



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ROSANGELA DUARTE DE MEDEIROS PERSON

ESTRATÉGIA PARA DETECÇÃO DE VARIANTES RHD NA ROTINA
IMUNOHEMATOLÓGICA

CAMPINAS

2017

ROSANGELA DUARTE DE MEDEIROS PERSON

**ESTRATÉGIA PARA DETECÇÃO DE VARIANTES RhD NA ROTINA
IMUNOHEMATOLÓGICA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestra em Ciências, área de Clínica
Médica.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. LILIAN MARIA DE CASTILHO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ROSANGELA DUARTE DE MEDEIROS PERSON
E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. LILIAN MARIA DE CASTILHO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

P431e Person, Rosangela Duarte de Medeiros, 1966-
Estratégia para detecção de variantes RhD na rotina imunohematológica /
Rosangela Duarte de Medeiros Person. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Lilian Maria de Castilho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Sistema do grupo sanguíneo Rh-Hr. 2. Indicadores e reagentes. 3.
Antígenos de grupos sanguíneos. I. Castilho, Lilian Maria de. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Strategy to detect RhD variants in blood donors

Palavras-chave em inglês:

Rh-Hr blood-group system

Indicators and reagents

Blood group antigens

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Lilian Maria de Castilho [Orientador]

Simone Cristina Olenscki Gilli

Wilson Baleotti Júnior

Data de defesa: 28-08-2017

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ROSANGELA DUARTE DE MEDEIROS PERSON

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. LILIAN MARIA DE CASTILHO

MEMBROS:

- 1. PROF^a. DR^a. LILIAN MARIA DE CASTILHO**
- 2. PROF^a. DR^a. SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI**
- 3. PROF. DR. WILSON BALEOTTI JÚNIOR**

**Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca
examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno**

Data: 28/08/2017

DEDICATÓRIA

Sou feliz e grata porque fui abençoada
com umextraordinário conjunto de pessoas
únicas com quem posso compartilhar a vida!
Obrigada família por me apoiarem!

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Agradeço a minha orientadora, Profa.Dra.Lilian Maria de Castilho, pelo suporte, correções e incentivos e principalmente por me dar forças para superar todas as etapas dessa jornada.

À Colsan (Associação Beneficente de Coleta de Sangue) por me fornecer a estrutura e apoio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

Aos membros titulares da banca examinadora: Profa.Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas de Castro, Prof.Dr. Wilson Baleotti Júnior e aos membros suplentes: Profa. Dra. Simone Cristina Olenscki Gilli e Prof. Dr. José Mauro Kutner pelo tempo dedicado, para leitura e análise desse trabalho.

Ao meu pai Cézar, minha mãe Vilma, minhas irmãs Silvia e Silvana e aos outros membros dessa família maravilhosa: Denilson, Rafael, André e Maria Antônia. Ao esposo José Aauto. São essas pessoas, através da sua presença, seus sorrisos, seus abraços, suas palavras, apoio, compreensão, amor e amizade, que dão sentido à minha vida e a tornam mais fácil e prazerosa de viver.

Em especial as minhas amigas, Cláudia Hauy e Janaína Muniz, por me incentivarem e ajudarem na superação das dificuldades em todas as etapas.

A todos da equipe do laboratório de Imuno-Hematologia da Colsan, pela paciência e apoio.

A Dra.Carine Arnoni, Dra.Flávia Latini e Diana Gazito pela atenção e contribuições científicas prestadas durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr.José Augusto Barreto, o primeiro a acreditar, incentivar e possibilitar a pesquisa científica na Colsan.

Agradeço também em especial a Dra.Marie Satake, Obrigada por ter acreditado em mim!

RESUMO

O antígeno D é o mais imunogênico no sistema Rh. O antígeno D é muito polimórfico e certas mutações e/ ou deleções levam a um fenótipo fraco definido por uma baixa densidade antigênica e que requerem a realização de testes até a fase de anti-globulina humana (AGH) para sua detecção. Neste estudo foram avaliadas diferentes tecnologias e clones de anti-D para propor a estratégia sorológica mais adequada para detectar o maior número de variantes D em doadores de sangue. Métodos: Foram selecionadas 101 amostras de doadores de sangue brasileiros com diferentes expressões de D na rotina de doadores. Os testes foram realizados em leitura imediata (LI) com onze reagentes anti-D comercialmente disponíveis em tubo e microplaca. Os testes confirmatórios para a presença de D fraco incluíram o teste de (AGH) em tubo, gel e aderência de glóbulos vermelhos em fase sólida (F.S). Todas as amostras de DNA foram extraídas do sangue periférico e as variantes D foram classificadas utilizando diferentes ensaios moleculares. Resultados: As variantes de RHD identificadas por análise molecular incluíram os tipos D fracos 1, 2, 3, 11 e 38 e D parcial (DAR1.2, DAR1, DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU4, DAU5, DAU6, DMH e DVII). O monoclonal Blend RUM-1/MS26 foi o melhor reagente anti-D utilizado para detectar o antígeno D na fase de LI em tubo, reagindo com 57% das variantes D com reatividade >2+, enquanto que o blend anti-D D175+ 415 foi o melhor monoclonal utilizado em microplacas, reagindo com 82% das variantes D. Os testes em F.S demonstraram forte reatividade (3-4+) com 100% das amostras testadas. Conclusão: Este estudo nos permitiu comparar e determinar a metodologia e os reagentes mais apropriados para identificar as variantes de D mais frequentes. Nossos resultados mostram que mesmo usando métodos e reagentes sensíveis para assegurar a correta caracterização do antígeno D, pelo menos 17% das amostras do doador necessitaram de um teste confirmatório de D para evitar a aloimunização em pacientes D negativos.

ABSTRACT

D antigen is the most immunogenic antigen in the Rh blood group system, The D antigen is highly polymorphic and certain mutations and /or deletions lead to a weak phenotype defined by decreased density of antigen sites which require the use of indirect antiglobulin test (IAT) for detection. In this study we evaluated different technologies and clones of anti-D to propose the most appropriate serologic strategy to detect the largest numbers of D variants in blood donors. Methods: We selected 101 samples from Brazilian blood donors with different expressions of D in our donor routine. The tests were performed at immediate spin (IS) with eleven commercially available anti-D reagents in tube and microplate. D confirmatory tests for the presence of weak D included the (IAT) test in tube, gel and solid-phase red blood cell adherence (SPRCA). All DNA samples were extracted from peripheral blood and the D variants were classified using different molecular assays. Results: RHD variants identified by molecular analysis included weak D types 1, 2, 3, 11 and 38 and partial Ds (DAR1.2, DAR1, DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU4, DAU5, DAU6, DMH and DVII). The RUM-1/MS26 monoclonal-monoclonal blended was the best anti-D reagent used to detect the D antigen at the IS phase in tube, reacting with 57% of the D variants with reactivity >2+, while the anti-D blend D175+415 was the best monoclonal (MoAb) used in microplate, reacting with 82% of the D variants. D confirmatory tests using SPRCA showed strong positive reactivity (3-4+) with 100% of the D variant samples tested. Conclusion: This study allowed us compare and determine the most appropriate methodology and reagents to identify the most frequent D variants. Our results show that even using sensitive methods and MoAbs to ensure the accurate assignment of D antigen, at least 17% of the donor samples need a confirmatory D test in order to avoid alloimmunization in D-negative patients

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem representativa dos genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>	19
Figura 2 - Proteínas Rh	20
Figura 3 – Representação dos 10 exons dos genes <i>RHD</i> e <i>RHCE</i> e os mecanismos genéticos envolvidos no fenótipo RhD Negativo.....	21
Figura 4 - Proteína RhD	22
Figura 5 – Representação dos mecanismos genéticos envolvidos nas variantes RhD.....	22
Figura 6– Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas envolvidas nos fenótipos RhD fracos tipos 1,2 ,3 e 4	24
Figura 7 - Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas envolvidas nos fenótipos DEL..	26
Figura 8 - Diagrama com alelos híbridos <i>RHD</i> e <i>RHCE</i>	27
Figura 9 - Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas envolvidas no fenótipos D parciais.....	28
Figura 10– Posição dos epítomos RhD nos loops extracelulares	29
Figura 11 - Árvore filogenética RHD	30
Figura 12– Fluxograma do estudo.....	34
Figura 13–Tipagem ABO/RhD pelo método de aglutinação em MC realizado no equipamento Neo® Immucor	43
Figura 14 – Teste confirmatório de RhD pelo método de F.S realizado no equipamento Neo® Immucor	44
Figura 15 - Teste de tipagem RhD e controle de Rh pelo método em tubo	46
Figura 16 - Teste de tipagem RhD e controle de Rh pelo método de aglutinação em gel Liss/Coombs	48
Figura 17- PCR Multiplex em gel de agarose à 4%	49
Figura 18 - PCR RFLP em gel de agarose à 2%.....	51
Figura 19 - Eletroferograma da reação de sequenciamento.	53
Figura 20 - Resultado da análise molecular das amostras de doadores voluntários de sangue	55
Figura 21 - Resultado da caracterização molecular das amostras de 101 doadores de sangue com fraca expressão do antígeno RhD.....	56
Figura 22 - Resultado da associação dos haplótipos <i>RH</i> e a caracterização molecular das amostras de 101 doadores de sangue com fraca expressão do antígeno RhD	57

Figura 23 Fluxograma para validação de reagentes anti-D IgM e IgM+IgG	85
Figura 24 Esquema descrevendo os clones anti-D mais adequados para as metodologias de tubo, microplaca gel e fase sólida	857

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Variantes RhD fracos mais comuns e seus respectivos alelos, haplótipos e densidade antigênica	25
Tabela 2 Técnicas e clones utilizados nas análises sorológicas do antígeno RhD.....	42
Tabela 3 Classificação das reações de hemaglutinação em tubo de acordo com as intensidades	46
Tabela 4 Classificação das reações de hemaglutinação em gel de acordo com as intensidades	47
Tabela 5 Sequencia de primers, temperatura de annealing e enzimas de restrição das reações de PCR-RFLP para identificação do gene RHD.....	50
Tabela 6 Primers para amplificação do gene RHD e sequenciamento	52
Tabela 7 Referencias para converção dos resultados de aglutinação em escores utilizados na análise estatística.	54
Tabela 8 Porcentagem de amostras detectadas de acordo com o grau de aglutinação em L.I pelo método de aglutinação em tubo.....	58
Tabela 9 Média de reatividade dos antissoros anti-D IgM e IgM+IgG na fase de L.I em tubo ...	58
Tabela 10 Porcentagem de amostras concluídas na fase de AGH pelo método em tubo com antissoros IgG e IgM+IgG	59
Tabela 11 Porcentagem de amostras concluídas em fase de AGH pelo método de aglutinação em gel Liss/Coombs e gel NaCl/Enzima com reagentes anti-D Bio-Rad	60
Tabela 12 Porcentagem de amostras e grau de aglutinação em L.I pelo método de aglutinação em MC com reagentes anti-D Immucor.....	61
Tabela 13 Média de reatividade dos antissoros IgM e IgM+IgG na fase de L.I em MC	62
Tabela 14 Porcentagem de amostras concluídas pelo método de F.S com reagentes anti-D Immucor	62
Tabela 15 Número de amostras e grau de aglutinação em L.I com diversos reagentes anti-D..	64
Tabela 16 Número de amostras e grau de aglutinação em AGH e fase sólida (capture) com diversos reagentes anti-D	67
Tabela 17 Número de amostras com reatividade $\geq 2+$ em tubo e MC com o clone IgM RUM1..	68
Tabela 18 Número de amostras com reatividade $\geq 2+$ em tubo e MC com o clone IgM MS201	69
Tabela 19 Número de amostras com reatividade $\geq 2+$ em tubo, gel NaCl/Enzima e MC com o clone IgM TH28.....	69

Tabela 20. Número de amostras concluídas pela metodologia de tubo, gel e F.S com o clone IgG MS26.....	71
Tabela 21 Número de amostras concluídas por testes moleculares e a relação com os haplótipos e clusters	74
Tabela 22 Análise comparativa entre as variantes DAR(4.2), DAU4 e DAU5 com o clone Blend D175+415	78
Tabela 23 Análise comparativa entre as variantes Fraco tipos 1, 2 e 3 e os clones IgM RUM1 e TH28+MS26 em equipamento automatizado.....	81
Tabela 24 Análise comparativa entre as variantes DAR1.2, DAR3.1, Fraco tipo 1 e Fraco tipo 2 nas metodologias em tubo (L.I) e gel	822

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Comparativo da reatividade de diferentes clones anti-D IgM com as variantes RhD fraco e RhD parcial. Os graus de reatividade estão descritos de acordo com a intensidade de aglutinação. O clone IgMTH28 foi utilizado nas metodologias de tubo e gel..... 75

Gráfico 2 Comparativo da reatividade de diferentes clones anti-D IgG com as variantes RhD fraco e RhD parcial. Os graus de reatividade estão descritos de acordo com a intensidade de aglutinação..... 76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Rh	Sistema Rh
RhD	Antígeno RhD
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
<i>RHDψ</i>	Pseudogene <i>RHD</i>
R1r	Fenótipo DCcee
r'r	Fenótipo dCcee
r''r	Fenótipo dccEe
DAR1.2	Antígeno RhD parcial DAR1.2
DAR1	Antígeno RhD parcial DAR1
DAR3.1	Antígeno RhD parcial DAR3.1
DAU0	Antígeno RhD parcial DAU0
DAU2	Antígeno RhD parcial DAU2
DAU4	Antígeno RhD parcial DAU4
DAU5	Antígeno RhD parcial DAU5
DAU6	Antígeno RhD parcial DAU6
DMH	Antígeno RhD parcial DMH
DVII	Antígeno RhD parcial categoria VII
Fraco tipo 1	Antígeno RhD fraco tipo 1
Fraco tipo 2	Antígeno RhD fraco tipo 2
Fraco tipo 3	Antígeno RhD fraco tipo 3
Fraco tipo 11	Antígeno RhD fraco tipo 11
Fraco tipo 38	Antígeno RhD fraco tipo 38
anti-LW	Landsteiner e Wiener
SMP1	Small Membrane Protein 1
pb	Pares de bases
α	Alpha
SNPs	Single nucleotide polymorphism
Teste em AGH	Teste em fase de antiglobulina humana
DHFRN	Doença Hemolítica do Feto e Recém-Nascido
LISS	Low Ionic Strength Solution
MC	Microplaca
F.S	Fase Sólida
T.A	Temperatura Ambiente
L.I	Leitura Imediata
rpm	Rotações por minuto
mL	Mililitro
μL	Microlitro
N/R	Não realizadas
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfisms

SUMÁRIO

1 Introdução	18
1.1 Fenótipo RhD Fraco	23
1.2 Fenótipos DEL	25
1.3 Fenotipo RhD Parcial	27
1.4 Filogenia dos alelos RHD	29
2 Objetivos	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3 Materiais.....	34
3.1 Fluxograma do Estudo.....	34
3.2 Casuística.....	35
3.2.1 Amostras de sangue de doadores voluntários de sangue.....	35
3.3 Materiais	35
3.3.1 Antissoros anti-D.....	35
3.3.2 Antissoros Controle de Rh	36
3.3.3 Antissoros para fenotipagem Rh estendida	36
3.3.4 Microplaca para tipagem Rh(D)	36
3.3.5 Solução de Diluição para testes em microplaca no equipamento NEO® Immucor	36
3.3.6 Microplaca para testes em F.S.....	37
3.3.7 Reagente potencializador para testes em F.S.....	37
3.3.8 Hemácias Indicadoras para testes em F.S.....	37
3.3.9 Soro Antiglobulina Humana.....	37
3.3.10 Hemácias Controle de Coombs	37
3.3.11 Cartões Gel LISS/Coombs	38
3.3.12 Cartões gel Neutro	38
3.3.13 Solução de diluição para testes em gel.....	38

3.3.14 Tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) 10X.....	38
3.3.15 Agarose para eletroforese	38
3.3.16 Kit de extração de DNA	39
3.3.17 Taq DNA Polimerase	39
3.3.18 Enzimas de restrição	39
3.3.19 Deoxinucleotídeos (dNTP)	39
3.3.20 Primers	39
3.3.21 Corante para DNA	40
3.3.22 Enzimas para purificação da PCR.....	40
3.3.23 Dideoxinucleotídeos.....	40
3.3.24 Kit de purificação da reação de sequenciamento	40
3.3.25 Polímero.....	40
3.3.26 Marcador Molecular	40
3.3.27 Preparo do tampão (TAE) 10X	41
3.3.28 Preparo do gel de agarose	41
4 Métodos	41
4.1 Testes Sorológicos	41
4.1.1 Tipagem RhD em equipamento automatizado	42
4.1.2 Teste confirmatório do antígeno RhD em equipamento automatizado	43
4.1.3 Fenotipagem para os antígenos C, c, E, e em equipamento automatizado	45
4.1.4 Tipagem RhD em tubo	45
4.1.5 Tipagem RhD em gel NaCl/Enzima	46
4.1.6 Tipagem RhD em gel Liss Coombs.....	47
4.2 Testes Moleculares.....	48
4.2.1 Extração de DNA	48
4.2.2 PCR-Multiplex	48
4.2.3 PCR-RFLP	50
4.2.4 Sequenciamento	51
4.3 Estatística.....	54

5 Resultados	55
5.1 Testes Moleculares.....	55
5.1.1 Resultados da genotipagem RHD em doadores voluntários de sangue	55
5.1.2 Resultados da caracterização molecular das variantes RHD.....	55
5.1.3 Resultados da associação das variantes RhD com haplótipos RH	56
5.2 Testes Sorológicos.....	57
5.2.1 Resultados dos testes sorológicos realizados pelo método de aglutinação em tubo	57
5.2.2 Resultados dos testes sorológicos realizados pelo método de aglutinação em gel Liss/Coombs e gel NaCl/Enzima.....	59
5.2.3 Resultados dos testes sorológicos realizados pelo método de aglutinação em microplaca e F.S em equipamento automatizado	60
5.2.4 Variantes RHD e reatividade sorológica em L.I.....	62
5.2.5 Variantes RHD e reatividade sorológica com os testes confirmatórios em tubo, gel e F.S.....	65
5.2.6 Variantes RHD e reatividade sorológica dos reagentes monoclonais anti-D de clones IgG e blend utilizados nos testes confirmatórios	70
Discussão	72
6.1 Análise molecular das variantes RhD fraco e RhD parcial.....	72
6.2 Associação das variantes RhD fraco e RhD parcial com a reatividade sorológica	75
6.4 Reatividade sorológica das variantes RhD fraco.....	78
6.5 Eficiência das técnicas e clones utilizados na detecção das variantes RhD.....	81
6.6 Correlação das variantes RhD e discrepâncias de resultados	83
6.7 Avaliação de reagentes anti-D para utilização na rotina de doadores de sangue.....	84
6.8 Recomendações para a rotina de tipagem RhD em doadores de sangue.....	86
7 Conclusões	88
8 Referência Bibliográfica	90
9 ANEXOS	102
9.1 Documento de aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da UNICAMP.....	102
9.2 Artigo submetido a aprovação.....	103

1 Introdução

Em 1939, Levine e Stetson, relataram uma reação pós transfusional em uma mulher que foi transfundida com sangue do marido, após o parto de uma criança com hidropsia que nasceu morta. Levine demonstrou que a mãe tinha um anticorpo que aglutinava as hemácias do marido ABO compatível, concluindo que ela havia se sensibilizado contra um antígeno que o feto herdara do pai.¹

No ano seguinte Landsteiner e Wiener, relataram um anticorpo obtido por meio da imunização de coelhos com hemácias de macacos *Rhesus*. Esse anticorpo aglutinava cerca de 85% das hemácias humanas testadas, foi denominado como fator Rhesus (Rh) e era muito semelhante ao descrito anteriormente por Levine e Stetson.² Alguns anos mais tarde, provou-se que os anticorpos Rh dos animais e humanos não reconheciam o mesmo antígeno, porém a nomenclatura Rh foi mantida.³ Somente a partir de 1963 ficou definido que os anticorpos de animais deveriam ser renomeados como anti-LW (Landsteiner e Wiener) e os anticorpos humanos passaram a ser chamados de anti-D.⁴

O sistema Rh é o sistema de grupo sanguíneo com o maior número de polimorfismos entre os marcadores conhecidos da membrana eritrocitária.⁵ Atualmente é composto por 54 antígenos,⁶ sendo que os cinco principais são: D, C, c, E, e. Estes antígenos formam oito complexos gênicos, chamados de haplótipos RH: Cde, cde, cDE, cDe, cdE, Cde, CDE, CdE.⁷ A alta imunogenicidade dos antígenos Rh, especialmente do antígeno RhD, torna esse sistema o mais importante na prática transfusional depois do sistema ABO.⁸

A maioria dos sistemas de grupos sanguíneos é codificada por um simples loci gênico,⁹ em contrapartida, os antígenos do sistema Rh são codificados por dois genes denominados *RHD* e *RHCE*, localizados no cromossomo 1, na posição 1p36.13-34.3.¹⁰ Ambos os genes contém 10 éxons e estão em orientações opostas no cromossomo (3'RHD5'-5'RHCE3'), separados por um gene independente *SMP1*(Small Membrane Protein 1).¹¹

O gene *RHD* é flanqueado por dois segmentos de DNA, conhecidos como caixas Rhesus "Rhesus Boxes".¹² **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

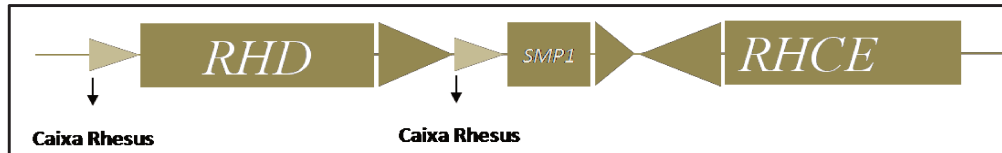


Figura 1 - Imagem representativa dos genes *RHD* e *RHCE*
Sequências em orientações opostas, as caixas *Rhesus*, e o gene *SMP1*. Fonte: Adaptado de Wagner & Flegel.¹²

As diferenças básicas entre estes dois genes estão no éxon 10 e, na deleção de 600pb (pares de base) no íntron 4 do gene *RHD*.^{10,13} Essa homologia pode estar relacionada ao fato de ambos terem sido originados a partir de um gene ancestral comum.¹⁰ São genes complexos que originam os numerosos antígenos do sistema Rh.¹⁴

O gene *RHD* codifica a proteína RhD e o gene *RHCE* codifica a proteína RhCE que expressa os antígenos C/c e E/e.¹⁵ As proteínas Rh são compostas de 417 aminoácidos, com estruturas muito similares.¹⁶ As proteínas RhD e RhCE não são glicosiladas,¹⁷ possuem peso molecular de 30kD (Kilodalton) e são inseridas na membrana eritrocitária através da ligação com a glicoproteína RhAG (glicoproteína RH50), a qual possui peso molecular de 50 kD e é codificada pelo gene *RHAG* localizado no cromossomo 6p12-p21, formando assim o chamado "complexo Rh".¹⁸

A glicoproteína RhAG não é polimórfica, mas é importante para a expressão de RhD e RhCE na membrana eritrocitária,¹⁹ mutações no gene *RHAG* são responsáveis pela perda de expressão de antígenos Rh (Rhnull).^{5,20} As proteínas Rh30 e RhAG apresentam 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 α -hélices transmembranares. Essa homologia pode estar relacionada ao fato de ambas terem sido originadas a partir de um gene ancestral comum.^{21,22}

Os polipeptídios Rh atravessam 12 vezes a membrana eritrocitária, formando seis alças extracelulares, apresentando os segmentos amino-terminal e carboxi-terminal intracelularmente.²³ **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

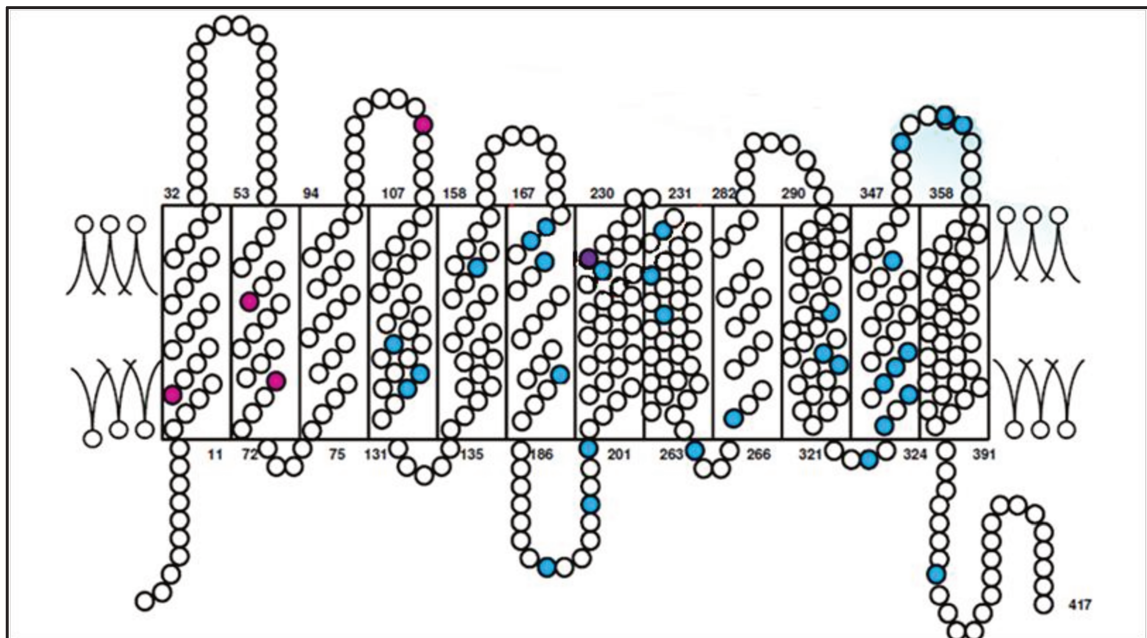


Figura 2 - Proteínas Rh

Modelo das proteínas Rh na membrana eritrocitária, formadas por 417 aminoácidos, a qual apresentam 12 segmentos transmembranários, 6 alças extracelulares e 5 alças intracelulares. Os círculos azuis representam as diferenças de aminoácidos entre as proteínas RhD e RhCE. Os círculos de cor rosa representam aminoácidos críticos para os antígenos C/c e o de cor roxa representam os aminoácidos críticos para os antígenos E/e da proteína RHCE. Fonte: Adaptado de Flegel.²⁴

A elevada homologia entre os dois genes *RH* resulta nas proteínas RhD e RhCcEe diferindo entre 32 e 35, dos 417 aminoácidos codificados. Os alelos E/e diferem pela troca de um único nucleotídeo no éxon 5 do gene *RHCE*, levando a substituição de uma Prolina (E) para uma Alanina (e) na posição 226. Os alelos C/c diferem pela troca de um único nucleotídeo no éxon 1 e cinco nucleotídeos no éxon 2 do gene *RHCE* produzindo um polipeptídeo com quatro substituições de aminoácidos, 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.²⁵

A maioria dos indivíduos caucasianos (85%) e do Sudeste Asiático 99%) possuem o gene *RHD* que codifica o antígeno RhD e são conseqüentemente RhD positivo.^{26,27,28} (Figura 3 A). Em indivíduos RhD negativos a proteína RhD não é

expressa na superfície do eritrócito. O fenótipo RhD negativo é mais comum em caucasianos com uma prevalência que varia entre 15% e 17% e é menos frequente em africanos e asiáticos onde as porcentagens são de 5% e 3% respectivamente.²⁹ Alguns eventos genéticos são responsáveis pela ausência do antígeno RhD na membrana da hemácia. A deleção do gene *RHD* é o mecanismo molecular mais comum entre os indivíduos caucasianos³⁰(Figura 3B), enquanto que africanos e asiáticos muitas vezes apresentam genes *RHD* inativos ou silenciosos. Em aproximadamente 66% de indivíduos negros RhD negativos originários da África do Sul, o mecanismo mais comum é a presença do pseudogene *RHD*(*RHD* ψ), que é resultante da duplicação de 37 pb entre a região limite do intron 3 e o éxon 4 do gene *RHD*, que gera um sinal de códon de parada, levando a produção de uma proteína não funcional (Figura 3C).³¹ Foi também observado em 15% desta população a presença de um gene híbrido *RHD-CE-D*³¹(Figura 3D), o qual não expressa o antígeno RhD e codifica um antígeno C alterado. Em asiáticos cerca de 30% de indivíduos aparentemente RhD negativos são na verdade DEL, um fenótipo caracterizado por uma significativa redução do antígeno RhD na membrana da hemácia.³²

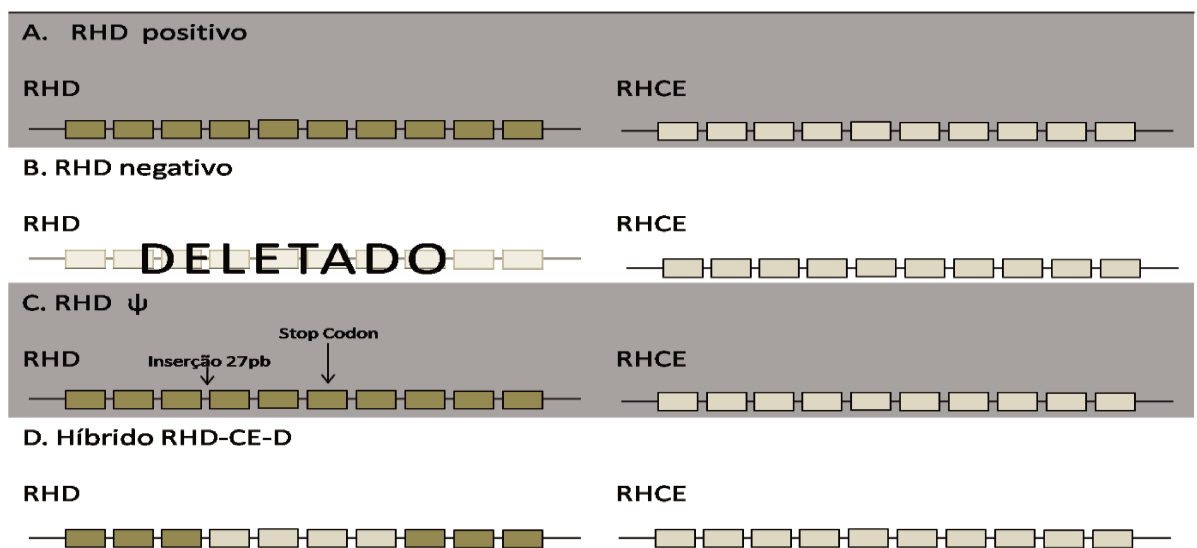


Figura 3 – Representação dos 10 exons dos genes *RHD* e *RHCE* e os mecanismos genéticos envolvidos no fenótipo RhD Negativo

3A- Presença dos genes *RHD* e *RHCE* resultando no fenótipo RhD positivo. Fonte: Wagner & Flegel²²

3B- Gene *RHD* deletado, mecanismo genético mais comum pelo fenótipo RhD negativo em caucasianos. Fonte: Colin&Zahar³⁰

3C- Gene *RHD* ψ que forma uma proteína não funcional, Fonte: Singleton et.al³¹

3D- Gene híbrido *RHD-CE-D*, onde os exons 4, 5, 6 e 7 do gene *RHD* são substituídos por éxons do gene *RHCE*, levando à ausência da proteína RhD. Fonte: Singleton et.al³¹

Embora a maioria dos indivíduos apresente um fenótipo RhD positivo ou RhD negativo, a natureza altamente polimórfica do gene *RHD* resulta em um número de variantes RhD com antígenos muito complexos e de diferentes densidades antigênicas. Existem mais de 200 alelos envolvidos na expressão alterada do antígeno RhD.²⁴(Figura 4)

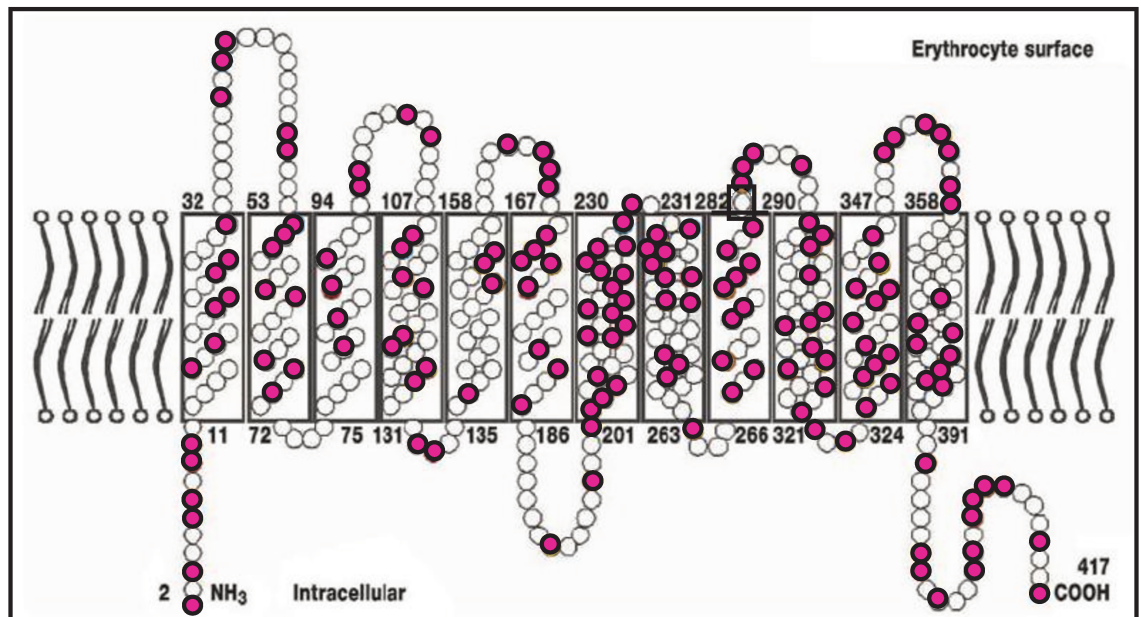


Figura 4 - Proteína RhD

Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas, envolvidas na alteração de expressão do antígeno RhD. Fonte: Adaptado de:Flegel.²⁴

Os fenótipos Rh variantes surgem de pelo menos 2 mecanismos: rearranjos gênicos nos genes *RHD* e *RHCE* (Figura 5)²⁶ e mutações de ponto que causam alterações de aminoácidos, podendo levar a perda de alguns epítomos e / ou expressão de antígenos de baixa incidência.²¹

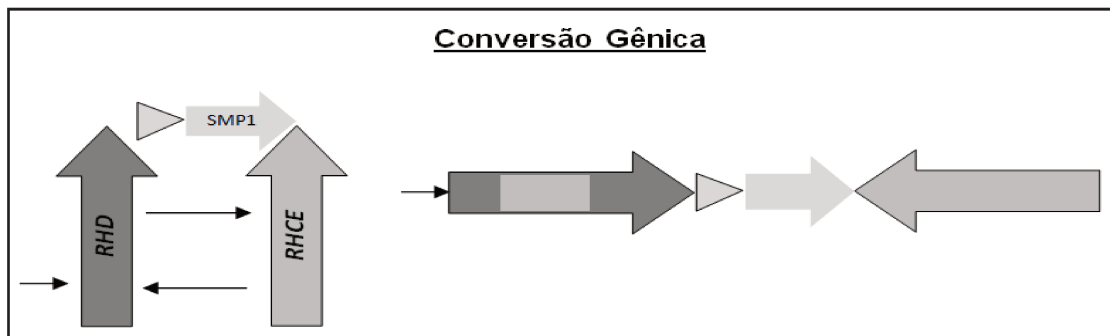


Figura 5 – Representação dos mecanismos genéticos envolvidos nas variantes RhD

Devido à elevada homologia e proximidade dos genes *RHD* e *RHCE*, os eventos de conversão gênica ocorrem em cis através da formação de hairpin entre os genes e resultam na substituição de éxons *RHD* por éxons *RHCE*. Fonte:Wagner et.al.²⁶

A análise molecular determinou a base genética de muitas variantes RhD, e dentre essas, é possível destacar os fenótipos RhD fraco, RhD parcial e Del.³³

1.1 Fenótipo RhD Fraco

O fenômeno RhD fraco foi observado pela primeira vez em 1946,³⁴ e foi anteriormente chamado de "Du". Primeiramente essa variante foi descrita como uma variação de expressão quantitativa derivada de uma redução dos níveis de mRNA,^{21,35} mas em 1999 a base molecular do D fraco foi definida por Wagner et.al.³⁶ Estes autores demonstraram que a variante RhD fraco apresenta alterações de aminoácidos na região transmembranar e/ou intracelular da proteína RhD e ocorre pela presença de polimorfismo de único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*) ou SNPs missenses em diferentes éxons do gene *RHD*.³⁶ Essas alterações afetam a eficiência de inserção da proteína na membrana eritrocitária e, portanto a quantidade do antígeno RhD na membrana, o que leva à redução do número de sítios antigênicos nessas hemácias justificando a razão destes não formarem aloanticorpo anti-D.^{37,38} Atualmente mais de 70 diferentes tipos de mutações associadas ao fenótipo D fraco já foram reportados (tipos 1-74).³⁹

O fenótipo RhD fraco é caracterizado por hemácias com uma expressão reduzida de antígenos RhD, quando comparada com a expressão normal que dependendo do haplótipo apresenta uma densidade antigênica variando entre 10.000 a 23.000 sítios antigênicos por célula.⁴⁰ Contudo, alguns fenótipos foram identificados com densidade variando entre 53 e 4.000 sítios antigênicos por hemácia⁴¹ e, dependendo do antissoro anti-D utilizado, reagem apenas pelo teste de antiglobulina humana (AGH).⁹

Em determinados indivíduos, a expressão do antígeno RhD é diminuída quando o alelo *RHCE*C* está em trans com o gene *RHD*, ocorrendo uma redução da expressão do RhD na membrana da hemácia,⁴² o que dificulta a sua identificação sorológica.⁴³

Estima-se que a freqüência de D fraco na população européia esteja entre 0,2% e 1%, e os tipos mais frequentemente encontrados são os D fracos tipo 1, 2 e 3 que correspondem à 95% do total dos fenótipos D fracos desta população.³⁸ As variantes de D fraco tipos 1, 2 e 3 não possuem epítomos RhD alterados e portanto

não levam a produção de anti-D, caso o receptor seja transfundido com hemácias RhD positivas ou no caso de gestantes que venham a gerar um feto RhD positivo.⁹

Na população brasileira a estimativa de D fraco é em torno de 0,2% e 1,5%, e diferentemente da população européia a porcentagem dos D fracos tipo 1, 2 e 3 é menor, entre 25% a 55%. A variante mais encontrada é o D fraco tipo 4 detectada entre 20% e 40% da nossa população.⁴⁴ Uma das divisões da árvore filogenética RHD é representada pelo grupo de alelos D fraco tipo 4 que estão localizados no vestíbulo da proteína RhD, o que representa a entrada do canal transmembranar da proteína RhD.⁴⁵ As trocas de aminoácidos envolvidas nos fenótipos RhD fracos tipos 1, 2, 3 e 4 estão representadas na figura 6.

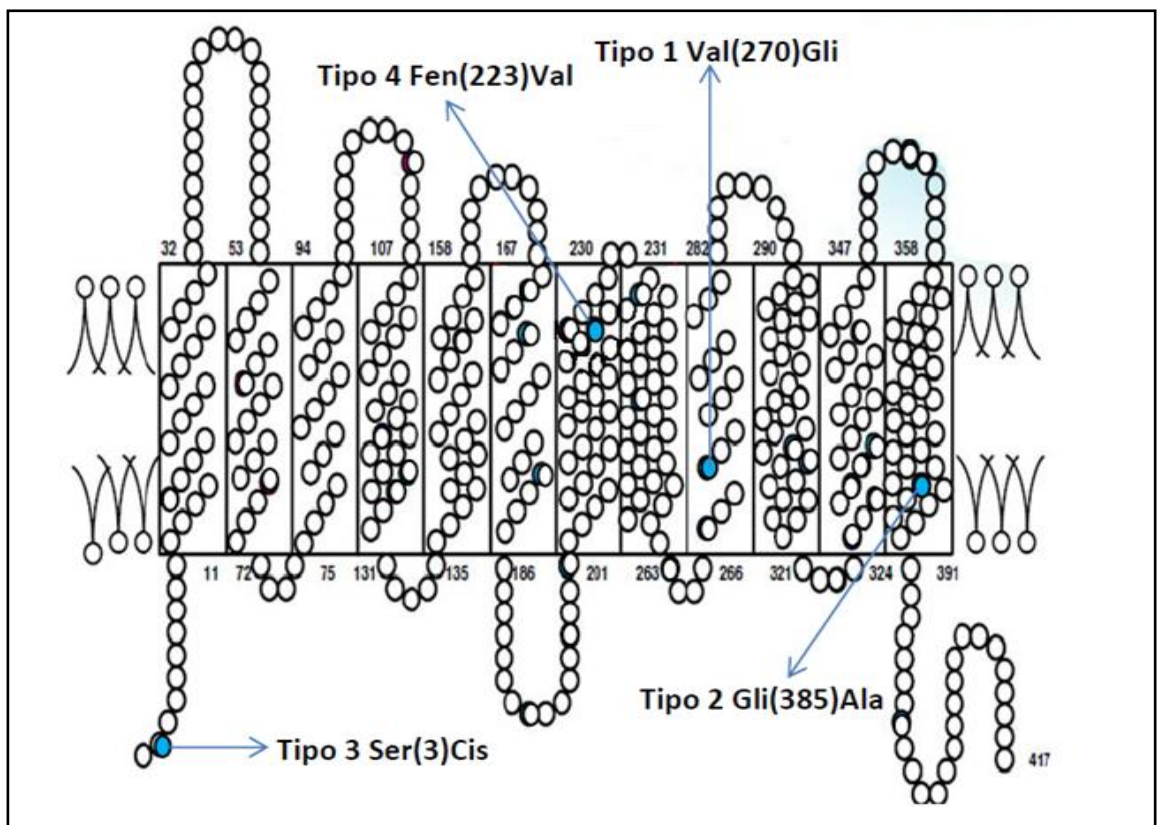


Figura 6– Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas nos fenótipos RhD fracos tipos 1, 2, 3 e 4. As substituições de aminoácidos ocorrem nas regiões transmembranares ou intracelulares da proteína. Fonte: Adaptado de:Flegel.²⁴ e também a troca de aminoácidos primordial para ocorrência do RhD fraco tipo 4.⁴⁵

O significado clínico dos antígenos D fracos está relacionado principalmente com a falha na identificação. Os tipos de D fraco com reduzida densidade antigênica podem ser tipados como RhD negativo e caso essas hemácias sejam transfundidas

em indivíduos RhD negativos, poderão induzir à aloimunização, que é a formação de anticorpos em receptores, frente à exposição à antígenos não próprios.⁴⁶

Entre os D fracos mais comuns, o que apresenta maior densidade antigênica é o D fraco tipo 4 (4.0 e 4.1); entre 2.300 e 3.800 sítios antigênicos por hemácia, seguido pelos tipos 3, 1 e 2. (1.900, 1.300 e 500) sítios antigênicos por hemácia respectivamente.⁴⁰ Conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Variantes RhD fracos mais comuns e seus respectivos alelos, haplótipos e densidade antigênica

Variante RhD	Alelo <i>RHD</i>	Exon	Troca de Nucleotídeos	Haplótipo associado	Nº de sítios antigênicos	Referencia
D Fraco tipo 1	<i>RHD*01W.01</i>	6	809T>G	Ce	1.300	40
D Fraco tipo 2	<i>RHD*01W.02</i>	9	1154G>C	cE	500	40
D Fraco tipo 3	<i>RHD*01W.03</i>	1	8C>G	Ce	1.900	40
D Fraco tipo 4.0	<i>RHD*09.03.01</i>	4	602C>G	ce	Entre 1.872 e 1.919	37,40
		5	667T>G			
		6	809G>A			
D Fraco tipo 4.1	<i>RHD*09.04</i>	1	48G>C	ce	Entre 533 e 1.283	37,40
		4	602C>G			
		5	667 T>G			
		6	819G>A			

1.2 Fenótipos DEL

O fenótipo DEL outra variante do antígeno RhD, é caracterizado por uma significativa redução da expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária e é mais encontrado em populações asiáticas. Devido a baixa densidade antigênica, em torno de 20-40 sítios antigênicos por hemácia, essa variante é identificada como RhD negativo pelos testes sorológicos rotineiros.¹⁸ O termo "DEL" é devido ao fato dessa variante ser detectada sorologicamente somente através de testes de adsorção e eluição.⁴⁷

Os alelos *DEL* resultam de deleções em íntrons ou SNPs em sítios de splice no gene *RHD* que impedem a integração da proteína RhD na membrana eritrocitária, reduzindo sua expressão e está em geral associado aos alelos *RHCE*C* e *RHCE*E*.⁴⁸

As substituições de aminoácidos dos antígenos DEL estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD (Figura 7).⁴⁹

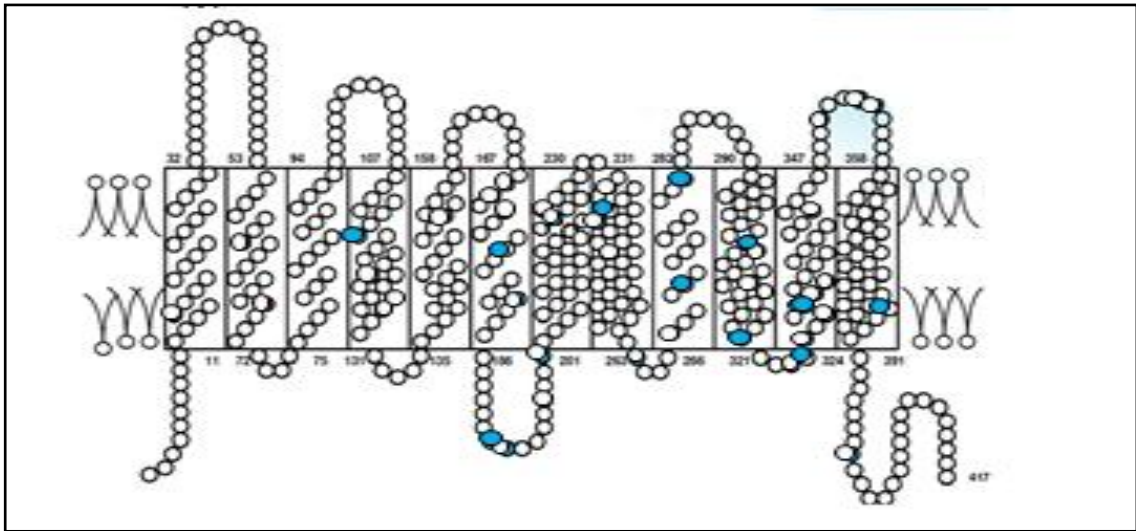


Figura 7 - Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas envolvidas nos fenótipos DEL. As substituições de aminoácidos ocorrem nas regiões transmembranares ou intracelulares da proteína. Fonte: Westhoff C.M.⁴⁹

A prevalência do alelo *RHD*DEL1* em doadores de sangue r'r e r''r da Ásia Oriental foi relatada ser entre 15-30%.^{28,47,50} Deste modo, a análise molecular *RHD G1227A*, também conhecida como *RHDK409K*, é considerada uma ferramenta essencial na prática transfusional para a detecção do fenótipo DEL em asiáticos.^{51,52}

Em populações caucasianas o alelo *RHD M295I* é o alelo *DEL* mais frequente, porém a prevalência relatada é de 1% a 2% em doadores r'r e r''r.²⁶

A literatura apresenta controvérsias em relação a imunogenocidade do antígeno DEL, porém existem relatos de formação de anti-D em receptores RhD negativos transfundidos com hemácias DEL.^{48,53} Esses relatos podem ser explicados pela classificação errônea deste fenótipo como RhD negativo. Assim, quando se identifica molecularmente o alelo *DEL* em doadores de sangue, não se recomenda transfundir esse sangue em receptores RhD-negativo.^{48,53}

1.3 Fenotipo RhD Parcial

A elevada homologia e proximidade entre os genes *RHD* e *RHCE*, facilita a ocorrência de conversão gênica em cis durante os rearranjos gênicos, através da formação de "hairpin" que leva a constituição de genes híbridos (partes do gene *RHD* em *RHCE* e vice-versa). Esse evento é responsável pela alteração na estrutura e expressão dos antígenos Rh.²² Grandes regiões de gene *RHCE* inseridos no gene *RHD* podem resultar na ausência completa do antígeno RhD na superfície da hemácia, conforme já citado sobre o gene híbrido *D-CE-DS* em africanos, mas alternativamente os eventos de conversão gênica podem resultar em alelos híbridos, que conservam alguns epítomos RhD, mas que podem, expressar novos epítomos, essas variantes são conhecidas como RhD parcial.⁵⁴ (Figura 8)

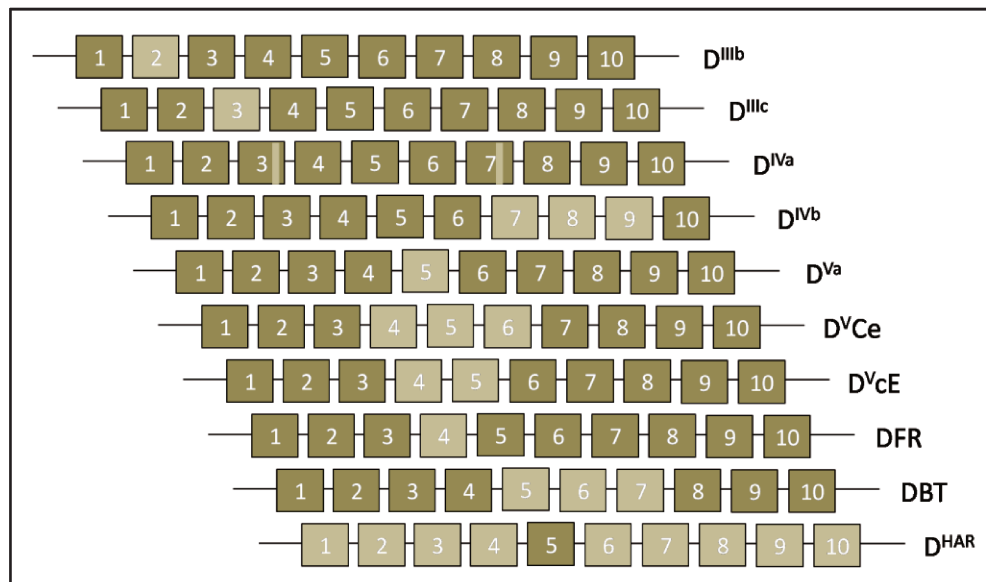


Figura 8 - Diagrama com alelos híbridos *RHD* e *RHCE*

Retângulos escuros representam éxons do gene *RHD* e os retângulos claros representam os éxons do gene *RHCE*. Fonte: Facts Book 2012⁴⁰

Além da conversão gênica, mutações de ponto também são responsáveis pela formação dos antígenos D parcial, os quais podem ocorrer em consequência à um único SNP ou através de um conjunto de SNPs.¹

As alterações responsáveis pelo fenótipo RhD, ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD⁴⁹ (Figura 9), nas alças onde estão localizados os epítomos Rh, alterando a sua conformação e a exposição dos epítomos Rh. Isto explica porque os indivíduos com fenótipo RhD parcial perdem a expressão de

alguns epítomos do antígeno RhD e podem desenvolver aloanticorpo anti-D ao entrar em contato com hemácias RhD-positivo normais.^{54,55,56}

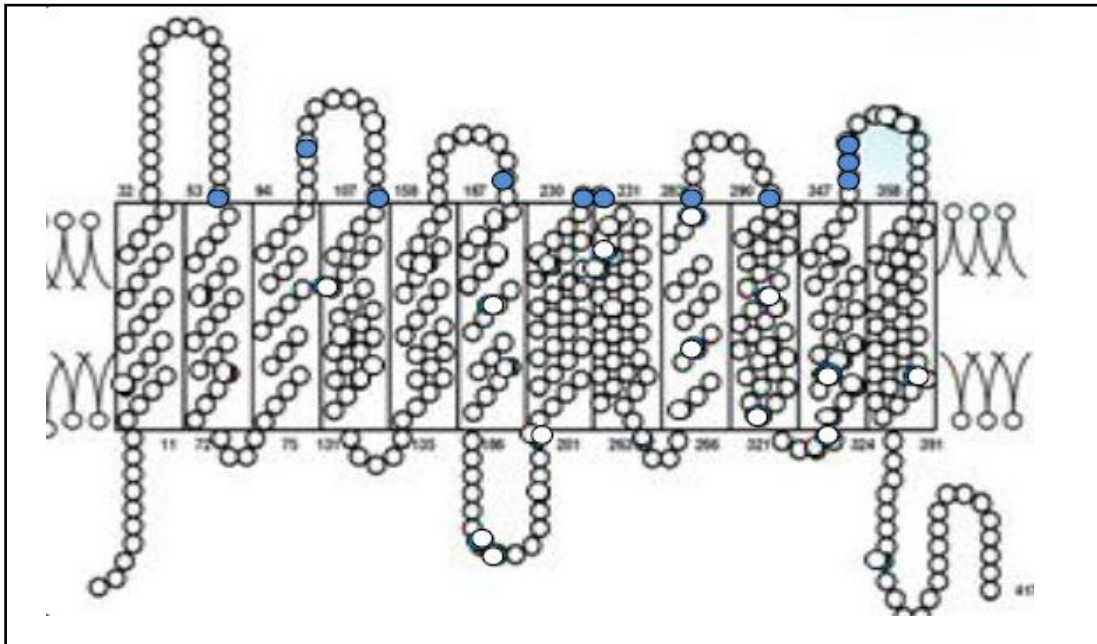


Figura 9 - Modelo da proteína RhD e as trocas de aminoácidos descritas envolvidas nos fenótipos D parciais. As substituições de aminoácidos ocorrem nas região extracelular da proteína. Fonte: Westhoff C.M.⁴⁹

Na maioria das vezes as variantes RhD parciais reagem fortemente com antissoros anti-D, no entanto, alguns apresentam uma fraca expressão. Isso ocorre pois, a densidade antigênica das variantes RhD parcial é ampla e em alguns casos estão dentro da faixa de 10.000 a 35.000 sítios antigênicos por hemácia, incluindo DIVa, DHMii e DIIIc; ou com densidades inferiores, <10.000 sítios antigênicos por hemácia como nos casos dos D parciais DVa, DVIIa, DVII, DNU.^{57,58}

Considerando a complexidade dos epítomos RhD, vários anticorpos anti-D com diferentes especificidades e afinidades foram caracterizados. Lomas e colaboradores propuseram em 1993 que haviam 9 epítomos⁵⁹, o que foi expandido para 16,⁶⁰ e posteriormente para 30, por Scott e colaboradores⁶¹ (Figura 10), demonstrando a ampla heterogeneidade sorológica dos fenótipos RhD parciais.

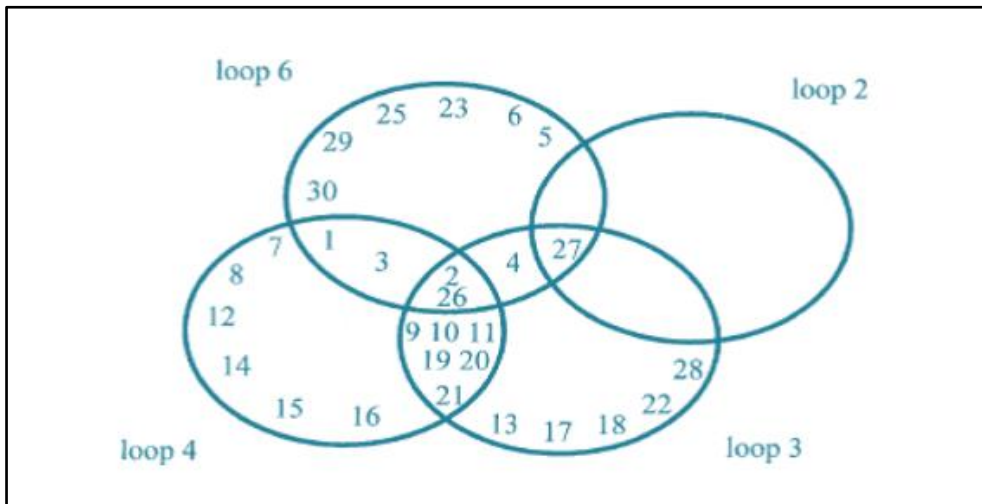


Figura 10– Posição dos epítomos RhD nos loops extracelulares descrito por Scott e colaboradores em um estudo realizado em 1996.⁶¹

A imunização anti-D não é um pré-requisito para determinar que um antígeno seja RhD parcial, pois, em muitos tipos não foram relatados casos de imunização anti-D.²⁵ Entretanto, como indivíduos com a variante RhD parcial podem desenvolver anti-D, o ideal seria que estes recebessem hemácias de doadores RhD negativos, porém na prática, a maioria destes indivíduos são fenotipados como RhD positivo e são apenas reconhecidos como variantes D parcial após produzirem anti-D.⁹

1.4 Filogenia dos alelos *RHD*

Carritt e colaboradores descreveram em 1997 os mecanismos da heterogeneidade em populações Euroasiáticas e forneceram um modelo de filogenia para os haplótipos RH.⁶² Em 2000, estes haplótipos foram reconhecidos por representar o cluster euroasiático.⁵⁷ De acordo com Wagner e Flegel, os haplótipos Rh originaram-se da evolução do haplótipo Dce (R0), este teria sofrido eventos moleculares e se dividido em cinco “clusters” RHD independentes.²²

O desenvolvimento dos anticorpos monoclonais por Kohler e Milstein em 1975 se tornaram importantes ferramentas imunoquímicas.⁶⁴ Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas produzidas por um único clone de células B, diferindo dos anticorpos policlonais por serem monoespecíficos, homogêneos e pela capacidade de serem produzidos em grande quantidade.

No início do ano de 1990, os reagentes comerciais anti-D monoclonais começaram a ser amplamente utilizados, substituindo os policlonais nos testes sorológicos. Os anticorpos policlonais eram obtidos a partir de indivíduos imunizados (ser humano ou animais) e apresentavam baixas concentrações e pouca especificidade⁶⁵ e sua produção foi sendo descontinuada devido a falta de matéria prima de origem humana.

As diferenças de reatividade na detecção das variantes RhD, têm criado uma discussão sobre quais os testes e os reagentes adequados para as rotinas de doadores de sangue e receptores. Vários indivíduos previamente classificados como D fraco apresentaram posteriormente forte aglutinação com os atuais reagentes anti-D monoclonais.⁴³

Em 2001 Wagner e colaboradores realizaram um estudo com 8442 doadores previamente classificados como RhD negativo e detectaram que 50 deles eram RhD positivo e 2 receptores foram sensibilizados.²⁶ Em 2005, Gassner e colaboradores analisaram 1700 doadores de sangue identificados como RhD negativo C e/ou E positivos e detectaram que 5 deles apresentaram o fenótipo RhD fraco.⁶⁶ Os estudos mencionados foram realizados com doadores europeus e utilizaram técnicas de biologia molecular. Em outro estudo publicado em 2007 por Kulkarni e colaboradores, realizado com a população Indiana, foram testados diversos reagentes anti-D monoclonais, e foi relatado que todos os antissoros testados não detectaram pelo menos 1 tipo de variante do antígeno RhD.⁶⁷

O significado clínico do antígeno D fraco é que a falha na identificação deste antígeno em doadores pode levar a aloimunização de receptores RhD negativo. As variantes do antígeno RhD em gestantes também possuem importância clínica devido ao risco de Doença Hemolítica do Feto e Recém-Nascido (DHFRN).⁶⁸

Como mencionado anteriormente, densidade antigênica do antígeno D fraco pode variar entre 53 a 4.000 sítios antigênicos por hemácia.⁴⁰ Isso faz com que algumas variantes com baixa intensidade não sejam detectadas em testes sorológicos, nem mesmo no teste indireto em AGH. Nas variantes D parciais a densidade antigênica também é variada, de 200 a 26.900 antígenos por hemácia, como antígenos RhD normais apresentam densidade antigênica entre 10.000 a 25.000 sítios por hemácia, muitos tipos de D parciais podem ser classificados como RhD normais ou como RhD fracos.⁴⁰

A ocorrência das variantes RhD está relacionada com a etnia. Cerca de 0,2% a 1% dos indivíduos caucasianos europeus apresentam diminuição da expressão do antígeno D.⁶⁹ Essa situação ainda é mais complexa em africanos: a ocorrência de variantes RhD parciais e aloimunização em indivíduos RhD-positivos é muito mais frequente do que em europeus.

Nos últimos anos, o sistema Rh se revelou bem mais complexo na prática, sendo de suma importância a sua correta caracterização. A diversidade antigênica das hemácias humanas² com a sua geo-distribuição heterogênea fazem com que a gama de reagentes disponíveis no mercado não atenda todas as necessidades da demanda transfusional, pois nenhuma combinação de reagentes é capaz de detectar todas as variantes RhD.⁶⁷

No Brasil, devido ao alto grau de miscigenação da população, uma grande variedade de alelos RHD são encontradas⁴⁴ o que aumenta a complexidade e dificulta a classificação das variantes. O ideal para a rotina de doadores de sangue seria utilizar uma combinação adequada de antissoros que detectassem a maioria das variantes do antígeno RhD, em especial, as variantes com baixa densidade antigênica, garantindo maior segurança transfusional e prevenindo assim a aloimunização ao antígeno RhD, reduzindo o risco de doença hemolítica do feto e recém nascido e reações transfusionais hemolíticas.⁷⁰

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar através da utilização de diferentes técnicas e clones variados de antissoros anti-D uma estratégia para detecção de variantes RhD em doadores de sangue.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar as intensidades de aglutinação obtidas com diversos clones de antissoros anti-D utilizando diferentes técnicas:

Hemaglutinação em tubo

Hemaglutinação em gel

Hemaglutinação em microplaca em equipamento automatizado

Fase Sólida em equipamento automatizado

Caracterizar por técnicas de biologia molecular amostras de DNA de doadores de sangue que apresentarem discrepâncias na tipagem RhD ou fraca expressão do antígeno D.

Verificar as associações entre os achados moleculares e os resultados sorológicos.

Realizar *feedback* de doadores de repetição inseridos no estudo, com resultados divergentes e estabelecer quais as variantes envolvidas nas discrepâncias de tipagens RhD

3 Materiais

3.1 Fluxograma do Estudo

O estudo foi realizado com amostras de doadores de sangue caracterizadas como RhD fraco. Essas amostras apresentaram reações <4+ em leitura imediata (L.I) pelo método de aglutinação em microplaca (MC) e foram submetidas à testes confirmatórios em fase sólida (F.S). Essas metodologias são utilizadas na rotina de tipagem ABO/Rh(D) de doadores e são realizadas em equipamento automatizado. Adicionalmente as amostras selecionadas foram submetidas à testes manuais para tipagem RhD em tubo e gel, utilizando diversos clones anti-D. Todas as amostras selecionadas, foram submetidas à testes moleculares para identificação da variante *RHD*. O fluxo detalhado do estudo está descrito abaixo (Figura 12)

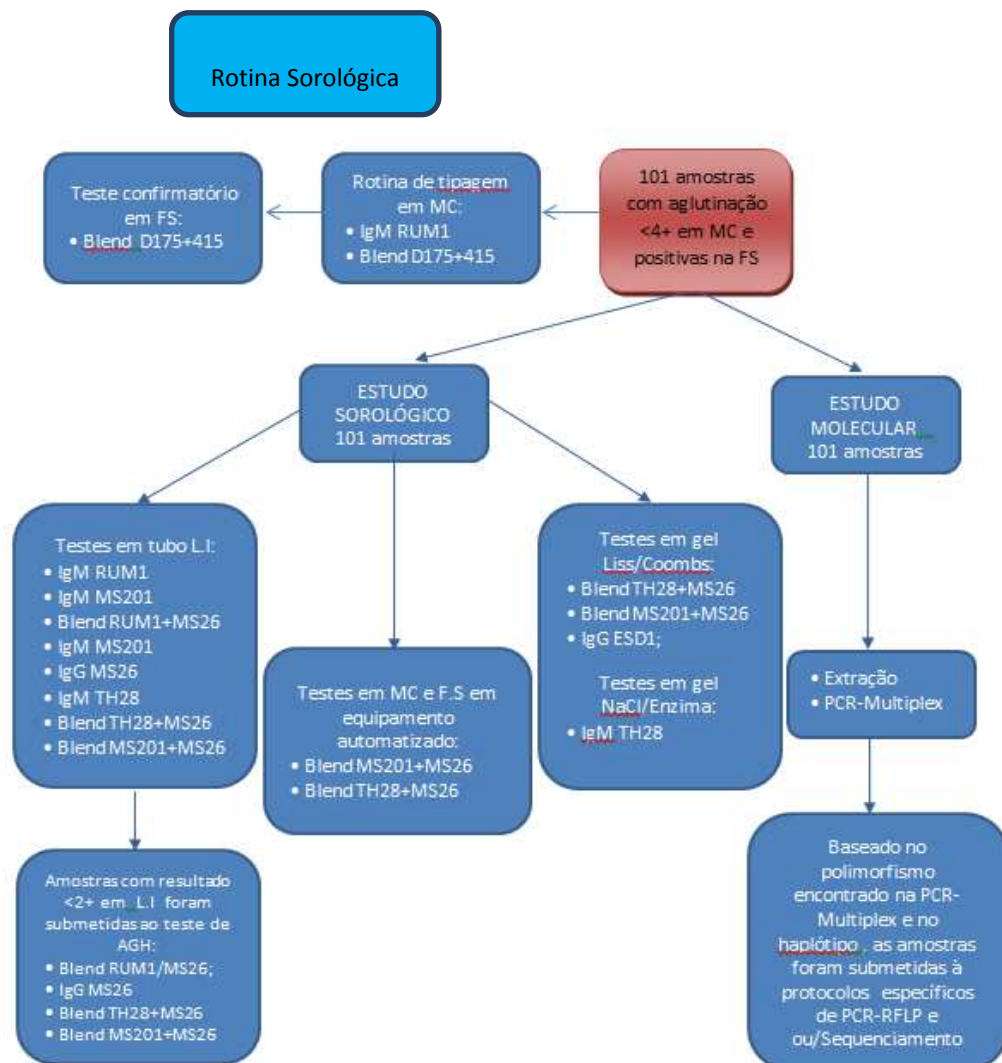


Figura 12– Fluxograma do estudo

3.2 Casuística

3.2.1 Amostras de sangue de doadores voluntários de sangue

Após parecer do comitê de ética nº1.616.418, foram selecionadas 101 amostras de doadores voluntários de sangue da Colsan - Associação Beneficente de Coleta de Sangue que apresentaram fraca expressão ou discrepâncias na tipagem RhD de um total de 123.000 doadores abrangendo o período de novembro de 2013 até agosto de 2014. As amostras foram coletadas em tubos contendo anticoagulante e o *buffy coat* foi separado para extração de DNA.

3.3 Materiais

3.3.1 Antissoros anti-D

Foram selecionados todos os antissoros anti-D disponíveis no mercado brasileiro. Esses reagentes são preparados à partir de sobrenadantes de culturas celulares, contendo anticorpos monoclonais IgM e IgG com especificidade anti-D.

- Monoclonal IgM clone TH28 + IgG clone MS26 (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil)
- Monoclonal IgM clone MS201 + IgG clone MS26 (Diamed, Cressier, Switzerland)
- Monoclonal IgG clone ESD1 (Diamed, Cressier, Switzerland)
- Monoclonal IgM clone TH28 (Diamed, Cressier, Switzerland)
- Monoclonal IgM clone RUM-1 (Lorne Laboratories, Berkshire, UK)
- Monoclonal IgM clone MS-201 (Lorne Laboratories, Berkshire, UK)
- Monoclonal IgM clone RUM-1 + IgG clone MS-26 (Lorne Laboratories, Berkshire, UK)
- Monoclonal IgM clone MS201 (Fresenius, São Paulo, Brasil)
- Monoclonal IgG clone MS26 (Fresenius, São Paulo, Brasil)
- Monoclonal IgM clone RUM-1 (Immucor, Med.Diagnostik, Rodermark, Germany)
- Monoclonal IgM clone D175 + IgG clone D415 (Immucor-Dominion Biologicals, Nova Scotia, Canada)
- Monoclonal IgM clone MS201 + IgG MS26 (Immucor Inc. Norcross, GA, USA)
- Monoclonal IgM clone TH28 + IgG MS26 (Immucor, Inc. Norcross, GA, USA)

3.3.2 Antissoros Controle de Rh

Foi utilizado o controle Rh do mesmo fabricante do(s) antissoro(s) anti-D IgG e blend descritos no ítem anterior.

- DiaClon Rhesus Control (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil)
- Anti-D Monoclonal Control (Lorne Laboratories, Berkshire, UK)
- Controle Rh para anti-D IgG (Fresenius, São Paulo, Brasil)
- Novaclone™ Diluent Control (Immucor-Dominon Biologicals, Nova Scotia, Canada)

3.3.3 Antissoros para fenotipagem Rh estendida

Os reagentes descritos abaixo detectam os antígenos C, c, E, e do sistema Rh através de leitura imediata (L.I) e foram utilizados na confirmação destes antígenos em todas as amostras do estudo.

- Monoclonal anti-C IgM clone MS273 (Immucor Med.Diagnostik, Rodermark, Germany)
- Monoclonal anti-c IgM clone MS33 (Immucor Med.Diagnostik, Rodermark, Germany)
- Monoclonal anti-E IgM clone MS258+MS80 (Immucor Med.Diagnostik, Rodermark, Germany)
- Monoclonal anti-e IgM clone MS16+MS21+MS63 (Immucor Med.Diagnostik, Rodermark, Germany)

3.3.4 Microplaca para tipagem Rh(D)

Para a tipagem RhD em equipamento automatizado foi utilizada a MC com 96 poços, fundo em U, transparente com código de barras da (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)

3.3.5 Solução de Diluição para testes em microplaca no equipamento NEO® Immucor

A Solução aditiva isotônica Galileo Diluent (Immucor Med.Diagnostik, Rodermark, Germany) é utilizada em todos os testes de hemaglutinação no preparo da suspensão de hemácias que é utilizada nas reações com antissoros reagentes.

3.3.6 Microplaca para testes em F.S

A MC Capture-R®Select (Immucor, Norcross, GA, USA) possui poços modificados para a imobilização de eritrócitos humanos. Utilizada em ensaios em F.S, para a detecção de anticorpos IgG contra os antígenos correspondentes.

3.3.7 Reagente potencializador para testes em F.S

O reagente Capture®LISS (Immucor, Norcross, GA, USA) LISS (*Low Ionic Strength Solution*) é um potencializador de baixa força iônica.

3.3.8 Hemácias Indicadoras para testes em F.S

O reagente de hemácias indicadoras sensibilizadas com anti-IgG, Capture-R Ready Indicator Red Cells (Immucor, Norcross, GA, USA) foram utilizados na detecção de anticorpos anti-eritrocitários de classe IgG em testes de F.S.

3.3.9 Soro Antiglobulina Humana

Para o teste confirmatório em tubo, foi utilizado o Soro de Coombs BSA® (Fresenius, São Paulo, Brasil), um reagente monoespecífico preparado à partir de soros de coelho e/ou cabra previamente imunizados à fração gamaglobulina do soro humano.

3.3.10 Hemácias Controle de Coombs

Utilizado ao final do teste de AGH para assegurar o processo de lavagem e a presença do soro antiglobulina humana, o Coombs control IgG (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil) é um reagente de hemácias à 4% de origem humana, sensibilizadas com IgG e foi utilizado ao final do teste confirmatório do antígeno RhD em fase de AGH.

3.3.11 Cartões Gel LISS/Coombs

Esse cartão com 6 microtubos ID-Gel Liss/Coombs (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil), contém reagente polisspecífico AGH (anti-IgG de coelho e anti-C3d monoclonal, linhagem celular C139-9) suspensos em gel.

3.3.12 Cartões gel Neutro

Esse cartão ID-Gel NaCl/Enzima (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil) possui 6 microtubos com gel neutro.

3.3.13 Solução de diluição para testes em gel

Para testes em cartões ID-Gel NaCl/Enzima foi utilizado o ID-Diluyente 1 (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil) que é uma solução de bromelina modificada para suspensões de hemácias; para testes em ID-gel Liss/Coombs foi utilizado o ID-Diluyente 2 (Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brasil), para suspensões de hemácias.

3.3.14 Tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA) 10X

Este tampão foi preparado, dissolvendo-se 242 g de Tris (Sigma Chemical CO ® St Louis,), 57,1 g de ácido acético glacial (Sigma Chemical CO ®, St Louis) e 100 mililitros(ml) de EDTA 0,5 M, pH8.0 (Sigma Chemical CO ®, St Louis), em 1000 ml de água deionizada e destilada (ddH₂O).

3.3.15 Agarose para eletroforese

Ultra Pure™ Agarose Invitrogen (Invitrogen®, Carlsbad, CA) foi utilizada para preparação do gel em diferentes concentrações, de acordo com cada protocolo. O gel de agarose é a matriz na qual é aplicada uma amostra e que permite realizar a separação de moléculas, conforme o seu tamanho, forma ou carga.

3.3.16 Kit de extração de DNA

Foi utilizado o kit QiAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) que contém colunas de centrifugação, buffers e tubos de coleta para purificação baseada em membrana de sílica.

3.3.17 Taq DNA Polimerase

A enzima com atividade DNA polimerase Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) foi utilizada nas reações em cadeia da polimerase, *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

3.3.18 Enzimas de restrição

As enzimas de restrição utilizadas para digestão dos produtos de PCR estão descritas no Tabela 5 e foram obtidas das empresas: (Fermentas, Hanover, MD); (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) e (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

3.3.19 Deoxinucleotídeos (dNTP)

Os nucleotídeos dATP, dGTP, dCTP e dTTP foram obtidos da Invitrogen®, Carlsbad, CA e foram utilizadas nas técnicas de PCR convencional na concentração de 10mM.

3.3.20 Primers

Os primers utilizados nos protocolos de PCR convencional e sequenciamento de DNA, foram obtidos da empresa Invitrogen®, Carlsbad, CA e estão descritos nas tabelas 5 e 6.

3.3.21 Corante para DNA

Foi utilizado o Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc, Hayward, CA) um corante fluorescente de ácido nucleico para coloração do produto da PCR em gel de agarose.

3.3.22 Enzimas para purificação da PCR

Foram utilizadas para purificar a reação de PCR as enzimas Exonuclease I (USB® Products Affymetrix, Inc, Cleveland, Ohio, USA) e Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP (Fermentas, Hanover, MD).

3.3.23 Dideoxynucleotídeos

Para reação de sequenciamento foram utilizados dideoxynucleotídeos presentes no kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3.24 Kit de purificação da reação de sequenciamento

Para purificação da reação de seqüenciamento foi utilizado o BigDye X-Terminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.3.25 Polímero

Para eletroforese capilar foi utilizado polímero POP-7™ Polymer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

3.3.26 Marcador Molecular

Foi utilizado o marcador molecular de 100pb obtido da (LGC Biotecnologia São Paulo, SP, Brasil)

3.3.27 Preparo do tampão (TAE) 10X

Foi preparado dissolvendo-se 48,4 g de Tris, 11,42 ml de ácido acético glacial e 20 ml de EDTA 500mM pH=8 em 1 litro de água destilada.

3.3.28 Preparo do gel de agarose

A solução de agarose foi preparada em TAE 10x de acordo com a concentração específica de cada protocolo (2% ,4%).Esta solução era aquecida em forno e microondas, durante 1 minuto e, após resfriamento, adicionava-se 50 µg de Gel Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc, Hayward, CA).

4 Métodos

4.1 Testes Sorológicos

As amostras selecionadas foram analisadas sorologicamente em 3 métodos:

- Ensaio automatizado no equipamento NEO® Immucor: metodologia que é utilizada na rotina de testes sorológicos de doadores. Além dos clones utilizados na rotina, as amostras foram analisadas em L.I pela técnica de MC com mais dois antissoros anti-D Blend Immucor. Esses antissoros também foram utilizados nos testes confirmatórios em equipamento automatizado pelo teste em F.S.
- Teste manual em tubo: realizado com oito reagentes anti-D comercialmente disponíveis de diferentes fabricantes (Lorne, Fresenius e Bio-Rad). As amostras com reatividade <2+ em L.I, foram submetidas à testes confirmatórios para determinar a presença do fenótipo RhD fraco que incluíram o teste em fase de AGH.
- Gel-Liss: realizado com 2 antissoros anti-D Blend Bio-Rad previamente testados em tubo e um antissoro anti-D IgG Bio-Rad utilizado somente em GT. Gel neutro: realizado com 1 antissoro IgM Bio-Rad previamente testado em tubo.

Os protocolos foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. As tecnologias e clones utilizados na análise sorológica estão apresentados na Tabela 2

Tabela 2 Técnicas e clones utilizados nas análises sorológicas do antígeno RhD

Método	Fabricante	Anti-DIgM	Anti-D IgG	Anti-D IgM+IgG
Tubo-Manual	Lorne	RUM-1, MS-201	-	RUM-1/MS-26
Tubo-Manual	Fresenius	MS-201	MS-26	—
Tubo-Manual	Bio-Rad	TH-28	—	TH28+MS-26, MS201+MS26
Gel-Liss-Manual	Bio-Rad	—	ESD1	TH28+MS-26, MS201+MS26
Gel NaCl Enzima-Manual	Bio-Rad	TH-28	—	—
Aglutinação em Microplaca-Automação	Immucor	RUM-1	—	D175+415,MS201+MS26,TH28+MS26
Fase Sólida-Automação	Immucor	—	—	D175+415,MS201+MS26,TH28+MS26

4.1.1 Tipagem RhD em equipamento automatizado

A rotina de tipagem RhD foi realizada no equipamento NEO® Immucor, que utiliza MC, reagentes e amostras de sangue e executa testes pré selecionados.

O teste de hemaglutinação em MC em equipamento automatizado utiliza o mesmo princípio da hemaglutinação em tubo, porém em uma superfície menor. A tipagem RhD foi realizada em MC utilizando os antissoros da rotina: anti-D rapid (IgM RUM-1) e anti-D Blend: (IgM D175+IgG D415). Adicionalmente foram utilizados os clones MS201+MS26 e TH28+MS26.

O protocolo do teste baseia-se na diluição de 53 microlítros (µl) de sedimento de hemácia em 313 µL de Galileo Diluent seguido de incubação (6 minutos à 20°C) com 10 µL de anti-D. Após a incubação, seguiram-se as etapas de centrifugação, leitura e interpretação dos resultados.

A leitura da aglutinação é realizada por câmeras que capturam a imagem pela parte inferior da MC. O software NEO calcula um valor de reação para cada poço e atribui um resultado com base em critérios pré-definidos, associados ao valor calculado da reação. O equipamento utiliza um software para conduzir a mecânica e o processamento de dados.

Todas as funções do equipamento são totalmente automatizadas, incluindo: manipulação de amostras e reagentes, pipetagem, incubação, lavagem, agitação, centrifugação, leitura e interpretação dos resultados. A interpretação dos resultados ABO/RhD realizado pelo equipamento automatizado está descrito na Figura 13.

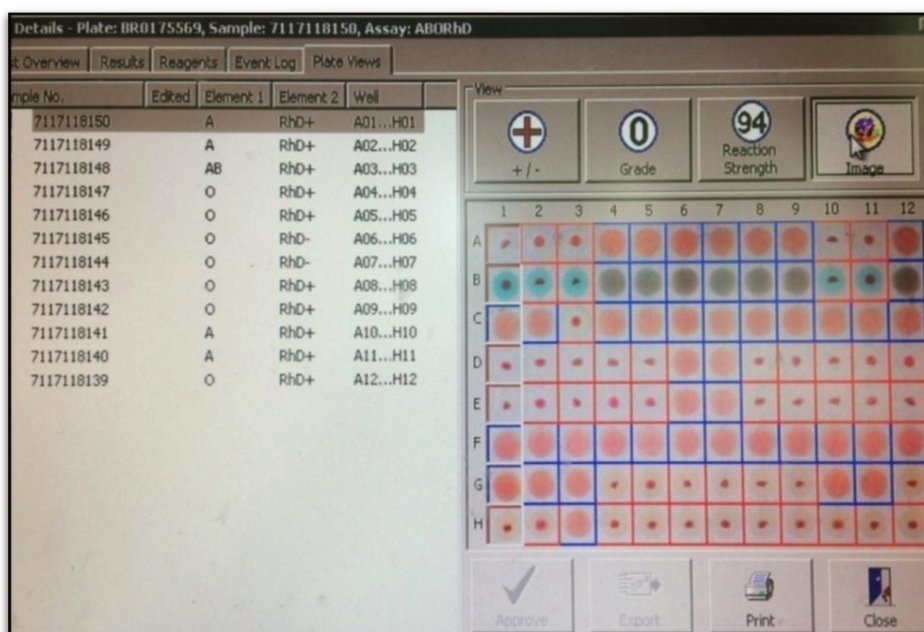


Figura 13—Tipagem ABO/RhD pelo método de aglutinação em MC realizado no equipamento Neo@ImmuCor

4.1.2 Teste confirmatório do antígeno RhD em equipamento automatizado

As amostras com resultados negativos ou <4+ de aglutinação em MC, foram confirmadas pelo método de F.S em placas Capture-R®Select. O teste de Capture-R é baseado nos procedimentos de Plapp e colaboradores.⁷¹ Os glóbulos vermelhos são inicialmente ligados às superfícies dos poços de teste de microtitulação em polistereno. Após incubação, as imunoglobulinas residuais livres são removidas dos poços por lavagem e é adicionada uma suspensão de glóbulos vermelhos indicadores sensibilizados com anti-IgG. A centrifugação vai possibilitar o contato dos glóbulos vermelhos indicadores com os anticorpos ligados aos glóbulos vermelhos imobilizados na MC. No caso de um teste positivo, a migração dos glóbulos vermelhos indicadores para o fundo do poço é impedida, devido à formação de complexos anti-IgG-IgG. Na ausência de interações detectáveis antígeno-anticorpo (teste negativo), os glóbulos vermelhos indicadores não se ligam aos

glóbulos vermelhos imobilizados e aglomeram-se no fundo dos poços, como botões fortemente compactados.

O protocolo deste teste consiste em adicionar em uma MC(Capture-R®Select uma suspensão de 70 µL de diluente (System Liquid) com 3 µL de hemácias) Após breve centrifugação e lavagem, 10 µl de anti-D IgM+IgG (IgM clone D175 e IgG clone D415) e 50 µl de LISS são pipetados. Após incubação de 15 minutos à 37°C e lavagem, adiciona-se a célula indicadora (Capture–R Indicator Red Cells), e, após centrifugação, realiza-se a leitura e interpretação dos resultados no equipamento Neo.

De acordo com o fabricante as características de desempenho do sistema de teste Capture-R Select foram estabelecidas em avaliações paralelas com o Capture-R Modificado e métodos de hemaglutinação em tubo. Os resultados destes estudos demonstram que o teste Capture-R Select tem uma especificidade e sensibilidade semelhantes, quando são testadas amostras conhecidas que contêm anticorpos IgG específicos para os antígenos eritrocitários.

Em paralelo ao protocolo de rotina, foram utilizados também os clones MS201+MS26 e TH28+MS26 Immucor para confirmação. As etapas de leitura e interpretação de resultados estão descritas no item 4.1.1. Os resultados do teste confirmatório em F.S estão descritos na Figura 14



Figura 14 – Teste confirmatório de RhD pelo método de F.S realizado no equipamento Neo® Immucor

4.1.3 Fenotipagem para os antígenos C, c, E, e em equipamento automatizado

As amostras com fraca expressão do antígeno RhD foram submetidas ao protocolo de fenotipagem dos antígenos C, c, E, e para a determinação do haplótipo Rh. A fenotipagem estendida foi realizada em MC no equipamento automatizado NEO®.

O protocolo deste teste baseia-se na adição de uma suspensão de 314 µL de Galileo Diluent com 4 µL de sedimento de hemácia e, 10 µl de cada antissoro anti-C,-c,-E –e em uma MC. Após breve incubação (5 minutos à 20º C), realiza-se centrifugação e posterior leitura e interpretação. As etapas de leitura e interpretação de resultados estão descritas no item 4.1.1.

4.1.4 Tipagem RhD em tubo

Todas as amostras foram submetidas ao protocolo de tipagem RhD em tubo, conforme descrito no Tabela 2. As reações negativas ou <2+ foram confirmadas em fase de AGH.

Teste manual em tubo (L.I.)

Para cada amostra analisada, foram identificados 2 tubos com o número da amostra do doador: 1 anti-D, 1 Controle de Rh (ctrh) quando necessário. Após identificação dos tubos 50µL das hemácias em teste a 5% em solução salina 0,9%, foram adicionadas com 50µL do antissoro anti-D e 50µL de ctrh nos respectivos tubos. Os tempos de incubação em temperatura ambiente (T.A) foram seguidos de acordo com o protocolo de cada fabricante e; após incubação, os tubos foram homogeneizados e posteriormente centrifugados por 15 segundos à 3200 rpm (rotações por minuto). A leitura das reações foi realizada em aglutinoscópio por um único observador e a intensidade de aglutinação (0 a 4+) foi registrada. Figura 15A.

Teste confirmatório em tubo (AGH)

As amostras com reações <2+ foram incubadas a 37°C em banho-maria e, após incubação, as hemácias foram lavadas 3 vezes com solução fisiológica e o sobrenadante totalmente decantado. Adicionou-se 50µL de soro anti-IgG e após

centrifugação por 15 segundos à 3200 rpm, foi realizada a leitura e interpretação dos resultados. A leitura das reações foi realizada em aglutinoscópio por um único observador e a intensidade de aglutinação (0 a 4+) foi registrada. Figura 15B.

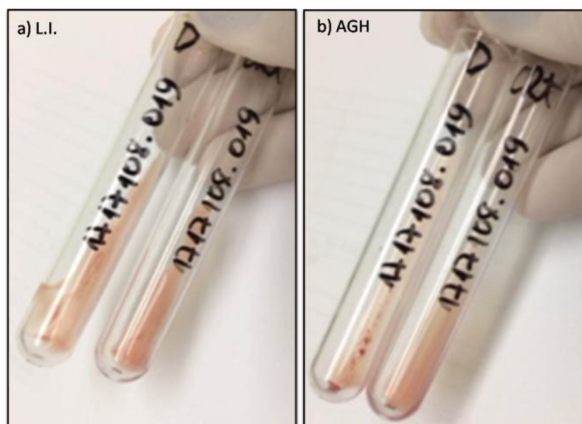


Figura 15 - Teste de tipagem RhD e controle de Rh pelo método em tubo,

15 a) L.I com resultado negativo.

15 b) Em fase de AGH com presença de fraca aglutinação do antígeno RhD.

Os resultados em L.I e fase de AGH foram visualizados e classificados de acordo com o grau de hemaglutinação, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 Classificação das reações de hemaglutinação em tubo de acordo com as intensidades

++++	Botão Sólido
+++	Grumos grandes
++	Grumos pequenos
+	Grumos muito pequenos
W	Sem grumos a olho nú
Negativo	Hemácias suspensas

4.1.5 Tipagem RhD em gel NaCl/Enzima

Todas as amostras foram submetidas ao protocolo de tipagem RhD em gel Enzima/NaCl, conforme descrito na Tabela 2.

Cada amostra analisada foi identificada com seu respectivo número em 2 microtubos de gel Enzima/NaCl ; o primeiro para o antissoro anti-D, o segundo para o respectivo controle. Após identificação dos cartões, 50 µL das hemácias a 0,8% em diluente 1 e 25 µL do anti-soro anti-D foram adicionados aos tubos contendo gel

neutro. Após incubação de 15 min em T.A os cartões foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos.

Os resultados foram visualizados por um único observador e classificados de acordo com o grau de hemaglutinação, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 Classificação das reações de hemaglutinação em gel de acordo com as intensidades

Intensidade de Hemaglutinação	
++++	Faixa de glóbulos vermelhos aglutinados na parte superior da coluna
+++	Faixa superior de aglutinações, de tamanho médio na metade superior da coluna
++	Aglutinações de tamanho pequeno ou mediano na extensão da coluna
+	Algumas aglutinações de tamanho pequeno na coluna
W	Escassas aglutinações de tamanho pequeno na metade inferior da coluna
Negativo	Faixa de glóbulos vermelhos no fundo e na parte restante da coluna sem aglutinações visíveis

4.1.6 Tipagem RhD em gel Liss Coombs

Todas as amostras foram submetidas ao protocolo de tipagem RhD em gel Liss Coombs, conforme descrito no Tabela 2.

Após identificação dos cartões, 50 µL das hemácias a 0,8% em diluente 2 e 25 µL do anti-soro anti-D foram adicionados aos tubos contendo gel e soro antiglobulina humana. Após incubação a 37 °C por 15 minutos, os cartões foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. A leitura das reações foi realizada de acordo com os padrões de aglutinação em GT.

A leitura das reações foi realizada visualmente e a intensidade de aglutinação (0 a 4+) foi registrada. Figura 16. Os resultados foram visualizados por um único observador e classificados de acordo com o grau de hemaglutinação, conforme descrito na Tabela 4.



Figura 16 - Teste de tipagem RhD e controle de Rh pelo método de aglutinação em gel Liss/Coombs. A primeira amostra apresentou reação de aglutinação fraca (1+), a segunda amostra apresentou reação mais intensa (3+), o controle de Rh se manteve negativo validando a reação.

4.2 Testes Moleculares

4.2.1 Extração de DNA

As amostras incluídas neste estudo foram investigadas molecularmente para a identificação da variante RhD. Para isso, foi realizada a extração de DNA a partir de 200 μ L de *buffy coat* utilizando o DNA blood mini kit (QIAamp, Qiagen, Inc., Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi estimada no equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermalCycler, Uniscience Inc., São Paulo, SP, Brazil) e as amostras foram armazenadas em freezer -20°C .

4.2.2 PCR-Multiplex

Inicialmente todas as amostras foram submetidas a uma reação de PCR multiplex, com amplificações dos éxons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene *RHD*, através de um protocolo adaptado de Maaskant *et al.*⁷² A técnica de PCR multiplex foi realizada para um volume final de 12,5 μ L, contendo 100ng de DNA, 0,65U de Taq Platinum Polimerase e tampão apropriado suplementado com 2mM de MgCl_2 , 0,2mM de cada

dNTP e concentrações variadas dos primers. A reação foi submetida às seguintes condições: denaturação prévia de 95°C por 15min, seguida de 32 ciclos de 95°C por 15 min, 55,6°C por 1 min e 72°C por 45 seg, e uma extensão final de 72°C por 10 min. O produto foi visualizado em gel de agarose 4%. Figura 17.

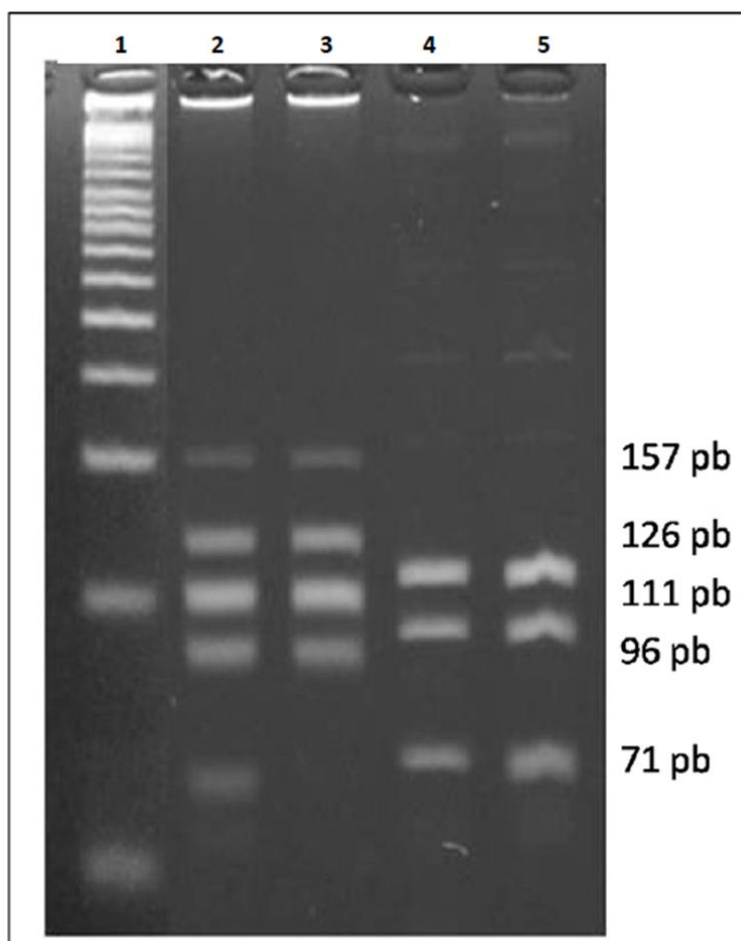


Figura 17 PCR Multiplex em gel de agarose à 4%. Amplificação dos exons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene *RHD*.
 Linha 1 Marcador molecular de 50pb
 Linha 2 indica a amplificação dos exons 5, 4, 3, 7 e 9
 Linha 3 amplificação dos exons 5, 4, 3 e 7
 Linhas 4 e 5 indicam a amplificação dos exons 4, 3 e 9

Esta reação nos permitiu identificar os seguintes polimorfismos: 455A>C, 602 C>G, 667 C>G, 1048 G>C e 1154 G>C. Estes polimorfismos são encontrados em diferentes variantes, portanto baseando-se no resultado da PCR multiplex e no haplótipo previamente fenotipado (CcEe) direcionamos a investigação a protocolos específicos de PCR-RFLP e/ou seqüenciamento de éxons específicos conforme descrito por Arnoni e colaboradores.⁷³

4.2.3 PCR-RFLP

A PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), foi realizada para genotipagem dos antígenos RhD fracos, tipo 1, tipo 2 e tipo 3, e os parciais DAR e DAU. Os primers e as enzimas de restrição utilizadas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 Sequencia de primers, temperatura de annealing e enzimas de restrição das reações de PCR-RFLP para identificação do gene RHD

Troca	Exon	Variante RHD		Sequencia de Nucleotídeos	Temp	Enzima de Restrição
8C>G	1	D Fraco tipo 3	Sense Antisense	ATAGAGAGGCCAGCACAA AGAAGATGGGGGAATCTTTTCCT	63°C	<i>SacI</i>
48G>C	1	DAR4.1	Sense Antisense	TCCATAGAGAGGCCAGCACAA GCTATTTGCTCCTGTGACCACTT	62°C	<i>ApaI</i>
744C>T	5	DAR1.2	Sense Antisense	TAAGCACTTCACAGAGCAGG TATGTGTGCTAGTCCTGTTAGAC	60°C	<i>BtsI</i> mutl
809T>G	6	D Fraco tipo 1	Sense Antisense	AGATGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGTGCACCT CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	62°C	<i>ApaLI</i>
835G>A	6	DAU3 DAU4	Sense Antisense	AGATGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGTGCACCT CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	62°C	<i>NlaIII</i>
957G>A	7	DAR1.1 DAR1.2 DAR2.1	Sense Antisense	CATCCCCCTTTGGTGGCC AAGGTAGGGGCTGGACAG	64°C	<i>BseYI</i>
998G>A	7	DAU2 DAU6 DAU7	Sense Antisense	CTTCATTTCAACAACTCCCCGA GTGATAAATCCATCCAAGGTAGGGGCCGGCCAGAAT	56°C	<i>AclI</i>
1136C>T	8	DAU	Sense Antisense	CTGGAGGCTCTGAGAGGTTGAG CATAGACATCCAGCCACACGGCA	62°C	<i>NlaIII</i>
1154G>C	9	D Fraco tipo 2	Sense Antisense	TGAGATACTGTCGTTTGACACACAATACTTC GTTTTACTCATAAACAGCAAGTCAACATATATCCT	55°C	<i>AluI</i>

A PCR foi padronizada para um volume final de 12,5 µL, contendo 100ng de DNA, 0,5U de Taq Platinum Polimerase e tampão apropriado suplementado com 2mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP e 0,2uM de primer. A reação foi padronizada de acordo com a temperatura de anelamento de cada primer descrito na Tabela 5.

O produto foi visualizado em gel de agarose 2%. Após avaliar a eficiência da PCR foi realizada a digestão enzimática conforme orientado pelo fabricante. Figura 18.

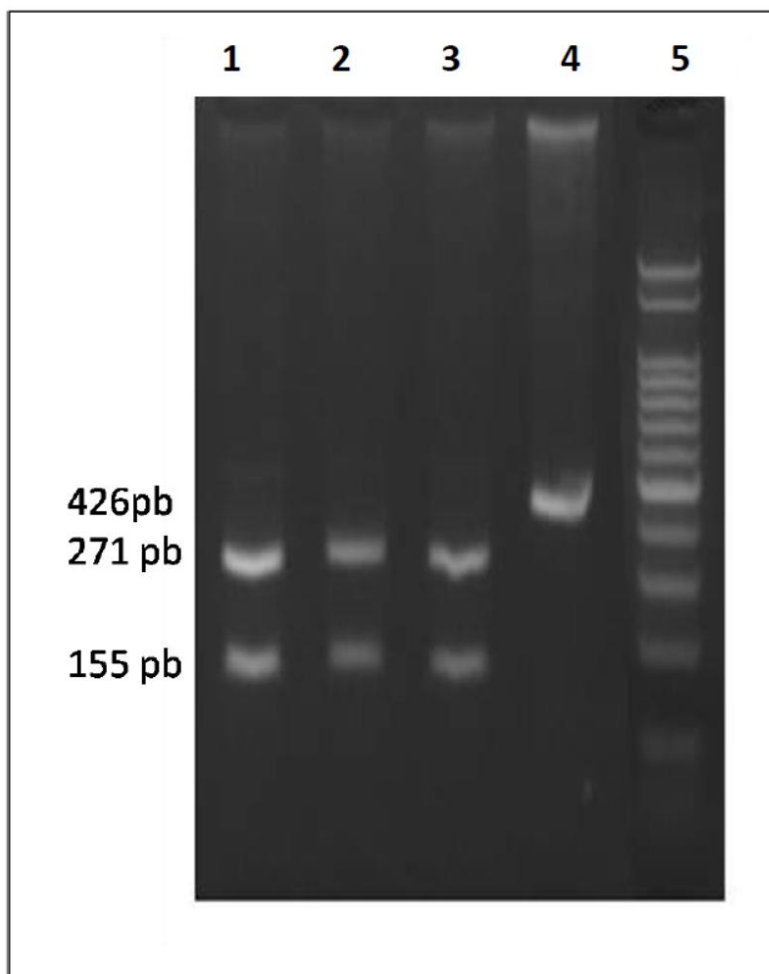


Figura 18 - PCR RFLP em gel de agarose à 2% Identificação de uma variante RhD fraco tipo 3.
 Linhas 1, 2 e 3, amplificação de 271 pb e 155 pb, o que não caracteriza a variante RhD fraco tipo 3
 Linha 4 amplificação de 426 pb, caracterizando a variante RhD fraco tipo 3
 Linha 5 marcador de peso molecular de 100pb

4.2.4 Sequenciamento

Inicialmente foi realizada a PCR para amplificação dos éxons do gene *RHD* utilizando os primers descritos na Tabela 6. A reação teve 12,5 µl de volume final, contendo 100ng de DNA, 0,4uM de primer e 6,25µl de 2X PCR Master Mix. e foi realizada sob as seguintes condições: denaturação prévia de 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos de 92°C por 20 seg, temperatura de anelamento específica por 30 seg e 72°C por 90 seg, e uma extensão final de 72°C por 5 min.

Tabela 6 Primers para amplificação do gene RHD e sequenciamento

Exon	Sequencia de Nucleotídeos	Produto
Exon1-s Exon1-a Exon1-seq	TCAACTGTGTAAGTATGAGGAGTCAG GCTATTTGCTCCTGTGACCACTT TCCATAGAGAGGCCAGCACAA	767 pb
Exon2-s Exon2-a Exon2-seq	TGACGAGTGAAACTCTATCTCGAT GGCATGTCTATTTCTCTGTCTAAT CCTGGATTCTTGTGATACACG	1602 pb
Exon3-s Exon3-a Exon3-seq	GTCGTCCTGGCTCTCCCTCTCT CTTTTCTCCCAGGTCCTCCT GGTCCCTCCTCCCAGCAC	219 pb
Exon4-s Exon4-a Exon4-seq	GCCGACACTCACTGCTCTTAC TGAACCTGCTCTGTGAAGTGC GGGAGATTTTTTCAGCCAG	378 pb
Exon5-s Exon5-a Exon5-seq	TAAGCACTTCACAGAGCAGG TATGTGTGCTAGTCCTGTTAGAC TAAGCACTTCACAGAGCAGG	516 pb
Exon6-s Exon6-a Exon6-seq	CAGGGTTGCCTTGTTCCCA CTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG CTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG	274 pb
Exon7-s Exon7-a Exon7-seq	CATCCCCCTTTGGTGGCC AAGGTAGGGGCTGGACAG GTCTCACCTGCCAATCTGCT	405 pb
Exon8-s Exon8-a Exon8-seq	CTGGAGGCTCTGAGAGGTTGAG CATAGACATCCAGCCACACGGCA CTGGAGGCTCTGAGAGGTTGAG	516pb
Exon9-s Exon9-a Exon9-seq	TGCAGTGAGCCGAGGTCAC CACCCGCATGTCAGACTATTTGGC GAGATTAAAAATCCTGTGCTCCAAAC	697 pb
Exon10-s Exon10-a Exon10-seq	CAAGAGATCAAGCCAAAATCAGT AGCTTACTGGATGACCACCA CAGTCTGTTGTTTACCAGATGTTGTTAT	381 pb

Após a eletroforese em gel de agarose (2%) para avaliar a eficiência da reação, 5µl do produto da PCR foi purificado com 0,5µl da Exonuclease I e 1,0µl de Shrimp Alkaline Phosphatase - SAP (Fermentas, Hanover, MD) para remoção do excesso de dNTPs e primers (37°C durante 45 minutos + inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos).

Para a reação de sequenciamento que teve volume final de 20µl, foi utilizado 3µl do PCR purificado adicionado a 0,15uM de primer sense ou antisense, 2µl de BigDye e tampão apropriado. Esta reação foi submetida a ciclagem: 96°C por 2min, seguida de 26 ciclos de 96°C por 10 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4min. O produto a ser sequenciado foi purificado com o kit BigDye X-terminator conforme as orientações do fabricante. O seqüenciamento foi realizado no sequenciador 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com POP-7™ Polymer (Applied Biosystems) e o resultado analisado no software CLC Sequence Viewer. Figura 19

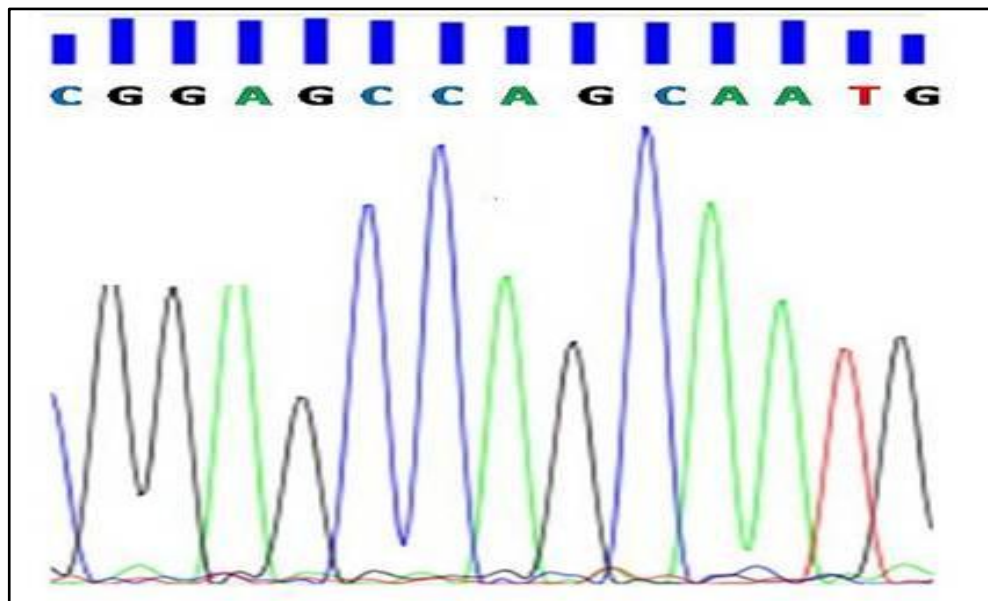


Figura 19 - Eletroferograma da reação de sequenciamento após normalização de dados. Cada elevação do gráfico representa o nucleotídeo (A,T,C,G) correspondente à uma posição específica do fragmento amplificado

4.3 Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software R version 3.4.0 (2017-04-21).⁷⁴

Para realização dos testes estatísticos, os resultados obtidos através dos testes de aglutinação foram convertidos em escores como determinados na Tabela 7.

Tabela 7 Referências para converção dos resultados de aglutinação em escores utilizados na análise estatística.

AGLUTINAÇÃO	ESCORE
4+	99
3+	85
2+	70
1+	50
W	20
Negativo	10

Os testes de Wilcoxon não foram aplicados entre pares de variáveis; em vez disso, a mediana de cada variável foi comparada com o valor 10 (indicador de resultado negativo).

Foi utilizado o teste de Wilcoxon para avaliar a relação da eficiência de aglutinação entre os antisoros descritos anteriormente e metodologias utilizadas.

Cada variável foi analisada de três formas: para os 101 doadores; para os 13 doadores com Variante RhD Fraco Tipo 11 ou Tipo 38; e para os demais doadores ($101 - 13 = 88$). As análises referem-se aos reagentes (clones IgG e IgM+IgG) utilizados em testes confirmatórios em fase de AGH (Antiglobulina Humana).

5 Resultados

5.1 Testes Moleculares

Foi realizado um estudo sistemático a nível molecular em 101 amostras, para determinar a frequência de alelos *RHD* variantes presentes na população de doadores de sangue da Colsan - Associação Beneficente de Coleta de Sangue.

5.1.1 Resultados da genotipagem *RHD* em doadores voluntários de sangue

A análise molecular das variantes RhD foi concordante com resultados sorológicos prévios. Todos os indivíduos do estudo foram previamente tipados como RhD fraco pelo teste de hemaglutinação, e na sua totalidade, apresentaram alelos *RHD* variantes. Das 101 amostras estudadas, 49 foram caracterizadas molecularmente como RhD parcial, 51 como RhD fraco e 1 apresentou associação de RhD parcial e RhD fraco. Os resultados obtidos encontram-se na figura 20.

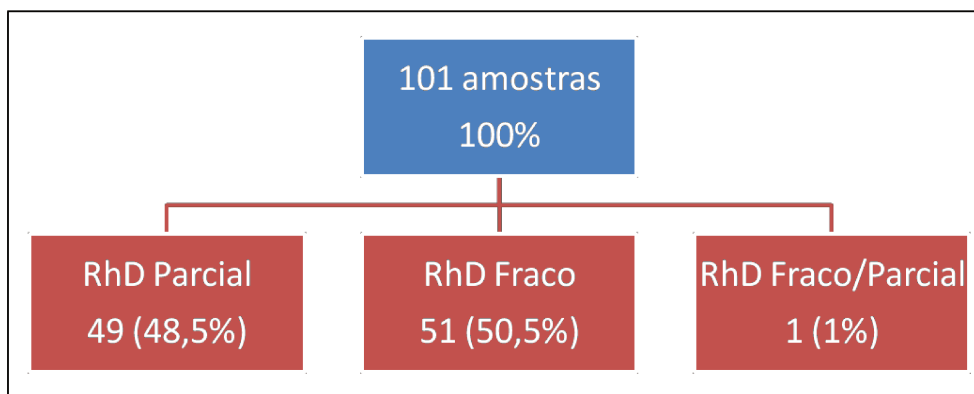


Figura 20 - Resultado da análise molecular das amostras de doadores voluntários de sangue

5.1.2 Resultados da caracterização molecular das variantes *RHD*

O estudo molecular dessas amostras permitiu demonstrar quais as variantes presentes nessa população de doadores e sua correlação com os resultados sorológicos. No total foram identificados 15 alelos *RHD*, 10 alelos referentes à *RHD* parcial e 5 alelos à *RHD* fraco. Os resultados demonstraram que o alelo *RHD*^{DAR}1.2* foi o mais frequente nessa população de doadores e correspondeu à

29,7% do total de amostras, seguido pelo *RHD*D fraco tipo 3* (20,8%), *RHD*D fraco tipo 38* (9,9%) e *RHD*D fraco tipo 1* (8,9%).

Outros alelos menos prevalentes corresponderam a 30,7% de todas as amostras estudadas. Os alelos *RHD* que codificam os antígenos D fracos tipos 1, 2 e 3 representaram 37% das variantes RhD encontradas. Em 3 doadores, ainda pudemos observar a presença do *RHD ψ* em heterozigose com um alelo *RHD* normal. Os tipos de RhD fraco e parciais encontrados e suas frequências estão descritas na figura 21.

<i>RHD</i> Parcial n=49		<i>RHD</i> Fraco n=51		<i>RHD</i> Fraco/Parcial n=1	
•DAR1.2	n=31	•Fracotipo 3	n=22	•Fracotipo 2/DAR1.2	n=1
•DAR1	n= 5	•Fracotipo 38	n=10		
•DAR3.1	n= 3	•Fracotipo 1	n= 9		
•DAU4	n= 3	•Fracotipo 2	n= 7		
•DMH	n= 2	•Fracotipo 11	n= 3		
•DAU0	n= 1				
•DAU2	n= 1				
•DAU5	n= 1				
•DAU6	n= 1				
•DVII	n= 1				

Figura 21 - Resultado da caracterização molecular das amostras de 101 doadores de sangue com fraca expressão do antígeno RhD

5.1.3 Resultados da associação das variantes RhD com haplótipos *RH*

Os tipos de alelos *RHD* identificados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente nas 101 amostras de doadores de sangue. Os resultados demonstram que as variantes RhD parcial identificadas, estão relacionadas ao haplótipo R_0 (cDe) enquanto que os tipos de D fraco, na sua maioria, estão relacionados ao haplótipo R_1 (CDe), com exceção do D fraco tipo 2 que está associado com o haplótipo R_2 (cDE), estando portanto esses achados concordantes com a literatura.⁴⁰

Em relação a variante RhD fraco tipo 11 que apresenta uma densidade antigênica muito baixa, a associação mais comum descrita é com o haplótipo R_0 (cDe), porém, em nosso estudo, todas as amostras D fraco tipo 11 possuem o fenótipo R_1r (Cde/cde), o que pode sugerir associação com o haplótipo CDe, a qual

já foi anteriormente descrita e relacionada ao fenótipo DEL.⁷⁵ A figura 22 mostra a associação dos tipos de variantes RhD encontradas com os haplótipos *RH*.

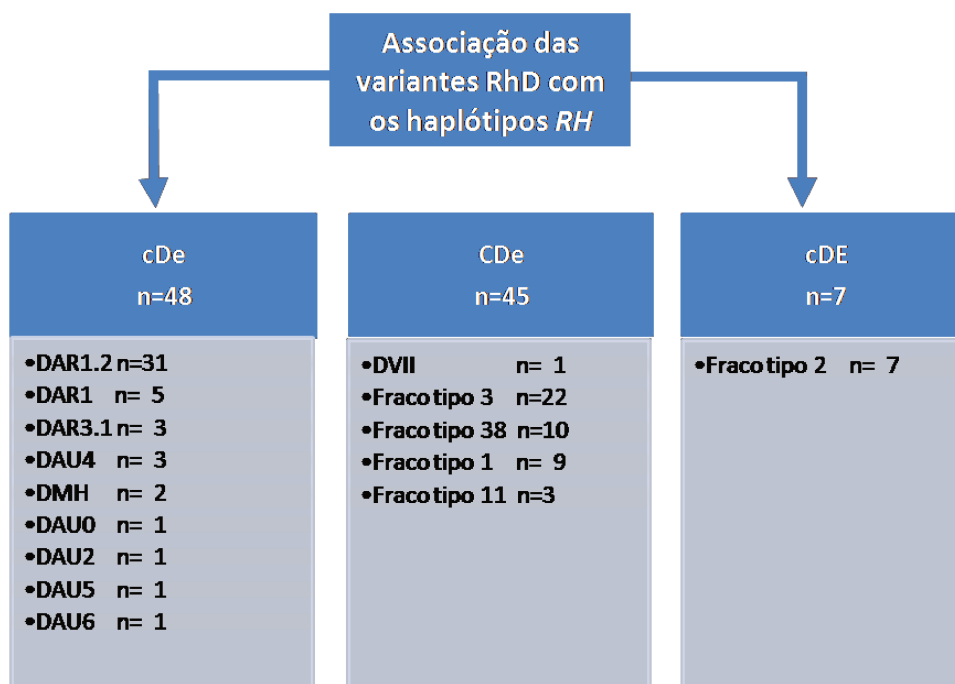


Figura 22 - Resultado da associação dos haplótipos *RH* e a caracterização molecular das amostras de 101 doadores de sangue com fraca expressão do antígeno RhD

5.2 Testes Sorológicos

Com a finalidade de verificar a reatividade sorológica do antígeno RhD utilizando diversos clones e diferentes metodologias, as amostras do estudo foram avaliadas pelas técnicas de aglutinação em tubo, MC e Gel, e teste confirmatório em F.S com diversos reagentes anti-D.

5.2.1 Resultados dos testes sorológicos realizados pelo método de aglutinação em tubo

Fase de L.I.

Em relação aos testes realizados em tubo, nossos resultados apresentaram um padrão de reatividade variado entre os diversos clones utilizados, principalmente na fase de L.I. Os reagentes anti-D clones IgM RUM1, IgM MS201 e Blend RUM1+MS26 da Lorne, foram mais sensíveis nos testes de aglutinação direta em tubo na fase de L.I. Os demais antissoros, IgM clones MS201 (Fresenius) e TH28

(Bio-Rad), e Blend TH28+MS26 e MS201+MS26 ambos da Bio-Rad, assim como o antissoro IgG MS26 (Fresenius), foram menos sensíveis, detectando menos amostras e reagindo mais fracamente, como podemos observar na Tabela 8.

Tabela 8 Porcentagem de amostras detectadas de acordo com o grau de aglutinação em L.I pelo método de aglutinação em tubo obtidos por reagentes anti-D IgM e Blend

Fabricante	Lorne		Fresenius		Bio-Rad		
Grau de Aglutinação	IgM RUM1	IgM MS201	Blend RUM1+MS26	IgM MS201	IgM TH28	Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS26
	%	%	%	%	%	%	%
3-4+	23,7	21,8	25,7	9,9	13,8	11,9	15,9
1-2+	46,5	52,5	44,6	46,5	40,6	41,6	45,5
W*	13,9	7,9	12,9	21,8	25,7	22,8	17,8
0	15,9	17,8	16,8	21,8	19,9	23,7	20,8
*fraca aglutinação							

Conforme mencionado anteriormente, obtivemos resultados mais conclusivos com o antissoro Blend RUM1+MS26 (Lorne). Para isso, foram consideradas amostras que obtiveram resultados $\geq 2+$ de aglutinação em L.I, critério utilizado para conclusão dos testes nessa fase. Nos demais antissoros, Blend clones TH28+MS26 e MS201+MS26 da Bio-Rad e Fresenius IgG clone MS26, observamos um padrão de aglutinação inferior à 2+ na maioria das amostras testadas, e portanto, nesses casos, houve a necessidade de teste confirmatório em fase de AGH para conclusão dos resultados. Testes estatísticos demonstraram que o antissoro IgM RUM1 apresentou uma média de 61,2 de sensibilidade em relação a detecção do antígeno D. A Tabela 9 descreve a média de desempenho dos antissoros IgM e IgM+IgG na fase de L.I em tubo.

Tabela 9 Média de reatividade dos antissoros anti-D IgM e IgM+IgG na fase de L.I em tubo

Fabricante	Lorne		Fresenius		Bio-Rad		
	IgM RUM1	IgM MS201	Blend RUM1+MS26	IgM MS201	IgM TH28	Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS26
Média de reatividade	61,4	60,9	60,9	42,4	42,9	42,6	46

Teste Confirmatório (Fase de AGH)

As amostras com reações <2+ em L.I. pela técnica de aglutinação em tubo, foram testadas em fase de AGH com antissoros IgG e IgM+IgG para a detecção do antígeno RhD. O número de amostras confirmadas na fase de AGH esteve diretamente relacionada ao desempenho dos mesmos antissoros na primeira fase do teste. De maneira geral, os reagentes testados nessa fase apresentaram desempenho similar. O método de aglutinação em tubo não foi sensível o suficiente para detectar todas as variantes RhD. O antissoro IgG MS26 Fresenius reagiu com 89 amostras, e os demais, Blend RUM-1/MS-26 Lorne, Blend TH28+MS26 e Blend MS201+MS26 Bio-Rad, apresentaram reatividade com 88 amostras de um total de 101 amostras testadas. Na análise estatística embasada nos graus de aglutinação obtidos, o teste de Wilcoxon apresentou valores significativos ($P \leq 0.001$) para todos os reagentes analisados pelo método em tubo. As amostras realizadas em tubo na fase de AGH encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 Porcentagem de amostras concluídas na fase de AGH pelo método de tubo com antissoros IgG e IgM+IgG

Grau de Aglutinação	Fabricante			
	Lorne	Fresenius	BioRad	
	BlendRUM1+MS26	IgG MS26	Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS26
	%	%	%	%
N/R*	56,4	9,9	29,6	30,6
3-4+	0	1	0	0
1-2+	25,7	68,3	43,6	46,5
W**	4,9	8,9	13,8	9,9
Total	87	88,1	87	87
p-valor***	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$

* amostras não realizadas, concluídas em fase de L.I

** fraca aglutinação

***p valor obtidos através do teste de Wilcoxon

5.2.2 Resultados dos testes sorológicos realizados pelo método de aglutinação em gel Liss/Coombs e gel NaCl/Enzima

Todas as amostras do estudo foram avaliadas pela técnica de aglutinação em gel Liss/Coombs com os antissoros Blend TH28+MS26 e MS201+MS26 Bio-Rad,

assim como em gel NaCl/Enzima com o antissoro IgM TH28 Bio-Rad. No entanto, apenas 33,6% das amostras foram testadas com o antissoro clone ESD1 Bio-Rad, uma vez que o mesmo foi introduzido posteriormente ao trabalho. Comparando apenas os antíseros testados com o número total de amostras, notamos que os mesmos detectaram entre 83% e 87% das variantes RhD com aglutinação entre 3+ e 4+.

Assim como na metodologia em tubo, os testes de aglutinação em gel também não foram sensíveis o suficiente para detectar todas as variantes RhD, e em geral, os reagentes testados em gel Liss/Coombs apresentaram desempenho similar. Os antíseros Blend TH-28+MS26 e MS201+MS26, reagiram com 91 amostras, e o antissoro IgM TH28 em gel NaCl/Enzima, apresentou reação com 89 amostras de um total de 101 amostras testadas. Na análise estatística embasada nos graus de aglutinação obtidos, o teste de Wilcoxon apresentou valores significativos ($P \leq 0.001$) para todos os reagentes analisados pelo método em gel. Esses resultados podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11 Porcentagem de amostras concluídas em fase de AGH pelo método de aglutinação em gel Liss/Coombs e gel NaCl/Enzima com reagentes anti-D Bio-Rad

Fabricante	Bio-Rad		
	Gel Liss/Coombs Blend TH28+MS26	Gel Liss/Coombs Blend MS201+MS26	Gel NaCl/Enzima IgM TH28
Grau de Aglutinação	%	%	%
3-4+	87,2	87,2	83,2
1-2+	0	1	1
W*	2,9	1,9	3,9
Total	90,1	90,1	88,1
p-valor**	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$	$P \leq 0,001$

*fraca aglutinação

p-valor** valor obtidos através do teste de Wilcoxon

5.2.3 Resultados dos testes sorológicos realizados pelo método de aglutinação em microplaca e F.S em equipamento automatizado

Fase de L.I.

Nos testes de aglutinação em microplaca (MC), o reagente anti-D Blend clone D175+415 obteve melhores resultados do que os demais clones da empresa

Immucor. Os testes realizados em L.I. com esse antissoro apresentaram aglutinação entre 3+ e 4+ com 32,6% das amostras. Os demais clones Immucor obtiveram resultados inferiores conforme apresentado na Tabela 12. .

Tabela 12 Porcentagem de amostras e grau de aglutinação em L.I pelo método de aglutinação em MC com reagentes anti-D Immucor

Fabricante	Immucor			
	IgM RUM-1	Blend D175 + 415	Blend MS201+MS26	Blend TH28 +MS26
Grau de Aglutinação	%	%	%	%
3-4+	23,8	32,7	12,9	11,9
1-2+	49,5	42,6	18,8	35,6
W*	5,9	7,9	16,8	12,9
0	20,8	16,8	51,5	39,6
Total	100	100	100	100

*fraca aglutinação

Testes estatísticos demonstraram que o antissoro Blend D175+415 apresentou uma média de 68,3 de sensibilidade em relação a detecção do antígeno D. A Tabela 13 descreve a média de desempenho dos antissoros IgM e IgM+IgG na fase de L.I em MC.

Tabela 13 Média de reatividade dos antissoros IgM e IgM+IgG na fase de L.I em MC

Fabricante Immucor	IgM RUM1	Blend D175+415	Blend MS201+MS26	Blend TH28+MS26
Média de Reatividade	63,3	68,3	35,7	43,9

Teste Confirmatório em F.S.

O critério adotado para confirmação do antígeno RhD fraco em F.S., foi diferente do que foi adotado na fase de AGH pelo método em tubo. Nesse teste, foram selecionadas amostras com escore 88 o que ainda corresponde à 4+ de aglutinação.

Os antissoros Blend D175+415 e MS201+MS26 utilizados no método de F.S, detectaram 100% das variantes RhD. Esses dois reagentes apresentaram escore de reação entre 80 e 99 com a maioria das amostras testadas. Esse padrão de

reatividade foi observado em 84,1% das amostras em relação ao clone Blend D175+415, e 89,1% em relação ao clone Blend MS201+MS26.

O antissoro Blend TH28+MS26 foi menos sensível que os demais clones Immucor, e detectou 97% das variantes RhD. As amostras concluídas no teste de L.I em MC, não foram submetidas ao teste confirmatório em F.S. e estão identificadas no Tabela como N/R. Na análise estatística considerando as variantes de menor densidade antigênica, o teste de Wilcoxon apresentou valores significativos diferentes para os reagentes analisados pelo método de F.S. Os resultados podem ser observados na Tabela 14

Tabela 14 Porcentagem de amostras concluídas pelo método de F.S com reagentes anti-D Immucor

Fabricante	Immucor		
	Blend D175 + 415	Blend MS201 + MS26	Blend TH28 + MS26
Escore de reação	%	%	%
N/R*	11,9	6,9	6,9
80-99 (3-4+)	84,2	89,2	83,2
51-79 (1-2+)	3,9	3,9	5
22-50 (W)**	0	0	1,9
Total	100	100	97
p-valor***	P<=0,001	P<=0,001	P<=0,005
* amostras não realizadas, concluídas em fase de L.I			
** fraca aglutinação			
p-valor*** valor obtidos através do teste de Wilcoxon			

5.2.4 Variantes *RHD* e reatividade sorológica em L.I

Nossos resultados demonstraram que algumas variantes RhD apresentaram reatividade similar com todos os clones de reagentes anti-D utilizados pelas técnicas de tubo e microplaca. Os fenótipos DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU4 e DAU5, apresentaram padrão de aglutinação entre 3+ e 4+ com todos os reagentes e técnicas utilizadas na fase de L.I. Outros fenótipos como DAR1, DAU6, DMH e DVII, apresentaram reações mais fracas entre 1+ e 2+ em L.I. pelos mesmos métodos já citados. Em relação às outras variantes encontradas em maior número como DAR1.2, D Fraco tipo 3 e D Fraco tipo 1, observamos uma ampla variação nas reatividades pelo método em tubo, entre W (fraco) e 4+ em L.I, com exceção da variante D fraco tipo 2, que apresentou reações mais fracas com a maioria dos

clones e metodologias utilizadas. As variantes RhD fraco tipo 38 e tipo 11 não foram detectadas em fase de L.I pelo método em tubo com nenhum clone testado, assim como em MC, teste de rotina que é realizado em equipamento automatizado. Os dados apresentados podem ser observados na Tabela 15, a qual mostra o padrão de reatividade em L.I. nas técnicas de tubo e MC de todas as variantes analisadas.

Tabela 15 Número de amostras e grau de aglutinação em L.I com diversos reagentes anti-D

Análise Molecular Genótipo <i>RHD</i>	n	Grau de Aglutinaç ão	Lorne			Fresenius	Bio-Rad			Immucor			
			Tubo			Tubo	Tubo			Microplaca			
			IgM RUM1	IgM MS201	Blend RUM- 1/MS-26	IgM MS201	IgM TH28	Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS2 6	IgM RUM-1	Blend D175 + 415	Blend MS201 + MS26	Blend TH28 + MS26
DAR1.2 (Fraco tipo 4.2.2)	30	0	0	1	0	3	2	2	2	1	2	17	8
		W	3	1	2	7	11	10	6	2	2	6	5
		1-2+	17	18	14	19	15	16	19	23	19	7	17
		3-4+	10	10	14	1	2	2	3	4	7	0	0
Fraco tipo 3	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6
		W	1	1	2	5	6	7	3	1	0	7	4
		1-2+	18	18	17	15	13	13	15	16	12	7	10
		3-4+	2	2	2	1	2	1	3	4	9	1	1
Fraco tipo 38	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Fraco tipo 1	9	0	0	1	1	2	1	3	2	0	1	5	5
		W	4	3	3	4	4	3	3	2	1	0	0
		1-2+	2	3	3	1	2	1	1	4	4	1	1
		3-4+	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
Fraco tipo 2	7	0	2	3	2	4	4	5	4	6	1	7	7
		W	4	3	4	3	2	1	3	1	5	0	0
		1-2+	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
DAR1	5	W	0	0	0	2	2	2	1	0	0	3	3
		1-2+	4	5	5	3	3	3	4	2	2	2	2
		3-4+	1	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0
Fraco parcial 11 ou Del	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DAR3.1 (Fraco tipo 4.0)	3	1-2+	0	0	0	2	2	2	2	1	1	1	2
		3-4+	3	3	3	1	1	1	1	2	2	2	1
DAU4	3	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
		W	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		1-2+	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	2
		3-4+	1	1	1	2	3	2	2	2	3	3	1
DAU0	1	3-4+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAU2	1	3-4+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAU5	1	3-4+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAU6	1	1-2+	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
DMH	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		1-2+	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
		3-4+	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DVII	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		1-2+	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Fraco tipo 2 /DAR1.2	1	1-2+	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
Fraco tipo 3/RHDψ	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
		W	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
		1-2+	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
DAR1.2/RHDψ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		W	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1-2+	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
DMH /RHDψ	1	W	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
		1-2+	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1

5.2.5 Variantes *RHD* e reatividade sorológica com os testes confirmatórios em tubo, gel e F.S

Entre as variantes identificadas como D parcial, 49 amostras (48,5%), foram na sua totalidade identificadas em fase de AGH pelos testes confirmatórios de RhD, através dos métodos de aglutinação em tubo, gel e F.S, com todos os clones IgG e blend (IgM+IgG) testados.

Em relação as amostras caracterizadas como D fraco, em 51 amostras (50,5%), observamos que as variantes RhD fraco tipos 1 e 3, apresentaram resultados entre W e 2+ pelo método de aglutinação em tubo, e reatividade entre 3+ e 4+ pelos métodos em gel e F.S.

As amostras identificadas como RhD fraco tipo 38, apresentaram reações negativas nos testes confirmatórios em tubo com os clones Blend RUM1+MS26 (Lorne), Blend TH28+MS26 e MS201+MS26 ambos (Bio-Rad), sendo que, apenas o clone IgG MS201 (Fresenius) foi capaz de detectar este fenótipo em uma amostra. Ainda em relação a essa variante, observamos que os mesmos clones Blend (TH28+MS26 e MS201+MS26) da Bio-Rad utilizados na técnica em tubo reagiram em 30% das amostras pela técnica de aglutinação em gel Liss/Coombs.

As amostras caracterizadas como RhD fraco tipo 2, as quais apresentaram reações negativas ou fracamente reativas nos testes em tubo e microplaca em L.I., obtiveram reações mais fortes nos testes confirmatórios, apresentando padrão de aglutinação entre 1+ e 2+ nos testes em tubo e entre 3+ e 4+ em F.S.

A variante RhD fraco tipo 11 não foi detectada pelas técnica de aglutinação em fase de AGH pelas técnicas de tubo e gel com nenhum clone utilizado. Em relação a essa variante, apenas os antissoros Immucor Blend D175+415 e MS201+MS26, utilizados na técnica de F.S foram eficazes na sua identificação.

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos na fase de AGH pelos métodos de aglutinação manual em tubo, gel e em F.S. no equipamento automatizado.

Tabela 16 Número de amostras e grau de aglutinação em AGH e fase sólida (capture) com diversos reagentes anti-D

			Lorne Tubo	Fresenius Tubo	Bio-Rad Tubo		Bio-Rad Gel				Immucor Capture		
Análise Molecular Genótipo <i>RHD</i>	n	Graude Aglutinação	Blend RUM-1/MS-26	IgG MS26	Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS26	Liss		Papaina		Blend D175 + 415	Blend MS201 + MS26	Blend TH28 + MS26
							Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS26	ESD1	IgMTH28			
DAR1.2 (Fraco tipo 4.2.2)	30	N/R	22	0	8	7	0	0		0	0	0	0
		W	0	1	2	2	0	0		1	0	0	0
		1-2+	8	28	20	21	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	1	0	0	30	30	8	29	30	30	30
Fraco tipo 3	21	N/R	16	1	8	9	0	0		0	0	0	0
		W	1	1	1	1	0	0		0	0	0	0
		1-2+	4	19	12	11	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	21	21	9	21	21	21	21
Fraco tipo 38	10	0	10	9	10	10	7	7		9	0	0	0
		W	0	1	0	0	3	2	3	1	0	0	2
		1-2+	0	0	0	0	0	1	1	0	3	1	5
		3-4+	0	0	0	0	0	0		0	7	9	3
Fraco tipo 1	9	N/R	5	2	3	3	0	0		0	3	2	2
		W	0	2	5	2	0	0		0	0	0	0
		1-2+	4	5	1	4	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	9	9	2	9	6	7	7
Fraco tipo 2	7	W	4	3	5	5	0	0		2	0	0	0
		1-2+	3	4	2	2	0	0		1	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	7	7		4	7	7	7
		N/R	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
DAR1	5	W	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		1-2+	2	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5
		N/R	3	3	3	3	3	3		3	0	0	3
Fraco parcial 11 ou Del	3	1-2+	0	0	0	0	0	0		0	1	3	0
		3-4+	0	0	0	0	0	0		0	2	0	0
		N/R	3	1	2	2	0	0		0	2	1	1
		1-2+	0	2	1	1	0	0		0	0	0	0
DAR3.1 (Fraco tipo 4.0)	3	3-4+	0	0	0	0	3	3	2	3	1	2	2
		N/R	1	2	2	2	0	0		0	2	1	1
		1-2+	2	1	1	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	3	3	1	3	1	2	2
DAU4	3	N/R	1	2	2	2	0	0		0	2	1	1
		1-2+	2	1	1	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	3	3	1	3	1	2	2
		N/R	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
DAU0	1	3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
		N/R	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
		N/R	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
DAU2	1	3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
		N/R	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
		N/R	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
DAU5	1	3-4+	0	0	0	0	1	1		1	0	0	0
		N/R	1	1	0	0	0	0		0	1	0	0
		1-2+	0	0	1	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
DAU6	1	N/R	1	0	0	0	0	0		0	1	0	0
		1-2+	0	0	1	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
		N/R	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0
DMH	1	1-2+	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
		N/R	1	0	1	1	0	0		0	1	0	0
		1-2+	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0
DVII	1	3-4+	0	0	0	0	1	1		1	0	1	1
		N/R	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0
		1-2+	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1
Fraco tipo 2/ DAR1.2	1	N/R	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0
		1-2+	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1
		W	0	1	1	0	0	0		0	0	0	0
Fraco tipo 3/RHDψ	1	1-2+	1	0	0	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1
		N/R	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0
		1-2+	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0
DAR1.2/RHDψ	1	3-4+	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1
		1-2+	1	1	1	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1
		N/R	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0
DMH/RHDψ	1	1-2+	1	1	1	1	0	0		0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1		1	1	1	1
		N/R	1	0	1	1	0	0		0	0	0	0
		1-2+	0	1	0	0	0	0		0	0	0	0

Os tipos de variantes encontradas foram associadas ao grau de aglutinação em L.I. com os clones IgM: RUM1, MS201 e TH28 de diferentes fabricantes. Esses clones foram utilizados nas metodologias para tipagem RhD em tubo, gelNaCl/Enzima e MC. O clone IgM D175 utilizado somente na metodologia em MC não foi avaliado, pois, trata-se de um clone exclusivo do fabricante Immucor.

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos com o clone IgM RUM1, em tubo e MC. Os resultados demonstram que o clone RUM1 Immucor utilizado em MC foi mais eficiente, detectando 59,4% do total de amostras com padrão de aglutinação $\geq 2+$, enquanto que o mesmo clone IgM RUM1 e o blend IgM/IgG (RUM1/MS26) da empresa Lorne, quando utilizados em tubo, detectaram 50,5% e 49,5% das variantes respectivamente. A maior diferença observada com o clone RUM1 entre os fabricantes e as duas metodologias foi em relação ao antígeno RhD parcial DAR1 detectado em 100% das amostras em MC no equipamento automatizado, enquanto que o clone RUM1 Lorne utilizado na metodologia em tubo detectou apenas 40% dessa variante.

Tabela 17 Número de amostras com reatividade $\geq 2+$ em tubo e MC com o clone IgM RUM1

Análise Molecular Genótipo <i>RHD</i>	Total n	Lorne Tubo Clone IgMRUM1 $\geq 2+$		Lorne Tubo Clone IgMRUM1/MS26 $\geq 2+$		Immucor Microplaca Clone IgMRUM1 $\geq 2+$	
		n	%	n	%	n	%
DAR 1.2	31	21	67,7	20	64,5	22	70,9
Fraco tipo 3	22	14	63,6	14	63,6	16	72,7
Fraco tipo 38	10	0	0	0	0	0	0
Fraco tipo 1	9	3	33,3	3	3	4	44,4
Fraco tipo 2	8	1	12,5	1	12,5	1	12,5
DAR1	5	2	40	2	40	5	100
Fraco tipo 11	3	0	0	0	0	0	0
DAR 3.1	3	3	100	3	100	3	100
DAU4	3	1	33,3	1	33,3	2	66,6
DAU0	1	1	100	1	100	1	100
DAU2	1	1	100	1	100	1	100
DAU5	1	1	100	1	100	1	100
DAU6	1	1	100	1	100	1	100
DMH	2	1	50	1	50	1	50
DVII	1	1	100	1	100	1	100
Total	101	51	50,5	50	49,5	60	59,4

Na Tabela 18, podemos observar os resultados obtidos com o clone IgM MS201 em tubo e MC. Em relação a esse clone, verificamos que o reagente da empresa Lorne apresentou resultados superiores em tubo quando comparado com os resultados do reagente Immucor em microplaca, detectando 49,5% do total de amostras com padrão de aglutinação $\geq 2+$. A maior diferença entre os fabricantes e as duas metodologias foi observada em relação as variantes RhD parcial DAR1.2 e ao antígeno RhD Fraco tipo 3. A metodologia em tubo realizada manualmente associada ao clone MS201 Lorne detectou 67,7% das amostras DAR 1.2 e 54,5% do D fraco tipo 3 com padrão de aglutinação $\geq 2+$, enquanto que o clone MS201/MS26 Immucor, utilizado na metodologia em MC detectou 16,1% e 13,6% dessas variantes respectivamente.

Tabela 18 Número de amostras com reatividade $\geq 2+$ em tubo e MC com o clone IgM MS201

Análise Molecular Genótipo RHD	Total n	Lorne Tubo Clone IgM MS201 $\geq 2+$		Fresenius Tubo Clone IgM MS201 $\geq 2+$		Bio-Rad Tubo Clone IgM MS201/MS26 $\geq 2+$ n %		Immucor Microplaca Clone IgM MS201/MS26 $\geq 2+$	
		n	%	n	%	n	%	n	%
DAR 1.2	31	21	67,7	10	32,2	8	25,8	5	16,1
Fraco tipo 3	22	12	54,5	8	36,3	9	40,9	3	13,6
Fraco tipo 38	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Fraco tipo 1	9	3	33,3	2	22,2	3	33,3	4	44,4
Fraco tipo 2	8	0	0	1	12,5	1	12,5	1	12,5
DAR1	5	2	40	0	0	2	40	0	0
Fraco tipo 11	3	0	0	0	0	0	0	0	0
DAR 3.1	3	3	100	2	66,6	1	33,3	3	100
DAU4	3	3	100	2	66,6	2	66,6	3	100
DAU0	1	1	100	1	100	1	100	1	100
DAU2	1	1	100	1	100	1	100	1	100
DAU5	1	1	100	1	100	1	100	1	100
DAU6	1	1	100	1	100	0	0	1	100
DMH	2	1	50	1	50	0	0	0	50
DVII	1	1	100	1	100	1	100	0	0
Total	101	50	49,5	31	30,7	30	29,7	23	22,7

Na Tabela 19, podemos observar os resultados obtidos com o clone IgM TH28, em tubo, gel NaCl/Enzima e MC. Os melhores resultados obtidos com este clone foram em gel, que detectou 83,1% do total de amostras com padrão de aglutinação $\geq 2+$. A maior diferença entre as metodologias, foi observada em relação às variantes RhD parcial DAR1.2 e ao antígeno RhD Fraco tipo 3. O clone IgMTH28 Bio-Rad utilizado em gel NaCl/Enzima detectou 96,7% das amostras DAR1.2 e 100% do antígeno RhD fraco tipo 3 com padrão de aglutinação $\geq 2+$, enquanto que o mesmo reagente quando utilizado na metodologia em tubo, detectou 19,3% das amostras DAR1.2 e 31,8% do RhD fraco tipo 3, concluindo apenas 26,7% do total de variantes RhD. Outro antissoro da Bio-Rad, o Blend IgMTH28/MS26, concluiu 28,7% do total de amostras. Em relação à metodologia em MC associada ao clone TH28 Immucor, observamos um padrão semelhante à metodologia em tubo, com 25,7% do total de amostras analisadas com padrão de aglutinação $\geq 2+$.

Tabela 19 Número de amostras com reatividade $\geq 2+$ em tubo, gel NaCl/Enzima e MC com o clone IgM TH28

Análise Molecular Genótipo RHD	Total	Bio-Rad Tubo Clone IgM TH28 $\geq 2+$		Bio-Rad Tubo Clone IgM TH28/MS26 $\geq 2+$		Bio-Rad Gel Papaina Clone IgM TH28 $\geq 2+$		Immucor Microplaca Clone IgM TH28/MS26 $\geq 2+n$ %	
		n	%	n	%	n	%	n	%
DAR 1.2	31	6	19,3	9	29	30	96,7	7	22,5
Fraco tipo 3	22	7	31,8	8	36,3	22	100	5	22,7
Fraco tipo 38	10	0	0	0	0	0	0	0	0
Fraco tipo 1	9	3	33,3	3	33,3	9	100	4	44,4
Fraco tipo 2	8	1	12,5	1	12,5	5	62,5	1	12,5
DAR1	5	1	20	1	20	5	100	0	0
Fraco tipo 11	3	0	0	0	0	0	0	0	0
DAR 3.1	3	2	66,6	1	33,3	3	100	2	66,6
DAU4	3	3	100	2	66,6	3	100	2	66,6
DAU0	1	1	100	1	100	1	100	1	100
DAU2	1	1	100	1	100	1	100	1	100
DAU5	1	1	100	1	100	1	100	1	100
DAU6	1	0	0	0	0	1	100	1	100
DMH	2	0	0	0	0	2	100	0	0
DVII	1	1	100	1	100	1	100	1	100

5.2.6 Variantes *RhD* e reatividade sorológica dos reagentes monoclonais anti-D de clones IgG e blend utilizados nos testes confirmatórios

Os tipos de variantes RhD encontradas foram associados ao grau de aglutinação em testes de AGH indireta e escore em F.S. Para esses testes confirmatórios foi utilizado o clone IgG MS26 de diferentes fabricantes. O clone IgG D415 utilizado somente na metodologia em F.S não foi avaliado, pois, trata-se de um clone exclusivo do fabricante Immucor. Por se tratar de testes confirmatórios foram considerados todos os graus de reatividade. A maior diferença entre as metodologias, foi observada em relação às variantes RhD fraco tipo 38 e RhD fraco tipo 11. A metodologia em tubo associada ao clone IgG MS26 Lorne, detectou apenas 1 amostra RhD fraco tipo 38, mas não apresentou reatividade com nenhuma das amostras RhD fraco tipo 11, concluindo assim 88,1% do total de amostras testadas. A metodologia em gel Liss/Coombs realizada manualmente associada aos antissoros Blend TH28/MS26 e MS201/MS26, detectou 20% das amostras RhD Fraco tipo 38, mas não detectou nenhuma variante RhD Fraco tipo 11, enquanto que os mesmos reagentes quando utilizados na metodologia em tubo, não reagiram com nenhuma variante RhD fraco tipo 38 e 11, concluindo 87,1% do total de variantes RhD. Desempenho semelhante foi observado como o clone Lorne Blend RUM/MS26 na metodologia em tubo, que também concluiu 87,1% das variantes RhD. O método de F.S associado ao clone TH28/MS26 reagiu com todas as amostras RhD fraco 38, mas não reagiu com as variantes RhD fraco tipo 11, concluindo 97% das amostras, enquanto que a mesma técnica quando testada com o clone MS201/MS26, conseguiu concluir 100% das variantes RhD. Os resultados obtidos nos testes confirmatórios podem ser observados na Tabela 20. As amostras concluídas nos testes de L.I em tubo e MC, não foram submetidas ao testes confirmatórios em tubo e F.S, e estão identificadas na Tabela como N/R.

Discussão

6.1 Análise molecular das variantes RhD fraco e RhD parcial

Nesta investigação sistemática de uma população de doadores de sangue, que compreendeu 101 amostras com fraca expressão do antígeno D, identificamos 15 alelos variantes *RHD*, o que permitiu diferenciar os fenótipos RhD fraco e RhD parcial, tornando possível determinar os tipos mais freqüentes em nossa população e associá-los às suas reatividades sorológicas. No estudo, cinco tipos de D fracos (1, 2, 3, 11 e 38) e dez D parciais (DAR1.2, DAR1, DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU4, DAU5, DAU6, DMH e DVII) foram identificados por testes moleculares.

Quando comparamos nossos resultados com dados da literatura, verificamos em nossa população, a presença de variantes RhD fraco tipos 1, 2 e 3 que são prevalentes em populações caucasianas,^{76,77} assim como os D parciais DAR1.2 (fraco tipo 4.2.2) e DAR 3.1 (fraco tipo 4.0) que são variantes relatadas principalmente na população africana.⁷⁵ Conforme observamos, as grandes diferenças raciais podem ser reconhecidas não apenas pela frequência dos fenótipos Rh, mas também a nível molecular,⁷⁸ assim nossos resultados estão de acordo com o esperado quando uma população miscigenada é estudada.^{79,80}

Dos alelos *RHD* pertencentes aos clusters "africanos", os mais frequentes em nosso trabalho fazem parte do cluster D fraco tipo 4, em particular, o antígeno DAR1.2 foi o mais prevalente em nossos doadores e correspondeu a 30% de nossas amostras. Esse achado está de acordo com a frequência relatada anteriormente do alelo *DAR1.2* em doadores de sangue brasileiros.⁸¹

Outros alelos encontrados em menor frequência como DAU0, DAU2, DAU4, DAU5 e DAU6, corresponderam à 6,9% do total de nossas amostras. Destes, apenas DAU0 está descrito como uma variante de origem europeia,⁶³ embora esse dado contraste com os achados reportados por Wagner e colaboradores em um trabalho realizado com indivíduos de origem africana em Mali, onde o alelo DAU0 foi prevalente.⁸² Os outros alelos *DAU*

encontrados em nosso trabalho, são prevalentes em indivíduos de origem africana.⁶³ Outras variantes encontradas, DVII e DMH, pertencem ao cluster chamado de euroasiático e totalizaram duas amostras, correspondendo à 1,9% de nossos doadores.

Entre as amostras identificadas como D fraco, 38 (37%) foram caracterizadas como D fracos tipos 1, 2 e 3. Esse achado é comparável com as frequências publicadas para outras populações de doadores do Sudeste do Brasil^{44,81,83} mas contrasta com estudos realizados em europeus onde esses tipos de variantes são comuns, abrangendo mais de 90% de todos os indivíduos D fracos europeus.^{69,84}

Dentre os alelos D fracos encontrados em nosso trabalho, o RhD fraco tipo 38 correspondeu a 10% de nossas amostras. Embora seja considerado um alelo raro, ele é relativamente comum na população portuguesa⁸⁵ e está sendo descrito com maior frequência em brasileiros com fenótipo R₁r (DCcee). Em um trabalho realizado por Costa e colaboradores em doadores de São Paulo, onde os autores realizaram um estudo molecular em amostras previamente classificadas como RhD negativas, foi reportada a presença de 11 indivíduos RhD fraco tipo 38 em um total de 18 doadores com alelos variantes. Com isso os autores estimam que a presença da variante D fraco tipo 38 pode variar entre 2 à 6% em indivíduos com o fenótipo R₁r (DCcee).⁸⁶ Esses dados demonstram a forte presença desse alelo em brasileiros e são condizentes com o fato do Brasil ter sido colonizado por portugueses.^{85,86}

Identificamos ainda em nosso trabalho, três amostras que apresentaram fraca reatividade sorológica e foram caracterizadas molecularmente como D fraco tipo 11, e que corresponderam a 2,9% de nossos doadores. Este tipo de D fraco ocorre associado a dois haplótipos Rh (cDe e Cde), faz parte do cluster euroasiático e foi inicialmente denominado DEL quando associado a forma alélica Ce. Atualmente é considerado D fraco parcial, pois já foi demonstrada aloimunização em pacientes D fraco tipo 11.²⁶

Quando associamos os tipos de variantes encontradas em nosso trabalho com seus respectivos haplótipos, verificamos que os RhD fracos tipos 1 e 3 estão associados aos haplótipos R₁r (CcDee), o tipo 2 ao haplótipo R₂r

(ccDEe) e o tipo 4 (DAR1.2, DAR, DAR3.1) ao haplótipo R₀r, e estão de acordo com o que está descrito na literatura.³⁶ Em nosso estudo verificamos o haplótipo R₀r que é predominante de populações africanas, associado ao RhD parcial DMH, que normalmente está associado ao haplótipo R₁r em populações europeias, demonstrando que embora as associações entre variantes RhD e haplótipos RhCE específicos estejam bem estabelecidas na literatura, diferenças entre populações ainda podem ocorrer. Em nossas amostras a variante D fraco tipo 11 que apresenta uma expressão antigênica muito fraca encontrava-se associada ao haplótipo R₁r confirmando dados de estudos prévios, que relatam que este tipo de D fraco apresenta uma reatividade enfraquecida quando associado ao haplótipo R₁r (CcDee).²⁶

A relação das variantes *RHD* com os seus respectivos haplótipos e clusters estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21 Número de amostras concluídas por testes moleculares e a relação com os haplótipos e clusters

Genótipo RHDParcial	n	%	Haplótipo	Haplótipo	Cluster
			Típico	Encontrado	
DAR1.2	31	30,7	cDe	cDe	D Fraco tipo 4
DAR1	5	4,9	cDe	cDe	D Fraco tipo 4
DAR3.1	3	2,9	cDe	cDe	D Fraco tipo 4
DAU4	3	2,9	cDe	cDe	DAU
DMH	2	1,9	CDe	cDe	Euroasiático
DAU0	1	0,99	cDe	cDe	DAU
DAU2	1	0,99	cDe	cDe	DAU
DAU5	1	0,99	cDe	cDe	DAU
DAU6	1	0,99	cDe	cDe	DAU
DVII	1	0,99	Cde	CDe	Euroasiático
Genótipo <i>RHDFraco</i>					
Fraco tipo 3	22	21,8	CDe	CDe	Euroasiático
Fraco tipo 38	10	9,9	N/R	CDe	Euroasiático
Fraco tipo 1	9	8,9	CDe	CDe	Euroasiático
Fraco tipo 2	7	6,9	cDE	cDE	Euroasiático
Fraco tipo 2/DAR1.2	1	0,99	cDE/cDe	cDE	Euroasiático/ D Fraco tipo 4
Fraco tipo 11	3	2,9	cDe	CDe	Euroasiático

6.2 Associação das variantes RhD fraco e RhD parcial com a reatividade sorológica

O foco do trabalho foi a investigação de variantes RhD com fraca expressão em uma população de doadores de sangue, utilizando uma série de reagentes anti-D e diferentes metodologias. Todas as amostras do estudo foram associadas ao grau de aglutinação obtidos em L.I nos testes em tubo e MC e também nos testes confirmatórios em fase de AGH e F.S. Com isso, foi possível observar a diferença de reatividade dos clones e métodos utilizados em nosso trabalho com as diversas variantes RhD.

As diferenças de sensibilidade entre os clones e metodologias utilizados podem ser observados nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 Comparativo da reatividade de diferentes clones anti-D IgM com as variantes RhD fraco e RhD parcial. Os graus de reatividade estão descritos de acordo com a intensidade de aglutinação. O clone IgMTH28 foi utilizado nas metodologias de tubo e gel.

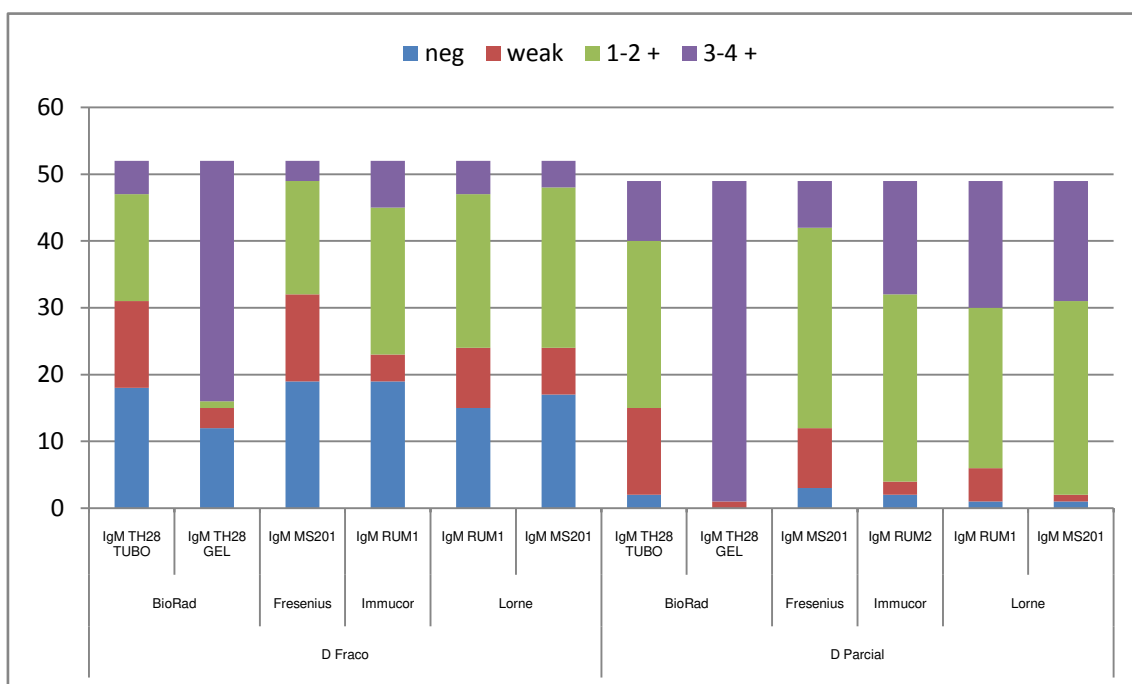
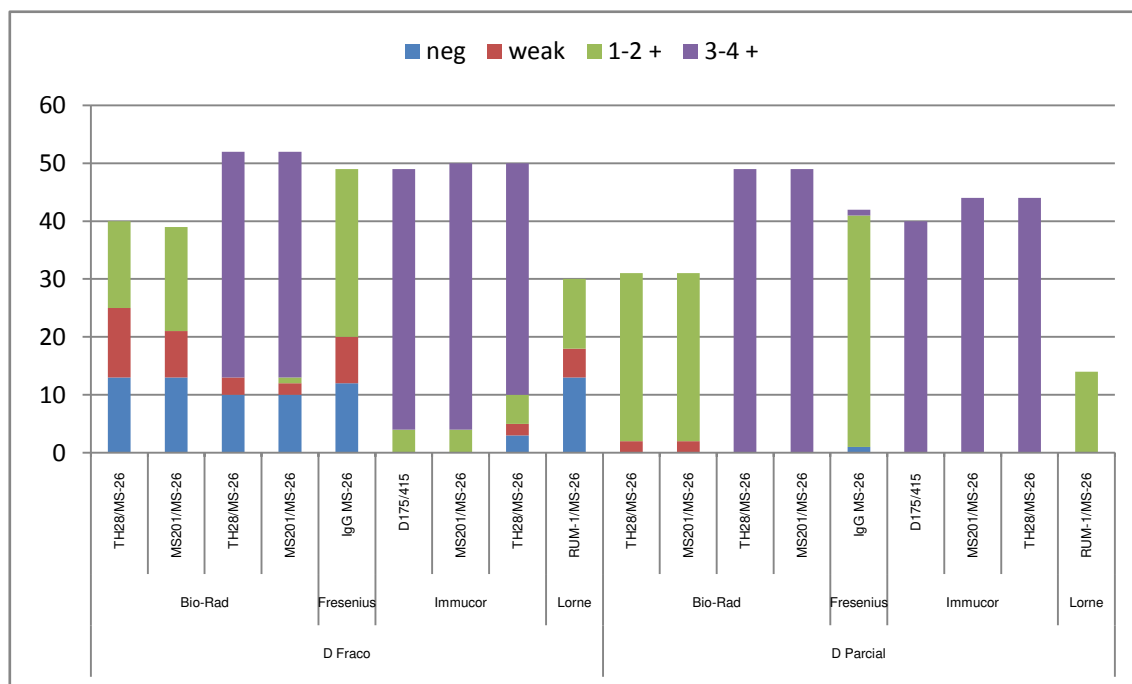


Gráfico 2 Comparativo da reatividade de diferentes clones anti-D IgG com as variantes RhD fraco e RhD parcial. Os graus de reatividade estão descritos de acordo com a intensidade de aglutinação.



6.3 Reatividade sorológica das variantes RhD parcial

Os antígenos RhD parciais apresentam um ou mais epítomos alterados em sua estrutura, entretanto o número de sítios antigênicos estimado pode estar diminuído ou semelhante ao de um antígeno RhD normal, que expressa cerca de 10.000 a 30.000 sítios antigênicos por célula⁸⁷ e portanto pode variar muito. Estas características podem explicar os resultados obtidos em nosso trabalho, onde observamos que mesmo se tratando de variantes do mesmo tipo, o padrão de reatividade em relação aos reagentes utilizados não foi similar, pois, os anti-D monoclonais são produzidos contra determinados epítomos da proteína RhD e dependendo da especificidade podem não reagir com alguns D parciais.

Em relação ao D parcial DAR1.2, os 31 indivíduos que apresentaram essa variante possuíam o fenótipo R₀r (Dccee), destes, 26 apresentaram reações variadas nos testes de aglutinação em L.I pela metodologia em tubo, com padrão de reatividade entre 0-4+. Apenas 5 amostras com a variante DAR 1.2 apresentaram reatividade semelhante nos testes de L.I, e obtiveram entre

1-2+ de aglutinação com todos os clones IgM e IgM+IgG testados. Ainda em relação a variante DAR 1.2, observamos a mesma variação de reatividade nos testes de aglutinação em L.I. na metodologia em MC, que foi realizada no equipamento automatizado com os reagentes IgM clone RUM1 e IgM+IgG clones D175+415, MS201+MS26 e TH28+MS26 Immucor. Notamos ainda padrões variados, em relação à variante DAR1 em 4 das 5 amostras, nas variantes DAR3.1 e DAU4 em 2 das 3 amostras, e também em relação ao D parcial DMH onde ocorreram variações nos padrões de aglutinação com as 2 amostras encontradas.

Pudemos constatar ainda pouca variação antigênica entre os D parciais DAU0, DAU2 e DAU5 onde observamos padrões de aglutinação entre 3-4+, e reações mais enfraquecidas entre 1-2+ para a variante RhD parcial DAU6 com todos os reagentes utilizados na fase de L.I.

Nossos resultados demonstraram que dentre os antissoros utilizados, apenas os clones RUM1 e RUM1+MS26, ambos do fabricante Lorne, detectaram todos os RhD parciais em L.I. Interessante enfatizar que o clone RUM1 Immucor utilizado na automação em MC não obteve os mesmos resultados. Duas amostras, uma identificada molecularmente como DAU4 e outra como DAR 1.2 não apresentaram aglutinação em L.I com o clone RUM1 Immucor e foram confirmadas como positivas apenas em teste confirmatório em F.S. Detectamos desempenho semelhante em relação ao clone Immucor D175+415, onde observamos reatividade com a maior parte de nossas amostras D parciais.

Os resultados obtidos em nosso trabalho em relação aos parciais DAU4, DAU5 e DAR corroboram com os encontrados por Denome⁸⁸ e colaboradores em um trabalho realizado com pacientes no Canadá, onde essas variantes foram também detectadas em L.I com o reagente anti-D D175+415 (Immucor), conforme podemos observar na Tabela 22.

Tabela 22 Análise comparativa entre as variantes DAR(4.2), DAU4 e DAU5 com o clone Blend D175+415

RhD Parcial	Padrão de Reatividade	Clone D175+415			
		Person,2017		Denomme <i>et al</i> , 2005	
		n	%	n	%
DAR (4.2)	Positivo	29	93,5	7	100
	Negativo	2	7	0	0
DAU4	Positivo	1	100	1	100
	Negativo	0	0	0	0
DAU5	Positivo	1	100	1	100
	Negativo	0	0	0	0

Assim, comprovamos que na sua maioria, os reagentes monoclonais utilizados em nosso trabalho se mostraram potentes na detecção de variantes D parcial, ou seja, sem a necessidade de testes confirmatórios. A boa performance dos reagentes monoclonais na detecção de variantes RhD confirmam achados de Kumar⁴⁶, o qual afirma que reagentes monoclonais potentes, detectam células RhD positivas que dificilmente seriam detectadas por reagentes menos sensíveis como os reagentes policlonais utilizados no passado.

Pudemos constatar ainda que 100% das variantes RhD parciais encontradas em nossos doadores, foram reativas nos testes confirmatórios na fase de AGH em tubo com todos os clones IgG e IgM+IgG utilizados, assim como em gel Liss/Coombs e F.S, demonstrando que todas as variantes RhD parcial de nossa população foram detectadas.

6.4 Reatividade sorológica das variantes RhD fraco

O fenótipo D fraco é resultado de uma menor quantidade de sítios antigênicos presentes na superfície da hemácia.⁸⁹ Tal como no fenótipo D normal, os antígenos D fracos possuem os epítomos D normais, no entanto, eles são expressos mais fracamente. A variação de expressão entre os

diferentes tipos de D fraco e os resultados obtidos em nosso trabalho, estão de acordo com os descritos na literatura e demonstram que os tipos de D fracos 11 e 38 apresentaram menor densidade antigênica^{26,85,86}, seguidos pelos tipos 2, 1 e 3.³⁷ Interessante observar em nosso trabalho, que os 3 doadores com a variante RhD fraco tipo 11 apresentaram o fenótipo R₁r, haplótipo que está associado a expressão diminuída do antígeno D²⁶, fato que explica a baixa reatividade observada em nossos testes sorológicos em relação a essa variante.

Ainda não se sabe a razão da grande variabilidade de expressão antigênica nos mesmos tipos de D fraco³³ e além do efeito "cis-trans" exercido na presença do haplótipo RHCE,⁹⁰ nenhum mecanismo molecular que comprove essa variação foi identificado. Hipóteses para essa variação de expressão, seriam diferenças entre o mesmo tipo de variante que possam afetar a meia vida do mRNA, ou, que , possam haver diferenças sutis em alguma outra parte do complexo Rh, que afetem a expressão do antígeno D.⁸⁷

A variante D fraco tipo 3, foi o tipo de D fraco mais encontrado em nossa população, com 22 doadores que representaram 20,8% do total. Destes, 20 amostras apresentaram reações variadas nos testes em L.I pela metodologia em tubo assim como em MC, e o padrão de aglutinação observado variou entre 0-4+. Apenas 2 indivíduos com a variante D fraco tipo 3 apresentaram reatividade semelhante, onde observamos entre 1-2+ de aglutinação com todos os clones IgM e IgM+IgG testados. Notamos ainda essa variação nos padrões de aglutinação em relação à variante RhD fraco tipo 1, onde observamos em sete das nove amostras encontradas com essa variante.

O antígeno RhD fraco tipo 2, apresentou grau de aglutinação inferior a 1+ nos testes em tubo e MC com todos os clones IgM utilizados. Em relação a essa variante, obtivemos resultados conclusivos apenas nos testes confirmatórios na fase de AGH. Ainda em relação aos fracos tipo 1, 2 e 3, todos foram detectados na fase de AGH em tubo com todos os clones IgG e IgM+IgG utilizados, assim como em gel Liss/Coombs e F.S. Também observamos que as variantes RhD fraco tipos 38 e 11 apresentaram um número de sítios antigênicos bem inferior aos tipos 1, 2 e 3, e que as mesmas não foram identificadas por técnicas sorológicas em tubo com nenhum dos

clones testados, demonstrando que o teste confirmatório em tubo não é suficientemente sensível para a detecção dessas variantes. Em relação a técnica em gel Liss/Coombs, verificamos melhor reatividade quando utilizamos o clone ESD1. Quando comparamos esse clone com os demais clones Bio-Rad, verificamos um padrão de reatividade superior, porém, não podemos afirmar que esse clone foi mais eficiente que os demais, pois, não foi possível testá-lo com todas as amostras de nosso trabalho. Ainda em relação aos doadores RhD fraco tipos 38 e 11, observamos que a técnica em F.S, foi a mais sensível para identificá-los.

Os tipos de variantes mais frequentes em nossa população foram respectivamente os D fracos tipos 4 (DAR 1.2), 3, 38, 1 e 2. Na população européia, Lai *et al.*⁹¹ demonstraram que os tipos mais frequentes são os tipos 1, 2 e 3. Esses dados demonstram mais uma vez que os D fracos tipos 1, 2 e 3 são as variantes mais freqüentes em europeus, e que diferentemente da nossa população, as variantes D fraco tipos 4 e 38 são mais raras. No mesmo trabalho, os resultados sorológicos obtidos com os clones RUM 1 e TH28+MS26 utilizados em equipamento automatizado, foram menos consistentes do que os obtidos em nosso estudo. Os clones IgM RUM1 e IgM TH28 obtiveram respectivamente, positividade em 71% e 28% das variantes mais frequentes naquela população na fase de L.I, enquanto que em nosso trabalho obtivemos 84% e 51% de positividade utilizando os mesmos clones. Comparando os dois trabalhos, notamos que obtivemos resultados mais consistentes, e que possivelmente existam diferenças na performance entre os 2 modelos de equipamentos, assim como diferenças de densidade antigênica dentre as variantes RhD. Pudemos constatar também, que o clone IgM RUM1 foi mais eficiente na detecção das variantes RhD fraco na fase de L.I.

A Tabela 23 sumariza os resultados obtidos em nosso trabalho em um comparativo ao estudo realizado por Lai *et al.*⁹¹

Tabela 23 Análise comparativa entre as variantes Fraco tipos 1, 2 e 3 e os clones IgM RUM1 e TH28+MS26 em equipamento automatizado

RhD Fraco	Padrão de Reatividade	Clone IGM RUM1				Clone TH28+MS26			
		Person, 2017		Lai <i>et al</i> , 2008		Person, 2017		Lai <i>et al</i> , 2008	
		n	%	n	%	n	%	n	%
tipo 1	Positivo	9	100	14	74	4	44	3	16
	Negativo	0	0	5	26	5	56	16	84
tipo 2	Positivo	1	14	1	25	0	0	0	0
	Negativo	6	22	3	38	7	32	4	44
tipo 3	Positivo	21	100	5	100	15	17	5	100
	Negativo	0	0	0	0	6	29	0	0
Total	Positivo	31	84	20	71	19	51	8	28
	Negativo	6	16	8	29	18	49	20	72

6.5 Eficiência das técnicas e clones utilizados na detecção das variantes RhD

Pelo que observamos em nosso trabalho, os testes realizados em tubo apresentaram maior variabilidade de resultados, principalmente na etapa de leitura, onde de fato pode ocorrer maior subjetividade. Diferenças na temperatura do teste, rotação das centrífugas e concentração das hemácias, podem também afetar o grau de aglutinação e contribuir para a variabilidade de resultados nesse teste.⁹¹

A diferença de reações de aglutinação entre as diversas variantes RhD pode ser observada quando comparamos nossos resultados com o trabalho de

Abdelrazik e colaboradores,⁹² que realizou um estudo sorológico e molecular de variantes RhD em uma população de doadores e pacientes do Egito. Comparando os dois trabalhos, observamos que obtivemos resultados mais consistentes na técnica em tubo em L.I. No trabalho realizado por Abdelrazik, foi utilizado o clone ESD1 (Bio-Rad) para a técnica em tubo, em nosso trabalho utilizamos diversos reagentes anti-D, e destacamos o clone RUM-1 Lorne, o qual obteve resultados mais consistentes utilizando a mesma técnica. Quando observamos os resultados obtidos na técnica em gel, notamos que nos dois trabalhos foram evidenciados resultados mais conclusivos em

relação às variantes estudadas. Diante desses dados, embora a reação de aglutinação dependa diretamente do reagente anti-D, acreditamos que o método utilizado para a realização da tipagem RhD, assim como a variação de expressão antigênica presente nos diversos tipos de D fraco e D parcial, sejam os motivos pelos quais ocorra a variabilidade de resultados em um mesmo tipo de variante. A Tabela 24 sumariza os resultados obtidos em nosso trabalho em comparação ao estudo de Abdelrazik e colaboradores.⁹²

Tabela 24 Análise comparativa entre as variantes DAR1.2, DAR3.1, Fraco tipo 1 e Fraco tipo 2 nas metodologias em tubo (L.I) e gel

Variantes RhD	Padrão de reatividade	Tubo L.I				Gel			
		Person, 2017		Abdelrazik,2013		Person, 2017		Abdelrazik,2013	
		n	%	n	%	n	%	n	%
DAR1.2	Positivo	31	100	7	32	30	100	22	100
(4.2.2)	Negativo	0	0	15	68	0	0	0	0
DAR3.1	Positivo	3	100	5	45	3	100	11	100
(4.0)	Negativo	0	0	6	55	0	0	0	0
Fraco tipo 1	Positivo	9	100	0	0	9	100	2	100
	Negativo	0	0	2	100	0	0	0	0
Fraco tipo 2	Positivo	5	71	2	40	71	100	5	100
	Negativo	2	29	3	60	0	0	0	0
Total	Positivo	49	96	14	35	49	100	40	100
	Negativo	2	4	26	65	0	0	0	0

Em relação à sensibilidade dos reagentes utilizados, de maneira geral, todos os anticorpos monoclonais produzidos para utilização na rotina de tipagem RhD disponíveis comercialmente apresentam alta afinidade e avides, mas também, podem apresentar variação na reatividade com as diferentes variantes RhD.⁹³ Essa variação pode ser consequência das características da afinidade dos anticorpos e a densidade dos antígenos RhD,^{37,94} assim como diferenças nas formulações dos fabricantes. A propósito, a diferença na formulação de reagentes pelos fabricantes, pode ser observada em nosso trabalho, quando comparamos o clone IgM RUM1 utilizado em duas metodologias diferentes. Notamos que o clone IgM RUM1 Lorne utilizado no método de aglutinação em tubo, detectou todas as variantes D parciais em L.I e portanto foi mais eficiente que o mesmo clone do fabricante Immucor que foi utilizado na automação no teste em MC. Portanto, em relação à fase de L.I, o anticorpo IgM RUM1, em especial o clone IgM RUM1 Lorne, demonstrou padrões de aglutinação superiores aos demais clones IgM utilizados, MS201, TH28 e D175.

Nos testes confirmatórios, o clone IgG MS26 foi utilizado nas técnicas em tubo, gel e F.S, e quando comparamos esse clone com as três metodologias utilizadas, pudemos observar que a técnica em F.S, apresentou maior sensibilidade na detecção de variantes de baixa densidade antigênica sem perder a especificidade.

Considerando os três métodos utilizados, observamos que as técnicas em gel e F.S apresentam algumas vantagens em relação aos testes em tubo. A padronização dos resultados é uma das maiores vantagens, visto que não há agitação de tubo para ressuspender o botão de hemácias nesses testes. Considerando esta vantagem, as técnicas em gel e F.S proporcionam resultados mais consistentes e bem definidos enquanto que os testes realizados em tubo apresentam variação na leitura, classificação e interpretação do teste. Em especial os resultados obtidos pela técnica em F.S, interpretados pelo software do equipamento automatizado, oferece maior segurança em relação à interpretação realizada de maneira visual.

Ainda em relação aos clones utilizados em nosso trabalho, é interessante mencionar que um dos reagentes Immucor (clones TH28+MS26) também não foi capaz de detectar as três amostras classificadas como RhD fraco tipo 11 no teste em F.S. Isso demonstra, que quando tratamos de variantes de baixa densidade antigênica, diferenças sutis na fabricação dos reagentes, podem influenciar na sensibilidade do teste.

6.6 Correlação das variantes RhD e discrepâncias de resultados

A partir da implantação da automação em nosso laboratório com o equipamento NEO[®] (Immucor, Norcross, GA, EUA), novos reagentes e metodologias foram introduzidos em nossa rotina de doadores e desde então discrepâncias entre resultados recentes da tipagem RhD e registros anteriores foram detectadas. A maioria das discrepâncias encontradas foram relativas as variantes D fraco tipos 38 e 11, ambas com densidade antigênica muito baixa^{69,88} e que foram previamente classificadas como RhD negativo pelo método de aglutinação em tubo e gel em fase de AGH.

Ao realizar uma análise retrospectiva de nossos resultados, observamos que sete dos dez doadores caracterizados molecularmente como D fraco tipo 38, foram tipados como RhD negativo em doações prévias. Da mesma forma, todos os doadores D fraco tipo 11 identificados neste estudo, foram também erroneamente classificados como D negativo e assim como os demais, foram todos reclassificados como RhD positivos. Considerando todas as doações incorretamente classificadas, um total de 37 unidades de sangue foram liberadas como D negativo, quando na verdade eram D positivo. Considerando um levantamento recente em nossa rotina de doadores, identificamos que temos em média 90 doadores com o fenótipo RhD fraco ao mês, e levando em conta que os doadores RhD fraco tipo 38 correspondam a cerca de 3% dessas variantes, estimamos que cerca de 2 doadores por mês, não seriam detectados pelos testes confirmatórios pelas técnicas de aglutinação em tubo e/ ou gel e seriam erroneamente tipados como RhD negativos.

6.7 Avaliação de reagentes anti-D para utilização na rotina de doadores de sangue

Como validação da metodologia e dos clones citados, além de amostras de doadores RhD+ com fenótipos R1R1, R2R2, R0r, R1r, R1R1, R1R2 e R1r que fazem parte da rotina de validação de antissoros anti-D, recomendamos a inclusão de amostras de hemácias de doadores com fenótipos RhD parcial DAR1.2 e RhD fraco tipo 38, previamente identificadas por técnicas de biologia molecular, conforme fluxo descrito Figura 23.

Doadores com a variante DAR1.2 são adequados para a validação de antissoro anti-D clones IgM, pois, podem apresentar reações bastante enfraquecidas nos testes em L.I, e doadores RhD fraco tipo 38, apresentam a mesma característica, porém, em testes confirmatórios, o ideal para avaliação de antissoro anti-D clones IgG.

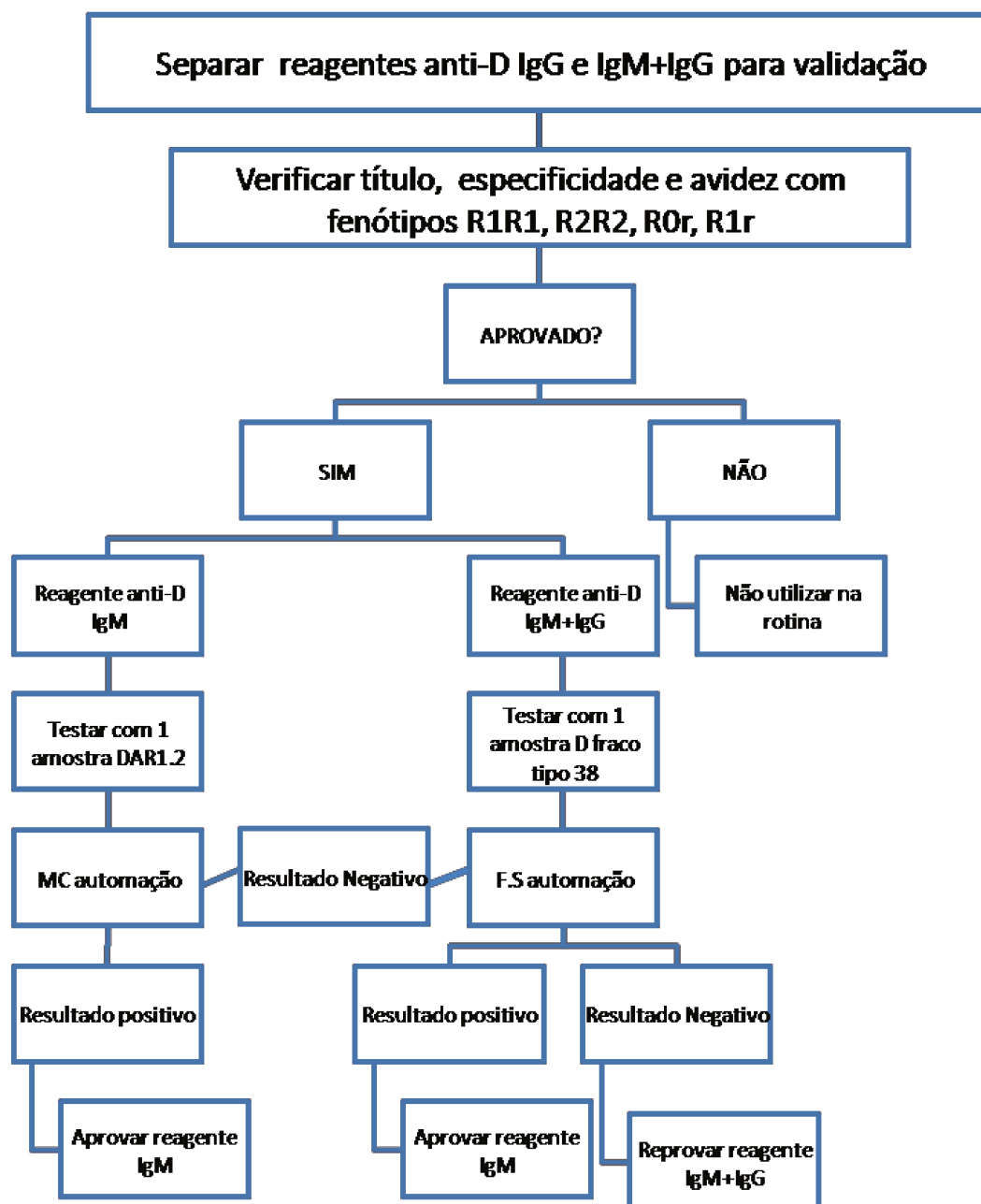


Figura 23 Fluxograma para validação de reagentes anti-D IgM e IgM+IgG

6.8 Recomendações para a rotina de tipagem RhD em doadores de sangue

Neste trabalho observamos que a sensibilidade do método assim como a dos reagentes anti-D, influenciam nos resultados da tipagem RhD.

Em relação às metodologias utilizadas, todas apresentaram pontos positivos e negativos. Embora o teste de aglutinação direta em tubo tenha um custo menor, ele demonstrou ser menos sensível para detectar variantes do antígeno D com baixa densidade antigênica.

O teste em gel é mais sensível quando comparado ao teste em tubo, pode ser utilizado em processos automatizados, mas é mais oneroso e também não foi sensível o suficiente para detectar todas as variantes RhD.

A técnica em fase sólida utilizada como teste confirmatório em um equipamento automatizado, demonstrou ser a única metodologia capaz de detectar todas as variantes D, incluindo os tipos de D fraco que expressam menos que 200 sítios antigênicos como D fraco tipo 38 e D fraco tipo 11.

De acordo com os nossos resultados, dentre os diversos clones e métodos utilizados, recomendamos o clone IgM RUM1 para os testes em L.I para os métodos de tubo e MC, considerando que o mesmo apresentou maior intensidade de aglutinação na primeira fase da reação. Para metodologia em gel, dentre os reagentes testados, o clone IgG ESD1 foi o mais eficiente na detecção da variante D fraco tipo 38, e portanto é a melhor escolha a ser utilizada com essa técnica.

Se considerarmos que a metodologia e reagente mais adequados para a rotina de doadores são os que identificam o maior número de variantes RhD da forma mais eficiente possível, a recomendação para a rotina de tipagem RhD seria a combinação da metodologia de F.S com os clones D175+415 e MS201+MS26, visto que, foram os únicos a detectarem as variantes RhD fraco tipos 38 e 11, variantes de menor densidade antigênica. A estratégia proposta para cada método descrito neste trabalho está representada na figura 24.

Tipagem RhD Fase de Leitura Imediata	Tipagem RhD Teste Confirmatório	Tipagem RhD Teste Confirmatório
•Método de aglutinação em tubo - Clone IgM RUM1 •Método de aglutinação em microplaca - Clone IgM RUM1	•Método de aglutinação em gel - Clone IgG ESD1	•Método de Fase Sólida - Blend D 175+415 •Método de Fase Sólida - Blend MS201+MS26

Figura 24 Esquema descrevendo os clones anti-D mais adequados para as metodologias de tubo, microplaca, gel e fase sólida

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a complexidade da tipagem RhD, através dos diferentes padrões de reatividade obtidos entre os diversos clones e metodologias utilizados na rotina imunohematológica.

Em relação aos reagentes monoclonais anti-D, observamos que a reatividade dos mesmos, depende da concentração e avidéz dos anticorpos presentes nesses reagentes. De fato, o número de sítios antigénicos, a acessibilidade de um epítopo, a apresentação, as concentrações e a classe de imunoglobulina podem afetar as reações dos antígenos RhD fracos e parciais com reagentes monoclonais,³⁹ todos estes aspectos devem ser considerados e portanto a escolha dos reagentes e da metodologia requer atenção especial, principalmente em uma população mista com influência de etnias caucasianas, indígenas e africanas, como a população brasileira.

7 Conclusões

Considerando os resultados obtidos em nosso trabalho, os métodos e reagentes anti-D utilizados nos testes sorológicos para determinação das variantes RhD em amostras de doadores de sangue, concluímos que:

1. Não é possível diferenciar o antígeno RhD fraco de um antígeno RhD parcial por técnicas sorológicas.
2. Testes moleculares são importantes para caracterização das variantes presentes em nossa população.
3. Nossos resultados diferem de estudos na população européia, onde as os RhD fracos tipos 1, 2 e 3 são mais comuns.
4. Em nossos doadores as variantes mais encontradas foram: DAR1.2, D Fraco tipo 3 e D Fraco tipo 38 e corresponderam a 61% do total de amostras do estudo.
5. Observamos variação da expressão antigênica entre as amostras que apresentam o mesmo tipo de variante RhD.
6. O clone IgM RUM-1 obteve o melhor desempenho na detecção de variantes RhD nos testes de aglutinação em L.I. em tubo, assim como nos testes realizados em microplaca.
7. Para a metodologia de gel, o clone ESD1 Bio-Rad, demonstrou ser uma boa opção para detectar variantes de D, incluindo o D fraco tipo 38.
8. As variantes RhD fraco tipo 11 e tipo 38 apresentam baixa densidade antigênica e podem não ser detectadas dependendo das técnicas e reagentes utilizados.
9. Nossos resultados demonstram claramente a diferença na formulação dos reagentes anti-D que se encontram no mercado brasileiro.
10. O teste confirmatório em F.S utilizando os reagentes Blend D175+415 e MS201+MS26, é uma boa opção para detecção de variantes com baixa densidade antigênica como os D fracos tipo 38 e 11.

11. O teste confirmatório ainda é imprescindível para detecção de variantes RhD em doadores de sangue, com a finalidade de evitar a aloimunização RhD em pacientes RhD-negativo.

8 Referência Bibliográfica

1. Lomas-Francis, C.;Reid, The Rh blood group system: the first 60 years of discovery. Immunohematology. v16:p. 7-17, 2000
2. Daniels,G: Bromilow,I.Essential Guide to Blood Groups. Blackwell Publishing, 2007, cap.4, p.33.
3. Reid.M, Lomas Francis C.The Blood Group Antigen Factsbook.2 ed:Academic Press;2004
4. Levine P, Celano MJ, Wallace J, Sanger R. A human 'D-like' antibody. Nature.1963;198:596-7.
5. Huang,C.H.Molecular insights into the Rh protein family and associated antigen, Current Opinion in Hematology,4:94-103,1997
6. Storry, J.R.; Castilho, L.; Daniels, G; Flegel, W.A.; Garraty, G.; de Haas, M.; Hyland, C.; Lomas-Francis, C.; Moulds, J.M.; Nogues, N.; Olsson, M.L.; Poole,J.; Reid, M.E.; Rouger, P.; Van Der Schoot, E.; Scott,M.; Tani, Y.; YU, L.C.; Wendel,S.; Westhoff, C.; Yahalom, V.; Zelinski T. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Cancun report (2012). Vox Sang, v.107, n.1, p.90-6, 2014.
7. Mouro, I.; Colin, Y.; Cherif-Zahar,B. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. Nature Genetic, 5:62-65,1992.
8. Flegel WA. The genetics of the Rhesus blood group system. Blood Transfus. 2007;5(2):50-7.

9. Westhoff, C.M. Review : the Rh blood group D antigen dominant, diverse, and difficult. *Immunohematology*, v. 21, p. 155-163, 2005.
10. 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.
11. 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
12. Wagner FF, Flegel WA. *RHCE* represents the ancestral *RH* position, while *RHD* is the duplicated gene. *Blood* 2002; 99:2272–3.
13. Arce MA, Thompson ES, Wagner S, Coyne KE, Ferdman BA, Lubin DM (1993) Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 82:651–655.
14. Westhoff, C.M. Rh complexities: Molecular biology genotyping. *Transfusion* v.47:17S-22S, 2007.
15. Agre, P.; Cartron, J.P. Molecular Biology of the Rh antigen. *Blood*, 78:551-563, 1991.
16. Le Van Kim, C., Cherif-Zahar, B., Raynal, V., Mouro, I., Lopez, M., Cartron, J-P. and Colin, Y. (1992) Multiple Rh mRNA isoforms are produced by alternative splicing. *Blood* 80, 1074–1078.
17. De Vetten, M.P.; Agre, P. The Rh Polypeptide is a major fatty acid acylated erythrocyte membrane protein. *Journal Biological Chemistry*, 263:18193-18196, 1988.

18. 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.
19. Eysers SAC, Ridgwell K, Mawby WJ, Tanner MJA. Topology and organization of human Rh (Rhesus) blood group-related polypeptides. *J Biol Chem* 1994;269:6417.
20. Cherif-Zahar B, Raynal V, Gane P, *et al.* Candidate gene acting as a suppressor of the *RH* locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat Genet* 1996;12:168-73.
21. Avent, N.D.; Reid, M.E. The Rh Blood group system: a review. *Blood*, 95:375-387, 2000.
22. Wagner, F.F.; Flegel, W.A. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 95, 12:3662-3668, 2000.
23. Avent, N.D.; Butcher, S.K.; Lui, W. Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmic face of the human erythrocyte membrane. *Journal Biological Chemical*, 267:15-134, 1992.
24. Flegel, WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin in Hemat* 2006; v.13:476-83.
25. Race, R.R. Modern concepts of the blood group system. 127 *Ann NY Acad. Sciene*: 884-891, 1965.
26. Wagner, F.F., A. Frohmajer, and W.A. Flegel, *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics*, 2001. 2: p. 10-24. 25

27. Luettringhaus, T.A., D. Cho, D.W. Ryang, and W.A. Flegel, An easy *RHD* genotyping strategy for D- East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion*, 2006. 46(12): p. 2128-37.

28. Zhuo, C.S., X.F. Zhuo, Y.J. Guo, and C.Q. Wang, *RHD* gene polymorphism of RhD negative individuals in population of Fujian province. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui* = Journal of experimental hematology /Chinese Association of Pathophysiology, 2008. 16(2): p. 435-8.

29. Race RR, Sanger R. Blood groups in man. ed Sixth Blackwell; Oxford, England: 1975.

30. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V, Van Huffel V, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. 1991;78:2747–2752. [[PubMed](#)]

31. Singleton BK, Green CA, Avent ND, *et al.* 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.

32. Shao CP, Maas JH, Su YQ, *et al.* Molecular background of Rh D-positive, D-negative, D(el) and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang*. 2002;83:156–61.

33. Denomme, G.A.; Dake, L.R.; Vilensky, 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.

34. Stratton F: A new Rh allelomorph. *Nature* 158: 25-26 (1946).
35. Rouillac, C.; Gane, P.; Cartron, J.P.; Le Pennec, P.Y. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D and RhC/e in phenotype. *Blood*. 87:4853-4861, 1996.
36. Wagner, F.F., C. Gassner, T.H. Muller, D. Schonitzer, F. Schunter, and W.A. Flegel, Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood*, 1999. 93(1): p. 385-93.
37. Wagner, F.F., A. Frohmajer, 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.
38. Muller, T.H.; Wagner, F.F., Trockenbacher, A.; Eicher, N.I.; Flegel W.A.; Schonitzer, D.; Schunter, F.; Gassner, C. PCR screening for common weak D type shows different distributions in three Central Europeans populations. *Transfusion*, 41:45-52, 2001.
39. <http://www.isbtweb.org/> Table blood group systems v4.0 141125.
40. The Blood Group Antigen Facts Book 2012; 3rd
41. Westhoff, C.M. The Rh blood group system in review: A New face for the next decade. *Transfusion*, 44: 1663-1673, 2004.
42. Cepellini, R. et. al. An interaction between alleles at the Rh locus in man which weariness of reactivity of the Rh0 factor (Du). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 41, p. 283, 1993.
43. 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.

44. Credidio ,DC.; Pellegrino, J.; Castilho L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology*. 2011;27(1):6-11.
45. Flegel, W.A., von Zabern, I., Doescher, A., Wagner, F.F., Strathmann, K.P., Geisen, C. et al, D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion*. 2009;49:1059–1069.
46. Kumar L. Difficulties in Immunohematology: The weak D antigen. *MJAFI*. 2005;61(4). Epub 350.
47. Okubo, Y., H. Yamaguchi, T. Tomita, and N. Nagao, A D variant, Del? *Transfusion*, 1984. 24(6): p. 542.
48. Wagner, T., G.F. Kormoczi, C. Buchta, M. Vadon, G. Lanzer, W.R. Mayr, and T.J. Legler, Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion*, 2005. 45(4): p.520-6.
49. Westhoff CM. The structure and function of the Rh antigen complex. *Semin Hematol* 2007;44:42-50.
50. Xu, Q., J. Zhang, Q. Wang, S. Zhang, and G. Si, *RHD* gene polymorphism among RhD-negative Han Chinese. *Chinese medical journal*, 2003. 116(10): p. 1539-43.
51. Wang Y-H, Chen J-C, Lin K-T, Lee Y-J, Yang Y-F, Lin T-M. Detection of RhDel in RhD-negative persons in clinical laboratory. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2005; 146(6): 321-5.
52. Srijinda S, Suwanasophon C, Visawapoka U, Pongsavee M. RhC Phenotyping, Adsorption/Elution Test, and SSP-PCR: The Combined Test for D-Elute Phenotype Screening in Thai RhD-Negative Blood donors *ISRN Hematol*. 2012;2012:358316

53. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion*. 2005; 45(10): 1581-4.
54. Rouillac, C., Y. Colin, N.C. Hughes-Jones, M. Beolet, A.M. D'Ambrosio, J.P. Cartron, and C. Le Van Kim, Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D- CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood*, 1995. 85(10): p.2937-44.
55. Mouro, I.; Le Van Kim, C.; Rouillac, C. Rearrangements of the blood group *RHD* gene associated with D^{VI} category phenotype. *Blood*, 83: 1129-1135, 1994.
56. 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.
57. Flegel, W.A. and F.F. Wagner, Molecular genetics of *RH*. *Vox sanguinis*, 2000. 78 Suppl 2: p. 109-15.
58. Flegel, W.A. and F.F. Wagner, RHD antigen density and agglutination in RHD variant red cells. *Transfus Clin Biol*, 1996. 3(6): p. 385-6.
59. Lomas, C., K. McColl, and P. Tippett, Further complexities of the Rh antigen D disclosed by testing category DII cells with monoclonal anti-D. *Transfusion medicine*, 1993. 3(1): p. 67-9.
60. Tippett, P.; Lomas-Francis, C.; Wallace, M. The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang*, v.70, p.123-31, 1996.

61. Scott, M.L., D. Voak, J.W. Jones, N.D. Avent, W. Liu, N. Hughes-Jones, and H. Sonneborn, A structural model for 30 Rh D epitopes based on serological and DNA sequence data from partial D phenotypes. *Transfus Clin Biol*, 1996. 3(6): p. 391-6.
62. Carritt B, Kemp TJ, Poulter M: Evolution of the human RH (rhesus) blood group genes: a 50 year old prediction (partially) fulfilled. *Hum Mol Genet* 6: 843-850 (1997).
63. 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*.2002 Jul 1;100(1):306-11.
64. Kohler, G.; Milstein, C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.
65. Blanchard, D. Biochemical Approaches to the Detection and Characterization of Membrane Proteins Carrying Blood Group Determinants. *Transf.Clin.Biol.V.4* p.217-222, 1995.
66. Gassner, C, Doescher A, Drnovsek TD, *et al.* Presence of RHD in serologically D–, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 2005;45:527-38
67. Kulkarni, S.S. *et al.* Potencial of commercial anti-D reagents in the identification of partial D variants in Indian population. *Indian J. Med. Res.*, v.125, p. 641-644, 2007.
68. Baleotti,W; Suzuki,RB; Ruiz, MO; Fabron,A;Castilho,L.Severe Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn Due to an Anti-D Developed Against the Partial D DAR.*Transfusion* ,v.50, p.148A

69. Ansart-Pirenne, H.; Asso-Bonnet, M.; Le Pennec, P.Y.; Rossel, M.; Patereau, C.C.; Noizat-Pirenne, F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*, v.44, p.1282-1286, 2004.
70. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M: *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. London: Blackwell Scientific Publications (1993)
71. Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM, *et al.* A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984;82:719-721.
72. 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;38:1015-21
73. Arnoni CP, Latini FRM, Muniz JG, Gazito D, Person RM, Vendrame TAP, Barreto JA, Castilho L. How do we identify RHD variants using a practical molecular approach? *Transfusion* 2014; 54:962-9.
74. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
75. <http://www.uni-ulm.de/wflegel/RH/ version 2.0>
76. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab* 2002;48:53–9.

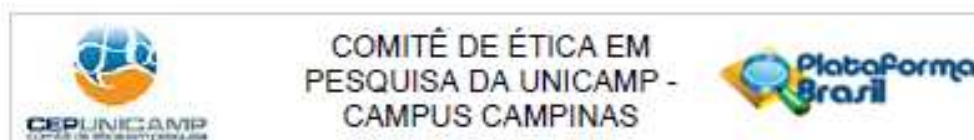
77. Flegel WA. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion* 2007;47(1 Suppl):47S–53S.
78. Garraty, G. Do we need to be concerned about weak D antigens? *Transfusion*, v. 45, p. 1547-1551, 2005.
79. Chen Q, Flegel WA. Random survey for RHD alleles among D+ European persons. *Transfusion* 2005;45:1183–91.
80. Dogic V, Bingulac-Popovic J, Babic I, *et al.* Distribution of weak D types in the Croatian population. *Transfus Med* 2011;21:278–9.
81. Cruz BR, Chiba AK, Moritz E, Bordin JO. RHD alleles in Brazilian blood donors with weak D or D-negative phenotypes. *Transfus Med* 2012; 22:84-89.
82. Wagner FF, Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B4 and Flegel WA: RHD allele distribution in Africans of Mali *BMC Genetics* 2003 4:14
83. Campos FC, Mota MA, Aravechia MG, Torres KB, Bub CB, Kutner JM, Castilho L. Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. *J Clin Lab Anal* 2016; 30:845-48.
84. Daniels G. variants of RhD-current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology* 2013; 161:461-470.
85. Rodrigues MJ, Rodrigues F, Tilley L, Poole J, Chabert T, Souza G. Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. *Transfusion*. 2006;46 Suppl.:141A–2A (abstract).

86. Costa S, Martin F, Chiba A, Langhi D Jr, Chiattonne C, Bordin J. *RHD* alleles and D antigen density among serologically D–C+Brazilian blood donors. *Transfus Med*. 2014;24(1):60–1.
87. Beckers EA, Faas BH, Ligthart P, *et al*. Lower antigen site density and weak D immunogenicity cannot be explained by structural genomic abnormalities or regulatory defects of the *RHD* gene. *Transfusion*. 1997;37:616–23.
88. 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;45:1554-60. [PubMed]
89. Daniels, G. Human blood groups. John Wiley & Sons (2008)
90. Araszkievicz P, Szymanski IO. Quantitative studies on the Rh-antigen D. Effect of the C gene. *Transfusion* 1987;27: 257-61.
91. Lai M, Grasso C, Boschi I, *et al.*: Characterization of anti-D monoclonal antibody reagents based on their reactivity with the weak D phenotype. *Transfusion* 2009; 49:937–942
92. Abdelrazik AM, Elshafie SM, Ezzat Ahmed GM, Abdelaziz HM. Combining serology and molecular typing of weak D role in improving D typing strategy in Egypt. *Transfusion*. 2013;53(suppl 2):2940–2944. [PubMed]
93. Issit PD, Anstee DJ. Applied blood group serology. 4th ed. Durham (NC): Montgomery Scientific Publications, 1998. P.327-423.

94. Kormoczi GF, Forstemann E, Gabriel C, Mayr WR, Schonitzer D, Gassner C. Novel Weak D types 31 and 32: adsorption-elution-supported D antigen analysis and comparison to prevalent weak D types. *Transfusion* 2005;45:1574-80.

9 ANEXOS

9.1 Documento de aprovação do Comitê de ética em Pesquisa da UNICAMP



Continuação do Parecer: 1.703.698

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_415898.pdf	26/08/2016 14:37:12		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_final_RDMP_2016.pdf	26/08/2016 14:35:15	Rosângela Duarte de Medeiros	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_Resposta_UNICAMP.pdf	26/08/2016 14:33:28	Rosângela Duarte de Medeiros	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Final.pdf	26/08/2016 14:32:48	Rosângela Duarte de Medeiros	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	POBM001_Biorrepositorio.pdf	26/08/2016 14:32:24	Rosângela Duarte de Medeiros	Acelto
Outros	Matricula.pdf	10/06/2016 15:10:43	Rosângela Duarte de Medeiros	Acelto
Folha de Rosto	foihaderosto.pdf	20/05/2016 15:08:33	Rosângela Duarte de Medeiros	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 02 de Setembro de 2016

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7167 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

9.2 Artigo submetido a aprovação

SEROLOGIC FINDINGS OF *RHD* ALTERED ALLELES IN BRAZILIAN BLOOD DONORS

Rosangela de Medeiros Person¹, Carine Prisco Arnoni¹, Janaína Guilhem Muniz¹, Tatiana Aparecida de Paula Vendrame¹, Flavia Roche Moreira Latini¹, Jordão Pellegrino Jr², Lilian Castilho²

¹ Colsan - Associação Beneficente de Coleta de Sangue, São Paulo, SP, Brazil

² Hemocentro-Unicamp, Campinas, SP, Brazil

Running title: Serological findings of *RHD* variants

Key Words: D variant, *RHD* alleles, weak D, partial D, hemagglutination, RHD genotyping

Corresponding author (proofs and reprint requests): Rosangela de Medeiros Person

Colsan – Associação Beneficente de Coleta de Sangue
Address: Avenida Jandira 1260, Indianópolis – CEP 04080-006
Telephone: (55 11) 5055-6588
Fax: (55 11) 5055-6588
Email:@colsan.org.br

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grant nº 2015/07559-9

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest relevant to the manuscript.

Abstract

Background: We evaluated different technologies and clones of anti-D to propose the most appropriate serologic strategy to detect the largest numbers of D variants in blood donors. **Methods:** We selected 101 samples from Brazilian blood donors with different expressions of D in our donor routine. The tests were performed at immediate spin (IS) with eleven commercially available anti-D reagents in tube and microplate. D confirmatory tests for the presence of weak D included the indirect antiglobulin test (IAT) in tube, gel and solid-phase red blood cell adherence (SPRCA). All DNA samples were extracted from peripheral blood and the D variants were classified using different molecular assays. **Results:** *RHD* variants identified by molecular analysis included weak D types 1, 2, 3, 11 and 38 and partial Ds (DAR1.2, DAR1, DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU4, DAU5, DAU6, DMH and DVII). The RUM-1/MS26 monoclonal-monoclonal blend was the best anti-D reagent used to detect the D antigen at the IS phase in tube, reacting with 83% of the D variants while the anti-D blend D175+415 was the best monoclonal (MoAb) used in microplate to minimize the need of IAT, reacting with 82.2% of the D variants. D confirmatory tests using SPRCA showed strong positive reactivity (3-4+) with 100% of the D variant samples tested. **Conclusion:** Our results show that even using sensitive methods and MoAbs to ensure the accurate assignment of D antigen, at least 17% of the donor samples need a confirmatory D test in order to avoid alloimmunization in D-negative patients.

Introduction

Rh system is the second clinically important blood group system after the ABO (1). Two highly homologous genes, *RHD* and *RHCE*, which are located on Chromosome 1 encode the RhD and RhCE proteins, respectively (2,3).

D antigen is the most important antigen of Rh system because of its implication in hemolytic transfusion reaction (HTR) and hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). The D-negative phenotype is observed in 15% to 17% of Caucasians compared to 5% of Africans and less than 3% in Asian populations (4). In Caucasians the D-negative phenotype results predominantly from deletion of the *RHD* gene. In Africans, besides *RHD* gene deletion and the inactive genes, *RHD* Ψ and the *RHD-CE-D^s* hybrid gene give rise to the loss of D expression (5). In South East Asian populations, 15-30% of D-negative individuals carry a *RHD* allele that encodes a protein with very weak expression of D antigen, leading to the DEL phenotype (6,7), which can only be detected by adsorption-elution techniques (8).

Although most individuals are either RhD-positive or RhD-negative, a plethora of variants of D have been described (9). The *RHD* gene is highly polymorphic and D expression is caused by a large number of *RHD* alleles. Part of these alleles leads to a reduced or variable expression of D antigenic epitopes on the red cell surface (9). These variations in the RhD antigen structure result either in a partial or a weak D phenotype, leading to qualitative or quantitative changes in Rh protein expression respectively.

Despite the fact that more sensitive monoclonal reagents have been produced, not all anti-D reagents detect the same partial or weak expression of D antigen (10-12). Donors and patients with these atypical alleles may be mistyped by serology because many of these alleles do not react equally with all anti-D typing reagents.

Populations with African admixture, such as, the Brazilian population, can present a high variety of *RHD* alleles (13). Considering this fact, the best strategy of D typing in the donor routine would be a suitable combination of anti-D reagents to identify weak D variants that could induce anti-D formation in D-negative recipients.

In this report, we evaluated different technologies and clones of anti-D to propose the most appropriate serologic strategy to identify weak D variants in donor's routine. We also performed molecular analyses to characterize the *RHD* alleles in order to know the *RHD* repertoire in this Brazilian population and to identify those *RHD* alleles undetected in serologic tests that could be responsible for transfusion-induced anti-D formation.

Methods

Blood samples

From Nov 2013 to Aug 2014, we selected a total of 101 blood donor samples from 123,936 samples RhD typed in microplate with two commercial anti-D monoclonal antibodies (MoAbs) using an automatic immunoassay analyzer (Neo®, Immucor, Norcross, GA, USA) that showed atypical D serologic typing (reactivity pattern < 4+). This study was conducted in accordance with an institutional ethical review.

Serologic analysis

Once a discrepancy was noted with the automated assay Neo®, the red cells (RBCs) were further analyzed at IS in tube test with eleven commercially available anti-D reagents from different sources (Lorne Laboratories, Berkshire, UK; Fresenius, São Paulo, Brazil; Bio-Rad, Lagoa Santa, BH, Brazil and Immucor, Norcross, GA, USA). D confirmatory tests for the presence of weak D included the indirect antiglobulin test (IAT) in tube test, gel test and solid phase red cell adherence (SPRCA) for RBC samples with reactivity <2+ at immediate spin in tube and for samples with reactivity <4+ in microplate. The protocols were performed according to the manufacturer's instructions. The technologies and clones used in the serologic analysis are shown in Table 1. The serologic reactivity was graded according to the degree of hemagglutination from 0 to 4+.

Molecular analysis

DNA was extracted from whole blood using the QIAmp DNA Blood Mini-Kit (Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacture's recommendations. The DNA concentration and purity were calculated by the measurement of optical density at 260 and 280 nm using a NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermal Cycler, Uniscience Inc., São Paulo, SP, Brazil) and DNA samples were kept at -20 °C. Molecular tests performed on all 101 samples with atypical results in serology included: a multiplex PCR that detects *RHD* gene hybrid alleles, PCR-RFLP and Sanger sequencing according to our approach previously described (14, 15).

Results

Molecular findings

Molecular analyses confirmed that all RBC samples that showed atypical D serologic typing had altered *RHD* alleles and in all, 15 different *RHD* alleles were identified (Table 2). From 101 blood donor samples tested, 49 samples (48.5%) were molecularly characterized as partial D, 51 (50.5%) as weak D and 1 as weak/partial D (1%). DAR1.2 was the most frequent allele found (29.7%), followed by weak D type 3 (20.8%), weak D type 38 (9.9%) and weak D type 1 (8.9%). Less prevalent *RHD* alleles corresponded to 30.7% of all samples studied. Weak D types 1, 2 and 3 represented 37% of the RhD variants in this multiethnic population.

Serologic findings

Table 2 shows the molecular types of D variants found and the pattern of reactivity in degree of agglutination at IS and Table 3 summarizes the results obtained on D confirmatory test by IAT. In both tables the results were described in four patterns of hemagglutination: 0; W; 1-2+; 3-4+. The data showed a wide range of reactions, mainly at the IS phase in tube test.

When the reagents showed an immediate spin-negative result in tube test, the RBCs were tested for the presence of weak D with the IAT. The RUM-1/MS26 monoclonal-mono-clonal blended approved reagent was the best monoclonal (MoAb) anti-D reagent used to detect the D antigen at the IS phase in tube, reacting with 83% of the D variants while the anti-D blend D175+415 was the best MoAb used in microplate to minimize the need of IAT on donor samples, reacting with 82.2% of the D variants. D confirmatory tests using gel cards showed (3-4+) agglutination reactions in 88% of the samples, but serologic agglutination patterns were more consistent with MoAbs in solid phase, in which 100% of the samples showed strong positive reactivity (3-4+).

The monoclonal anti-D IgM RUM1 and the blend RUM-1/MS-26 reagents were reactive with all DAR1.2, DAR1 and weak D Type 3 samples in tube and most of them reacted 1+ to 2+, while the other anti-D reagents showed inconsistent results.

Weak D types 1 and 2 samples showed heterogeneity in their reactivity with the anti-D reagents at IS. The monoclonal anti-D IgM RUM-1 was the only reagent to give positive reactions with all weak D type 1 samples analyzed, while weak D type 2 samples had at least one IS-negative result with all clones tested. Nevertheless, all of these samples were detected by IAT with all anti-D reagents tested. Similar results were obtained in microplate with anti-D IgM RUM-1 and blend D175+415 reagents, however, this test was less sensitive with the other MoAbs anti-D used. All blood samples classified as DAR1.2, DAR1, weak D types 1, 2 and 3 reacted with all monoclonal anti-D tested by gel. DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU5, DAU6, DVII and DMH were detected at IS with all reagents and methods and reacted strongly in IAT in tube, gel and in SPRCA.

Only 30% of weak D type 38 samples were detected by IAT in gel test, while all weak D type 38 and the three weak D type 11 RBCs reacted strongly (3-4+) with the Immucor anti-D Blend D175+415 in SPRCA.

Discussion

Determining RhD antigen status with reliable reagents and methods is required and essential to detect D variants in order to avoid alloimmunization in RhD-negative patients. However, the serologic distinction between D-positive and D-negative RBCs is not always straightforward in the case of D variants (16). Monoclonal anti-D reagents are evaluated for their ability to identify some D variants and to not react with other variants.

Herein we have demonstrated the serologic RhD typing complexity to identify D variants showing the differences of reactivity obtained with different anti-D reagents and methods. In the donor samples studied, five different weak D types (1, 2, 3, 11 and 38) and eleven partial D (DAR1.2, DAR1, DAR3.1, DAU0, DAU2, DAU4, DAU5, DAU6, DMH and DVII) were identified by molecular analyses.

RHD alleles are grouped into D clusters, some of which comprise many alleles. Among the weak D type 4 cluster, partial D DAR1.2 was the most prevalent partial D in our donors corresponding to 30% of our samples. This finding is in agreement with the previously reported frequency of DAR1.2 allele in Brazilian blood donors (17). We observed that the variant alleles from the weak D type 4 cluster were better reactive by IAT with all monoclonal anti-D and methods used.

Among the DAU cluster we found a small number of samples classified as DAU0, DAU2, DAU4, DAU5 and DAU6 and all of them were detected at IS, except DAU4, which was not detected with the MoAb anti-D IgM RUM-1 and the RUM-1/MS-26 blended reagents. Of these, only DAU0 was found in Caucasians while the other four DAU alleles were observed in Africans (18).

Among the most common weak D types, weak D types 1, 2 and 3 were found in 37% of our D variant blood donors. This finding is comparable to frequencies published for other donor population from Southeast Brazil (13, 17, 19), but is in contrast with studies performed in Europeans where these weak D types are common encompassing more than 90% of all European weak D individuals (20, 21). Weak D type 1 was better detected with the MoAb anti-D IgM RUM-1 and therefore we could recommend this clone for detection of this weak D type at IS in tube or microplate. Weak D type 2 showed a great variability in the reactivity at IS phase with all MoAbs anti-D used and for this weak D type we would recommend the indirect antiglobulin test in gel or the SPRCA test. Weak D type 3 was the most prevalent weak D type found in our donor population representing 20.8% of the samples and was reactive with most of the monoclonal anti-D employed.

By changing reagents and technologies, D antigen discrepancies between existing tests and historical records occur. When the automation using an immunoassay analyzer (Neo®, Immucor, Norcross, GA, USA) was introduced in our blood donor's routine, D typing discrepancies with previous typing results performed manually were found. Most of them were related to weak D type 38 and type 11 that have very low antigen density (21,22) which were previously classified as D negative. Weak D type 38 is predominant in the Portuguese population (23) but has also been found with a considerable frequency among Brazilians (19, 22) and corresponded to 10% of our D variant samples. When we performed a look back, we observed that 7 of 10 donors classified as weak D type 38 were mistyped as D negative in previous donations. Likewise, all donors with weak D type 11 identified in this study were previously typed as D negative. We found D antigen discrepancies between the recently implemented automated technology and historical records results in 37 blood donors erroneously typed as D negative. Costa et.al (22) showed a similar scenario in 4 of 520 donors typed as RhD-negative, who were molecularly typed as weak D.

Serologic discrepancies caused by D variants can only be resolved by the use of *RHD* genotyping. However, this strategy cannot be applied routinely due to the cost and feasibility. The reactivity of the monoclonal anti-D reagents depends on the concentration and avidity of antibodies. In fact, the number of antigenic sites, accessibility of an epitope, the presentation, the concentrations and the class of immunoglobulin can affect the reactions of weak and partial RhD antigens with monoclonal reagents (24). The choice of the reagents and methodology requests special attention, mainly in a mixed population with influence of Caucasian, Indian and African ethnicities, as Brazilians, leading to diversity of D variants, besides atypical heterozygous composition or the presence of new alleles.

In this study, the clones IgM RUM-1 and RUM-1/MS26 blended had better performance to detect D variants at the IS tube tests, while the IgM RUM-1 showed better reactivity in microplates. For gel IAT, the ESD1 clone showed to be a good option to detect D variants, including some weak D type 38 samples.

Regarding the technologies used, all of them have positive and negative points. Although the tube test has a reduced cost and a short incubation, it showed to be less sensitive to detect D variants, requiring more RhD work up. Gel test is more sensitive, and could be used in an automated process, but it is more costly. Solid phase is used as a confirmatory test in an automated analyzer and was the unique methodology able to detect all the D variants, including the weak D types with very low density as the weak D type 38 and the weak D type 11, that express less than 200 D antigen sites.

Serology cannot discriminate weak D from partial D, but may provide a clue about the probable D variant to be tested molecularly. The sensitivity of the method used to type donors may depend on the anti-D reagent used and on the exact conditions of the methods. Our results show a great variation of methods and reagents to detect D variants in Brazilian blood donors and even using sensitive methods and different MoAb anti-D reagents to ensure the accurate assignment of D antigen, at least 17% of the donor samples would need a confirmatory D test in order to avoid alloimmunization in D-negative patients. Therefore, according to our results, RBCs with D-negative results at IS should be tested by IAT.

In conclusion, this study allowed us to compare and determine the capacity and limitations of different technologies and reagents to identify the most frequent D variants in a population with high degree of miscegenation, particularly those with weakened D expression.

References

1. Avent, N.D. and M.E. Reid, The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000; 95: 375-87
2. Cherif-Zahar B, Mattei MG, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron J-P, Colin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome 1p34.3-1p36.1 region by in situ hybridization. *HumGenet.* 1991; 86:398–400
3. Cherif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C, *et al.* Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6243–6247
4. Daniels G. 2002. *Human Blood Groups*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd
5. Daniels G. The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transp Immunol* 2005; 14:143-153
6. Luettringhaus, T.A., D. Cho, D.W. Ryang, and W.A. Flegel, An easy RHD genotyping strategy for D- East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion* 2006; 46: 2128-37
7. Mak, K.H., K.F. Yan, S.S. Cheng, and M.Y. Yuen, Rh phenotypes of Chinese blood donors in Hong Kong, with special reference to weak D antigens. *Transfusion* 1993; 33:348-51.
8. Wagner T, Körmöcz GF, Buchta C, *et al.* Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion* 2005; 45:520–6.
9. Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci* 2011; 44:81-91
10. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008; 48:473-77
11. Judd WJ, Moulds M, Schlanser G. Reactivity of FDA-approved anti-D reagents with partial D red blood cells. *Immunohematology* 2005; 21:146-8.
12. Lai M, Grasso C, Boschi I, D'Onofrio G, Pascali V, Leone G. Characterization of anti-D monoclonal antibody reagents based on their reactivity with weak D phenotype. *Transfusion* 2009; 49:937-42

13. Credidio DC, Pellegrino J, Castilho L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology* 2011; 27:6-11
14. Maaskant-vanWijk PA, Faas BH, de Ruijter JA, *et al.* Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 1998; 38:1015-21.
15. Arnoni CP, Latini FRM, Muniz JG, Gazito D, Person RM, Vendrame TAP, Barreto JA, Castilho L. How do we identify RHD variants using a practical molecular approach? *Transfusion* 2014; 54:962-9.
16. Fung Kee Fung K, Eason E, Crane J, *et al.*; Maternal Fetal Medicinal Committee, Genetics Committee. Prevention of Rh alloimmunisation. *J ObstetGynaecolCan* 2003; 25: 765-73
17. Cruz BR, Chiba AK, Moritz E, Bordin JO. RHD alleles in Brazilian blood donors with weak D or D-negative phenotypes. *Transfus Med* 2012; 22:84-89.
18. Wagner FF, Ladewig B, Angert KS, *et al.* The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood* 2002; 100:306-311.
19. Campos FC, Mota MA, Aravechia MG, Torres KB, Bub CB, Kutner JM, Castilho L. Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. *J Clin Lab Anal* 2016; 30:845-48
20. Daniels G. variants of RhD-current testing and clinical consequences. *British Journal of Haematology* 2013; 161:461-470
21. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*. 2004; 44:1282–6
22. Costa S, Martin F, Chiba A, Langhi D Jr, Chiatton C, Bordin J. RHD alleles and D antigen density among serologically D- C+ Brazilian blood donors. *Transfus Med*. 2014; 24:60–1
23. Rodrigues MJ, Rodrigues F, Tilley L, Poole J, Chabert T, Souza G. Several new examples of weak D type 38 in the Portuguese population. *Transfusion* 2006; 46 Suppl.:141A–2A (abstract)
24. Moulds, M.K. Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. *Immunohematology* 2006; 22: 52-57.

Table 1 – Technologies and clones used in the serological analysis of RhD

Method anti-D	IgM+IgG Anti-D	Source	IgM Anti-D	IgG
Manual-Tube RUM-1/MS-26 Fresenius	MS-201	Lorne Manual-Tube MS-26	RUM-1, MS-201	—
Manual-Tube TH28+MS-26, MS201+MS26		Bio-Rad	TH-28	—
Manual-Liss- Gel ESD1	TH28+MS-26, MS201+MS26	Bio-Rad	—	
Manual-NaCl Enzyme Gel		Bio-Rad	TH-28	—
Microplate agglutination method D175+415, MS201+MS26, TH28+MS26		Immucor	RUM-1	
Solid-phase RBC adherence D175+415, MS201+MS26, TH28+MS26		Immucor	—	

Table 2 Number of samples and degree of agglutination in immediate spin with various anti-D reagents

			Lorne			Fresenius	Bio-Rad			Immucor			
			Tube			Tube	Tube			Microplate			
Molecular Analysis <i>RHD</i> Genotype	n	Agglutination Degree	IgM RUM1	IgM MS201	Blend RUM-1/MS-26	IgM MS201	IgM TH28	Blend TH28+MS26	Blend MS201+MS26	IgM RUM-1	Blend D175 + 415	Blend MS201 + MS26	Blend TH28 + MS26
DAR1.2(Weak D type 4.2.2)	30	0	0	1	0	3	2	2	2	1	2	17	8
		W	3	1	2	7	11	10	6	2	2	6	5
		1-2+	17	18	14	19	15	16	19	23	19	7	17
		3-4+	10	10	14	1	2	2	3	4	7	0	0
Weak D Type 3	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6
		W	1	1	2	5	6	7	3	1	0	7	4
		1-2+	18	18	17	15	13	13	15	16	12	7	10
		3-4+	2	2	2	1	2	1	3	4	9	1	1
Weak D Type 38	10	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Weak D Type 1	9	0	0	1	1	2	1	3	2	0	1	5	5
		W	4	3	3	4	4	3	3	2	1	0	0
		1-2+	2	3	3	1	2	1	1	4	4	1	1
		3-4+	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
Weak Type 2	7	0	2	3	2	4	4	5	4	6	1	7	7
		W	4	3	4	3	2	1	3	1	5	0	0
		1-2+	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
DAR1	5	W	0	0	0	2	2	2	1	0	0	3	3
		1-2+	4	5	5	3	3	3	4	2	2	2	2
		3-4+	1	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0
Weak/Partial 11 or Del	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
DAR3.1 (Weak D type 4.0)	3	1-2+	0	0	0	2	2	2	2	1	1	1	2
		3-4+	3	3	3	1	1	1	1	2	2	2	1
DAU4	3	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
		W	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
		1-2+	0	2	0	1	0	1	1	0	0	0	2
		3-4+	1	1	1	2	3	2	2	2	3	3	1
DAU0	1	3-4+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAU2	1	3-4+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAU5	1	3-4+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DAU6	1	1-2+	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
DMH	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		1-2+	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
		3-4+	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
DVII	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		1-2+	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
		3-4+	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Weak D type 2 /DAR1.2	1	1-2+	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0
		3-4+	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
Weak D type 3/RHDψ	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
		W	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
		1-2+	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
DAR1.2/RHDψ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
		W	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1-2+	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
DMH /RHDψ	1	W	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
		1-2+	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1