da genotipagem <i>RHD</i> em amostras de doadores de sangue com autoanti-D e pacientes com aloanti-D.....	64
DISCUSSÃO	66
A. Análise sorológica e molecular em amostras de sangue e DNA de pacientes e doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD fraco ou que apresentaram discrepâncias sorológicas na tipagem RhD.....	67
B. Caracterização molecular dos tipos de D Fraco.....	68
C. Caracterização molecular das variantes D Parcial.....	69
D. Caracterização molecular das variantes <i>DEL</i>	70
E. Caracterização molecular de amostras <i>RHD+</i> e <i>RHD-</i> que apresentaram resultados discrepantes na tipagem RhD.....	70
F. Correlação das variantes <i>RHD</i> e haplótipos <i>RH</i>	71
G. Variantes <i>RHD</i> e reatividade sorológica.....	71
H. Recomendações na tipagem RhD.....	73
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE	87

INTRODUÇÃO

Descoberto em 1939, o sistema Rh tornou-se o sistema de grupo sanguíneo com maior grau de polimorfismo entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária (HUANG, 1997).

Os genes do sistema Rh, *RHD* e *RHCE* são altamente homólogos e diferem na sua localização cromossômica. Os genes *RHD* (LE VAN KIM et. al., 1992) e *RHCE* (CHERIF-ZAHAR et. al., 1991) estão localizados no cromossomo 1p36.13-34.3 (CHERIF-ZAHAR et. al., 1991; CARRIT et. al., 1997) organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 75kb. As diferenças básicas entre estes dois genes estão na região do éxon 10 e na deleção de 600pb no íntron 4 do gene *RHD* se comparado ao gene *RHCE*. O gene *RHAG* reside na região 6p11-21 (RIDGWELL et. al., 1992) e parece estar distribuído nos 10 éxons correspondentes aos genes *RHD* e *RHCE* (CARTRON, 1994) (Figura 1).

O sistema Rh é uma família de proteínas constituída pelos polipeptídios RhD e RhCE com peso molecular de 30 kD (proteínas Rh ou Rh30) codificados pelos genes *RHD* e *RHCE* e pela glicoproteína RhAG de peso molecular 50 kD (glicoproteína Rh50) codificada pelo gene *RHAG*. Os antígenos Rh somente são expressos na superfície da membrana eritrocitária quando a glicoproteína RhAG está presente. Na ausência de RhAG os antígenos Rh não são expressos. A associação das proteínas Rh30 e RhAG dentro de uma mesma família de proteínas baseia-se no fato de ambas apresentarem 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 α hélices transmembranares (Figura 1). Acredita-se que tanta homologia esteja relacionada ao fato de ambas terem sido originadas a partir de um gene ancestral comum (AVENT e REID, 2000, WAGNER & FLEGEL, 2000). As proteínas RhAG e Rh30 compartilham homologia com a família das proteínas transportadoras de amônia; e a proteína RhAG foi recentemente caracterizada como transportadora de amônia. (AVENT, 2001; HUANG & YE, 2010). Atualmente, muitos estudos estão sendo realizados para confirmar se realmente essa é sua única função e identificar a verdadeira função das proteínas RhD e RhCE.

Constituído atualmente por 50 antígenos (DANIELS et al, 2009), o sistema Rh apresenta cinco principais antígenos: D, C/c e E/e. Estes antígenos formam oito complexos gênicos, conhecidos como haplótipos *RH* (*Cde*, *cde*, *cDE*, *cDe*, *cdE*, *Cde*, *CDE*, *CdE*) (RACE, 1965). Destes, o antígeno RhD é o mais importante do ponto de vista clínico devido ao seu alto grau de imunogenicidade. O gene *RHD* codifica o antígeno RhD enquanto o gene *RHCE* (alelos *RHCE*Ce*, *RHCE*cE*, *RHCE*ce* e *RHCE*CE*) codifica os antígenos C/c e E/e (AGRE & CARTRON., 1991).

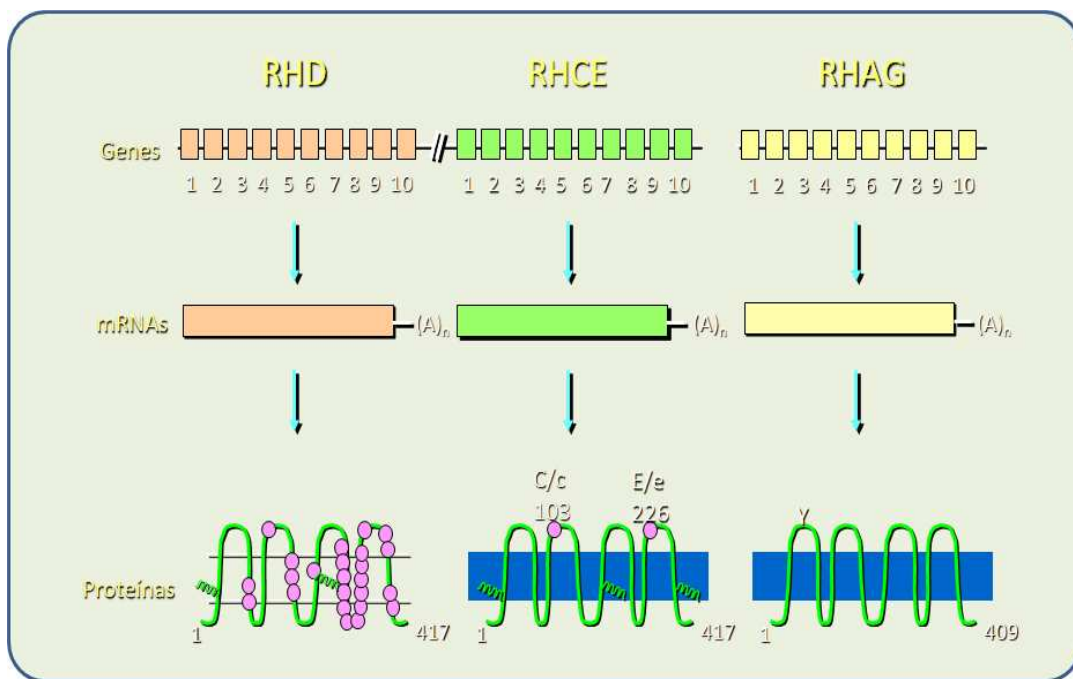


Figura 1: Família de proteínas Rh

Os antígenos do sistema de grupo sanguíneo Rh são definidos por polipeptídeos não glicosilados, denominados RhD e RhCE (DEVETTEN e AGRE, 1988). A presença ou ausência do antígeno na superfície das hemácias está correlacionada com a presença ou ausência de um membro desta família de polipeptídeos. Os polipeptídeos Rh atravessam a membrana eritrocitária 12 vezes, apresentando os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal intracelularmente (AVENT et. al., 1992). Os polipeptídeos

RhD e RhCE têm um único resíduo externo *cisteína* na quinta alça extracelular que pode estar relacionado com a expressão antigênica (Figura 2).

O polimorfismo E/e resulta da substituição de um único aminoácido no éxon 5, na quarta alça extracelular, quando da substituição de uma *Prolina* (E) na posição 226, para uma *Alanina* (e) (MOURO et. al., 1992). Os antígenos C e c diferem, um do outro, pela substituição de quatro aminoácidos em uma cadeia de 417 aminoácidos, muito embora, apenas a substituição de uma *Serina* (C) na posição 103 (segunda alça extracelular) para uma *Prolina* (c) pareça ser crítica para o polimorfismo C/c (MOURO et. al., 1992). Por outro lado, o polipeptídeo codificado pelo gene *RHD* difere daquele codificado pelo *RHCE*, em 35 aminoácidos. Essas diferenças podem talvez explicar, em parte, a imunogenicidade do antígeno RhD (ISSITT, 1996).

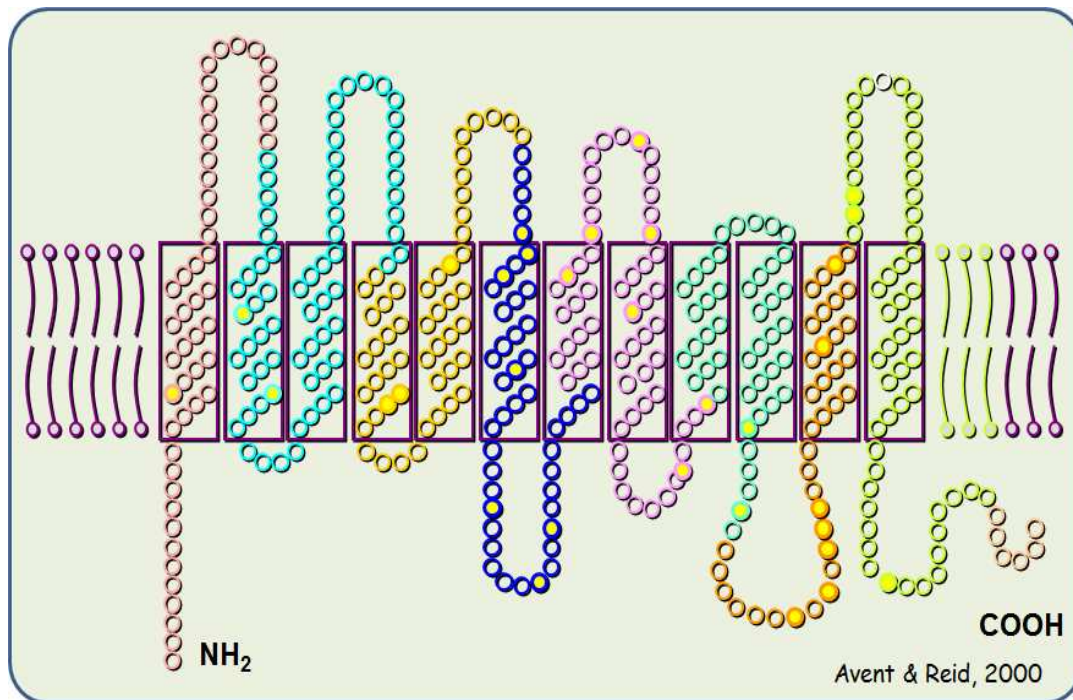


Figura 2: Proteínas Rh

COLLIN et. al. (1991) demonstraram por meio da análise do DNA genômico de diferentes fenótipos do sistema Rh, que os indivíduos RhD-positivo possuem os genes *RHD* e *RHCE*, enquanto os indivíduos RhD-negativo possuem somente o gene *RHCE*. Na quase totalidade dos casos dos indivíduos Caucasianos RhD-negativo, o gene *RHD* está deletado (LE VAN KIM et. al., 1992; ARCE et. al., 1993). Em alguns casos, o fenótipo RhD negativo pode também estar associado com trocas homólogas dos éxons 3 a 7, ou éxons 2 a 9 do gene *RHCE* no gene *RHD* (BLUNT, 1994; HUANG, 1997).

OKUDA et. al. e DANIELS et. al. (1997) demonstraram a presença de um gene *RHD* intacto em Japoneses e Africanos RhD-negativo, que parecia estar associado com as frequências dos fenótipos RhD-negativo e RhC-positivo em diferentes populações.

SINGLETON et al. (2000) verificaram que 66% dos Africanos RhD-negativo originários da África do Sul apresentavam uma duplicação de 37 pb na região limítrofe entre o íntron 3 e o éxon 4 do gene *RHD*. Esta duplicação introduz um códon de terminação na posição 210 e uma alteração no quadro de leitura, levando à produção de uma proteína que não é expressa na membrana eritrocitária. Além disto, foi também observado em 15% destes Africanos, a presença de um gene *RHD* híbrido (*RHD-CE-D^s*) associado ao fenótipo VS+V. Este gene apresenta os éxons 4 a 8 de *RHCE* e codifica uma proteína alterada com fraca expressão dos antígenos RhC e Rhe e nenhuma expressão do antígeno RhD.

WAGNER e FLEGEL (2000) estabeleceram a estrutura molecular do locus Rh, em que os dois genes *RHD* e *RHCE* possuem orientações opostas e encontram-se separados por 30000 pb (Figura 3). Nesta região, encontra-se um outro gene denominado *SMPI* que tem a mesma orientação do gene *RHD* e cuja função no locus Rh ainda não está totalmente esclarecida. O gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA, denominados “caixas Rhesus”, com um comprimento de aproximadamente 9000 pb, apresentando 98% de homologia e orientação idêntica. (Figura 3). De acordo com estes autores, a “caixa Rhesus” conteria a deleção do gene *RHD* com 1463 pb de extensão e estaria presente na maioria dos indivíduos Caucasianos RhD-negativo.

Esta descoberta possibilitou a padronização de técnicas moleculares para a determinação da zigozidade do antígeno RhD. Mediante estudos realizados com análises das seqüências genômicas do locus RH de humanos e camundongos, WAGNER & FLEGEL (2002) chegaram à conclusão de que o gene *RHD* é o gene duplicado enquanto os genes *RHCE* e *SMP1* são os genes ancestrais.

A proximidade entre estes genes facilitaria a ocorrência de conversão gênica em cis durante os rearranjos gênicos entre eles, levando assim à formação de genes híbridos (partes do gene *RHD* em *RHCE* e vice-versa), responsáveis por algumas variantes do antígeno RhD (Figura 3).

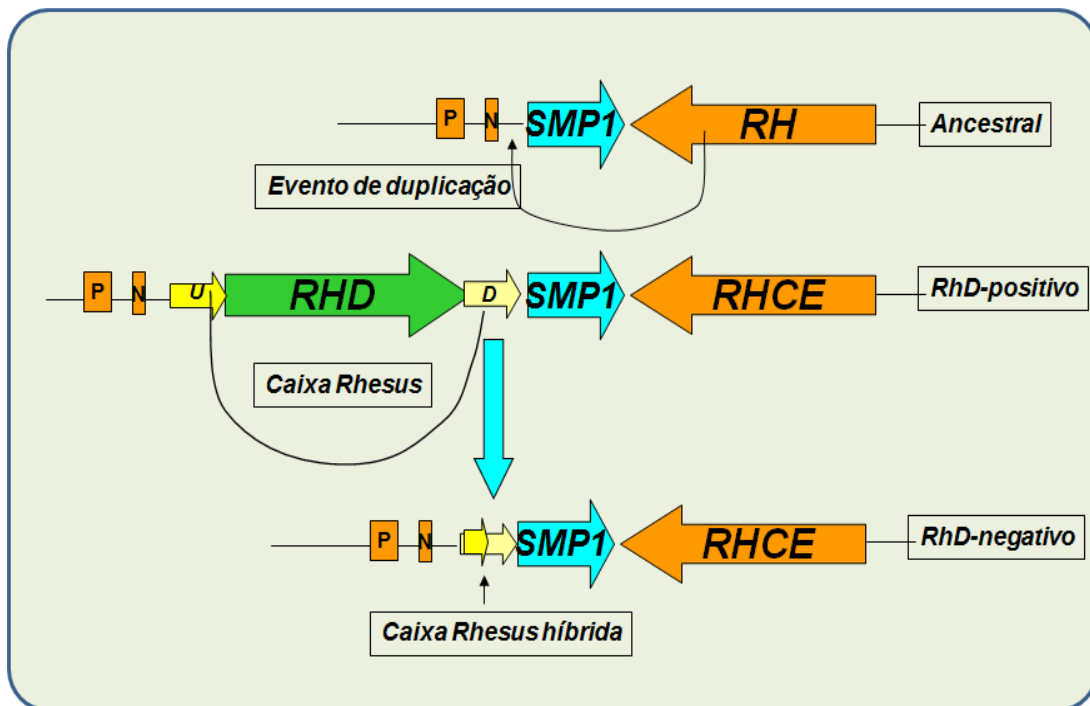


Figura 3: Modelo do locus Rh proposto por Wagner e Flegel (2000).

O antígeno RhD é o mais importante do sistema Rh devido ao seu envolvimento na doença hemolítica peri-natal e nas reações transfusionais hemolíticas. As bases moleculares do polimorfismo do antígeno RhD foram objetos de numerosos trabalhos. O antígeno RhD é considerado como um mosaico composto de 37 epítomos,

onde pelo menos nove epítomos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (LOMAS et. al., 1984). Alguns indivíduos RhD-positivo podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítomos alterados, definindo-se, assim, as categorias do antígeno RhD parcial (D^{II} , D^{III} , D^{IV} , D^V , D^{VI} , D^{VII} , DFR, DBT, R^{oHar}) que são diferenciadas umas das outras de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítomos (TIPPETT, et. al., 1996) (Figura 4).

D Categoria	Reação com anticorpos monoclonais							
	epD1	epD2	epD3	epD4	epD5	epD6/7	epD8	epD9
II	+	+	+	0	+	+	+	0
IIIa	+	+	+	+	+	+	+	+
IIIb	+	+	+	+	+	+	+	+
IIIc	+	+	+	+	+	+	+	+
Iva	0	0	0	+	+	+	+	0
Va	0	+	+	+	0	+	+	+
VI	0	0	+	+	0	0	0	+
VII	+	+	+	+	+	+	0	+
DFR	+/0	+/0	+	+	+/0	+/0	0	+
DBT	0	0	0	0	0	+/0	+	0
R^{oHar}	0	0	0	0	+/0	+/0	0	0

Figura 4: Categorias do antígeno RhD parciais definidas por Tippet (1996).

A análise molecular das variantes de RhD mostrou que a perda da expressão de certos epítomos RhD está associada a polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no gene *RHD* ou a rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE*. As variantes D^{II} , D^{IIIa} , D^{IVa} , D^{VII} , DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, R_0^{Har} , DAR e DAU ocorrem pela presença de SNPs no gene *RHD* enquanto as variantes D^{IIIb} , D^{IIIc} , D^{IVb} , D^{Va} , D^{VI} , DFR, DBT e DCS ocorrem pela formação de genes híbridos, em que um fragmento do gene *RHD* é substituído por um fragmento genômico do gene *RHCE*. Estes genes codificam proteínas híbridas RhD-CE-D de 417 aminoácidos que conservam alguns epítomos RhD, mas que podem, ocasionalmente, expressar novos epítomos detectáveis sorologicamente. Estas

alterações ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD, as alças onde estão localizados os epítomos Rh (Figura 5), mudando a sua conformação e a exposição dos epítomos de RhD. Este fato explica por que os indivíduos com o fenótipo RhD parcial perdem a expressão de alguns epítomos do antígeno RhD e podem desenvolver aloanticorpo anti-D, ao entrar em contacto com hemácias RhD-positivo normais (HUANG et. al.,1997; ROUILLAC et. al., 1995; MOURO et. al., 1994; BECKER et. al., 1996; WAGNER et. al., 1998; HEMKER et. al., 1999; WAGNER e FLEGEL, 2000, DENOMME et al, 2005).

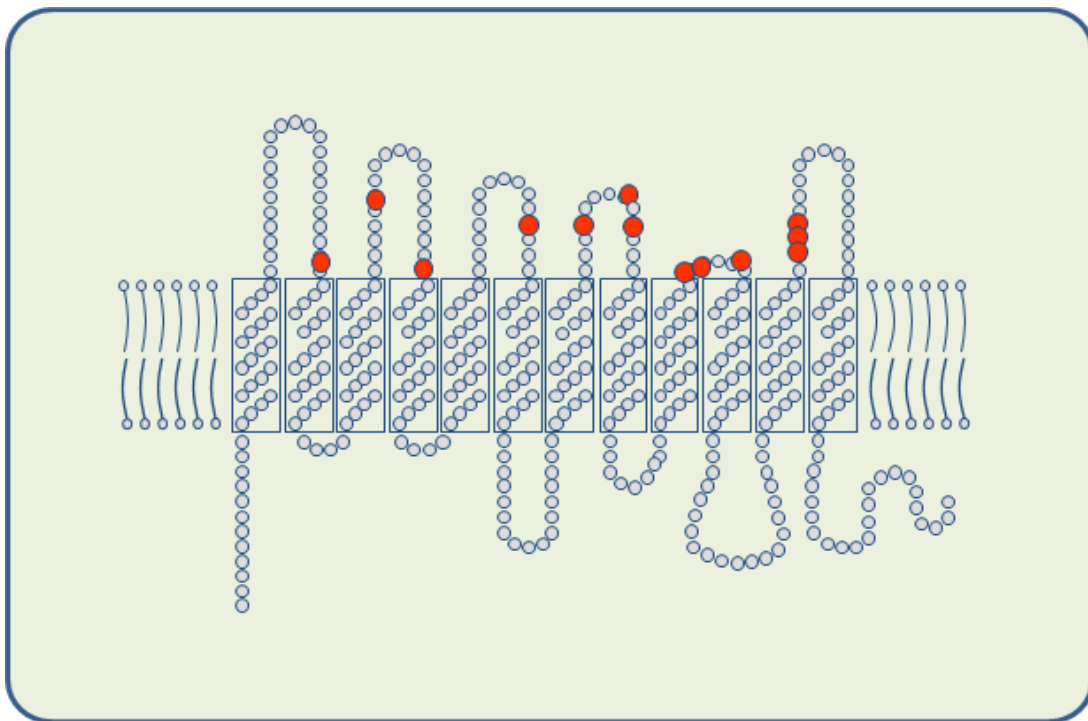


Figura 5: Proteína RhD parcial

Os antígenos RhD parciais categorias D^{III} , DAR e DAU não são caracterizados sorologicamente devido ao fato de não existirem anticorpos monoclonais que reconhecem os epítomos específicos expressos por estas variantes. Estudos moleculares demonstraram que elas ocorrem predominantemente em indivíduos de origem Africana e seus descendentes (HUANG et. al., 1997; HEMKER et. al., 1999, WAGNER et. al., 2002; CASTILHO et. al., 2005). A densidade antigênica dos antígenos RhD parciais varia entre 500 a 25.000 antígenos por hemácia e portanto muitos antígenos

RhD parciais podem ser sorollogicamente caracterizados como RhD normais uma vez que a densidade antigenica da proteina RhD varia entre 10.000 a 25.000 sitios por hemácia (WESTHOFF, 2004). Considerando o cut off sorológico de 500 antígenos por hemácias, alguns antígenos RhD parciais (DAU, DAR, DVI) podem também ser identificados na rotina sorológica como RhD fraco ou até mesmo como RhD-negativo (Figura 6)

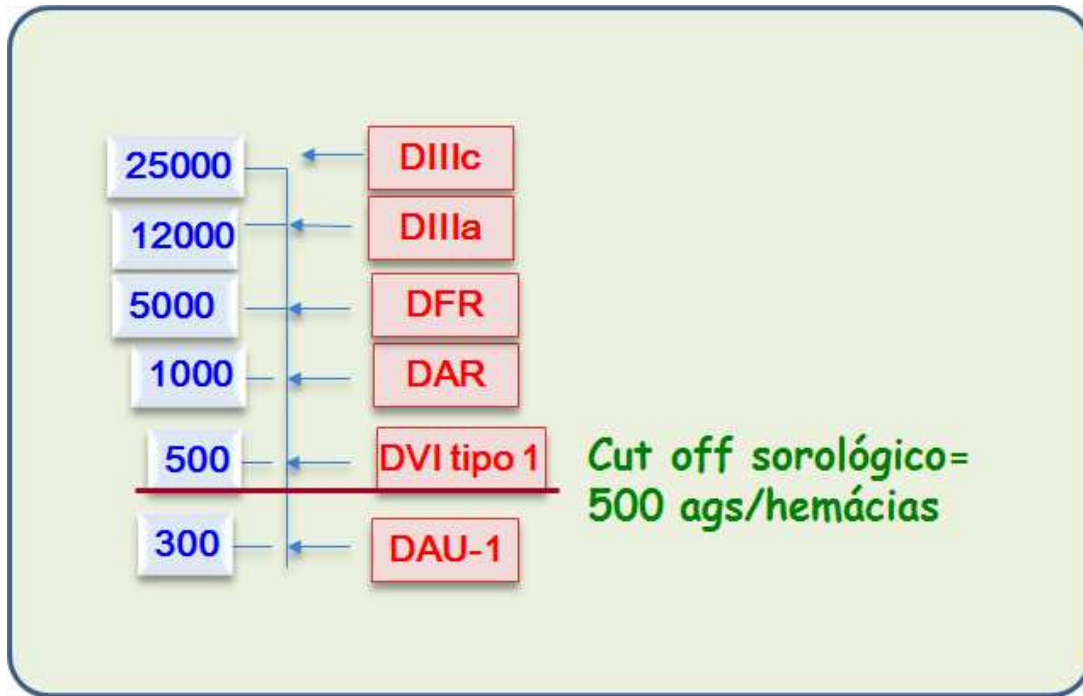


Figura 6: Densidades antigênicas de antígenos RhD parciais

Outra variante do antígeno RhD, o antígeno RhD fraco, foi descrita por STRATTON (1946). Este antígeno apresenta fraca expressão do antígeno RhD e, dependendo do anti-soro anti-D utilizado e da técnica de hemaglutinação, reage apenas pelo teste da antiglobulina humana.

AVENT e REID (2000) e ROUILLAC et al (1996) acharam que o antígeno RhD fraco apresentava uma variação de expressão quantitativa derivada de uma redução dos níveis de mRNA. WAGNER & FLEGEL (1999) demonstraram que, na verdade, o antígeno RhD fraco surgiu como uma consequência de SNPs em diferentes éxons do gene *RHD*. Atualmente mais de 70 tipos já foram descritos (Site RHESUS: www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/) e, em populações Caucásicas os tipos 1, 2, 3, 4 e 5 são os mais comuns e dentre estes os tipos 1, 2, 3 e 4.1 são os mais frequentes (MULLER et al, 2001).

Até o momento, não foi observada aloimunização anti-D em indivíduos que apresentam esses tipos de RhD fraco. As substituições dos aminoácidos dos diferentes tipos de RhD fraco estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD (Figura 7). Este fato explica a fraca expressão do antígeno RhD na membrana da hemácia, bem como a ausência de aloanticorpo anti-D na maioria dos indivíduos RhD fracos (WAGNER et. al.,2000; MULLER et. al.,2001).

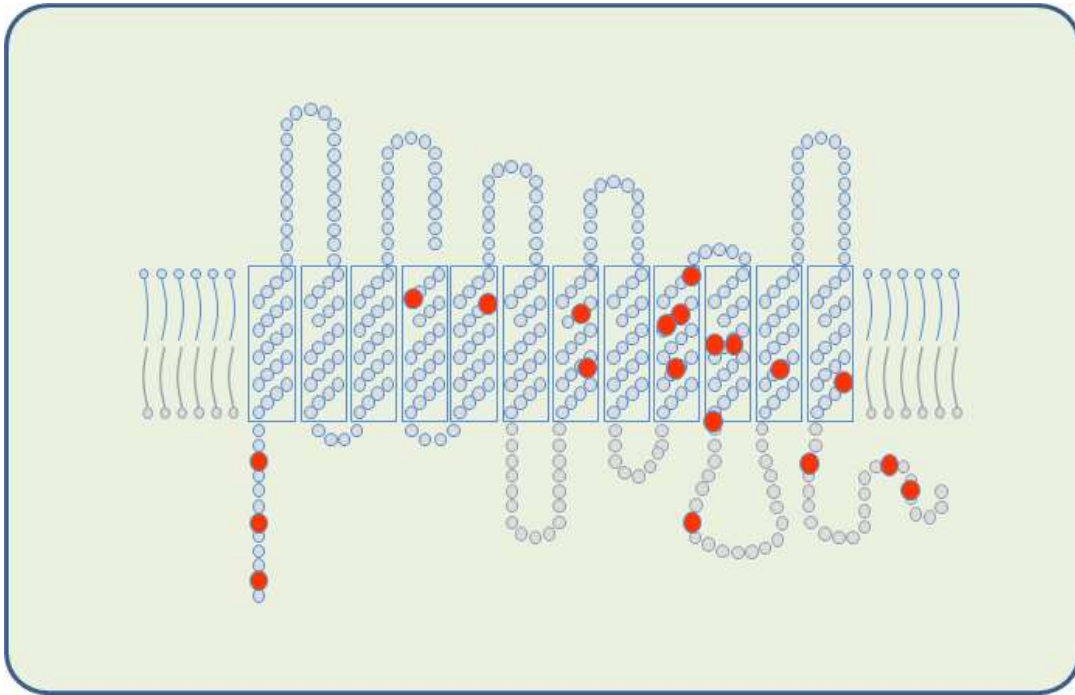


Figura 7: Proteína RhD fraco

A presença do alelo *RHC* em trans no locus Rh, também está associada com a expressão fraca do antígeno RhD na hemácia. Algumas vezes este mecanismo encontra-se associado com tipos do antígeno RhD fraco, ocorrendo, assim, uma redução ainda maior da expressão deste antígeno na membrana da hemácia, o que dificulta consideravelmente a sua identificação sorológica (MOTA et. al., 2005).

O mecanismo relacionado com a expressão reduzida do antígeno RhD fraco, não está totalmente esclarecido, e sua expressão difere dependendo do tipo presente na membrana da hemácia. Polimorfismos de único nucleotídeo que ocorrem no gene *RHD* fraco parecem envolver regiões importantes relacionadas com a integração da proteína Rh

com a membrana das hemácias ou com a glicoproteína RhAG (WAGNER e FLEGEL, 2004). A densidade antigênica do antígeno RhD normal varia entre 10.000 a 25.000 sítios por hemácias enquanto que os antígenos RhD fraco apresentam densidades antigênicas que variam de 53 a 4000 sítios antigênicos por hemácia (WESTHOFF, 2004). Entre os tipos de D fraco mais comuns, o que apresenta maior densidade antigênica é o D fraco tipo 4, seguido pelos tipos 3, 1, 2 e 5 (Figura 8). Considerando o cut off sorológico de 500 antígenos por hemácias, o antígeno RhD fraco tipo 2 encontra-se no limite de detecção enquanto que o tipo 5 geralmente não é detectado por testes de aglutinação direta.

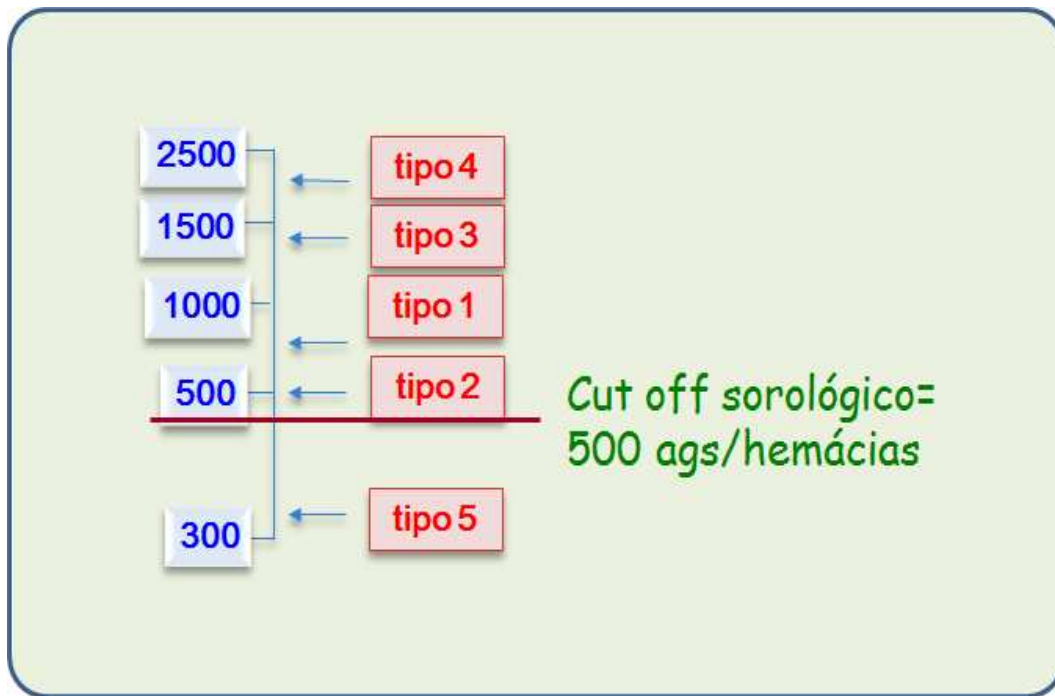


Figura 8: Densidades antigênicas de antígenos RhD fraco mais comuns

Uma outra variante RhD, recentemente identificada em Asiáticos (KORMOCZI et al, 2005), apresenta uma expressão muito reduzida do antígeno RhD, com densidades antigênicas inferiores a 50 antígenos/hemácia, ou seja, muito abaixo do cut off sorológico e, portanto, não é detectada sorologicamente nem mesmo por testes de aglutinação indireta (Figura 9). Pelo fato de somente ser identificada por testes de adsorção e eluição, esta variante foi denominada DEL.

doadores de sangue não se recomenda transfundir a receptores RhD-negativo (WAGNER et al, 2005; YASUDA et al, 2005).

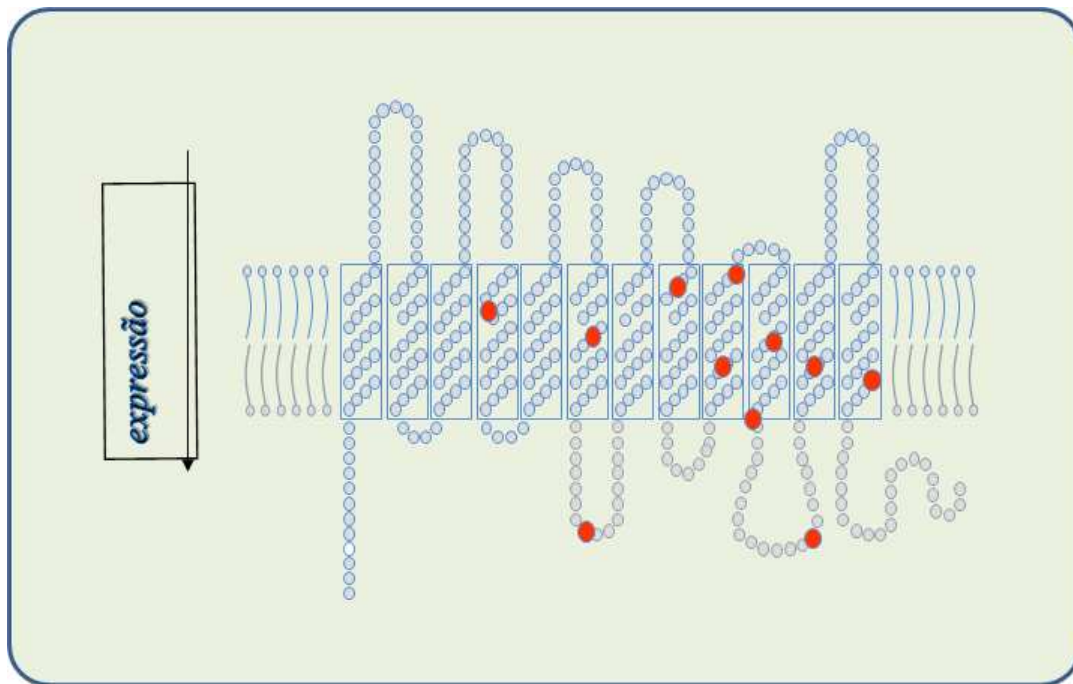


Figura 10: Proteína DEL

A distinção sorológica entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial de baixa densidade antigênica é muito difícil e mesmo com a grande variedade de monoclonais anti-D disponíveis ainda se classifica alguns RhD parciais como RhD fracos. No entanto, esta diferenciação é importante, em especial para pacientes e gestantes, pois pode auxiliar na conduta transfusional e na profilaxia Rh (DENOMME et al, 2008). As técnicas de biologia molecular têm sido indicadas para esta finalidade e atualmente estão sendo amplamente utilizadas na definição das variantes *RHD* (FLEGEL & WAGNER, 2002; POLIN et al, 2007)

WAGNER e FLEGEL (2000) definiram o modelo da árvore filogenética RH, a partir de estudos realizados com alelos RH de primatas. Segundo esses autores, os haplótipos RH originaram-se a partir da evolução do haplótipo *Dce* (Ro), que seria o haplótipo ancestral. Este teria sofrido eventos moleculares e se dividido em cinco “clusters” *RHD* independentes.

Os clusters RhD categoria IVa e RhD fraco tipo 4 estão presentes em Africanos e seus descendentes e geralmente ocorrem com o haplótipo *Dce* (Ro). Em 2002, WAGNER e FLEGEL estudando uma nova variante do antígeno RhD em Africanos, identificaram mais um cluster RhD independente, denominado DAU. Assim, estes três grupos formam o “cluster dos alelos Africanos”. O cluster euroasiático ocorre mais frequentemente com os haplótipos *DCE* e *DcE*. O quinto e principal cluster envolve o gene *RHD* normal, do qual derivam todos os outros (Figura 11).

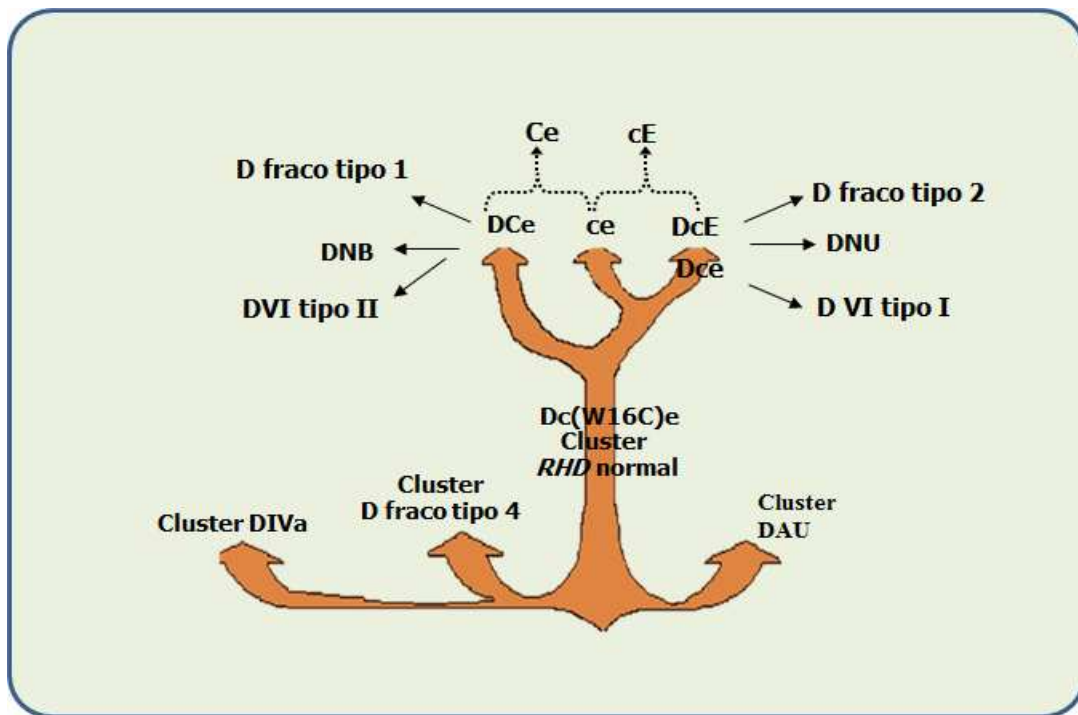


Figura 11: Árvore filogenética *RHD* idealizada por Wagner e Flegel, 2000.

Os métodos de genotipagem Rh baseiam-se atualmente nas técnicas de PCR alelo-específico ou PCR-RFLP (LE VAN KIM et. al., 1992; FAAS et. al., 1997; POULTER et. al., 1996; COLIN et. al., 1991), buscando identificar as diferenças nas seqüências entre os genes *RHD* e *RHCE* (CARRITT et. al., 1997; RIOS et. al., 1999; REID et. al., 2000).

Como rotina, os métodos que amplificam regiões específicas do íntron 4 e éxon 7 têm sido utilizados na genotipagem *RHD*. A amplificação simultânea do íntron 4 e éxon 7 em uma técnica de PCR multiplex tem sido também utilizada na genotipagem

dos alelos *RHCE**C/c e na detecção do pseudogene *RHD* (*RHD*Ψ) (SINGLETON et. al., 2000). Uma outra técnica de PCR multiplex tem possibilitado a caracterização molecular das variantes *RHD* híbridas, ou seja, as variantes que possuem inserção total ou parcial do éxon *RHD* pelo éxon *RHCE* equivalente (MAASKANT van WIJK et. al., 1998).

Devido ao alto grau de polimorfismo do sistema Rh, além das técnicas anteriormente mencionadas, pode ser ainda necessário o emprego de métodos específicos para a genotipagem de um antígeno particular, podendo até mesmo requerer métodos de sequenciamento direto para identificação de genes *RH* alterados.

A elucidação da base molecular das variantes Rh possibilitou o desenvolvimento de técnicas para a determinação de variantes que parecem ser predominantes em algumas populações, incluindo os microarranjos de DNA. Desta forma, é possível estabelecer a correlação adequada entre os fenótipos e os genótipos e o esclarecimento da perda de expressão de alguns antígenos Rh comuns. A determinação da frequência das variantes Rh em população com etnia distinta pode auxiliar na determinação de fenótipos Rh raros que não são caracterizados sorologicamente.

Devido a sua importância clínica e considerando que o antígeno RhD é o mais imunogênico do sistema Rh e que apresenta diversas variantes, estudos que possam esclarecer sua expressão e mecanismos moleculares envolvidos são importantes para a padronização de técnicas moleculares e sorológicas em diferentes populações.

O fato de existirem diferentes clones de anticorpos monoclonais anti-D, diferentes técnicas sorológicas e poucos estudos moleculares que caracterizem as variantes do antígeno RhD na população brasileira nos estimulou a realizar um estudo sorológico e molecular que possa ajudar a determinar as variantes *RHD* mais frequentes de nossa população bem como o seu envolvimento com a aloimunização. A partir deste estudo, acreditamos que seja possível estabelecer uma estratégia sorológica e molecular adequada para doadores e pacientes da população brasileira.

OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do tema e sua aplicação na prática clínica transfusional, os objetivos foram:

1. Caracterizar variantes do antígeno D através de estudo sorológico e molecular em amostras de sangue e DNA de pacientes e doadores voluntários de sangue fenotipados previamente como RhD fraco;
2. Associar os tipos de variantes RhD com os haplótipos Rh presentes;
3. Avaliar a reatividade de anti-D monoclonais comercialmente disponíveis com as variantes do antígeno D caracterizadas molecularmente;
4. Propor um protocolo para tipagem RhD em pacientes e doadores de sangue;

MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

1. Amostras de sangue

Após consentimento informado, foram analisadas no período de março de 2008 a junho de 2010, 131 amostras de doadores voluntários de sangue das regiões Sul, Sudeste e Nordeste e 223 amostras de sangue de pacientes da região Sudeste, previamente fenotipados como D fraco.

2. Cartões Gel (ID-Micro Typing Cards)

Os cartões ID-Diaclon ABO/Rh (clone 175/2) e ID-Nacl foram utilizados na realização da fenotipagem RhD e o cartão ID-Coombs Anti-IgG foi utilizado na confirmação do antígeno D fraco. Foram obtidos de Diamed S.A., Lagoa Santa, MG Brasil.

3. Cartões DG Gel®

O cartão DG Gel ABO/Rh (2D), soros anti-D monoclonal IgM (clone P3x61) e anti-D monoclonal IgG e IgM (clones P3x290, P3x35, P3x61, P3x21223 B10) foi utilizado na realização da fenotipagem RhD. O cartão DG Gel Coombs (AHG:Coombs Liss com antiglobulina humana poliespecífica) foi utilizado na confirmação do antígeno D fraco. Foram obtidos de Grifols do Brasil Ltda., Curitiba, PR Brasil.

4. Tampão LISS modificado (Diluyente 2 e DG Sol)

Tampão de baixa força iônica, utilizado na diluição das hemácias, para a realização da fenotipagem RhD e confirmação do antígeno D fraco.

5. Suspensão de hemácias a 0,8%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 0,8%, em LISS modificado (Diluyente 2). Após lavar três vezes as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 100g durante 1 minuto, a cada vez, 2 µl do concentrado de hemácias obtido foi ressuspenso em 0,5 ml de LISS modificado.

6. Suspensão de hemácias a 3%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 3% em salina. Após lavar três vezes as hemácias em solução fisiológica, usando centrifugação a 100g durante 1 minuto, a cada vez, 15 µl do concentrado de hemácias obtido foi ressuspensão em 0,5 ml de solução salina 0,9%.

7. Suspensão de hemácias a 5%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 5% em DG Sol e em LISS modificado (Diluyente 2, Diamed S.A.) : 25 µl de hemácias em 500 µl do diluyente.

8. Anti-soros

Os anti-soros empregados na determinação do antígeno RhD foram:

- anti-RhD Monoclonal IgG + IgM, clones P3x 61 / P3x 35 (Diagast, Lille, France).
- anti-RhD Monoclonal IgM , clone MS 201 (Fresenius Kabi, Itapeverica da Serra, SP Brasil).
- Anti-RhD Monoclonal IgG + IgM, clones MS26 + MS201 (Fresenius Kabi, Itapeverica da Serra, SP Brasil).
- Anti-RhD Monoclonal IgG, clone ESD1 (Diamed S.A., Lagoa Santa, MG Brasil)
- Anti-RhD Monoclonal IgG, clone MS26 (Diamed S.A., Lagoa Santa, MG Brasil)
- soro antiglobulina humana poliespecífico (Diamed S.A., Lagoa Santa, MG Brasil).

9. Extração de DNA

O QiAMP DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA foi utilizado na extração de DNA de amostras de sangue periférico.

10. dNTP 10mM

Os nucleotídeos dATP, dGTP, dCTP e dTTP foram obtidos da Sinapse (MBI Fermentas ®). A concentração de dNTP 10mM utilizada nas reações de PCR foi obtida diluindo-se 20µl de cada nucleotídeo em 120 µl de água deionizada e destilada (ddH₂O).

11. Taq DNA polymerase

As enzimas Taq DNA polymerase, utilizadas nas reações de PCR, foram obtidas da Invitrogen ®, Carlsbad, CA), São Paulo, SP. O kit contendo 5 unidades / µl desta enzima, inclui 1,25 ml de tampão 10X (200mM Tris-HCL pH8-4) e 1 ml de MgCl₂ 50mM.

12. Tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) 10x

Foram diluídas 108g de Tris (Sigma Chemical CO, St Louis), 55g de Ácido Bórico (Sigma Chemical CO, St Louis) e 7,44g de EDTA em 1L de água deionizada e destilada (ddH₂O).

13. Tampão Tris-Borato-EDTA (TEB) 1x

O tampão TEB 1x foi preparado diluindo-se 100ml de TEB 10x em 900 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

14. Gel de agarose a 1.5%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5g de agarose (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) em 100ml de TEB 1x. Esta solução foi aquecida em forno microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, foi adicionado 1,2 µl de brometo de etídio (Invitrogen ®, Carlsbad, CA).

15. Gel de agarose a 2.0%

Foram dissolvidas 3,0g de agarose (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) em 100ml de TEB 1x. Após aquecimento em forno microondas durante 1 minuto e, após resfriamento, 1,2 µl de brometo de etídio (Invitrogen ®, Carlsbad, CA) foi adicionado à solução.

16. Gel de poliacrilamida a 12%

O gel foi preparado misturando-se em um Becker 12,4ml de água deionizada e destilada (ddH₂O), 6,4ml de acrilamida 40% (Invitrogen®, Carlsbad, CA), 2ml de TEB 10x, 200ul de persulfato de amônia 10% (Invitrogen®, Carlsbad, CA) e 8 µl de TEMED (Invitrogen®, Carlsbad, CA). A solução foi distribuída em 4 pares de placas de vidro com suporte próprio e foi aguardada a sua polimerização.

17. Marcador molecular

Foi utilizado o Marcador molecular de 100 pb obtido da Sinapse (MBI Fermentas®).

18. Enzimas de restrição

As enzimas *Mnl*-I e *Hph*-I foram obtidas da Sinapse (MBI Fermentas®).

B. MÉTODOS

1. Fenotipagem RhD

A fenotipagem RhD foi determinada pelo teste de hemaglutinação clássico em tubo e pelo método em gel.

1.1. Fenotipagem RhD em tubo

Após identificação dos tubos, 50 µl dos anti-soros anti-D monoclonal IgM (clone MS201, Fresenius Kabi) e anti-D monoclonal IgG+IgM (clones MS26+MS201, Fresenius Kabi) e 50 µl das hemácias em teste a 3% em solução salina 0,9%, foram adicionadas aos tubos. Após centrifugação a 3500 rpm por 15 segundos, foi realizada a leitura das reações em função dos padrões de aglutinação em tubo.

1.2. Fenotipagem RhD em gel (Diamed S.A.)

Após identificação dos cartões ID-Diaclon ABO/Rh (clone 175/2) e ID-NaCl, 10 µl das hemácias em teste a 5% em Diluente 2 foram adicionadas aos microtubos do cartão ID-ABO/Rh e 50 µl das hemácias em teste a 0,8% em Diluente 2 e 25 µl de anti-D monoclonal IgG (clone MS26) foram adicionadas aos microtubos do cartão ID-NaCl. A seguir, os cartões foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste.

1.3. Fenotipagem RhD em gel (Grifols do Brasil Ltda)

Após identificação do cartão DG Gel ABO/Rh (2D), 10 µl das hemácias a 5% em DG Gel Sol foram adicionadas aos microtubos contendo gel. Os cartões foram centrifugados a 990 rpm por 9 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste.

2. Pesquisa do antígeno RhD fraco

A pesquisa do antígeno D fraco foi realizada pelas técnicas em tubo e em gel.

2.1 Pesquisa do antígeno RhD fraco em Tubo

A pesquisa do antígeno RhD fraco foi realizada pela técnica de hemaglutinação em tubo, utilizando-se 50 µl do anti-soro anti-D monoclonal IgG+IgM (clones P3x35/P3x61, Diagast) e 50 µl de suspensão de hemácias a 3% em salina. Após incubação da reação a 37°C por 30 minutos, os tubos foram lavados três vezes com solução salina e foi adicionado 100 µl de soro antiglobulina humana. Após centrifugação a 3500 rpm por 15 segundos, foi realizada a leitura das reações em função dos padrões de aglutinação em tubo.

2.2 Pesquisa do antígeno RhD fraco em Gel (Diamed S.A)

Após identificação do cartão ID-Coombs Anti-IgG, 50 µl das hemácias em teste a 0,8% em Diluente 2 foram adicionadas aos microtubos contendo gel e soro antiglobulina humana. A seguir, 50 µl do anti-D Monoclonal IgG (ESD1, Diamed S.A.) foi adicionado ao mesmo tubo. Após incubação a 37°C por 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste.

2.3 Pesquisa do antígeno RhD fraco em Gel (Grifols do Brasil Ltda)

Após identificação dos cartões DG Gel Coombs (AHG:Coombs Liss com antiglobulina humana poliespecífica), 50 µl das hemácias a 1% em DG Gel Sol e 25 µl do anti-D monoclonal IgG+IgM (clones MS26 e MS201, Fresenius Kabi,) foram adicionados aos microtubos contendo gel. Após incubação a 37°C por 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 990 rpm por 9 minutos. A leitura das reações foi realizada em função dos padrões de aglutinação em gel teste.

3. Extração de DNA

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se o QiAMP DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

A concentração e qualidade de todos os DNAs preparados foram analisadas. A qualidade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. E a concentração de DNA foi medida pela densidade óptica em espectrofotômetro a 260 nm.

4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase (PCR) utilizou 200 ng de DNA, 50 pmol de cada *primers*, 2 nmol de cada dNTP, 1.0 U de *Taq* DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 µl.

Todas as reações de PCR incluíram um protocolo padrão com variações na temperatura de anelamento e o número de ciclos encontrados na Tabela 1, realizados em termo ciclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, 2,0%, e gel de poliacrilamida 12%. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se nas Tabelas 2-6.

Tabela 1: Variações de temperatura de anelamento e número de ciclos das técnicas de PCR utilizadas

Genotipagem	Temperatura de Anelamento	Nº de ciclos
<i>RHD, RHCE*Cc, RHDΨ</i>	1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65°C, 3 minutos e 30 segundos a 72°C	32
<i>D fraco, D parcial DHMi, RHCE*Ee</i>	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C ou 65°C, 20 segundos a 72°C	35
<i>D parcial categoria VII</i>	45 segundos a 95°C, 45 segundos a 60°C, 45 segundos a 72°C	30
<i>DAR</i>	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C, 40 segundos a 72°C	35
<i>D parciais que ocorrem por genes híbridos</i>	1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, 45 segundos a 72°C	32

5. Análise dos fragmentos de PCR após digestão com enzimas de restrição (RFLP)

Os produtos de PCR amplificados foram digeridos *overnight* com enzimas de restrição apropriadas (New England Biolab®, e MBI fermentas®, Amherst, NY) em um volume final de 20 µl, utilizando-se 10 µl do produto de PCR e 10µl da mistura de enzima/tampão, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A análise do tamanho dos fragmentos obtidos com a digestão enzimática foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%.

6. Genotipagem *RHD*

Devido à alta homologia existente entre os genes *RHD* e *RHCE*, a estratégia utilizada na genotipagem *RHD* levou em consideração as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: intron 4 e exon 10. No intron 4, o gene *RHCE* possui 600 pb a mais que o gene *RHD*, enquanto, na região 3' não traduzida do exon 10, o gene *RHD* possui 47 pb a mais que o gene *RHCE*. Assim, foram utilizados *primers* (REID et al, 2000) que permitem determinar a presença do gene *RHD*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 12). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 2.

7. Genotipagem *RHCE*E/e*

A genotipagem *RHCE*E/e* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto de PCR (amplicon) obtido foi digerido com a enzima de restrição *Mnl*-I (PCR-RFLP) conforme descrito por RIOS et al, 1999 e REID et al, 2000. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. (Figura 13). As seqüências dos *primers* encontram-se na Tabela 2.

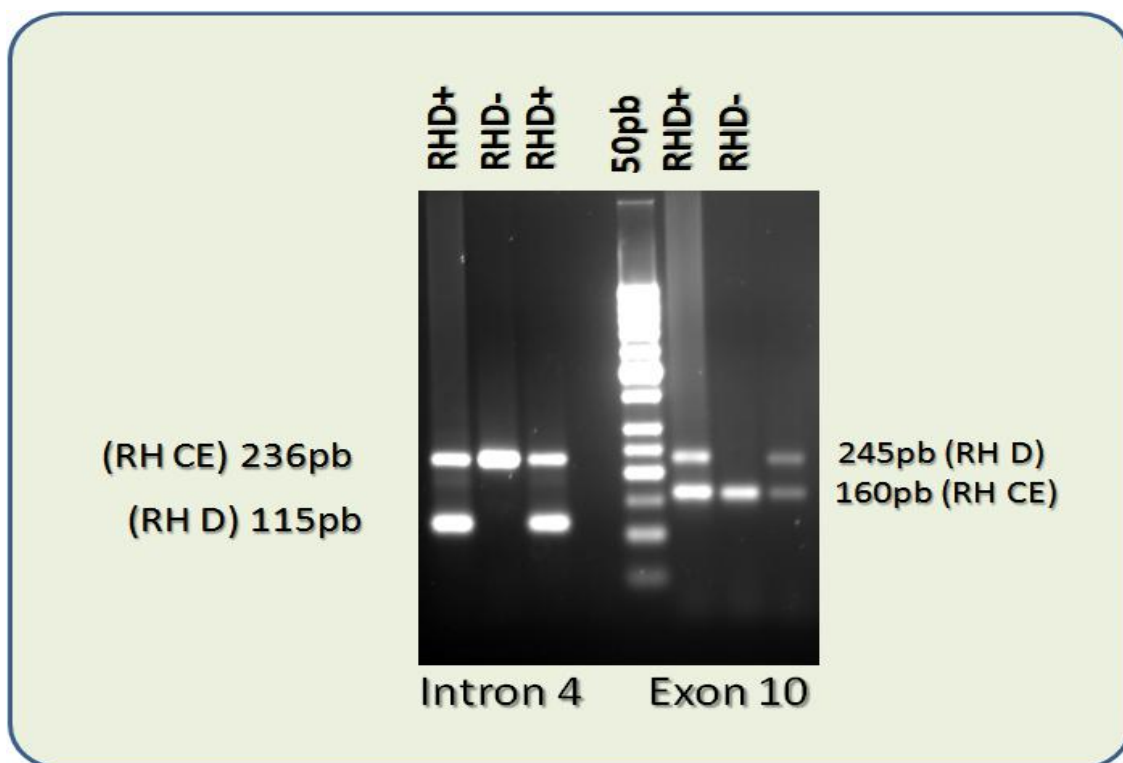


Figura 12. PCR para a genotipagem *RHD*

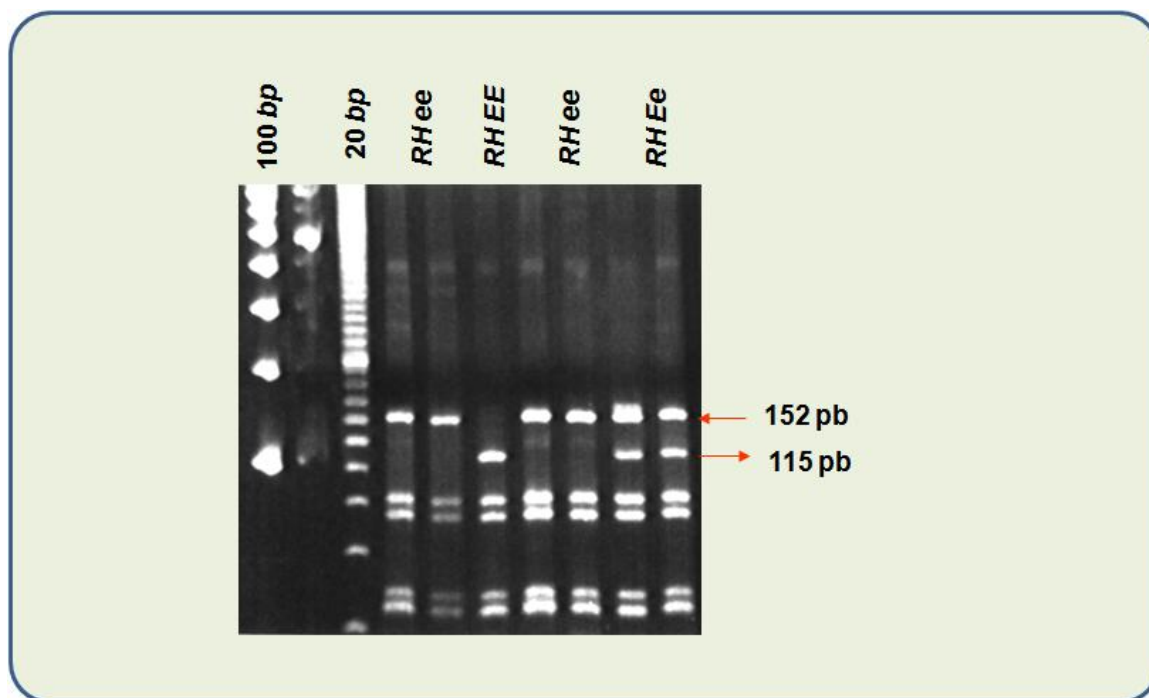


Figura 13. PCR-RFLP para a genotipagem *RHCE*Ee*

8. Genotipagem *RHCE**C/c

A genotipagem *RHCE**C/c e a determinação do pseudogene *RHD* foram realizadas utilizando-se uma técnica de PCR multiplex que permite a amplificação dos alelos *RHCE**C/c na presença do gene *RHD* e a detecção da duplicação de 37 pb no gene *RHD* conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHD* Ψ (SINGLETON et al., 2000). A reação de PCR utilizou 200 ng de DNA, 50 pmol de cada primer, 2 nmol de cada dNTP, 1.0 U de Taq DNA polimerase e tampão em um volume final de 50 μ l. A análise dos produtos de PCR obtido foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (figura 14). As mutações de ponto associadas com este polimorfismo e a sequências dos *primers* utilizados encontram-se na tabela 2.

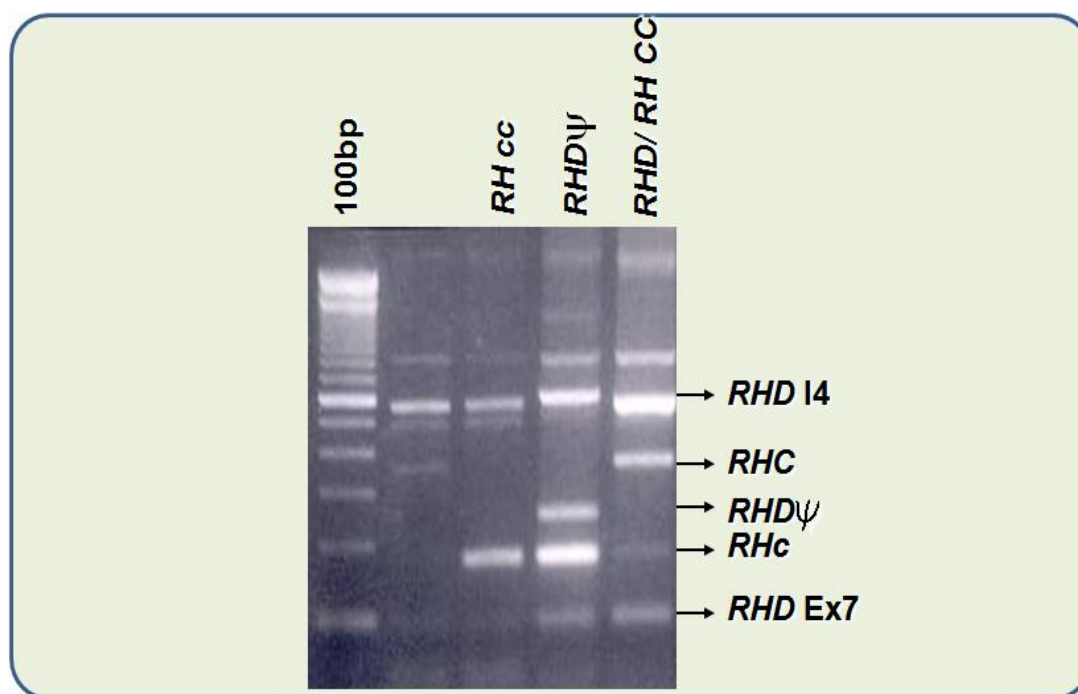


Figura 14. PCR multiplex para as genotipagens *RHD*, *RHCE**C/c e *RHD* Ψ

9. Caracterização molecular dos antígenos RhD Fraco e RhD Parcial HMi

A caracterização molecular dos antígenos RhD fraco e RhD parcial HMi foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR alelo-específico (MULLER et al., 2001) com o objetivo de identificar os cinco tipos do antígeno RhD fraco que ocorrem com mais

freqüência e detectar o antígeno RhD parcial HMi que pode ser confundido com RhD fraco sorologicamente. A reação de PCR e as condições foram previamente descritas. A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 15). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3.

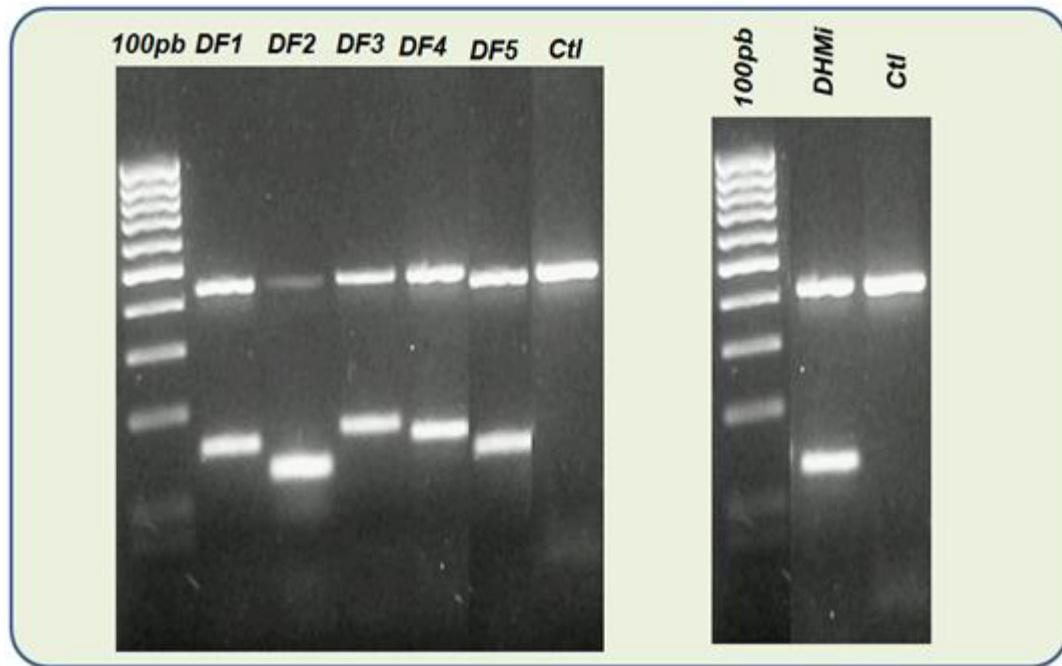


Figura 15. AS-PCR para caracterização dos tipos de D fraco mais comuns e D parcial DHMi

10. Caracterização molecular das variantes *RHD* híbridas e alelos *RHD* parciais que ocorrem pela presença de genes híbridos

Foi realizada a técnica de PCR multiplex que amplifica 6 exons específicos do gene *RHD*. As variantes híbridas são identificadas pela ausência de uma dessas regiões (MAASKANT-van-WIJK, 1998) e os alelos *RHD* parciais que ocorrem pela presença de genes híbridos são caracterizados conforme os exons amplificados.(Figura 16). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 4.

11. Caracterização molecular do antígeno RhD Parcial DAR

A caracterização do antígeno DAR foi realizada em todas as amostras de DNA identificadas como RhD fraco tipo 4. Foi utilizada a técnica de PCR-RFLP com primers específicos para amplificar o exon 7 do gene *RHD* e o produto obtido foi digerido com a enzima *Hph-I*. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (Figura 16). As sequência dos *primers* encontram-se na Tabela 5.

12. Caracterização molecular do antígeno RhD categoria VII

Foi utilizada a técnica de PCR alelo-específico para a caracterização molecular da variante RhD categoria VII, através dos primers R256 e RDVII que resultam na amplificação de um fragmento de 95 pb como produto específico DVII. A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 16). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 6.

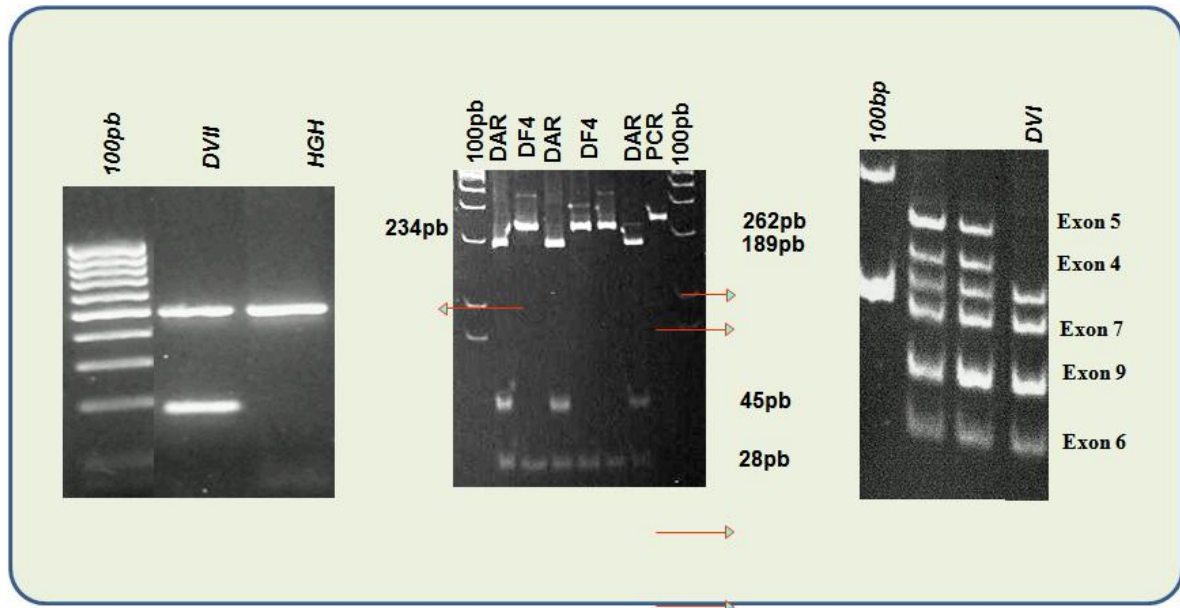


Figura 16. AS-PCR para caracterização de D parcial categoria VII , PCR-RFLP para DAR e multiplex para D parciais que ocorrem por genes híbridos

Tabela 2: Sequência dos *primers* utilizados nas genotipagens *D*, *RHCE* C/c*, *RHCE* E/e*

Primers	Sequências	Genbank
RHI41	5' -GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC -3'	Y10604, Y10605
RHI42	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC -3'	Y10604, Y10605
RHI43	5'ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG 3'	Y10605
EX10F	5'-TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA -3'	X54534,LO8429
RHD3'-UTR	5'-GTA TTC TAC AGT GCA TAA TAA ATG GTG -	(Huang, 1996)
RHCE3'-UTR	5'-CTG TCT CTG ACC TTG TTT CAT TAT AC -3'	(Huang, 1996)
EXON 7 for	5'-AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA -3'	
EXON 7 rev	5'-ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC -3'	AJ299026
INTRON 3 for 1	5'-GGG TTG GGC TGG GTA AGC TCT -3'	AB035192
INTRON 4 rev	5'-GAA CCT GCT CTG TGA AGT GCT -3'	AB041536
EXON 4 insert	5'-AAT AAA ACCC AGT AAG TTC ATG TGG -3'	AB041536
INTRON 3 for 2	5'-AAC CTG GGA GGC AAA TG TT -3'	AB035192
C for	5'-CAG GGC CAC CAC CAT TTG AA 3'	X54534
C rev	5' -GAA CAT GCC ACT TCA CTC CAG 3'	U66340
c for	5' -TCG GCC AAG ATC TGA CCG 3'	X54534
c rev	5' -TGA TGA CCA CCT TCC CAG G 3'	U66340
CEI4	5'-GGC AAC AGA GCA AGA GTC CA -3'	Y10605
CEX5	5'-CTG ATC TTC CTT TGG GGG TG -3'	X54534, LO8429

Tabela 3: *Primers* utilizados na técnica de PCR alelo-específico para RhD fraco e RhD parcial HMi

Primers	Sequências	Exon/pb
RHDF1 sense	5'aca cgc tat ttc ttt gca gAC TTA TGG 3'	Exon6/153pb
RHDF1 antisense	5'GGT ACT TGG CTC CCC CGAC 3'	
RHDF2 sense	5'ctc caa atc ttt taa cat taa att atg cat tta aac agC 3'	Exon9/126pb
RHDF2 antisense	5'gtg aaa aat ctt acC TTCCAGAAAACCTTGGTCATC 3'	
RHDF3 sense	5'aca gag acg gac aca ggA TGA GATG 3'	Exon1/166pb
RHDF3 antisense	5'CTT GAT AGG ATG CCA CGA GCCC 3'	
RHDF4 sense	5'AGA CTA CCA CAT GAA CAT GAT GCA CA 3'	Exon4/138pb
RHDF4 antisense	5' CAG ACA AAC TGG GTA TCG TTG CTC 3'	
RHDF5 sense	5' GGT GCT GGT GGA GGT GAC GGA 3'	Exon3/112pb
RHDF5 antisense	5' gag ctt ttg gcc ctt ttc tccc 3'	
HMi sense	5'AGG AGG CGT GGC TGT GGC TAT 3'	Exon6/108pb
HMi antisense	5'GGT ACT TGG CTC CCC CGAC 3'	
HGH sense	5'TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTTA 3'	434pb
HGH antisense	5'CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTTTC 3'	

Tabela 4: Sequência dos *primers* utilizados na caracterização Molecular das variantes *RHD* híbridas

Primers	Seqüências	Exon/pb
MR364	5'-TCG GTG CTG ATC TCA GTG GA-3'	Exon3/111
MR474M	5'-ACT GAT GAC CAT CCT CAT GT-3'	
MR496	5'-CAC ATG AAC ATG ATG CAC A-3'	Exon4/126
MR621	5'-CAA ACT GGG TAT CGT TGC TG-3'	
MR648	5'-G TGG ATG TTC TGG CCA AGT T-3'	Exon5/157
Mrex5	5'-cac CTT GCT GAT CTT ACC-3'	
MR898	5'-GTG GCT GGG CTG ATC TAC G-3'	Exon5/57
Mrex6	5'-tgtctagtttcttac CGG CAA GA-3'	
MR973	5'-AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA-3'	Exon7/96
MR1068	5'-ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC-3'	
Mre9SD2	5'-aacagGT TTG CTC CTA AAT ATT-3'	Exon9/71
MR1219	5'-A AAC TTG GTC ATC AAA ATA TTT AAC CT-3'	

Tabela 5: *Primers* utilizados na técnica de PCR para a determinação da Variante DAR

Primers	Seqüências	Tamanho
RHD16F	5' TCA TAC TGT GGT CCG TAA AC-3'	262pb
RHDEX7R	5'CAA TCA TGA CCA TTG CC 3'	

Tabela 6: *Primers* utilizados na técnica de PCR para a determinação da Variante D categoria VII

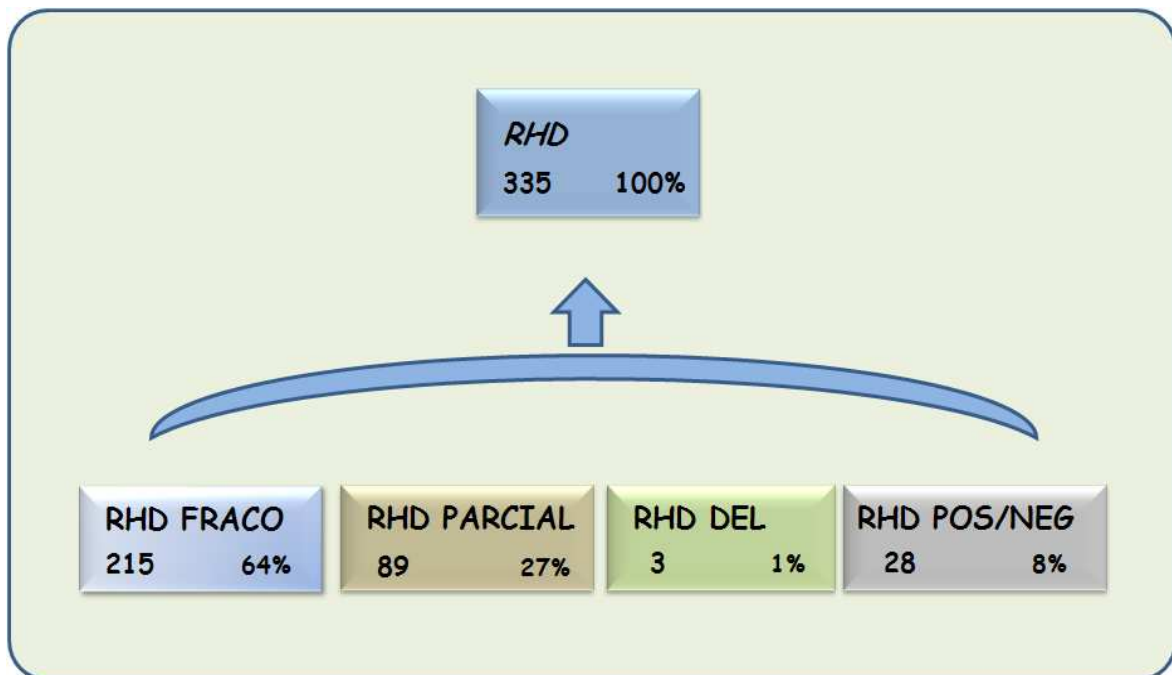
Primers	Seqüências	Tamanho
R256 sense	5'CTT GGT GTG CAG TGG GCA ATC C 3'	95 pb
RDVII antisense	5'CCA CCA TCC CAA TAC CTG TAC G 3'	

RESULTADOS

A. RESULTADO MOLECULAR NAS AMOSTRAS DE DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE E PACIENTES FENOTIPADOS PREVIAMENTE COMO D FRACO OU QUE APRESENTARAM DISCREPÂNCIAS NA TIPAGEM RhD

A caracterização molecular das variantes *RHD* foi realizada em 335 amostras, sendo 132 amostras de doadores voluntários de sangue das regiões Sul, Sudeste e Nordeste e 203 amostras de pacientes. Todos estes indivíduos foram previamente fenotipados por hemaglutinação como RhD Fraco ou apresentaram discrepâncias na tipagem RhD. Das 335 amostras estudadas, 215 foram molecularmente caracterizadas como ***RHD Fraco***, 89 como ***RHD Parcial***, 3 ***RHD DEL*** e 28 amostras apresentaram resultados ***RHD Positivo*** e ***RHD Negativo***. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 17.

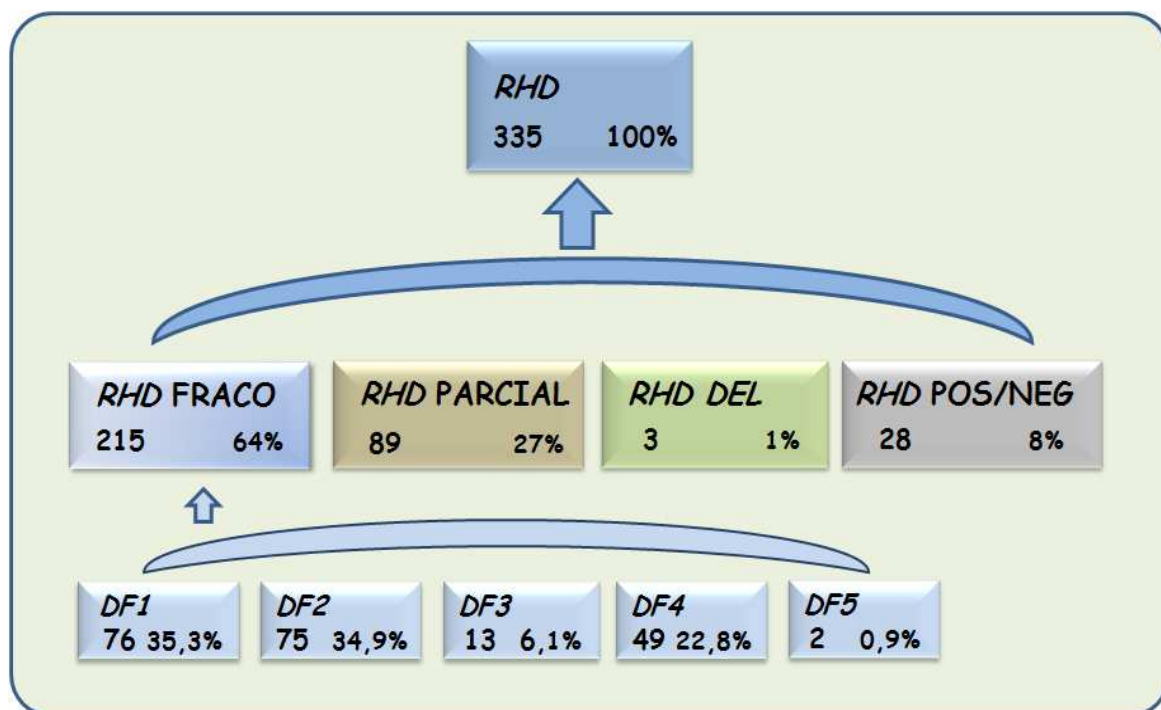
Figura 17. Resultado Molecular nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D Fraco.



1. Caracterização molecular dos Tipos de D fraco

A caracterização molecular dos tipos de D fraco em doadores voluntários de sangue e pacientes permitiu demonstrar a presença de diferentes tipos de D Fraco na população estudada. Os tipos de D fraco obtidos e suas frequências encontram-se na Figura 18. Os nossos resultados demonstram que os tipos 1, 2 e 4 são os mais frequentes, seguidos pelos tipos 3 e 5.

Figura 18. Caracterização Molecular dos tipos de D fraco encontrados nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D Fraco.

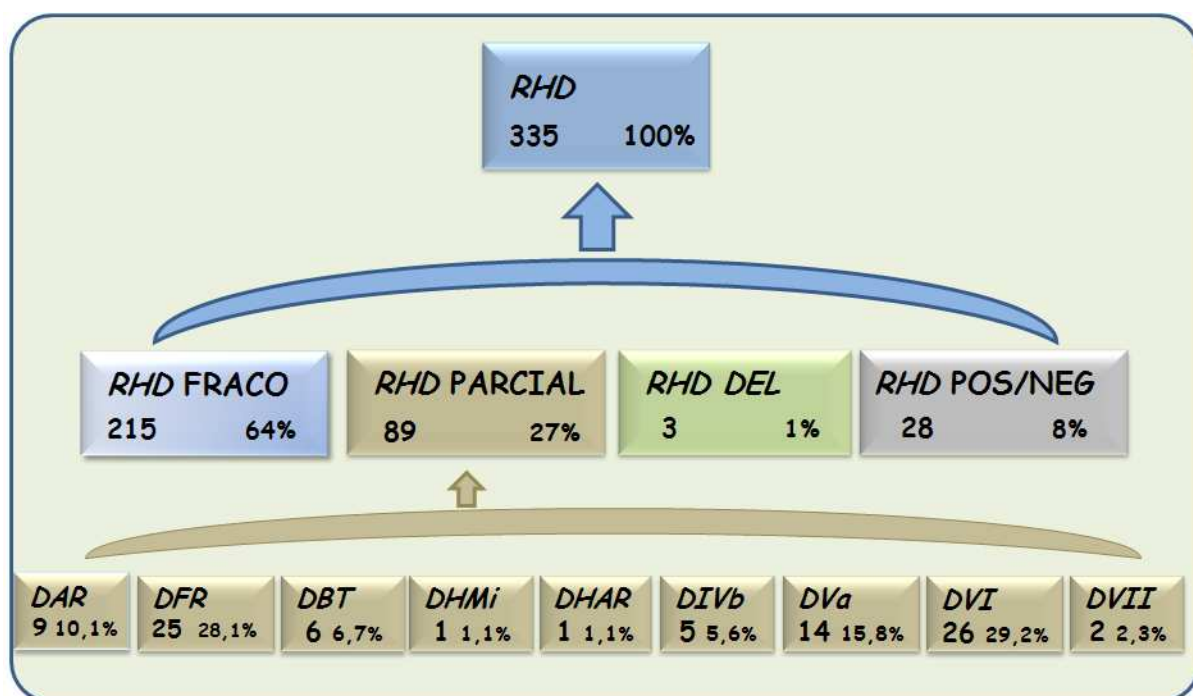


2. Caracterização molecular das variantes de D parcial

Os resultados da genotipagem *RHD* parcial em doadores voluntários de sangue e pacientes demonstraram que 27% das amostras fenotipadas como RhD fraco eram RhD

parcial. Diferentes tipos e categorias de D parcial foram encontrados. As categorias Va e VI e os tipos DFR e DAR foram os D parciais mais frequentes na população estudadas. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 19.

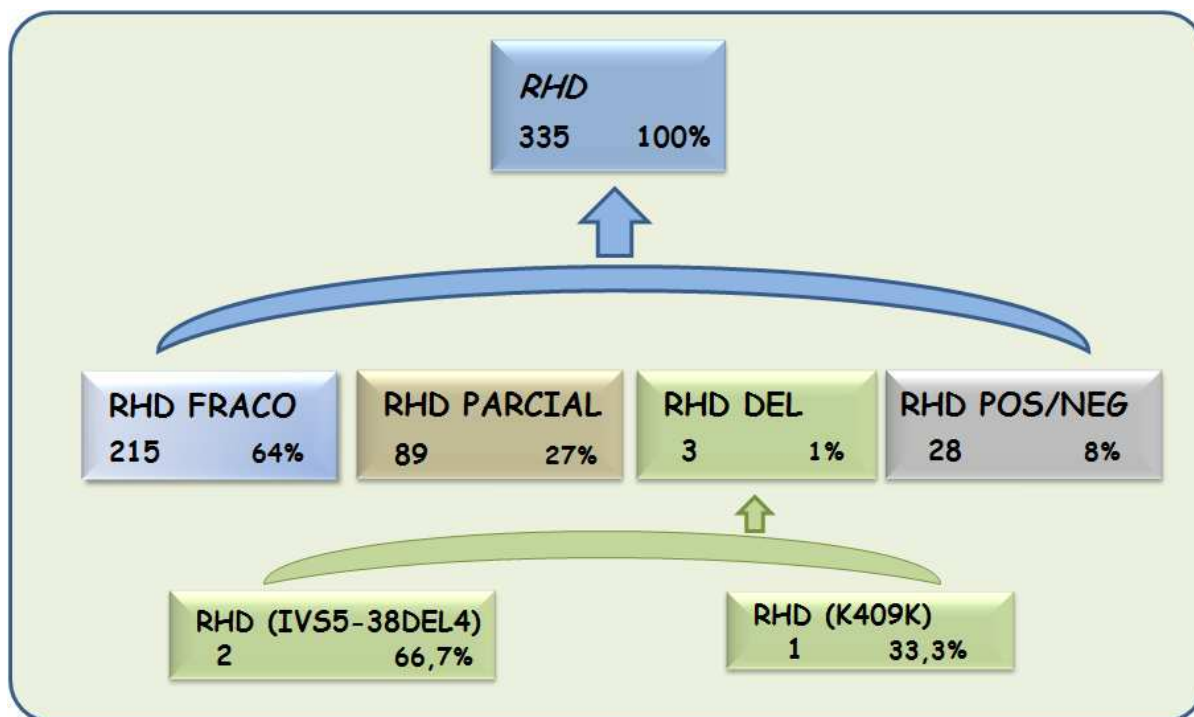
Figura 19. Caracterização Molecular das variantes de D Parciais encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como D Fraco.



3. Caracterização molecular das variantes de *DEL*

Três amostras identificadas como DEL em testes de adsorção e eluição foram enviadas à empresa Progenica (Bilbao, Spain) para confirmação molecular através do BLOODchip. Duas amostras apresentaram a deleção de 4 nucleotídeos no intron 5 característica do alelo *DEL RHD(IVS5-38DEL4)* e uma amostra apresentou um polimorfismo de único nucleotídeo em sítio de splice que determina o alelo *DEL RHD(K409K)*. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 20.

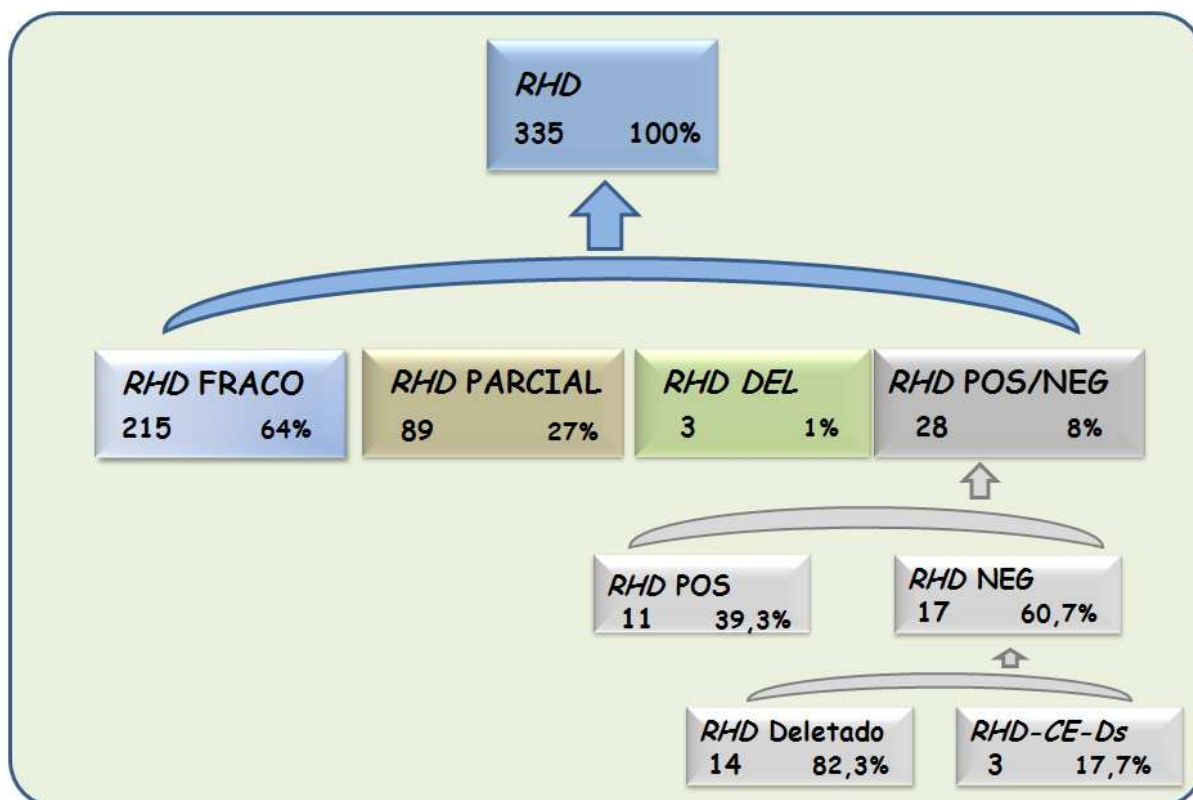
Figura 20. Caracterização Molecular das variantes *DEL* encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes fenotipados previamente como *DEL*.



4. Análise molecular em amostras que apresentaram resultados discrepantes na tipagem RhD

Com a finalidade de caracterizarmos molecularmente o antígeno RhD em vinte e oito amostras de DNA de doadores e pacientes que apresentaram resultados discrepantes na tipagem RhD, realizamos a genotipagem *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial nestas amostras. Nossos resultados demonstraram que 11 pacientes apresentavam o antígeno RhD normal, 14 apresentavam a deleção *RHD* e 3, a presença do gene híbrido *RHD-CE-Ds* que silencia a expressão do gene *RHD*. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 21.

Figura 21. Caracterização Molecular das amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes com resultados sorológicos discrepantes.



B. ASSOCIAÇÃO DOS TIPOS DE ALELOS *RHD* FRACO COM OS HAPLÓTIPOS *RH*

Os tipos de alelos *RHD* fraco identificados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente em 215 amostras. Os resultados demonstram que os tipos 1 e 5 estão frequentemente associados ao haplótipo R_1r (CcDee), o tipo 2 ao haplótipo R_2r (ccDEe) e os tipos 3 e 4 ao haplótipo R_0r (ccDee). Tabela 7.

Tabela 7. Correlação entre tipos de D fraco e haplótipos *RH* em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes previamente fenotipados como D fraco

Amostras	Haplótipos <i>Rh</i>	Tipos de D Fraco					Total
		<i>DF1</i>	<i>DF2</i>	<i>DF3</i>	<i>DF4</i>	<i>DF5</i>	
Doadores	<i>R₀r</i>	4		2	21		27
	<i>R₁r</i>	33		4		2	39
	<i>R₂r</i>		22				22
	Total	37	22	6	21	2	88
Pacientes	<i>R₀r</i>	3		3	28		34
	<i>R₁r</i>	36		4			40
	<i>R₂r</i>		53				53
	Total	39	53	7	28		127
Total de Amostras	<i>R₀r</i>	7		5	49		61
	<i>R₁r</i>	69		8		2	79
	<i>R₂r</i>		75				75
	Total	76	75	13	49	2	215

C. ASSOCIAÇÃO DOS TIPOS E CATEGORIAS DE ALELOS *RHD* PARCIAL COM OS HAPLÓTIPOS *RH*

Os tipos e categorias de alelos *RHD* parcial identificados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente em 89 amostras. Os resultados demonstram que D parcial categorias IVb e VI e os tipos DFR e DBT estão frequentemente associados ao haplótipo *R₁r* (CcDee) enquanto que D categoria Va e o tipo DAR ao haplótipo *R₀r* (ccDee). Tabela 8.

Tabela 8. Correlação entre variantes D parciais e haplótipos *RH* em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes previamente fenotipados como D fraco

Amostras	Haplótipos Rh	Variantes D parciais									Total
		<i>DAR</i>	<i>DFR</i>	<i>DBT</i>	<i>DHMI</i>	<i>DHAR</i>	<i>DIVb</i>	<i>DVa</i>	<i>DVI</i>	<i>DVII</i>	
Doadores	<i>R₀r</i>	1				1		3			5
	<i>R₁r</i>		6	3	1				12		22
	<i>R₂r</i>								1		1
	Total	1	6	3	1	1	0	3	13	0	28
Pacientes	<i>R₀r</i>	8		1				11			20
	<i>R₁r</i>		16	2			5		13	2	38
	<i>R₂r</i>		3								3
	Total	8	19	3	0						61
Total de Amostras	<i>R₀r</i>	9		1		1		14			25
	<i>R₁r</i>		22	5	1		5		25	2	60
	<i>R₂r</i>		3						1		4
	Total	9	25	6	1	1	5	14	26	2	89

D. ASSOCIAÇÃO DOS TIPOS DE ALELOS *RHD DEL* COM OS HAPLÓTIPOS *RH*

Os tipos de alelos *RHDDEL* encontrados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente em 3 amostras. Os resultados demonstram que *RHD(IVS5-38DEL4)* e *RHD(K409K)* estão associados ao haplótipo *R₁r* (CcDee). Tabela 9.

Tabela 9: Correlação entre variantes *DEL* e haplótipos *RH* em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes previamente fenotipados como D fraco

Amostras	Haplótipos Rh	Variantes <i>DEL</i>		Total
		<i>RHD (IVS5-38DEL4)</i>	<i>RHD (K409K)</i>	
Doadores	<i>R₁r</i>	1	1	2
Pacientes	<i>R₁r</i>	1		1
Total		2	0	1

E. ASSOCIAÇÃO DOS ALELOS *RHD*⁺ e *RHD*⁻ ENCONTRADOS COM OS HAPLÓTIPOS *RH*

Os alelos *RHD*⁺ e *RHD*⁻ encontrados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente em 28 amostras. Os resultados demonstram que as amostras classificadas como *RHD*⁻ por deleção do gene *RHD* estavam associadas ao haplótipo cde (r) ou Cde (r`) enquanto que as amostras que apresentaram o gene híbrido *RHD-CE-Ds* estavam associadas ao haplótipo cde. Não encontramos associações das amostras classificadas como *RHD*⁺ com haplótipos *RH* específicos. Tabela 10.

Tabela 10: Correlação entre os resultados *RHD* e haplótipos *RH* em amostras de doadores voluntários de sangue e pacientes com resultados sorológicos discordantes.

Amostras	Haplótipos Rh	<i>RHD</i>			Total
		Deletado	<i>RHD-CE-Ds</i>	Positivo	
Doadores	rr	7			7
	r'r	3			3
	r's		1		1
	R ₁ r			2	2
	R ₁ R ₂			1	1
	Total	10	1	3	14
Pacientes	rr	4			4
	r's		2		2
	R ₀ r			1	1
	R ₁ r			2	2
	R ₂ r			2	2
	R ₁ R ₁			1	1
	R ₁ R ₂			1	1
	R ₁ R ₂			1	1
	Total	4	2	8	14
Total de Amostras	rr	11			11
	r'r	3			3
	r's		3		3
	R ₀ r			1	1
	R ₁ r			4	4
	R ₂ r			2	2
	R ₁ R ₁			1	1
	R ₁ R ₂			2	2
	R ₁ R ₂			1	1
	Total	14	3	11	28

F. VARIANTES *RHD* ENCONTRADAS E REATIVIDADE SOROLÓGICA

Com a finalidade de avaliar a reatividade sorológica das variantes *RHD* encontradas em doadores voluntários de sangue e pacientes, realizamos a fenotipagem RhD em 116 amostras de sangue de doadores e em 188 amostras de sangue de pacientes com 6 clones de reagentes anti-D monoclonais pelas técnicas de Tubo e Gel. Nossos resultados demonstram que a reatividade com os anti-D monoclonais utilizados apresentou um padrão similar entre as variantes *RHD* de mesmo tipo ou categoria. Os alelos *RHD* fraco tipos 1, 3 e 4 e o alelo *RHD* parcial DBT foram detectados com todos os anti-D monoclonais utilizados em tubo e em gel. Os alelos *RHD* fraco tipos 2 e 5 e os alelos *RHD* parcial categoria VI e tipos DAR, DFR e DHMi não foram detectados com monoclonais anti-D IgM enquanto os alelos DIVb e DVa não foram detectados com monoclonal anti-D IgG. *RHD* fraco tipo 2 e *RHD* parcial categoria VI apresentaram o mesmo padrão de reatividade com os 6 anti-D monoclonais utilizados. Tabelas 11 e 12.

Tabela 11: Correlação entre as variantes de D e a reatividade sorológica com a utilização de diferentes clones de reagentes anti-D monoclonais pelas técnicas de Tubo e Gel, em amostras de doadores voluntários de sangue previamente fenotipados como D fraco.

Amostras Doadores	Variantes <i>RHD</i>	Clones de anti-D x grau de aglutinação								
		Tubo			Gel Diamed			Gel Grifols		
		IgM MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/A6H P3x35/P3x61	IgM 175/2	IgG MS26	IgG/A6H ESD1	IgM P3x61	IgG+IgM P3x35/P3X61	IgG+IgM/A6H MS26/MS201
37	<i>DF1</i>	0/2+	+ /2+	1/3+	1/2+	1/2+	2/3+	1/3+	2/4+	1/4+
22	<i>DF2</i>	0	0	1/2+	0	0/1+	1/2+	0	1+	2+
6	<i>DF3</i>	2+	2+	3+	1/3+	2/3+	4+	3+	3+	4+
21	<i>DF4</i>	0/2+	1/3+	2/3+	0/2+	1/3+	2/4+	2+	3+	3/4+
2	<i>DF5</i>	0	0	+	0	0	+	0	+	+
1	<i>DAR</i>	0	1+	1+	0	1+	2+	0	2+	3+
6	<i>DFR</i>	0	1+	1+	0	2+	2+	0	2+	2+
3	<i>DBT</i>	0/1+	1+	2+	2+	2+	3+	2+	2/3+	4+
1	<i>DHMi</i>	0	1+	2+	0	1+	2+	0	2+	3+
1	<i>DHAR</i>	0	0	0	0	0	0	0	+	0
3	<i>DVa</i>	0/1+	1+	1/2+	1/2+	0/2+	1/2+	1/2+	2+	1/3+
13	<i>DVI</i>	0	0	1+	0	1+	1+	0	1+	2+

Tabela 12: Correlação entre as variantes de D e a reatividade sorológica com a utilização de diferentes clones de reagentes anti-D monoclonais pelas técnicas de Tubo e Gel em amostras de pacientes previamente fenotipados como D fraco.

Amostras Pacientes	Variantes <i>RHD</i>	Clones de anti-D x grau de aglutinação								
		Tubo			Gel Diamed			Gel Grifols		
		IGM MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3x35/P3x61	IGM 175/2	IgG MS26	IgG/AGH ESD1	IGM P3x61	IgG+IgM P3x35/P3x61	IgG+IgM/AGH MS26/MS201
39	<i>DF1</i>	0/2+	+/2+	1/3+	1/2+	0/2+	2/3+	1/2+	2/4+	1/4+
33	<i>DF2</i>	0	0	1/2+	0	0/1+	1/2+	0	(+)/1+	1/2+
7	<i>DF3</i>	2+	2+	3+	3+	3+	4+	3+	3+	4+
28	<i>DF4</i>	0/2+	1/3+	2/3+	2/3+	2/3+	3/4+	2/3+	3+	3/4+
8	<i>DAR</i>	0	1+	1/2+	0	0/+	0/+	0	(+)/2+	1/2+
19	<i>DFR</i>	0	1+	1+	0	2+	3+	0	2+	2+
3	<i>DBT</i>	0	2+	1/2+	0/2+	0/2+	1/3+	0/2+	(+)/3+	1/4+
3	<i>DIVb</i>	1+	0	0/1+	2+	0	0/2+	2+	1/2+	1/2+
11	<i>DVa</i>	0	+/1+	1+	1/2+	0	1/2+	1/2+	1+	1+
18	<i>DVI</i>	0	0	1+	0	1+	1+	0	(+)/1+	2+
2	<i>DVII</i>	0	2+	2+	2+	2+	1/2+	2+	3+	4+

G. RESULTADOS DA GENOTIPAGEM *RHD* EM AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE COM AUTOANTI-D E EM PACIENTES COM ALOANTI-D

Com a finalidade de caracterizarmos molecularmente as variantes *RHD* em amostras de DNA de 5 pacientes fenotipados como RhD fraco que apresentavam anti-D, e de 2 doadores voluntários de sangue que apresentavam auto anti-D realizamos a genotipagem *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial nestas amostras. Dois pacientes apresentaram o alelo *RHD* parcial categoria VI, 1 apresentou o alelo DVa, 1 o alelo DIV e 1 o alelo DAR. Entre os doadores com autoanti-D um apresentou o alelo *RHD* fraco tipo 1 e o outro o alelo *RHD* fraco tipo 2. Tabela 13.

Tabela 13: Resultados da genotipagem em amostras de doadores voluntários de sangue com a presença de autoanti-D e de pacientes com a presença de aloanti-D.

Amostras	D Fraco		Variantes D parciais				Total
	<i>DF1</i>	<i>DF2</i>	<i>DAR</i>	<i>DIVb</i>	<i>DVa</i>	<i>DVI</i>	
Doadores	1	1					2
Pacientes			1	1	1	2	5

DISCUSSÃO

A. ANÁLISE SOROLÓGICA E MOLECULAR EM AMOSTRAS DE SANGUE E DNA DE PACIENTES E DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD FRACO OU QUE APRESENTARAM DISCREPÂNCIAS SOROLÓGICAS NA TIPAGEM RhD

A distinção entre as hemácias que apresentam epítomos alterados (RhD parcial) daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno RhD (RhD fraco e DEL) é importante para prevenir a aloimunização em pacientes e gestantes, uma vez que os indivíduos com o fenótipo RhD parcial apresentam risco de aloimunização, enquanto a maioria dos indivíduos RhD fraco e DEL não produzem anti-D. O reconhecimento de amostras com fraca expressão do antígeno RhD depende do método e da qualidade do reagente anti-D empregado.

A utilização de reagentes anti-D monoclonais de baixa afinidade e a dificuldade na obtenção de reagentes anti-D policlonais de boa qualidade têm causado discrepâncias entre os resultados da fenotipagem RhD. Algumas vezes estes reagentes tem deixado de detectar antígenos RhD fracos com baixa densidade antigênica. A não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D nos pacientes RhD-negativo transfundidos com estas hemácias (WAGNER et al., 2000; MOTA et al, 2005). Como a diferenciação entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial é impossível de ser realizada na rotina sorológica, muitos indivíduos classificados sorologicamente como RhD fraco são na verdade RhD parcial (ANSART-PIRENNE et al., 2004). Muitos pacientes tem produzido anti-D pelo fato de terem sido considerados RhD-positivos. Neste contexto, devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes de hemaglutinação, a genotipagem *RHD* tem sido cada vez mais utilizada para diferenciar os antígenos RhD, RhD fraco, DEL e RhD parcial (WHESTOFF et al., 2004).

Neste trabalho realizamos um estudo sorológico e molecular em 335 amostras, sendo 203 amostras de pacientes e 132 amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD fraco ou que apresentaram discrepâncias sorológicas na

tipagem RhD. Encontramos uma alta porcentagem (27%) de antígenos RhD parciais entre as amostras fenotipadas como RhD fraco, sendo que 61 destas amostras eram de pacientes e 5 deles já apresentavam aloanti-D. Nossos resultados diferem de outros resultados reportados na literatura (WAGNER et al, 1999; 2000) em que aproximadamente 5 a 10 % das amostras caracterizadas como D fraco são D parciais. A alta prevalência de indivíduos D Parciais classificados sorologicamente como D fraco em nossas amostras reforçam que a diferença entre os fenótipos D fraco e D parcial de baixa densidade antigênica não é definida através de técnicas sorológicas.

B. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS TIPOS DE D FRACO

Entre as amostras identificadas como D fraco, 213 (99.1%) das 215 foram caracterizadas como D fracos tipos 1, 2, 3 e 4 através das técnicas moleculares. Para estes indivíduos, a transfusão de sangue RhD positivo poderia ser considerada segura, uma vez que não há registros na literatura de aloimunização relacionada à estas variantes (MULLER et al, 2001; FLEGEL & WAGNER, 2002). Desta forma, o uso de unidades RhD negativo poderia ser preservado em 3-4% dos casos.

A maior prevalência dos tipos de D Fracos 1 e 2 encontrada em nosso estudo, concordou com outros estudos realizados na Europa (Tabela 14). No entanto, nossa população difere da população européia por apresentar uma maior frequência do antígeno D fraco tipo 4 quando comparado com a frequência do D fraco tipo 3. Tal fato pode ser explicado pelo processo de miscigenação que ocorreu na população brasileira, uma vez que o antígeno D fraco tipo 4 é mais frequente em populações africanas.

De acordo com a literatura, a maioria dos indivíduos que apresentam o fenótipo RhD fraco não desenvolvem anticorpos anti-D e podem ser transfundidos com sangue RhD-positivo (WAGNER & FLEGEL, 2004, FLEGEL, 2006). De fato, em nosso trabalho não encontramos nenhum paciente ou doador com os tipos de D fraco mais comuns e presença de aloanti-D. Em 2 doadores foi observado a presença de autoanticorpo anti-D, já previamente relatado na literatura (FLEGEL & WAGNER,

2002). Alguns pacientes com RhD fraco mais raros, como os tipos 4.2, 7 e 15 podem se aloimunizar se receberem sangue RhD-positivo.

Tabela 14: Frequência dos tipos do antígeno D fraco em diferentes regiões da Europa e no Brasil (presente trabalho)

D Fraco	Alemanha	Tyrol	Republica Checa	França	Espanha	Portugal	Brasil
Tipo 1	95 (60%)	43 (33%)	98 (58%)	30 (46%)	21 (49%)	16 (16%)	76 (35%)
Tipo 2	43 (27%)	10 (8%)	17 (10%)	21 (32%)	14 (33%)	63 (64%)	75 (35%)
Tipo 3	7 (4%)	65 (50%)	33 (20%)	3 (5%)	4 (9%)	14 (14%)	13 (6%)
Tipo 4	6 (4%)	4 (3%)	6 (4%)	0	4 (9%)	6 (6%)	49 (23%)
Outros	8 (5%)	8 (6%)	15 (8%)	11 (17%)	0	0	2 (1%)
Total	159	130	169	65	43	99	215

C. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES D PARCIAL

A alta prevalência de variantes sorológicas classificadas como D fraco e identificadas molecularmente como *RHD* parcial (27%), demonstra claramente que as técnicas sorológicas atualmente utilizadas não distinguem a variante D parcial das variantes com baixa densidade antigênica (D fraco). Dentre as variantes D parciais foi observado também em nossas amostras, uma alta prevalência dos antígenos D parciais DAR, DFR e D categorias Va e VI, reforçando a mistura étnica em nossa população, uma vez que DVI e DFR ocorrem predominantemente em Caucasianos enquanto que DVa e DAR têm sido mais frequentemente encontrados em Africanos (FLEGEL et al, 2009).

Com relação à alta prevalência das variantes *RHD* parcial DVI e DVa encontradas, nossos resultados estão de acordo com os resultados publicados referente à outras populações (REID & LOMAS-FRANCIS, 2006) mas diferem em relação às variantes DFR e DAR. Considerando que as variantes D parciais mais encontradas em

nosso estudo são também as mais frequentemente confundidas sorologicamente como D fraco, recomendamos a utilização de técnicas moleculares para sua identificação em pacientes e gestantes com a finalidade de se evitar a aloimunização anti-D.

D. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS VARIANTES *DEL*

As 3 amostras identificadas como *DEL* por adsorção e eluição foram caracterizadas molecularmente como *RHD(IVS5-38DEL4)* e *RHD (K409K)*. Já existem relatos na literatura de que estes alelos já induziram aloimunização primária e secundária (WAGNER et al, 2004; YASUDA et al, 2005). De acordo com a literatura, o alelo *DEL* está associado aos antígenos C ou E. Em nosso estudo, encontramos os 3 alelos *DEL* associados ao antígeno C, o que está de acordo com a maioria dos trabalhos publicados em Asiáticos (KORMOCZI et al, 2005).

Diante dos nossos resultados, apesar da imunogenicidade do antígeno *DEL* ainda ser discutida e existirem controvérsias na literatura em relação ao número de sítios antigênicos por hemácia na indução da aloimunização, recomendamos a análise molecular em amostras de doadores que apresentem o fenótipo RhD negativo e a presença do antígeno C por aglutinação direta e indireta e com resultado RhD positivo por adsorção e eluição. Este procedimento tem a finalidade de identificar o alelo *DEL* e evitar a aloimunização secundária principalmente em pacientes e mulheres em idade fértil.

E. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE AMOSTRAS *RHD+* E *RHD-* QUE APRESENTARAM RESULTADOS DISCREPANTES NA TIPAGEM RhD

Vinte e oito amostras foram analisadas devido a problemas encontrados na tipagem RhD rotineira. Algumas apresentaram discrepâncias entre os reagentes utilizados no passado e presente; outras apresentaram intensidades de aglutinações mais fracas que o esperado e, outras foram identificadas como *r'r* (Cde/cde) e suspeitou-se da presença de *DEL*. Na análise molecular, 11 amostras apresentaram o gene *RHD* normal e foram

caracterizadas como *RHD* Positivo e 17 amostras foram identificadas como *RHD* Negativo (14 pela deleção do gene *RHD* e 3 pela presença do gene híbrido *RHD-CE-Ds*).

Acreditamos que os problemas encontrados na tipagem RhD inicial das amostras identificadas molecularmente como *RHD*⁺ foram ocasionados pela utilização de reagentes anti-D policlonais, atualmente não recomendados na rotina. Com relação às amostras molecularmente caracterizadas como *RHD*⁻, pode ter ocorrido a suspeita da variante DEL, uma vez que todas as amostras apresentavam o antígeno C.

F. CORRELAÇÃO DAS VARIANTES *RHD* E HAPLÓTIPOS *RH*

De acordo com WAGNER et al (1999), as variantes *RHD* fraco, *RHD* parcial e *DEL* podem estar associadas a haplótipos *RH* específicos. As variantes *RHD* e os haplótipos associados encontrados em nosso estudo estão de acordo com outros estudos da literatura (MULLER et al, 2001; REID & LOMAS-FRANCIS, 2006). Além disso, observamos que o haplótipo cDe, predominante de populações africanas, também foi encontrado associado a variantes *RHD* correlacionadas aos haplótipos CDe e cDE, demonstrando mais uma vez a miscigenação da população brasileira.

Estes resultados sugerem que existe associação entre os tipos de *RHD* fraco, variantes *RHD* parcial e *DEL* e os haplótipos *RH* na população brasileira, mas também indicam que os haplótipos *RH* por si só não podem ser considerados na identificação dos tipos de *RHD* fraco e *RHD* parcial.

G. VARIANTES *RHD* E REATIVIDADE SOROLÓGICA

Como já mencionado anteriormente, não é possível diferenciar todas as variantes *RHD* por métodos sorológicos e como nem sempre os laboratórios de Imunohematologia podem dispor de recursos moleculares, em nosso estudo associamos cada tipo de RhD fraco e RhD parcial caracterizado, com o grau de aglutinação obtido na tipagem RhD com diferentes anticorpos monoclonais e técnicas sorológicas. Embora a

reação de aglutinação dependa diretamente do reagente anti-D utilizado, acreditamos que estes resultados podem ser de grande auxílio na identificação sorológica de variantes do antígeno RhD e consequentemente no direcionamento da melhor conduta transfusional para pacientes bem como na profilaxia Rh para gestantes.

Todas as variantes do antígeno RhD encontradas em nosso estudo, em doadores e pacientes foram associadas ao grau de aglutinação obtido à temperatura ambiente (TA) com anticorpos monoclonais IgG, IgM e blend (mistura IgG+IgM), e pelo teste da antiglobulina humana (AGH) com anticorpos monoclonais IgG e blend (Tabelas 11 e 12). Os tipos de D fraco 1, 3 e 4 e o antígeno D parcial DBT foram detectados a TA com todos os monoclonais utilizados pelas técnicas em tubo e gel, enquanto que D fraco tipo 2 e D parcial categoria VI apresentaram o mesmo padrão de reatividade em AGH com todos os anticorpos monoclonais utilizados. Isto pode ser explicado pelo fato que algumas variantes RHD apresentam o mesmo perfil de epítomos quando avaliadas com anticorpos monoclonais (WAGNER et al, 2001; DENOMME et al, 2008). Estes resultados demonstram mais uma vez que antígenos D parciais podem ser confundidos como D fraco reforçando que as técnicas sorológicas não distinguem D fraco de D parcial.

Observamos que entre os 6 anticorpos monoclonais utilizados neste estudo, apenas a mistura IgG (clone P3x35) e IgM (clone P3x61) detectou todas as variantes em gel, demonstrando também que a reatividade sorológica das variantes *RHD* depende do reagente e técnica utilizados conforme previamente relatado (DENOMME et al, 2008). Verificamos também que quando 2 anti-D monoclonais são associados, isto é, IgG+IgM ou IgM+blend a necessidade de confirmação pelo uso do teste indireto da AGH pode ser reduzida.

Nossos resultados mostram ainda que os antígenos D fraco tipos 2 e 5 e D parcial DVI, DAR, DFR e DHMI que apresentam baixa densidade antigênica, não foram detectados com monoclonais IgM enquanto que os antígenos D parcial DIVb e DVa não foram detectados com monoclonal IgG. Este padrão de reatividade obtido, especialmente com os antígenos D parcial indica que os reagentes anti-D IgG ou anti-D IgM não podem

ser utilizados isoladamente nas rotinas de doadores pois corremos o risco de não detectar algumas variantes do antígeno RhD.

Além disto, a detecção de variantes *RHD* fracas depende também da técnica utilizada e sua sensibilidade. Técnicas em tubo sem o teste indireto da AGH podem deixar de detectar variantes de baixa densidade antigênica como D fraco tipos 2 e 5 e D parcial categoria VI.

Neste trabalho observamos ainda que o grau de aglutinação é muito variado e depende diretamente do reagente e técnica empregada. Desta forma, baseado apenas na reatividade é muito difícil estabelecer um padrão em cruces para classificar as variantes *RHD* e definir uma recomendação transfusional.

H. RECOMENDAÇÕES NA TIPAGEM RhD

A sensibilidade do método e os reagentes anti-D podem influenciar os resultados da tipagem RhD. Em doadores, todas as variantes *RHD* potencialmente imunogênicas deveriam ser detectadas. Como já foi previamente demonstrado, mesmo com baixa densidade antigênica o antígeno RhD fraco pode ser imunogênico (FLEGEL e WAGNER, 2000; MOTA et al., 2005). Pacientes e gestantes com o fenótipo D parcial deveriam ser classificados como RhD-negativo.

Com base nestas primícias e diante dos resultados obtidos, nós propomos a utilização de dois reagentes anti-D na rotina de doadores para minimizar a necessidade do teste indireto da antiglobulina, detectar a maioria das variantes RhD e indicar a presença de um antígeno D parcial: a) IgG (clones MS26 ou ESD1) e IgM (clones MS201 ou 175/2 ou P3x61); b) IgM (clones MS201 ou 175/2 ou P3x61) e blend (clones MS26+MS201 ou P3x35+P3x61). Resultados negativos devem ainda ser confirmados pelo teste indireto da AGH. A estratégia por nós proposta neste trabalho para a rotina de doadores encontra-se representada na figura 22.

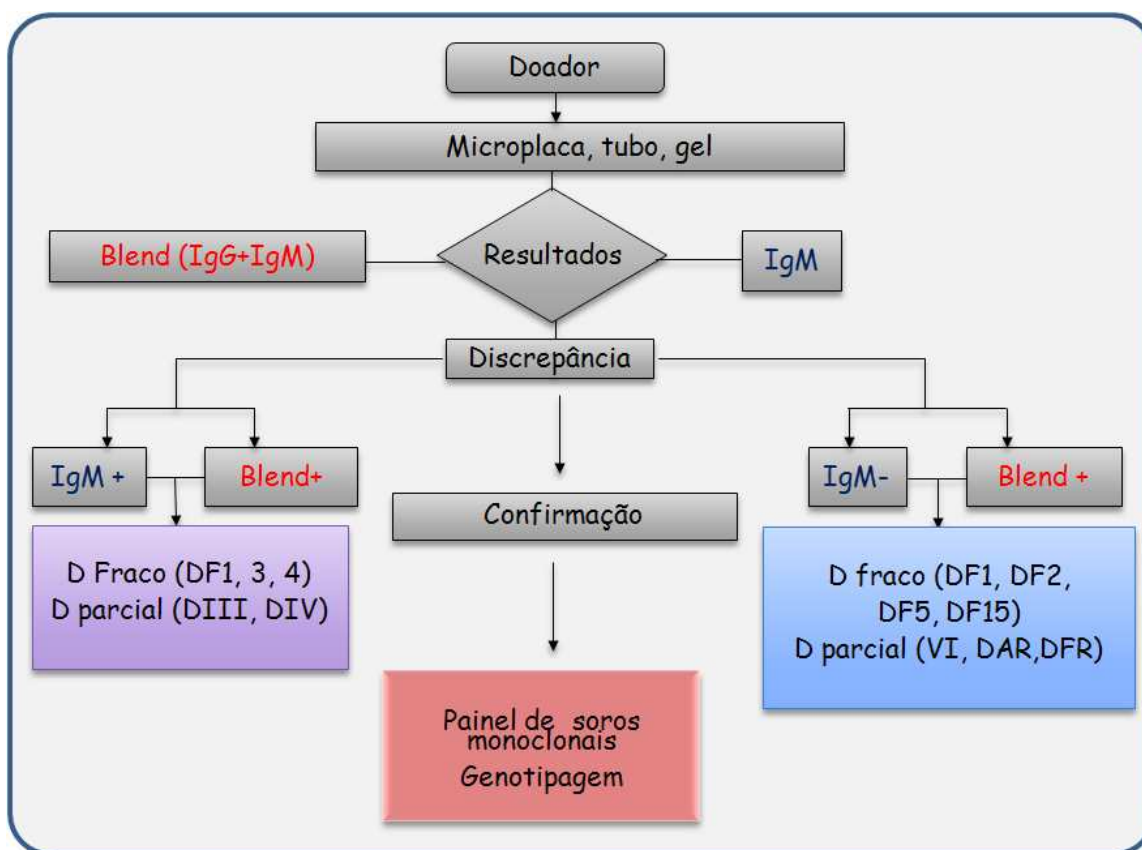


Figura 22. Fluxograma proposto para a rotina de doadores

Diante de nossos resultados e considerando as implicações clínicas da aloimunização anti-D em gestantes e pacientes propomos na tipagem RhD a utilização de dois reagentes monoclonais anti-D (um IgM que não detecte DVI e outro anti-D IgG ou blend que detecte DIV e DV). Quando os resultados entre os dois reagentes utilizados apresentarem discrepâncias pode-se suspeitar da presença de um D parcial. Ensaio molecular deve ser realizado para a correta identificação do alelo *RHD* presente. O fluxograma proposto para a rotina de pacientes encontra-se representado na Figura 23.

Estas estratégias propostas, envolvendo testes sorológicos associados às análises moleculares podem auxiliar a resolução dos problemas relacionados à tipagem RhD, garantindo a detecção das variantes do antígeno RhD fraco em doadores e evitando assim o risco de aloimunização anti-D em pacientes e gestantes. Além disso, podem ainda garantir uma maior segurança na indicação de sangue RhD-positivo e na profilaxia Rh, o

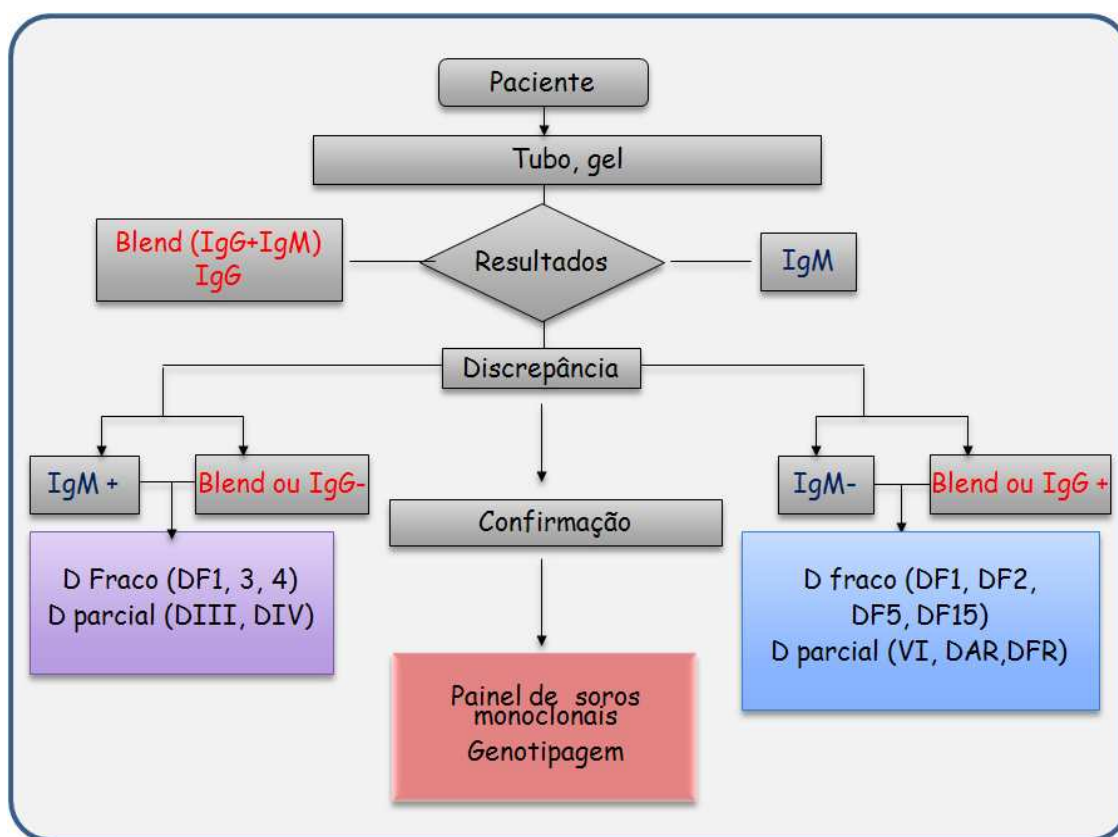


Figura 23. Fluxograma proposto para a rotina de pacientes

que pode resultar em uma redução de custos bem como a preservação dos estoques de sangue RhD-negativo.

Nossos resultados em conjunto com publicações anteriores da literatura demonstram claramente que a biologia molecular associada à hemaglutinação pode aumentar consideravelmente a segurança transfusional e materno-fetal devido a uma melhor caracterização dos antígenos RhD em nossa população.

Finalmente, este estudo é também interessante do ponto de vista de genética de população uma vez que mostra a diversidade dos alelos *RHD* em Brasileiros. É importante ainda lembrar que os dados mais recentes da literatura sobre o antígeno D fraco e D parcial são originários de estudos realizados em populações européias.

CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizada a caracterização sorológica e molecular das variantes do antígeno RhD em amostras de sangue e DNA de doadores voluntários de sangue e pacientes, podemos concluir que:

1. Os antígenos RhD fraco mais freqüentes na população estudada foram os tipos 1, 2 e 4, seguidos pelos tipos 3 e 5.
2. A população estudada apresentou maior freqüência do antígeno D fraco tipo 4 quando comparado ao D fraco tipo 3.
3. Indivíduos portadores dos antígenos D fracos tipos 1, 2, 3 e 4 podem receber sangue RhD-positivo, uma vez que não há registros na literatura de aloimunização relacionada à estas variantes
2. Oitenta e nove amostras fenotipadas como RhD fraco (27%) foram caracterizadas molecularmente como *RHD* parcial.
3. Não foi possível diferenciar por técnicas sorológicas antígenos RhD parciais de baixa densidade antigênica de antígenos RhD fracos.
5. Os antígenos DAR, DFR, DVI e DVa foram os D parciais mais frequentes na população estudada.
6. A caracterização molecular das variantes RhD parcial em pacientes e gestantes fenotipados como RhD fraco poderá contribuir significativamente na prevenção da aloimunização anti-D e na indicação da profilaxia Rh.
7. Em nosso estudo, encontramos 3 alelos *DEL* associados ao antígeno C: *RHD(IVS5-38DEL4)* e *RHD (K409K)*
8. Recomendamos a análise molecular em amostras de doadores que apresentem o fenótipo RhD negativo e a presença do antígeno C por aglutinação direta e indireta e com resultado RhD positivo por adsorção e eluição com a finalidade de identificar o alelo *DEL*

9. D fraco tipos 1 e 5 estão freqüentemente associados ao haplótipo R_{1r} (CcDee), D fraco tipo 2 ao haplótipo R_{2r} (ccDEe) e os tipos 3 e 4 ao haplótipo R_{0r} (ccDee)
10. D parcial categorias IVb e VI e os tipos DFR e DBT estão freqüentemente associados ao haplótipo R_{1r} (CcDee) enquanto que D categoria Va e o tipo DAR ao haplótipo R_{0r} (ccDee).
11. Em nosso estudo, o haplótipo cDe, predominante em populações africanas, também foi encontrado associado a variantes *RHD* correlacionadas aos haplótipos CDe e cDE.
12. Há pouca variação na reatividade sorológica entre as amostras que apresentam o mesmo tipo de antígeno RhD fraco independentemente do haplótipo RH presente.
13. Os tipos de D fraco 1, 3 e 4 e o antígeno D parcial DBT foram detectados a TA com todos os monoclonais utilizados pelas técnicas em tubo e gel enquanto que D fraco tipo 2 e D parcial categoria VI apresentaram o mesmo padrão de reatividade em AGH com todos os anticorpos monoclonais utilizados.
14. O anticorpo monoclonal mistura IgG (clone P3x35) e IgM (clone P3x61) detectou todas as variantes estudadas pela técnica de gel.
15. Quando 2 anti-D monoclonais são associados, isto é, IgG+IgM ou IgM+blend a utilização do teste indireto da AGH pode ser reduzida.
16. Os antígenos D fraco tipos 2 e 5 e D parcial DVI, DAR, DFR e DHMi, não foram detectados com monoclonais IgM enquanto que os antígenos D parcial DIVb e DVa não foram detectados com monoclonal IgG.
17. Nossos resultados demonstram claramente a necessidade da utilização de dois anti-soros monoclonais (IgM e IgG) na determinação do antígeno RhD.
18. A utilização de métodos de fenotipagem mais sensíveis em combinação com reagentes anti-D de alta afinidade IgG e blend, é recomendada na detecção de antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica em doadores de sangue.

19. As genotipagens *RHD*, *RHD* fraco e *RHD* parcial devem ser realizadas quando os resultados sorológicos não forem claros ou quando se tratar de paciente politransfundido ou gestante.
20. Nossos resultados demonstram que a biologia molecular associada à hemaglutinação pode aumentar consideravelmente a segurança transfusional pela melhor caracterização das variantes do antígeno RhD em nossa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE,P.; CARTRON, J.P. Molecular Biology of the Rh antigen. **Blood**, 78: 551-563, 1991.

ARCE, M A.; THOMPSON, E.S.; WAGNER, F.F.; COYNER; FERDMAN, K.E.; LUBLIN, D.M. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individual. **Blood**, 82:651-655, 1993.

AVENT, N.D.; BUTCHER, S.K.; LUI,W. Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmatic face of the human erythrocyte membrane. **Journal Biological Chemical**, 267:15-134,1992.

AVENT, N. D.; REID,M. E. The Rh Blood group system: a review. **Blood**, 95:375-387, 2000.

AVENT, N. D. A new chapter in Rh research: Rh protein are ammonium transporters. **Molecular Medicine**,7, 2001.

ANSART-PIRENNE, H.; ASSO-BONNET, M.; LE PENNEC, P.Y.; ROUSSEL, M.; PATEREAU, C.; NOIZAT-PIRENNE, F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. **Transfusion**, 44: 1282-1286,2004.

BECKER, E .A. M.; FAAS, B.H.W.; SIMSER, S.; OVERBEEKER, M.A.M.; VAN RHERNEN,D. J. The genetic basic of a new partial D antigen : D^{DBT}. **British Journal of Haematology**, 93: 720-727,1996.

BLUNT,T.; DANIELS, G.; CARRIT, B. Serotype switching in a partially detected *RHD* gene. **Vox Sanguinis**, 67:397,1994.

CARRITT, B.; KEMP, T.J.; POULTER, M. Evolution of the human Rh(Rhesus) blood group genes: A 50 year old prediction (partially) fulfilled. **Human Molecular Genetic**, 6:843-850,1997.

CARTRON, J.P. Defining the blood group antigen: biochemistry and molecular genetics. **Blood Reviews**, 8: 199-211,1994.

CASTILHO, L.; RIOS, M.; RODRIGUES, A.; PELLEGRINO, Jr.J.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in Sickle cell disease patients suggest increased risk of alloimmunization to RhD. **Transfusion Medicine**, 15: 49-55,2005.

CHERIF-ZAHAR, B.; MATTEI, M.G.; LE VAN KIM, C.; BAILLY,P.; CARTRON J.P. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. **Human Genetics**; 86:398-400,1991.

COLIN, Y.; CHERIF-ZAHAR, B.; LE VAN KIM, C.; VAN HUFFEL, R.; CARTRON, J.P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. **Blood**; 78:2747-52,1991.

DANIELS, G.; GREEN, C.; SMART, E. Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans. **Lancet**, 380:862-863,1997.

DANIELS G, CASTILHO L, FLEGEL WA, FLETCHER A, GARRATTY G, LEVENE C, LOMAS-FRANCIS C, MOULDS JM, MOULDS JJ, OLSSON ML, OVERBEEKE M, POOLE J, REID ME, ROUGER P, VAN DER SCHOOT E, SCOTT M, SISTONEN P, SMART E, STORRY JR, TANI Y, YU LC, WENDEL S, WESTHOFF C, YAHALOM V, ZELINSKI T. International Society of Blood Transfusion working party on terminology for red cell surface antigens. Macao report. **Vox Sanguinis**, 96:153-156,2009.

DENOMME G.A.; WAGNER F.F.; FERNANDES b.J.; LI W; FLEGEL W. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. **Transfusion**; 45:1554-1560, 2005

DENOMME G.A.; DAKE L.R.; LILENSKY D.; RAMYAR L.; JUDD W.J. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. **Transfusion**; 48:473-478, 2008

DE VETTEN, M.P.; AGRE, P.The Rh polypeptide is a major fatty acid acylated erythrocytes membrane protein. **Journal Biological Chemical**, 263: 18193-18196,1998.

FAAS, B.H.W.; BECKERS, E.A.M.; WILDOER, P.; LIGHTART, P.C.; OVERBEEKE, M.A.M.; ZONDERVAN, H.Á.; VON DEM BORNE, A.E.G.K.R.; VAN DER SCHOOT, C.E. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. **Transfusion**; 37:38-44,1997.

FLEGEL, W.A.; KHULL, S. R.; WAGNER, F.F. Primary anti-D immunization by weak D types 2 RBCs. **Transfusion**. 40: 428-434,2000.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular genetics of RH.**Vox Sanguinis**, 78: 109-115,2000.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. **Clin. Lab.**; 48: 53-59, 2002.

FLEGEL W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. **Current Opinion in Haematology**, 13: 476-483, 2006.

FLEGEL , W.A.; von ZABERN I.; DOESCHER A.; WAGNER F.F.; STRATHMANN K.P.; GEISEN C.; PALFI M.; PISACKA M.; POOLE J.; POLIN H.; GABRIEL C.; AVENT N. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. **Transfusion**, 49:1059-69, 2009

GAHMBERG, C. G. Molecular identification of the human Rh₀(D) antigen. **FEBS Lett**, 140: 93-97, 1982.

HEMKER, M.B.; LIGTHART, P.C.; BERGER, L.; VAN RHENEN, D.J.; VAN DER SCHOOT, C.E.; MAASKANT-VAN WIJK, P.A. DAR, a new RhD variant involving exon 4,5 and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African Black. **Blood**, 94: 4337-4342, 1999.

HUANG,C. H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigen. **Current Opinion in Hematology**,4: 94-103, 1997.

HUANG, C.H.; CHENG, Y.; REID, M.E. Human D^{IIIa} erythrocytes : RhD protein is associated with multiple dispersed amino acids variations. **American Journal of Hematology**, 55: 139-145,1997.

HUANG CH, YE M. The Rh protein family: gene evolution, membrane biology, and disease association. Review. **Cell Mol Life Sci.**; 67:1203-18, 2010.

ISSITT, P.D. Recent advances in the Rh blood group system. **Vox Sanguinis**, 70: 26-30,1996.

KORMOCZI G.F.; GASSNER C.; SHAO P.S.; UCHIKAWA M.; LEGLER T.J. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. **Transfusion**, 45:1561-1567, 2005.

LE VAN KIM,C.; MOURO, I.; CHERIF-ZAHAR, B. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. **Proc. Natl. Acad.Sci_USA**, 89: 925-929, 1992.

LOMAS, C.; TIPPETT, P.; THOMPSON, K.M. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. **Vox Sang**, 57: 261-164, 1984.

MAASKANT-VAN WIJK, P.A.; FAAS, B.H.; DE RUIJTER, J.A.; OVERBEEKE, M.A.; VON DEM BORNE, A.E.; VAN RHENEN, D.J.; VAN DER SCHOOT, C.E. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. **Transfusion**, 38:1015-1021,1998.

MOURO, I.; COLIN, Y.; CHERIF-ZAHAR,B. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. **Nature Genetic**, 5: 62-65,1992.

MOURO, I.; LE VAN KIM, C.; ROUILLAC, C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the D^{VI} category phenotype. **Blood**, 83: 1129-1135, 1994.

MOTA, M.; FONSECA, N.L.; RODRIGUES, A.; KUTNER, J.M.; CASTILHO, L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. **Vox Sanguinis**, 88: 130-135,2005.

MÜLLER, T.H.; WAGNER, F.F.; TROCKENBACHER, A.; EICHER, N.I.; FLEGEL, W.; SCHÖNITZER, D.; SCHUNTER, F.; GASSNER, C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations. **Transfusion**, 41:45-52, 2001.

OKUDA, H.; KAWANO, M.; IWAMOTO, S.; TANAKA, M.; SENO, T.; OKUBO, Y.; KAJII, E. The RHD gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. **Journal Clinical Investigation**; 100:373,1997.

POLIN H.; DANZER M.; HOFER K.; GASSNER W.; GABRIEL C. Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. **Transfusion**, 47:1350-1355, 2007.

POULTER, M.; KEMP, T.; CARRITT, B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. **Vox Sanguinis**, 70: 164-168,1996.

RACE, R.R. Modern concepts of the blood group system. **127Ann NY Acad. Scienc**: 884-891, 1965.

REID, M. E.; RIOS, M.; YAZDANBAKSH, K. Application of molecular biology techniques to transfusion medicine. **Seminars Hematology**, 37: 166-176, 2000.

- REID, M.E.; RIOS, M.; POWELL, D.; CHARLES-PIERRE, D.; MALAVADE, V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. **Transfusion**, 40: 48-53, 2000.
- REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. The Blood Group Antigens Facts Book. San Diego: CA, **Academic Press**, 2006.
- RIDGWELL, K.; SPURR, N.K.; LAGUDA, B.; MACGOCH, C.; AVENT, N.D.; TANNER, M.J.A. Isolation of cDNA clone for a 50kd glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (Rhesus) blood group antigen expression. **Biochemical Journal**, 287: 223-226, 1992.
- RIOS, M.; CASH, K.; STRUPP, A.; UEHLINGER, J.; REID, M.E. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. **Immunohematology**, 15: 61-65, 1999.
- ROUILLAC, C.; COLIN, Y.; HUGHES-JONES, N.C.; BOELET, M.D.; AMBROSIO, A.M.; CARTRON, J.P.; LE VAN KIM, C. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid RhD-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. **Blood**, 85: 2937-2944, 1995.
- ROUILLAC, C.; GANE, P.; CARTRON, J.P.; LE PENNEC, P.Y.; COLIN, Y. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D and RhC/e in phenotype. **Blood**, 87: 4853-4861, 1996.
- SINGLETON, B.K.; GREEN, C.A.; AVENT, N.D.; MARTIN, P.G.; SMART, E.; DAKA, A.; NARTER-OLAGA, E.G.; HAWTHORNE, L.M.; DANIELS, G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. **Blood**, 95:12-18, 2000.
- SHAO, P.S. Transfusion of RhD-positive blood in "Asia type" DEL recipients. **N. Engl. J. Med.**, 4: 472-473, 2010
- STRATTON F. New Rh alleomorph. *Nature*, 158:25-8, 1946
- TIPPETT, P.; LOMAS-FRANCIS, C.; WALLACE, M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen. **Vox Sanguinis**, 70: 123-131, 1996.

WAGNER, F.F.; GASSNER, C.; SMULLER, T.H.; SCHONITZER, D.; SCHUNTER, F.; FLEGEL, W.A. Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct Immunohematological feature. **Blood**, 91: 2157-2168, 1998.

WAGNER, F.F.; GASSNER, C.; SMULLER, T.H.; SCHONITZER, D.; SCHUNTER, F.; FLEGEL, W.A. Molecular of weak D phenotypes. **Blood**, 93: 385-393, 1999.

WAGNER, F.F.; FLEGEL, W.A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. **Blood**, 95, 12: 3662-3668, 2000.

WAGNER, F.F.; FROHMAJER, A.; LADEWIG, B.; EICHER, N.I.; LONICER, C.B.; MULLER, T.H.; SIEGEL, M.H.; FLEGEL, W.A. Weak D alleles express distinct phenotypes. **Blood**, 95,8: 2699-2708, 2000.

WAGNER, F.F.; FROHMAJER, A.; FLEGEL, W. A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. **BMC genetics**. 21: 10, 2001.

WAGNER, F.F.; ERNST M.; SONNEBORN H.H.; FLEGEL W.A. A D(V)-like phenotype is obliterated by A226P in partial D DBS. **Transfusion**, 41:1052-8, 2001

WAGNER, F.F.; LADEWIG, B.; ANGERT, K.S.; HEYMANN, G.A.; EICHER, N.I.; FLEGEL, W.A. The DAU allele cluster of the RHD gene. **Blood**, 100, 1: 306-311, 2002.

WAGNER, F.F.; FLEGEL, W. A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. **Immunohematology**, 20: 23-36, 2004.

WAGNER T.; KORMOCZI G.F.; BUCHTA C.; VALDON M.; LANZER G.; MAYR W.R.; LEGLER T.J. Anti-D immunization by DEL red blood cell. **Transfusion**, 45:520-526, 2005

WESTHOFF, C.M. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. **Transfusion**, 44: 1663-1673, 2004.

YASUDA H.; OHTO H.; SAKUMA S.; ISHIKAWA Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. **Transfusion**, 45: 1581-1584, 2005

APÊNDICE

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
2D (2541060831-002)	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
31D (2093)	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
32D (2094)	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
33D (2097)	São Paulo	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	3+	R1r	DF1
59D (0500067711-0)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
299D (62251002632)	São Paulo	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	0	R1r	DF1
300D (2015)	São Paulo	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	1+	R1r	DF1
330D (2055)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
385D (0407237-126)	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
388D (2187)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
441D (074-1510)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
464D (2264)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
472D (0107328-143)	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
744D (0100149290-0)	Marília	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
812D (0100214549-0)	Ribeirão Preto	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
833D (0108264-038)	Campinas	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
847D (02001665008)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
859D (300108106000-166)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
860D (300108106015-167)	São Paulo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
861D (300108126569-168)	São Paulo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
862D (300108106565-169)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
874D (0408294-013)	Campinas	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
886D (0308285-007)	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
943D (0100224465-0)	Ribeirão Preto	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
958D (0409097-015)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
959D (0109105-044)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
1006D (0409199-095)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
1024D C.C.K.	Florianópolis	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
1120D (0309311-014)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
1117D (88008-6)	Fortaleza	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
1126D G.L.X.M.	Santa Maria	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
1150D (4109323-025)	Campinas	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
1159D (0109362-020)	Campinas	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DF1
624D (23771)	São Paulo	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF1
893D (300108108329)	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF1
904D (0708336-016)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF1
980D (0200175015-3)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF1

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
1161D (4109365-065)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
28D (2062)	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
29D (2063)	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
34D (2080)	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
141D (300805032089)	Salvador	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
227D (4106215-044)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
282D (0206331-31)	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
283D (0106364-32)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
326D (300107087-736)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
327D (2053)	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
411D (4107274-034)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
450D (3035071123-048)	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
519D (0708018-035)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
646D (0308085-042)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
687D (230408-092)	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
752D (161D)	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
848D (0100216274-2)	Ribeirão Preto	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
849D (0500076951-1)	Ribeirão Preto	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
900D (0108343-022)	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
939D (0109061-001)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
1015D (4109209-037)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
1084D (85718-1)	Fortaleza	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
40D (862-2)	Ribeirão Preto	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
142D (4405324-023)	Piracicaba	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
284D (0906356-020)	Campinas	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
417D (0407289-076)	Campinas	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
389D (2198)	São Paulo	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF3
432D (0707304-010)	Campinas	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF3

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
269D (0306343-007)	Campinas	1+	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF4
35D (167-8)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
36D (574-8)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
37D (060-1)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
38D (132-7)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
39D (869-0)	Ribeirão Preto	3+	3+	4+	3+	4+	2+	3+	3+	R0r	DF4
43D (279-0)	Ribeirão Preto	3+	3+	4+	3+	4+	2+	3+	3+	R0r	DF4
51D (3100112521-5)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
56D (3100112523-1)	Ribeirão Preto	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
241D (4106265-060)	Campinas	1+	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF4
296D (4107017-053)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
302D P.C.F.	São Paulo	1+	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF4
308D (4407062-51)	Campinas	1+	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF4
360D (4407181-86)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
361D (4107191-015)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
616D (0129080312-076)	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
617D (13699)	São Paulo	3+	3+	4+	3+	4+	2+	3+	3+	R0r	DF4
743D (0500052352-0)	Marília	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
875D (52489-1)	Fortaleza	3+	3+	4+	3+	4+	2+	3+	3+	R0r	DF4
987D (0109157-007)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
988D (0409150-072)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
940D (300009111381)	São Paulo	0	0	(+)	(+)	(+)	0	0	0	R1r	DF5
684D (0908114-005)	Campinas	0	0	0	(+)	(+)	0	0	(+)	R1r	DF5

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL			TUBO					HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
896D (0108323-042)	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R0r	DAR
813D (0308235-032)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R1r	DBT
1038D (108235)	Florianópolis	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R1r	DBT
1127D D.A.S.P.	Santa Maria	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R1r	DBT
474D (2276)	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
568D (01001471903)	Marília	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
645D (0908071-045)	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
1160D (0309362-032)	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
627D (7708075-022)	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
1179D (0210006-016)	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
625D (358650)	São Paulo	0	0	0	(+)	0	0	0	0	R0r	DHAR
1013D (0409206-044)	Campinas	0	1+	2+	2+	3+	0	1+	2+	R1r	DHMI

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL			TUBO					HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
52D (0400039627-7)	Ribeirão Preto	1+	2+	2+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DVa
930D (0200171239-1)	Ribeirão Preto	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
932D (0109030-007)	Campinas	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
70D (2137)	São Paulo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
264D (0406301-22)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
265D (4106335-70)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
266D (0406331-013)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
271D (0906342-037)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
285D (0206356-28)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
297D (818717)	Salvador	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
382D (4107225-051)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
473D (4107326-065)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
797D (0408230-024)	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
929D (0100222022-0)	Ribeirão Preto	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
433D (0207298-017)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
520D (0208008-043)	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DVI

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
19D (0900000324-5)	Ribeirão Preto	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RHD-
20D (0900045877-3)	Ribeirão Preto	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RHD-
356D (0107174-29)	Campinas	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
967D (0200174429-3)	Ribeirão Preto	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
1037D (108226)	Florianópolis	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
1042D (108145)	Florianópolis	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
1105D M.S.C.S	Santa Maria	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
1040D (108129)	Florianópolis	0	0	0	0	0	0	0	0	r'r	RhD-
1063D (108606)	Florianópolis	0	0	0	0	0	0	0	0	r'r	RhD-
1128D F.S.M.	Santa Maria	0	0	0	0	0	0	0	0	r'r	RhD-
3D (254581)	Campinas	4+	4+	4+	4+	4+	2+	3+	4+	R1r	RhD+
686D (0108061-050)	Campinas	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	4+	R1r	RhD+
479D (13272-07)	São Paulo	4+	4+	4+	2+		2+	4+	4+	R1R2	RhD+
526D (0141080107013)	São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	r's	RHD-CE-Ds

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Doadores

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
	Campinas	0	0	0	0	0	0	0	0	R1r	DEL RHD (IVS5-38DEL4)
	São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	R1r	DEL RHD(K409K)

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
6P M.A.P.	Campinas	2+	2+	3+	2+	3+	1+	1+	2+	R0r	DF1
679P R.M.S.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF1
973P G.M.(RN)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF1
5P 1941	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
11P R.C.C.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
12P J.N.G.	Marília	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
27P C.M.C.	São Paulo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
247P A.L.	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
248P C.G.S.(RN)	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
268P E.P.S.	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
278P E.P.B.	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
386P A.G.V.	São Paulo	2+	0	2+	1+	2+	0	2+	2+	R1r	DF1
399P A.S.T.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
400P S.R.M.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
401P L.M.A.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
404P J.J.C.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
416P C.A.A.F.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
422P G.R.G.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
436P E.S.F.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
527P L.D.P.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
650P A.G.G.	São Paulo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
695P F.S.M.V.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
701P S.C.O.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
769P E.A.J.R.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
774P A.L.S.	Passo Fundo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
799P F.S.G.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
806P P.E.S.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
840P S.C.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
846P E.L.B.	Passo Fundo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
867P A.L.	Passo Fundo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
871P O.E.D.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
872P J.M.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
876P C.P.M.	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
877P J.A.O.	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
917P R.C.C.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF1
974P R.N.F.(RN)	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
1012P G.C.B.A.(RN)	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
1177P E.P.B.(RN)	Campinas	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1
481P S.M.F.S.	São Paulo	1+	1+	2+	1+	2+	0	(+)	1+	R1r	DF1

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI-	IgG ou DVI+	IgG/AGH	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH	IGM ou DVI-	IgG+IgM	IgG+IgM/AGH		
		175-2/P3X61	MS26	ESD1	P3X35/P3X61	MS26+MS201	MS201	MS26+MS201	P3X35/P3X61		
571P S.G.O.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
197P E.W.G.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
826P L.O.A.C.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
1P J.P.S.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
4P V.R.S.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
8P V.J.R.	Campinas	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
14P E.C.C.F.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
16P N.F.O.M.	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
17P D.C.P.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
22P Z.A.S.	São Paulo	0	0	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
26P F.D.	São Paulo	0	0	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
161P C.A.S.L.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R2r	DF2
209P A.A.M.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
421P L.S.A.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
424P B.S.S.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
529P E.C.R.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
560P E.S.G.	São Paulo	0	0	1+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
573P L.O.B.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
586P G.M.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
591P R.L.A.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
593P J.O.A.F.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
594P F.C.C.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
595P M.A.E.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
665P R.R.T.N.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
683P E.M.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
691P S.N.A.S.(RN)	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
704P P.M.N.S.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
713P L.C.S.	São Paulo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
729P E.M.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
736P H.F.F.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
738P G.P.P.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
747P G.H.R.F.	Marília	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
770P R.M.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
771P M.V.L.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
772P N.A.N.P.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
777P P.R.M.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
798P C.G.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
800P T.A.M.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
801P L.A.M.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
805P T.R.C.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
816P P.G.	Passo Fundo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
819P L.Z.S.	Passo Fundo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
820P E.C.	Passo Fundo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
821P J.J.R.A.C.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
825P D.S.L.	Passo Fundo	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
853P B.D.F.	Campinas	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
864P M.S.A.T.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
870P E.J.O.	Passo Fundo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
954P O.F.N.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
1002P W.R.S.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
1069P L.S.S.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2
1147 J.V.T.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	2+	R2r	DF2
1188P A.P.A.	Campinas	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R2r	DF2

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
315P A.A.S.	Campinas	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF3
844P M.A.F.F.	Passo Fundo	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF3
938P D.M.J.S.	Campinas	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF3
15P F.V.N.	São Paulo	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
437P A.E.A.	São Paulo	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
439P F.F.S.	São Paulo	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3
948P L.C.S.	Campinas	3+	3+	4+	3+	4+	2+	2+	3+	R1r	DF3

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL			TUBO					HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
13P H.F.S.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
21P A.P.C.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
24P V.S.S.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	2+	3+	3+	R0r	DF4
231P L.R.M.	Rio de Janeiro	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
232P W.S.L.	Rio de Janeiro	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
233P C.F.O.	Rio de Janeiro	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
235P J.M.A.M.	Rio de Janeiro	3+	3+	4+	3+	4+	2+	3+	3+	R0r	DF4
236P T.S.S.	Rio de Janeiro	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
270P S.P.	Campinas	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
274P N.P.J.	Campinas	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
426P M.G.B.L.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
427P P.N.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
469P C.R.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
475P W.B.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF4
503P S.A.L.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
528P E.R.P.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
603P W.A.C.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
614P T.C.D.	Campinas	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
615P S.R.S.S.	Campinas	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
669P L.H.F.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
709P E.P.H.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4
719P R.M.F.J.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
773P D.A.L.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
775P A.M.M.R.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
824P E.S.R.	Passo Fundo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
918P V.R.S.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DF4
470P R.G.Q.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	2+	2+	3+	R0r	DF4
585P A.S.A.	São Paulo	3+	3+	3+	3+	4+	1+	2+	3+	R0r	DF4

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL			TUBO					HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
663P L.A.G.	Campinas	0	0	0	2+	2+	0	0	2+	R0r	DAR
670P A.C.S.	São Paulo	0	0	0	2+	2+	0	0	2+	R0r	DAR
681P T.F.A.	São Paulo	0	0	0	(+)	1+	0	0	2+	R0r	DAR
696P M.C.G.V.	São Paulo	0	0	0	2+	2+	0	0	2+	R0r	DAR
746P A.M.O.	Marília	0	0	0	(+)	1+	0	0	2+	R0r	DAR
809P C.S.	Passo Fundo	0	0	0	(+)	1+	0	0	2+	R0r	DAR
749P J.E.A.	Marília	0	0	0	(+)	1+	0	0	2+	R0r	DAR
845P A.M.S.F.	Passo Fundo	0	(+)	(+)	1+	1+	0	0	1+	R0r	DAR

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
905P B.S.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R0r	DBT
705P D.S.	Campinas	0	(+)	1+	(+)	1+	0	0	1+	R1r	DBT
1131 (6100019783-2)	Ribeirão Preto	0	(+)	1+	(+)	1+	0	0	1+	R1r	DBT

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
657P G.A.M.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
49P C.J.G.L.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
50P G.G.S.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
122P M.F.D.	Rio de Janeiro	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
405P A.P.M.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
501P N.C.C.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
612P S.G.O.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
626P A.A.A.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
731P C.T.A.	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
732P J.F.S.	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
802P C.D.	Passo Fundo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
807P C.M.	Passo Fundo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
834P Z.M.S.	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
835P J.A.M.	Passo Fundo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
947P M.S.S.	Rio de Janeiro	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
1102P M.P.S.D.	Rio de Janeiro	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R1r	DFR
492P L.P.C.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R2r	DFR
680P C.A.P.	São Paulo	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R2r	DFR
854P R.F.S.	Campinas	0	2+	2+	2+	2+	0	1+	1+	R2r	DFR

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
549P L.N.S.	São Paulo	2+	0	0	1+	1+	1+	0	0	R1r	DIV
753P Z.A.B.F.	São Paulo	2+	0	2+	1+	2+	1+	0	1+	R1r	DIV
758P D.P.	São Paulo	3+	0	0	2+	1+	1+	0	0	R1r	DIV
R.S.L.	Campinas	2+	0	0	1+	1+	1+	0	0	R1r	DIV
J.M.	Campinas	3+	0	0	2+	1+	1+	0	0	R1r	DIV
358P R.B.T.	Campinas	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
364P A.P.S.	São Paulo	1+	0	1+	1+	1+	0	(+)	1+	R0r	DVa
390P R.R.S.	São Paulo	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
467P S.R.S.S.	Campinas	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
572P V.T.L.L.	São Paulo	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
584P V.P.S.(RN)	Campinas	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
635P L.L.	São Paulo	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
721P V.T.C.	São Paulo	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
784P R.L.S.	Campinas	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
1005P G.R.B.	Maringá	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
1058P O.A.G.C.	Campinas	2+	0	2+	1+	1+	0	1+	1+	R0r	DVa
438P S.L.S.	São Paulo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
480P L.R.M.	São Paulo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
7P A.S.M.	Campinas	0	1+	2+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
10P J.J.O.	São Paulo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
110P A.V.B.S.	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
378P H.H.R.	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
440P E.C.M.	São Paulo	0	0	1+	(+)	1+	0	0	1+	R1r	DVI
803P E.D.P.M.	Passo Fundo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
804P R.V.M.	Passo Fundo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
836P T.I.P.S.	Passo Fundo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
837P S.B.S.C.	Passo Fundo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
869P L.O.R.	Passo Fundo	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
866P M.R.M.	Campinas	0	1+	1+	1+	2+	0	0	1+	R1r	DVI
47P N.R.A.	São Paulo	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R1r	DVII
287P C.C.	Campinas	2+	2+	3+	3+	4+	0	2+	2+	R1r	DVII

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
I.R.	São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	R1r	DEL RHD(IVS5-38DEL4)

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
702P L.F.S.	Campinas	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
755P R.F.D.	São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
960P J.R.S.	Campinas	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
1003P F.S.M.	São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	rr	RhD-
445P (141330)	Florianópolis	0	0	0	0	0	0	0	0	r's	RHD-CE-Ds
446P (1452)	São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	r's	RHD-CE-Ds

Reatividade Sorológica com diferentes monoclonais - Amostras de Pacientes

Identificação	Procedência	GEL					TUBO			HAPLÓTIPO RH	VARIANTE
		IgM ou DVI- 175-2/P3X61	IgG ou DVI+ MS26	IgG/AGH ESD1	IgG+IgM P3X35/P3X61	IgG+IgM/AGH MS26+MS201	IGM ou DVI- MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/AGH P3X35/P3X61		
276P D.C.B.	Campinas	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R0r	RhD+
60P T.R.S.	São Paulo	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R1r	RhD+
839P G.D.	Passo Fundo	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R1r	RhD+
841P J.S.	Passo Fundo	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R2r	RhD+
843P V.S.	Passo Fundo	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R2r	RhD+
661P A.V.	Campinas	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R1R1	RhD+
941P S.M.B.C.	Campinas	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R1R2	RhD+
863P(300108107000-175)	São Paulo	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	4+	R1RZ	RhD+

Serological and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy

Débora C. Credidio, Jordão Pellegrino Jr, Lilian Castilho

Hemocentro- UNICAMP- Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Lilian Castilho, PhD
Hemocentro, Unicamp
Rua Carlos Chagas, 480
Caixa Postal 6198
CEP 13081-970 Barão Geraldo, Campinas, SP, Brazil
Telephone: (55 19) 3521-8749
Fax: (55 19) 3521-8600
e-mail: castilho@unicamp.br

This study was financially supported by Fapesp grant n° 2009/05924-0 and CNPq, Brazil. The Hematology and Hemotherapy Center - Hemocentro UNICAMP, forms part of the National Institute of Science and Technology of Blood, Brazil (INCT do Sangue –CNPq / MCT / FAPESP).

Short Title: D variants in Brazilians

Abstract

Background: Rh discrepancies are becoming a problem during routine testing due to partial D or weak D phenotypes. Panels of monoclonal antibodies (MoAb) are being developed in order to identify D variants such as partial D and weak D when there are anomalous RhD typing results but molecular characterization offers a more specific grouping of weak and partial D. The weak D phenotype is caused by many different *RHD* alleles encoding aberrant RhD proteins, resulting in distinct serologic phenotypes and anti-D immunizations. **Methods:** We evaluated currently used serologic methods and reagents to detect and identify D variants and correlated the results with molecular analyses. A total of 326 blood samples from Brazilian blood donors and patients with discrepant results of D typing in routine were analyzed. **Results:** In total, 235 (72,1%) weak D, 88 (37.4%) partial D and 3 (0.91%) DEL variants were identified. Among weak D samples, 76 weak D Type 1 (32.3%); 75 weak D Type 2 (31.9%); 13 weak D Type 3 (5.5%); 49 weak D Type 4 (20.8%) and 2 weak D Type 5 (0.85%) alleles were found. Among the partial D samples, 9 (10.2%) DAR, 24 (27.3%) DFR, 6 (9.8%) DBT, 1 (1%) DHMi, 1(1%) RoHAR, 26 (29.5%) DVI, 14 (15.9%) DVa, 5 DIVb (5.7%) and 2 (2.3%) DVII were observed. Two samples identified as DEL by adsorption/elution were characterized by molecular analyses as *RHD(IVS5-38DEL4)* and one sample as *RHD(K409K)*. **Conclusion:** Our results showed that the use of different methods and anti-D reagents in the serologic routine reveal some D variants that can be further investigated. Molecular methods can help to differentiate between partial D and weak D and characterize the weak D types providing additional information of value in the RhD typing. This distinction is important for selection of blood products and to prevent anti-D hemolytic disease of the fetus and newborn.

Key words: *RHD* alleles, weak D phenotype, partial D, anti-D immunization, Brazilians

Introduction

Rh epitopes are highly conformational and single amino acid changes in one part of the protein, including changes within the transmembrane regions, can affect expression of epitopes or result in new epitopes. Single nucleotide polymorphisms (SNP) and gene conversions between the *RHD* and *RHCE* genes are primarily responsible for the large number of variations in expression of the Rh antigens.^{1,2}

The RhD antigen is the most important blood group antigen determined by a protein, because D-negative individuals can be easily anti-D immunized. A plethora of *RHD* alleles have been identified at the molecular level including partial D, weak D types and a particularly weakly expressed D antigen termed DEL-only demonstrated by adsorption-elution.³⁻⁹

Weak D phenotypes are characterized by a depressed expression of the D antigen and at the molecular level, weak D variants are caused by many different *RHD* alleles carrying single or multiple missense mutations in their *RHD* coding sequences encoding altered RhD proteins.^{3,4,6} No alloanti-D has been found in individuals with the most common weak D types, 1, 2 and 3, however, little is known about the anti-D immunization risk of rare *RHD* alleles with lower antigen density than weak D type 2.^{4,10} Weak D types generally present all epitopes albeit some epitopes show variability depending on the monoclonal anti-D.¹¹ The classification of variants in weak D does not imply that carriers will not be immunized by exposition to normal D through transfusion or pregnancy.^{4, 12-14} The prevention of alloimmunization has to take into account the antigen density and the characterization of certain partial *RHD* alleles that serologically, shows weaker reactions.^{11,15} Partial D variants lack D antigen epitopes and individuals who harbor partial

D variant alleles have the potential to make alloanti-D.⁸ Anti-D immunization was also attributed to DEL phenotype.⁹

The distinction between weak D and partial D is important for selection of blood products and to prevent anti-D hemolytic disease of the fetus and newborn, however, it is not always straightforward and occasionally, phenotype discrepancies occur between two reagents.^{11, 16-17}

Populations with African admixture, such as, the Brazilian population, can present a high variety of *RHD* alleles.¹⁸ A comprehensive investigation of the *RHD* alleles of weak D phenotypes could have a considerable impact for typing and transfusion strategy in such populations. The use of different methods and anti-D reagents in the serologic routine has revealed some D variants that are being investigated by molecular methods. We here described the serology and molecular analyses performed to identify such variants among Brazilian blood donors and patients with discrepant results of D typing.

Materials and methods

Blood samples: Blood samples from 326 Brazilians (117 blood donors and 209 patients) with discrepant results of D typing, were referred by routine laboratories from different regions of Brazil to our laboratory for molecular characterization and transfusion counseling. RhD typing in routine laboratories was performed with different anti-D monoclonal antibodies (MoAbs) in conjunction with indirect antiglobulin test (IAT) as requested in Brazil. They were collected over a 2-year-period.

Serologic studies: D, C, c, E, e status of all RBCs were determined by hemagglutination in gel cards (Diamed AG, Morat, Switzerland) using routine anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e MoAbs

(Fresenius Kabi, São Paulo, Brazil). D antigen reactivity was analyzed by agglutination in tube and gel cards using 6 anti-D MoAbs: IgM (clone 175-2), IgG (clone ESD1) (Diamed AG, Switzerland), IgM (clone P3X61), Blend (clones P3X290, P3X35, P3X61, P3X21223B10) (Grifols, Spain), IgM (clone MS201), IgG (clone MS26) (Smart Kit -Fresenius Kabi, São Paulo, Brazil). Non-reactive samples were tested with anti-D blend (clones MS26/MS201) and anti-D IgG (clone ESD1) using the IAT in tube and two gel matrix techniques (Diamed, Morat, Switzerland and Grifols, Spain). Adsorption/elution test was performed on non-D reactive samples that presented the C antigen.

PCR assays: DNA was extracted from whole blood samples using the QIAmp DNA Blood Mini-Kit (Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacturer's recommendations. Two PCR assays were used to determine the presence or absence of *RHD*-specific amplified products from sequences in the intron 4 and exon 7.¹⁹ The other assays used were a PCR system using sequence specific primers that detect the common weak D types⁶, a multiplex PCR that detects the *RHD* gene hybrid alleles and by a PCR-RFLP²⁰ specific for the DVa and DAR alleles.²¹

Sequence analysis: Sequence analysis was performed to confirm the DEL phenotypes found by adsorption/elution on PCR products amplified from genomic DNA using *RHD* specific primers as previously reported.³ PCR products were purified by elution from 1% agarose gels using a Qiaex II gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA), and sequenced directly, without subcloning, on an ABI 373XL Perkin Elmer Biosystems (PEB) sequencer, and the PEB Big Dye reagent BD Half-term (GenPak, Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA).

Results

Over a 2-year period blood samples of 117 blood donors and 209 patients with discrepant results in routine diagnostics were tested by hemagglutination with currently used MoAbs in Brazil and by molecular analyses.

Molecular analyses

In total, 235 (72,1%) weak D, 88 (27%) partial D and 3 (0.92%) DEL variants were identified. Tables 1 and 2 summarize the distribution of weak D and partial D alleles and the associated haplotype. The weak D types 1, 2 and 4 were the most prevalent weak D types found in this population. Weak D type 1 was associated with the CDe haplotype, weak D type 2 with cDE and weak D types 3 and 4 with cDe.

Serologic reactivity

Six selected monoclonal anti-D (IgG, IgM and blend) were used in tube and gel in order to evaluate the reactivity pattern of these monoclonal anti-D reagents with D variants. The reactivity with the monoclonal anti-D reagents showed a generally consistent pattern among the variant *RHD* alleles that occurred more than once. Table 3 summarizes the results found in the donor and patient samples studied. Weak D types 1, 3 and 4 and partial D DBT were detected with all anti-D MoAbs in tube and gel. Weak D types 2 and 5 and partial D DAR, DFR, DHMi and DVI were not detected with the IgM monoclonal anti-D antibodies while DIVb and DVa were not detected with anti-D IgG. Weak D type 2 and partial D DVI showed the same pattern of reactivity with the six MoAb used.

Sequence analysis

In order to confirm the DEL phenotype results obtained by adsorption-elution, we performed sequence analysis of the *RHD* from 3 DNA samples. Two donor samples were characterized by molecular analyses as *RHD(IVS5-38DEL4)* and one patient sample as *RHD(K409K)*.

Discussion

We, herein, report a serological and molecular study of D variants in Brazilians with discrepant D typing results in routine and show a high percentage (27%) of partial D among the samples phenotyped as weak D. Sixty-one (69.3%) were from patients and 5 of them had already alloanti-D in their serum. Our results differ from other results reported that approximately 5 to 10 percent of weak D are partial D^{3,4,11,22} and reinforce that there is no well-defined borderline between weak D and partial D phenotypes expressing the D antigen weakly that has an aberrant *RHD* coding sequence.³ In our study weak D type 2 and D category VI showed similar monoclonal anti-D reactivity, and therefore a PCR screen for those variants should be recommended.

Among the weak D samples, 233 of 235 (99.1%) were categorized as weak D types 1, 2, 3 and 4 with the molecular assays and for those individuals D-positive transfusion could be considered safe because no immunization events have been documented yet.⁴ Such strategy is estimated to reduce the use of D- blood by 3-4 percent. The high prevalence of weak D Types 1, 2 and 3 was consistent with other studies in Europe^{3,4} however in our population we see a different result where weak D type 4 is more prevalent than weak D type 3. This could be due to the process of miscegenation that occurred in our population. For the partial D we also observed a higher prevalence of DAR, DFR

and DVa reinforcing that the ethnic background of the population may govern which variants are prevalent.

Weak D and partial D and the associated haplotype found in this study were consistent with other studies³, although we have also found the cDe haplotype associated with weak D types 1 and 3.

The 3 samples identified as DEL by adsorption/elution exhibited known DEL alleles, *RHD(IVS5-38DEL4)* and *RHD(K409K)*. Both alleles have been described before with anti-D alloimmunization.^{5,9} Taking account these results we recommend the molecular analyses on patient samples phenotyped as D- C+ but D+ by adsorption/elution to identify the DEL allele and avoid at least secondary immunization.

The sensitivity of the method used to type donor and patients may depend on the anti-D reagent used and on the exact conditions of the methods. For donor typing all potentially immunogenic D+ samples should be recognized as D+ and based on this we propose the use of two anti-D reagents (one anti-D blend and one anti-D IgM) to minimize the need for the IAT on donor samples. Since anti-D immunization may pose a serious clinical problem mainly in a young woman, we propose that two different anti-D reagents (one anti-D IgM that does not detect DVI and one anti-D IgG that detects DIV) be used routinely to establish the Rh status for obstetric patients and transfusion recipients. When a discrepancy occurs between the two reagents, molecular assay is performed to identify the *RHD* allele. This typing strategy with serological and molecular typing in combination can provide a better solution to the resolution of an accurate D antigen status to enable a safe identification of donor and avoid the risk of alloanti-D immunization in patients.

Finally, this study is of interest from a genetic and population perspective, because it gives insight into the diversity of the *RHD* alleles in Brazilians. It is important to remember that much of the recent data on weak D and partial D have come from Europe.

References

1. Avent ND & Reid ME The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000; 95:375-387
2. Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin. Hematol.* 2007; 44:42-50
3. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel W. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93:385-393
4. Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, Siegel MH, Flegel WA. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000; 95:2699-2708
5. Wagner FF. The Rhesus Base. Department of Transfusion Medicine, University Hospital, Ulm, Germany. 1998. <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>
6. Muller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001; 41:45-52
7. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D. Implications for blood bank practice. *Clin Lab* 2002; 48:53-9

8. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, Flegel WA. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 2005; 45:1554-1560.
9. Körmöcz GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 2005; 45:1561-7.
10. Legler TJ, Maas JH, Köhler M, et al. Sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transf Med* 2001; 11:383-88
11. Denomme GA, Dake LR, Vilensjy D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008; 48:473-478
12. Flegel WA, Khul SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion* 2000; 40: 428-434
13. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A., Kutner JM, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang* 2005; 88:130-135
14. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak d phenotype. *Curr opin Hematol* 2006; 13:476-483
15. Flegel WA, Wagner FF. RHD epitope density profiles of RHD variant red cells analysed by flow cytometry. *Transf. Clin. Biol.* 1996, 3:429-431

16. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec P-Y, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion* 2004, 44:1282-1286
17. Jones J, Filbey D: Selection of monoclonal antibodies for the identification of D variants: Ability to detect weak D and to split epD2,epD5 and epD6/7. *Vox Sang.* 70: 173-179, 1996
18. Castilho L, Carvalho T, Credidio D, Pellegrino J. RHD genotyping in blood donors with highly diverse ancestry phenotyped as D-negative. *Transfusion* 2008;48:188A
19. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood* 2000, 95:12-18
20. Maaskant-van wijk, PA, Faas BH, De Ruijter, JA., et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 1998; 38:1015-1021
21. Castilho L, Rios M, Rodrigues A, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF. High frequency of partial D DIIIa and DAR found in SCD patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfusion Medicine* 2005; 15:49-55
22. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens. Editorial. *Transfusion* 2005; 1547-1551.

Table 1: Weak D Types and associated haplotypes found in blood donor and patient samples

Samples	Haplotype	Weak D Types					Total
		<i>Type 1</i>	<i>Type 2</i>	<i>Type 3</i>	<i>Type 4</i>	<i>Type 5</i>	
Blood Donors	cDe	4		2	21		27
	CDe	33		4		2	39
	cDE		22				22
	Total	37	22	6	21	2	88
Patients	cDe	3		23	28		54
	CDe	36		4			40
	cDE		53				53
	Total	39	53	27	28		147
Total of Samples	cDe	7		25	49		81
	CDe	69		8		2	79
	cDE		75				75
	Total	76	75	33	49	2	235
	%	32.3	31.9	14.0	20.9	0.9	

Table 2: Partial D and associated haplotypes found in blood donor and patient samples

Samples	Haplotype	Partial D									Total
		<i>DAR</i>	<i>DFR</i>	<i>DBT</i>	<i>DHMi</i>	<i>DHAR</i>	<i>DIVb</i>	<i>DVa</i>	<i>DVI</i>	<i>DVII</i>	
Blood Donors	<i>cDe</i>	1				1		3			5
	<i>CDe</i>		5	3	1				12		21
	<i>cDE</i>								1		1
	Total	1	5	3	1	1	0	3	13	0	27
Patients	<i>cDe</i>	8		1				11		2	22
	<i>CDe</i>		16	2			5		13		36
	<i>cDE</i>		3								3
	Total	8	19	3	0						61
Total of Samples	<i>cDe</i>	9		1		1		14		2	27
	<i>CDe</i>		21	5	1		5		25		57
	<i>cDE</i>		3						1		4
	Total	9	24	6	1	1	5	14	26	2	88
	%	10.2	27.3	6.8	1.1	1.1	5.7	15.9	29.5	2.3	

Table 3: *RHD* alleles and reactivity with monoclonal anti-D reagents

Samples	<i>RHD</i> Alleles	MoAbs x reactivity								
		Tube			Gel Diamed			Gel Grifols		
		IGM MS201	IgG+IgM MS26+MS201	IgG+IgM/IAT P3x35/P3x61	IGM 175/2	IgG MS26	IgG/IAT ESD1	IGM P3x61	IgG+IgM P3x35/P3X61	IgG+IgM/IAT MS26/MS201
76	<i>Weak D type 1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
75	<i>Weak D type 2</i>	0	0	+	0	+	+	0	+	+
13	<i>Weak D type 3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	<i>Weak D type 4</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	<i>Weak D type 5</i>	0	0	+	0	0	+	0	+	+
10	<i>DAR</i>	0	+	+	0	+	+	0	+	+
24	<i>DFR</i>	0	+	+	0	+	+	0	+	+
6	<i>DBT</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	<i>DHMi</i>	0	+	+	0	+	+	0	+	+
5	<i>DIVb</i>	+	0	+	+	0	0	+	+	+
14	<i>DVa</i>	+	+	+	+	0	+	+	+	+
26	<i>DVI</i>	0	0	+	0	+	+	0	+	+
2	<i>DVII</i>	0	+	+	+	+	+	+	+	+