

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
HOSPITAL DAS CLÍNICAS – DIVISÃO HEMOCENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
BIOTECNOLOGIA MÉDICA

Janine Schincariol Sabino

**DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE Rh D
FRACO E Rh D PARCIAL NA POPULAÇÃO DA
ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO HEMOCENTRO
DE BOTUCATU**

Botucatu
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Janine Schincariol Sabino

**DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE Rh D
FRACO E Rh D PARCIAL NA POPULAÇÃO DA
ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO HEMOCENTRO
DE BOTUCATU**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento:
Biotecnologia Médica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Nogueira Dias Paes Secco

Botucatu
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Sabino, Janine Schincariol.

Determinação da incidência de Rh D fraco e Rh D parcial na população da área da abrangência do Hemocentro de Botucatu / Janine Schincariol Sabino - Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Valéria Nogueira Dias Paes Secco.

Assunto CAPES: 40100006

1. Biotecnologia médica. 2. Sangue – Análise e química. 3. Botucatu (SP).

CDD 616.15

Palavras chave: Reagente anti-D; Rh D fraco; Rh D parcial; Sistema Rh.

Sabino JS, Secco VNDP. Determinação da incidência de Rh D fraco e Rh D parcial na população da área de abrangência do Hemocentro de Botucatu.

O Sistema Rh é constituído por 48 antígenos eritrocitários, sendo o antígeno Rh D, considerado o mais imunogênico seguido dos antígenos c, E, C, e. A probabilidade de imunização por Rh D é muito mais alta quando comparada com outros antígenos de grupos sanguíneos humano que ocasionalmente produzem anticorpos irregulares, tornando esse sistema de grande importância clínica. O antígeno Rh D é composto por 37 epítomos, formando um mosaico. Qualquer mudança de aminoácidos em uma parte da proteína pode afetar a expressão da seqüência de epítomos ou resultar em novos epítomos. Por isso, os antígenos do grupo sanguíneo Rh D podem apresentar variações de sua expressão na membrana eritrocitária. As hemácias com fenótipo Rh D fraco diferem quantitativamente das células Rh D positivas normais, por serem definidas como tendo todos os epítomos Rh D presentes, porém com uma redução dos níveis de antígeno Rh D. As hemácias Rh D parcial diferem qualitativamente das células Rh D positivas normais, pois carecem de um ou mais epítomos que formam o antígeno Rh D. Em geral, os fenótipos Rh D parcial se expressam devido à presença de genes híbridos, os quais ocorrem predominantemente em indivíduos de origem africana. O número de amostras classificadas como Rh D fraco e Rh D parcial depende das características do reagente utilizado para a fenotipagem Rh D. Anteriormente os reagentes utilizados eram os policlonais, porém atualmente, com a descoberta do anticorpos monoclonais e a dificuldade de obtenção dos policlonais, tem-se utilizado apenas os reagentes monoclonais. Desde então, diferenças entre a reatividade de vários reagentes, especialmente na detecção de Rh D fraco e Rh D parcial, têm criado uma discussão sobre o teste adequado para doadores de sangue, pacientes e receptores. Diante disso, o trabalho teve como objetivo geral

identificar os pacientes, gestantes e doadores atendidos pela Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu que apresentam fenótipo Rh D fraco e/ou Rh D parcial evitando desse modo possíveis aloimunizações. Foram testadas 13.616 amostras de doadores, pacientes e gestantes. Em seguida, foram selecionadas as que possuíam o fenótipo Rh D positivo e que obtiveram resultado inferior ou igual a 2+ na primeira fase da reação, para realização da tipagem Rh D com dois anti-soros anti-D, sendo um policlonal e outro monoclonal, fenotipagem eritrocitária e painel de reagentes monoclonais para identificação de Rh D fraco e diferenciação de subtipos de Rh D parcial. Encontrou-se uma incidência de variantes Rh D, de 0,53% (72 amostras), das quais 50% (36) obtiveram o fenótipo Rh D parcial, 40% (29) Rh D fraco e 10% (7) não foi possível definir o fenótipo com o painel utilizado. Comparamos a intensidade de aglutinação com os diferentes reagentes, e verificamos que os monoclonais identificam as variantes Rh D com mais eficiência que os policlonais. O painel de reagentes monoclonais utilizado mostrou-se útil, uma vez que através dele foi possível a diferenciação sorológica entre Rh D fraco e Rh D parcial e identificação dos subtipos Rh D parcial. Em nosso estudo verificamos uma maior incidência da raça branca em variantes Rh D. O fenótipo CceeKneg em variantes Rh D foi o mais encontrado, podendo haver relação destes antígenos com a expressão alterada de Rh D.

Palavras-chave: Sistema Rh, Rh D fraco, Rh D parcial, Reagente anti-D.

Sabino JS, Secco VNDP. Determination of weak D and partial D incidence in the population of Botucatu's Blood bank area.

The Rh System is constituted by 48 red cells antigens, where the Rh D antigen is considered the most immunogenic followed by c, E, C, e antigens. The probability of immunization by Rh D is higher when is compared with other human sanguineous groups antigens, that occasionally produce irregular antibodies, what makes this system very important clinically. The antigen Rh D is composed by 37 epitopes, which forms a mosaic. Any amino acid change in a protein part can affect the expression of the epitopes sequence or results in new epitopes. Therefore, the sanguineous group Rh D antigens can present variations in the red cells membrane expression. The red cells with weak D phenotype are quantitatively different from the Rh D normal positive cells, because of the presence of all epitopes in their definition, but with a reduction of Rh D antigen levels. The red cells D partial are qualitatively different from the Rh D normal positive cells, because they need one or more epitopes that form Rh D antigen. In general, the partial D phenotype occurs due to the presence of hybrid genes, which occur predominantly in African individuals. The number of classified samples as weak D and partial D depends on the reagent used for the Rh D phenotyping characteristics. Previously the used reagents were polyclonal, but currently, with the discovery of the monoclonal antibodies and the difficulty of attainment of the polyclonal, it has been used only monoclonal reagents. Since then, differences between the reactivity of many reagents, especially in the detention of weak D and partial D, have been created a discussion about the appropriated tests for blood donators, patients and receivers. In this scenario, the objective of this work is to identify patients, pregnants and donators attempted by the Blood bank Division of Hospital of the Clinics of Botucatu who present weak D phenotype and/or partial D preventing possible immunizations. 13,616 donators, patients and pregnats had been tested. After that, it had been selected

the ones that had Rh D positive phenotype with results lower or equal 2+ in the first phase of the reaction, in order to do the Rh D typing with two reagents anti-D, which one is a polyclonal and another monoclonal, red cells phenotyping and monoclonal reagents panel to identification of weak D and differentiation of subtypes of partial D. It was found an incidence of variants Rh D, of 0,53% (72 samples), of which 50% (36) had gotten partial D phenotype, 40% (29) weak D and 10% (7) were not possible to define phenotype. With this panel we compared the intensity of agglutination with the different reagents, and verified that the monoclonal identified the Rh D variants more efficiently than the polyclonal. The monoclonal reagents panel was useful, because through it, it was possible to do the sorologic differentiation between weak D and partial D and the identification of the subtypes partial D. In our study we verified a higher incidence of the white race in variants Rh D. The phenotype CceeKneg in variants Rh D was much more encountered, what means that it possible to have relation of these antigens with the Rh D modified expression.

Key-words: System Rh, weak D, partial D, Reagents anti-D.

Os grupos sanguíneos são caracterizados pela presença ou ausência de antígenos na membrana eritrocitária os quais possuem características polimórficas bem definidas por componentes da membrana. Os antígenos eritrocitários são herdados geneticamente e são definidos por seqüências de aminoácidos específicas sobre proteínas ou por carboidratos ligados a estas proteínas ou lipídios (CASTILHO, 2003a). Pacientes que recebem transfusão de sangue e componentes sanguíneos podem desenvolver anticorpos dirigidos contra inúmeros antígenos eritrocitários (SELTAM *et al.*, 2003). O desenvolvimento dos anticorpos eritrocitários está relacionado com sua imunogenicidade, situações clínicas especiais e com a incidência dos antígenos na membrana da hemácia (ISSIT, 1994).

O Sistema Rh é constituído por 48 antígenos eritrocitários, além do antígeno Rh D, outros quatro antígenos são responsáveis por 99% dos problemas clínicos associados ao sistema Rh, os quais são formados por dois pares de antígenos antitéticos: C/c e E/e. (GIRELLO, 2002). Porém o antígeno Rh D é considerado o mais imunogênico seguido dos antígenos c, E, C, e, dentre outros (CASTILHO, 2007). A presença ou ausência do antígeno Rh D nas hemácias determina o fenótipo conhecido como Rh D positivo e Rh D negativo respectivamente. Dependendo do grupo étnico, a falta do antígeno Rh D, pode variar de 3% a 25%, na população humana (KUMAR *et al.*, 2005).

Como a imunização pode ocorrer em receptores Rh D negativos, o antígeno Rh D é de importância crítica para a transfusão de sangue (KUMAR *et al.*, 2005), pois tem um papel importante na destruição imune das hemácias em transfusões alogênicas, na incompatibilidade materno-fetal, nas anemias hemolíticas auto-imunes e em transplantes de órgãos (CASTILHO, 2003a).

O antígeno Rh D é altamente imunogênico e, se hemácias Rh D positiva forem transfundidas em um receptor Rh D negativo, o receptor provavelmente desenvolverá aloanticorpos anti-D e posteriormente não poderá ser transfundido com sangue Rh D positivo. Além disso, se uma mulher Rh D

negativo for sensibilizada e conceber um feto Rh D positivo, a passagem de anticorpos anti-D através da placenta durante a gestação resultará em Doença Hemolítica Perinatal (DHPN) (KUMAR *et al.*, 2005).

Estima-se que em transfusões Rh D incompatível, mais de 80% dos receptores se aloimunizam, produzindo anti-D (LICHTIGER *et al.*; 1983; RAMSEY *et al.*; 1989; ASFOUR *et al.*; 2004). A probabilidade de imunização por Rh D é muito mais alta quando comparada com outros antígenos de grupos sanguíneos humano que ocasionalmente produzem anticorpos irregulares (FROHN *et al.*; 2003), tornando esse sistema de grande importância clínica. Antes da criação de medidas preventivas destinadas a impedir a imunização de gestantes pelo antígeno Rh D, estimava-se que nas populações caucasóides, um dentre 20 a 26 casais incompatíveis quanto ao antígeno Rh D apresentava a DHPN em seus descendentes (LEVINE *et al.*, 1953).

Uma importante consideração na imunogenicidade de um antígeno é o grau de estranheza para o hospedeiro. As proteínas Rh D e Rh CE diferem entre si em 32 a 35 aminoácidos dos 417 aminoácidos totais, os quais explicam porque o antígeno Rh D quando visto por um sistema imune de uma pessoa Rh D negativo, frequentemente induz a uma resposta imune muito forte. Ambas as proteínas (Rh D e Rh CE) atravessam a membrana doze (12) vezes (Figura 1) (WESTHOFF, 2005).

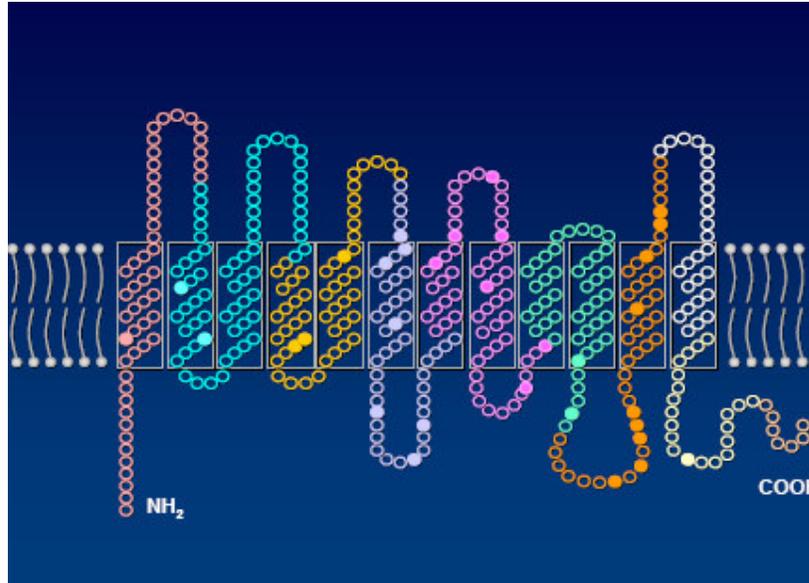


Figura 1: Proteína Rh. Proteínas Rh formada por 417 aminoácidos, a qual apresenta 12 segmentos transmembranares, 6 alças extracelulares e 5 alças intracelulares. Ambos segmentos carboxil e amino-terminal encontram-se na parte intracelular

A maioria dos sistemas de grupos sanguíneos é codificada por um simples loci gênico (WESTHOFF, 2005). Em contrapartida, os antígenos do sistema Rh são codificados por dois genes altamente homólogos, o gene *RHD*, o qual codifica a proteína Rh D e o gene *RHCE*, o qual codifica as proteínas C/c e E/e (Rodrigues, 2002; Mota *et al.*, 2005). Estes antígenos são formados por oito complexos gênicos, conhecidos como haplótipos Rh (*Cde*, *cde*, *cDE*, *cDe*, *cdE*, *Cde*, *CDE*, *CdE*) (RODRIGUES, 2005).

Estudos demonstraram que o antígeno Rh D é composto por 37 epítomos, formando um mosaico, onde pelo menos nove desses epítomos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (CASTILHO, 2007). Os epítomos Rh são altamente conformacionais, sendo que qualquer alteração de aminoácidos em uma parte da proteína, pode afetar a expressão da seqüência de epítomos ou resultar em novos epítomos (AVENT & REID, 2000). Por isso, os antígenos do grupo sanguíneo Rh D podem apresentar variações de sua expressão na membrana eritrocitária (SOLÍS *et al.*, 1997). Indivíduos cujos

eritrócitos carecem de parte do mosaico Rh D podem, quando expostos a um antígeno Rh D completo, produzir anticorpos contra os epítomos ausentes nos seus eritrócitos ¹.

Anticorpos dirigidos contra os antígenos do sistema Rh geralmente são da classe IgG, raramente fixam o complemento, reagem otimamente a 37°C e na fase de Antiglobulina Humana (AGH). Quase todos os anticorpos desse sistema resultam de aloimunização por transfusão ou gestação (GIRELLO, 2002).

Rh D fraco

As hemácias com fenótipo Rh D fraco, descrita por Stratton (1946), diferem quantitativamente das células Rh D positivas normais (SOLÍS *et al.*, 1997), por serem definidas historicamente como tendo todos os epítomos Rh D presentes, mas com uma redução dos níveis de antígeno Rh D (Figura 5), portanto são detectados apenas por alguns anticorpos anti-D mais potentes (WESTHOFF, 2005). Estima-se que a frequência de Rh D fraco na população seja inferior a 1% (GIRELLO, 2002), e as combinações em que o alelo *Dfraco* esta presente, variam de acordo com a raça. Assim, a combinação *cDfracoe* é considerada como característica das populações negróides, enquanto que as combinações *CDfracoe* e *cDfracoE* são aceitas como exclusivas das populações caucasóides. Em vista disso pode-se presumir que o fenótipo *CcDfracoe* pode ocorrer em negróides e caucasóides (BEIGUELMAN, 2003).

Porém, o número de amostras classificadas como Rh D fraco depende também das características do reagente utilizado para a fenotipagem Rh D (WESTHOFF, 2005). Atualmente sabe-se que apenas de 5 a 10% dessas amostras são detectadas pelo teste da AGH (JONG, 2007).

Em níveis moleculares, as variantes do Rh D fraco são causadas por substituições de aminoácidos localizados nos segmentos transmembranares e

¹ Fresenius Hemo Care (Sistema de Grupos Sangüíneo – Sistema Rh) Comunicação pessoal, 2007.

² Diamedia nº 29 (Considerações sobre a fenotipagem do antígeno RhD) Comunicação pessoal, 2007.

intracelulares da proteína Rh D (MOTA, *et al.*, 2005 & CASTILHO, 2007) (Figura 2), as quais são classificadas como sendo dos tipos 1 à 42. Como as alterações na proteína Rh D ocorrem na região intracelular ou na região transmembrana e não na superfície externa da hemácia, estas hemácias não apresentam falta de epítomos Rh D extracelulares. Essas alterações afetam primariamente a eficiência de inserção e, portanto a quantidade do antígeno Rh D na membrana. Fato estes que reflete na redução do número de sítios antigênicos nessas hemácias justificando a utilização da AGH para a detecção desse antígeno (Westhoff, 2005) e o porque destes não formarem aloanticorpo anti-D, como se observa nos indivíduos Rh D parciais ¹.

Ainda é pouco clara qual a diferença dos 42 tipos de Rh D fraco que poderiam alterar o epítopo Rh D (WESTHOFF, 2005). Embora alguns alelos tenham sido caracterizados como Rh D fraco, (por exemplo, Rh D fraco tipo 4.2) foi demonstrado que este Rh D fraco apresenta o mesmo *background* molecular responsável pelo fenótipo Rh D parcial DAR. No Rh D fraco tipo 4.2 existe uma mutação adicional, porém silenciosa. Ambos, Rh D fraco tipo 4.2 e o Rh D parcial DAR produzem aloanticorpos anti-D, assim como o Rh D fraco tipo 15 ², entretanto indivíduos do tipo 4.2 e 15 de Rh D fraco são melhores classificados como Rh D parcial. No mínimo, 90% dos indivíduos Rh D fraco, não produzem anti-D (WESTHOFF, 2005). Os Rh D fraco mais comuns são: tipo 1, associado com o haplótipo *cDfracoE*; o tipo 2, associado com o haplótipo *cDfracoE* ; tipo 3, também associado com o haplótipo *cDfracoE*. Indivíduos pertencentes aos fenótipos Rh D fraco não produzem aloanticorpo anti-D, mas podem possuir auto-anticorpo anti-D ².

¹ Fresenius Hemo Care (Sistema de Grupos Sangüíneo – Sistema Rh) Comunicação pessoal, 2007.

² Diamedia nº 29 (Considerações sobre a fenotipagem do antígeno RhD) Comunicação pessoal, 2007.

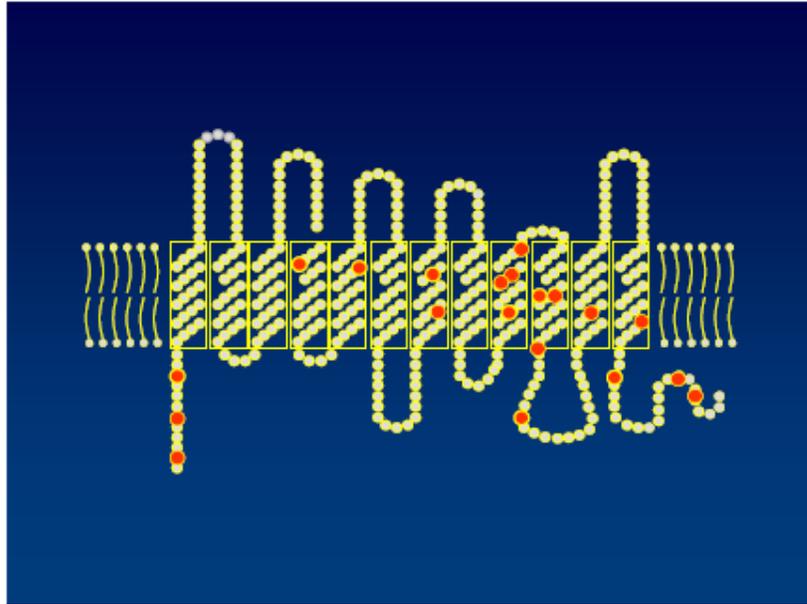


Figura 2: Proteína Rh D fraco. Aminoácidos em vermelho indicam que as substituições na proteína Rh D fraco ocorrem nas regiões transmembranares e intracelulares

Em 1955, Cepellini et al. verificaram que em determinados indivíduos, a expressão do antígeno Rh D é diminuída quando a codificação do haplótipo *D* é associada com a codificação do haplótipo *C*, ocorrendo uma redução da expressão de Rh D na membrana da hemácia, o que dificulta consideravelmente a sua identificação sorológica, podendo caracterizar o fenótipo Rh D fraco (CEPELLINI, 1993).

A não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D nos pacientes Rh D negativo transfundidos com estas hemácias Rh D fraco. Por outro lado, muitos indivíduos classificados sorologicamente como Rh D fraco são na verdade Rh D parcial. Como a diferenciação entre os antígenos Rh D fraco e Rh D parcial é difícil de ser caracterizada na rotina sorológica, muitos pacientes têm produzido anti-D pelo fato de terem sido considerados Rh D positivo (BARROS *et.al.*, 2006).

O significado clínico do antígeno Rh D fraco é que transfusões com essas hemácias em indivíduos Rh D negativo pode induzir a uma aloimunização. Alguns autores defendem que indivíduos Rh D fraco, especialmente mulheres

em idade gestacional poderiam ser tratadas como Rh D positivo quando forem doadoras e Rh D negativo quando forem receptoras (KUMAR *et al.*, 2005).

Rh D parcial

As hemácias Rh D parcial têm historicamente sido assim classificadas, porque são fenotipadas na rotina, como Rh D positivas normais, porém os indivíduos com este fenótipo podem produzir anti-D quando expostos ao antígeno Rh D normal (WESTHOFF, 2005). Essas hemácias diferem, qualitativamente, das células Rh D positivas normais, pois carecem de um ou mais epítomos que formam o antígeno Rh D (SOLÍS *et al.*, 1997), ou seja, apenas alguns epítomos são expressos normalmente ou fracamente (Figura 5) (DANIELS & BROMILOW, 2007).

Pelo fato dos genes *RHD* e *RHCE* estarem muito próximos podem ocorrer numerosos eventos de trocas (permuta) entre eles, resultando em uma nova proteína híbrida a qual carrega porções de Rh D e porções de Rh CE ou vice-versa (WESTHOFF, 2005). Em geral, o *background* molecular associado com os fenótipos Rh D parcial é devido à presença de genes híbridos (D-CE-D) que afetam o número e/ou conformação dos epítomos Rh D na região extracelular da proteína Rh D na membrana eritrocitária ² (Figura 3). Estudos moleculares demonstraram que a formação dos genes híbridos ocorre predominantemente em indivíduos de origem africana e seus descendentes (RODRIGUES, 2005). A substituição de um aminoácido na extensão extracelular do polipeptídeo D, com a perda de um ou mais epítomos Rh D, quando em contato com hemácias Rh D positiva normal (expressam todos os epítomos Rh D), acarreta nesse indivíduo Rh D parcial a aloimunização anti-D (Figura 4) (WAGNER *et al.*, 2005). Assim, tem-se um indivíduo Rh D positivo que pode desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítomos ausentes, definindo-se deste modo as categorias do antígeno Rh D parcial (DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT e DHAR) que são

² Diamedia nº 29 (Considerações sobre a fenotipagem do antígeno RhD) Comunicação pessoal, 2007.

diferenciadas umas das outras de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítomos (CASTILHO, 2007).

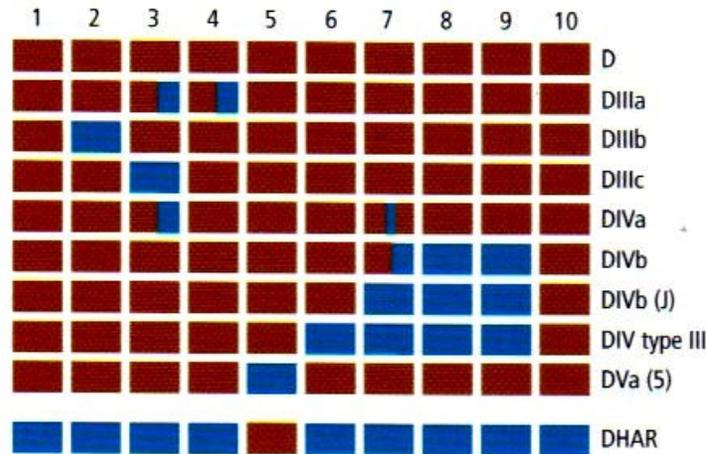


Figura 3: Genes híbridos. Diagrama dos genes híbridos (RHD-CE-D e RHCE-D-CE) formados, responsáveis pelos fenótipos de variantes Rh D. Retângulos marrons = éxons RHD; retângulos azuis = éxons RHCE

A imunização anti-D não é um pré-requisito para determinar que um antígeno seja Rh D parcial. Não foram relatados até o momento, caso de imunização anti-D em muitos dos diferentes tipos de Rh D parcial (FLEGEL, 2006). Entretanto, como indivíduos com o antígeno Rh D parcial podem produzir anti-D, o ideal seria que estes recebessem hemácias de doadores Rh D negativos, porém na prática, a maioria destes indivíduos é fenotipada como Rh D positivo e são apenas reconhecidos como fenótipo Rh D parcial após produzirem anti-D (WESTHOFF, 2005). O primeiro caso de um indivíduo Rh D positivo com anti-D em seu soro foi descrito em 1953, por Argall *et. al*, sendo que posteriormente outros casos foram detectados.

A ocorrência de Rh D parcial é rara na população em geral, sua identificação é possível através do uso de soros monoclonais específicos ou técnicas de biologia molecular. Atualmente, na rotina transfusional, pelo fato destes métodos serem de alto custo, o diagnóstico somente é possível através da

identificação do aloanticorpo anti-D, desenvolvido por transfusão ou gestação prévia, em indivíduos Rh D positivos (CASTILHO, 2003b).

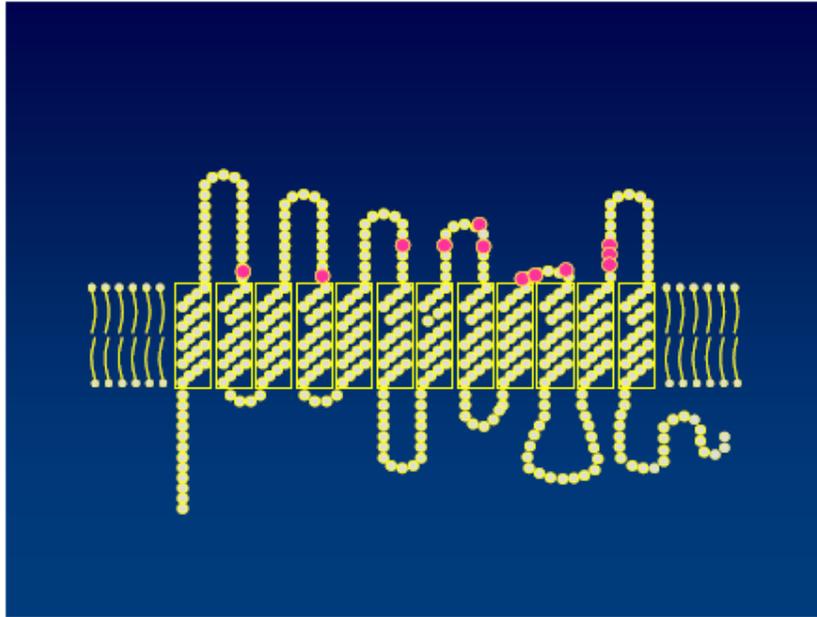


Figura 4: Proteína Rh D parcial. Aminoácidos em rosa indicam que as substituições na proteína Rh D parcial ocorrem nas alças extracelulares onde se localizam os epítomos Rh D

Reagentes

Anteriormente os reagentes desenvolvidos para testes de detecção do antígeno Rh D utilizavam anticorpos produzidos por mulheres sensibilizadas por Rh D ou voluntários hiperimunizados. Esses anticorpos denominados de policlonais eram efetivos, pois reconheciam numerosos epítomos Rh D, já que eram produzidos através de *pool* de soros humanos de mais de um doador (BROMILOW, 2007).

Com o advento da tecnologia, em 1980, surgiram os anticorpos monoclonais. Por definição, cada anticorpo monoclonal detecta apenas um epítopo antigênico (DANIELS & BROMILOW, 2007). Foram desenvolvidos, um grande número de anticorpos IgM, os quais proporcionam aglutinação direta das hemácias, porém logo percebeu-se que um simples monoclonal específico

para um único epítipo Rh D não era suficiente para identificar todas as células Rh D positivas.

No início de 1990, os reagentes comerciais anti-D monoclonais começaram a ser amplamente utilizados. Desde então, diferenças entre a reatividade de vários reagentes, especialmente na detecção de Rh D fraco e Rh D parcial, têm criado uma discussão sobre o teste e reagente adequado para doadores de sangue, pacientes e receptores (MOULDS *et al.*, 2006a). Anti-soros monoclonais anti-D IgG e IgM têm sido amplamente produzidos para substituir os policlonais na determinação do antígeno Rh D (BARROS, *et. al.*, 2006). Vários indivíduos formalmente classificados como Rh D fraco têm sido reclassificados, pois apresentam forte aglutinação com os atuais reagentes anti-D monoclonais. Por esse motivo, têm ocorrido mudanças na estratégia da fenotipagem do antígeno Rh D (MOTA, 2005).

Pouco se conhece a respeito da utilização de reagentes monoclonais na detecção dos antígenos Rh D fraco e Rh D parcial uma vez que não existe um limite bem definido entre os antígenos Rh D fraco e Rh D parcial, o qual perde epítipos específicos e pode estar associados à aloimunização anti-D (Barros, *et. al.*, 2006). Um único reagente monoclonal pode apresentar tanto reação positiva forte quanto negativa, dependendo da presença ou ausência de determinado epítipo Rh D. Como a incidência das variantes Rh D parcial diferem em diferentes populações, é importante conhecer a eficiência dos reagentes anti-D comumente utilizados em bancos de sangue para a identificação das variantes Rh D parcial (KULKARNI *et. al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que a ampla reatividade dos reagentes anti-D monoclonal com hemácias Rh D fraco e Rh D parcial ocorre devido a múltiplos fatores. A reatividade dos reagentes anti-D monoclonais dependem da concentração de anticorpos e da avidéz do anticorpo. Variáveis do antígeno (número de sítios antigênicos, acessibilidade de um epítipo e apresentação) e variáveis do anticorpo monoclonal (concentrações de imunoglobulinas e classe

de imunoglobulina) afetam as reações dos antígenos Rh D parcial com o reagente monoclonal (MOULDS, 2006b).

Moulds (2006b) sugere que a densidade antigênica tem um grande efeito no desempenho do reagente anti-D monoclonal na identificação das variantes Rh D, especialmente com anticorpos monoclonais de baixa avidéz. Isto explica o porque da existência de diferenças nas preferências relativas à avidéz dos reagentes anti-D. Alguns países, como o Reino Unido, recomendam para diminuir o número de discrepâncias, que se utilizem dois anti-D de reatividade semelhante. Outros países, como o Canadá e Itália, preferem por outro lado um reagente ávido e outro menos ávido, de modo a terem uma indicação das variantes Rh D (SMALLRIDGE, 2007).

A sugestão de que poderiam ser utilizados diferentes reagentes anti-D para doadores e pacientes na determinação de Rh D não é recente, apesar de sabermos que nenhuma combinação de reagentes é capaz de detectar todas as variantes Rh D parcial na população (KULKARNI *et. al.*, 2007). Recomendações atuais sugerem que para a fenotipagem Rh D de pacientes e gestantes não são necessárias investigações adicionais na detecção de todos os tipos de Rh D fraco e que o reagente anti-D de escolha seja aquele que não detecte o fenótipo Rh D parcial categoria VI. Esta conduta é considerada correta devido ao fato da transfusão de sangue Rh D negativo em receptores Rh D fraco não ser prejudicial e a transfusão Rh D positivo em receptores DVI classificados equivocadamente como Rh D positivo, ser considerada um evento adverso grave, uma vez que pode provocar a produção de anticorpos anti-D. Essa conduta significa que alguns tipos de Rh D fraco não serão detectados, o que pode ter outras implicações, como a administração de Imunoglobulina Rh D profilática antes ou após o parto. Ainda que seja improvável que essa profilaxia cause dano, deve-se considerar a exposição desnecessária de mulheres à componentes do sangue humano e o alto custo da Imunoglobulina ³. No Reino Unido, as recomendações atuais sugerem a realização da profilaxia em todas as

mulheres Rh D negativas ou Rh D fraco, independente da tipagem Rh D do Recém-Nascido (RN), mas para isso é necessário um teste Rh D extremamente sensível a fim de se evitar a utilização desnecessária da Imunoglobulina (SMALLRIDGE, 2007). Em alguns países como Alemanha e França têm-se regularizado o uso de dois reagentes anti-D monoclonais comercialmente disponíveis, selecionados de forma a maximizar a detecção de Rh D fraco e Rh D parcial tipos IV, V e VI na fenotipagem Rh D de doadores de sangue. Quando ambos os reagentes mostram resultados positivos ou negativos concordantes, não são realizados testes adicionais ². Por essas razões, alguns exemplos de determinações Rh D negativo no passado estão sendo fenotipadas hoje como Rh D fraco ou Rh D positivo (MOTA, 2005). Os reagentes para a fenotipagem Rh D nos EUA são uma mistura (Blend) de IgM monoclonal reativo a temperatura ambiente e monoclonal ou policlonal IgG reativo pela AGH para a determinação de Rh D fraco e Rh D parcial. Em todos estes reagentes, o componente anti-D IgM não reage com hemácias DVI, mas os componentes IgG reagem com estas hemácias na fase de AGH do teste. Entretanto, os clones de IgM e IgG apresentam diferenças na reatividade das variantes do antígeno Rh D, e segundo a FDA, é necessário especificar apenas a reatividade das categorias DIV, DV e DVI (WESTHOFF, 2005).

No Brasil, a RDC número 153, de 14 de junho de 2004 que está em vigor, apenas apresenta a necessidade de se testar as amostras até a fase de AGH, classificando-se o paciente como Rh D positivo de baixa expressão, se a mesma for positiva, a fim de se manter reservas de sangue Rh D negativo. Porém, no teste da AGH tem-se observado constantemente que vários reagentes anti-D não detectam todos os tipos de Rh D fraco, fato este que tem gerado um aumento no número de discrepâncias (MOTA, 2005).

Mesmo que muitas variantes do antígeno Rh D têm sido detectadas com o uso de anti-soros anti-D monoclonais bem definidos, a detecção dessas variantes continua sendo uma dificuldade sorológica (REID, 1998). Por esse

² Diamedia nº 29 (Considerações sobre a fenotipagem do antígeno RhD) Comunicação pessoal, 2007.

motivo, torna-se importante a fenotipagem dos antígenos Rh D parcial com a utilização de diferentes anti-D conhecidos, a fim de se caracterizar os tipos de antígenos Rh D parciais mais comuns. Esta rotina pode ajudar na diferenciação entre Rh D fraco e Rh D parcial, embora muitos fenótipos Rh D parcial sejam também Rh D fraco ¹.

Atualmente, o limite entre Rh D fraco e Rh D parcial tornou-se muito próximo devido ao grande número de alelos Rh D fraco descritos. Quando existem resultados discrepantes na fenotipagem Rh D, mesmo utilizando dois reagentes anti-D diferentes ou quando amostras de doadores aparentemente Rh D negativo são submetidas a testes adicionais para investigação da presença do antígeno Rh D, um painel constituído de anti-soros monoclonais pode fornecer informações adicionais valiosas ². Este painel nos auxilia na diferenciação das categorias de Rh D parciais (II, IV, V, VI, VII, DFR, DBT e RoHAR). A categoria DVI continua a ser a mais importante a se definir ¹, pois, esta categoria apresenta alteração em 24 epítomos, tendo, portanto grande possibilidade de produzir anti-D contra os epítomos ausentes.

A correta fenotipagem do antígeno Rh D na rotina dos laboratórios de Imunohematologia é primordial para garantir a segurança transfusional e prevenir a aloimunização ao antígeno Rh D. Devido as dificuldades de reprodutibilidade de resultados com os diferentes reagentes do mercado, a rápida evolução na produção de diferentes reagentes monoclonais (sendo atualmente os reagentes policlonais humanos mais caros e quase extintos), tem-se a necessidade de se estabelecer critérios na realização dos testes imunohematológicos de rotina de pacientes, doadores e gestantes dos Serviços de Hemoterapia. Mediante as características dos pacientes, gestantes, pacientes politransfundidos, candidatos a transplante atendidos em nosso hospital, e ao menor estoque de sangue Rh D negativo, fica evidente a necessidade de se estabelecer protocolos de fenotipagem para o antígeno Rh D. Torna-se de

¹ Fresenius Hemo Care (Sistema de Grupos Sangüíneo – Sistema Rh) Comunicação pessoal, 2007.

² Diamedia nº 29 (Considerações sobre a fenotipagem do antígeno RhD) Comunicação pessoal, 2007.

extrema importância dentro da rotina transfusional relacionar a reatividade obtida na fenotipagem Rh D na bancada com a diferenciação dos fenótipos Rh D fraco e Rh D parcial, dados estes que nos proporcionarão uma tomada de decisão mais segura em relação à transfusão de sangue Rh D positivo ou não em nossos receptores Rh D fraco. Outro fato que deve ser levado em consideração é a administração ou não da Imunoglobulina Rh D profilática em gestantes Rh D fraco, antes ou após o parto.

O painel constituído de anti-soros monoclonais é a opção mais acessível para os serviços que não realizam os testes de Biologia Molecular, e desta maneira têm a possibilidade de diferenciar alguns tipos de Rh D parcial do fenótipo Rh D fraco. Além do menor custo, em relação aos testes moleculares, ao uso desnecessário da Imunoglobulina e ao gasto com o paciente alosensibilizado que necessita de transfusão, este painel proporcionará uma maior segurança na rotina dos Laboratórios de Imunohematologia. Porém, caso não seja possível caracterizar o fenótipo Rh através deste painel, a amostra deverá ser submetida a testes adicionais em um laboratório especializado.

A partir deste estudo, acreditamos que seja possível estabelecer uma estratégia sorológica adequada para nossa população que venha a beneficiar os pacientes politransfundidos e principalmente as gestantes.

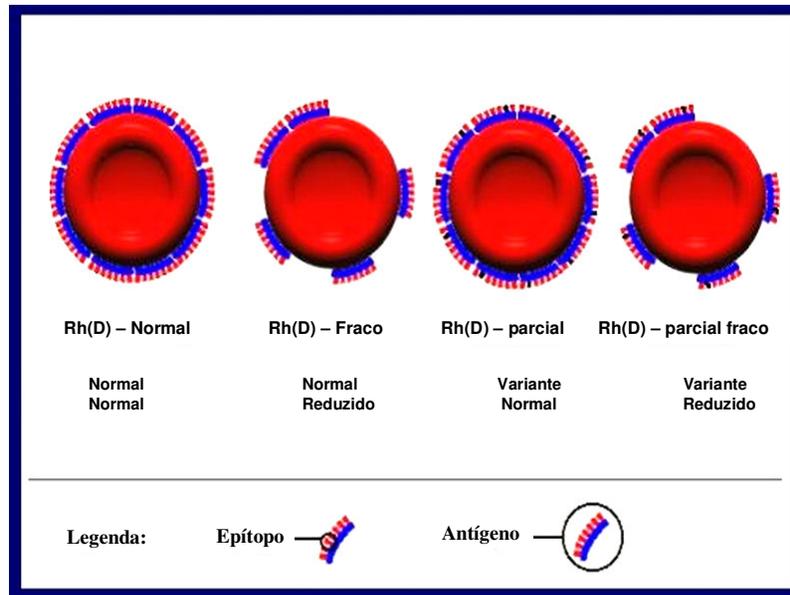


Figura 5: Variantes Rh D nas hemácias. A 1ª hemácia representa uma hemácia Rh D normal, a qual contém número adequado de antígenos e a presença de todos os epítomos D. A 2ª hemácia representa uma hemácia com o fenótipo Rh D fraco, onde há quantidade reduzida de antígenos, porém com todos os epítomos Rh D presentes. A 3ª hemácia representa o fenótipo Rh D parcial, o qual possui quantidade completa de antígenos, porém com um ou mais epítomos alterados em cada antígeno. A 4ª hemácia possui o fenótipo Rh D parcial fraco, onde há número reduzido de antígenos por hemácia e também epítomos alterados nestes antígenos

Objetivo geral:

- Identificar os pacientes, gestantes e doadores atendidos pela Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu que apresentam fenótipo Rh D fraco e/ou Rh D parcial.

Objetivos específicos:

A. Testar reagentes anti-D policlonal e monoclonal de procedências diferentes para a fenotipagem Rh D;

B. Verificar a presença de aloanticorpo anti-D no soro de pacientes, gestantes e doadores Rh D positivo;

C. Diferenciar, através de um painel de anticorpos anti-D monoclonais, as diferentes categorias de Rh D parcial, e suas respectivas frequências;

D. Verificar as frequências fenotípicas de pacientes, gestantes e doadores Rh D fraco e Rh D parcial em relação ao grupo sanguíneo, sexo, raça e técnica utilizada;

E. Realizar a imunofenotipagem do Sistema Rh (C, c, E e e) e Kell (K) de pacientes, gestantes e doadores de sangue Rh D fraco e Rh D parcial, e verificar as frequências antigênicas;

F. Associar os subtipos de Rh D parcial encontrados com os antígenos Rh (C, c, E e e) presentes;

G. Estabelecer um protocolo de liberação de resultado da tipagem Rh D de receptores transfusionais e gestantes portadores de variantes Rh D.

3.1 Comitê de Ética em Pesquisa

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEP).

Houve a dispensa da realização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelo fato das amostras utilizadas neste estudo estarem estocadas e não terem sido necessárias coletas adicionais de sangue.

3.2 Amostragem inicial

Foram analisadas por um período de 7 meses (05 de Março de 2007 a 31 de Outubro de 2007) a fenotipagem do grupo sanguíneo Rh D de todos os doadores, pacientes e gestantes da Divisão Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu, realizadas nas rotinas dos Laboratórios de Imunohematologia do Doador, Hemobiologia Perinatal e Agência Transfusional. Obtivemos um total de 13.616 amostras analisadas, sendo 8.772 amostras de doadores e 4.844 amostras de pacientes e gestantes.

Todas as amostras foram testadas com anti-soro anti-D monoclonal IgG (clone MS26) + IgM (clone Th28) de procedência Diamed, e seu respectivo soro controle, quanto a capacidade de detecção dos antígenos Rh D fraco de alta e baixa densidade antigênica e dos antígenos Rh D parcial que reagem como Rh D fraco. Do total de amostras (13.616), foram selecionadas 72 (0,53%) amostras as quais apresentaram intensidade de reação na primeira fase inferior ou igual a duas cruzes 2+.

As 72 amostras foram posteriormente testadas com anti-soros anti-D monoclonais IgG (clone MS26) + IgM (clone MS201) de procedência Fresenius Kabi, e anti-D policlonal de procedência Fresenius Kabi (Quadro 1). Com ambos reagentes, as amostras foram avaliadas pela reatividade até o teste da AGH.

Em seguida prosseguimos com a realização das fenotipagens das amostras com o Kit ID-Partial Rh D Typing (Painel de reagentes monoclonais anti-D) e a fenotipagem eritrocitária dos antígenos do Sistema Rh (C, c, E e e).

Quadro 1: Reagentes anti-D utilizados e suas respectivas linhagens

Reagentes	IgM monoclonal	IgG monoclonal	Ig
Diamed (monoclonal) - tubo	Th28	MS26	IgM/ IgG
Diamed (monoclonal) - microplaca	MS201	MS26	IgM/IgG
Fresenius (monoclonal) - tubo	MS201	MS26	IgM/ IgG
Fresenius (policlonal) - tubo	-	-	IgM/ IgG

3.3 Análise Estatística

Para determinação do número de doadores, pacientes e gestantes amostrados pelo processo, estabeleceu-se um nível de 95% de confiança e 10% de erro de estimação, considerando para o cálculo uma frequência de ocorrência de Rh D fraco e Rh D parcial variando de 0,5 a 1%.

O estudo da associação entre Rh D fraco e Rh D parcial foi realizado utilizando o Teste de Goodman para contrastes dentro de populações multinomiais (GOOMAN,1965).

Todas as conclusões, no presente trabalho, foram discutidas no nível de 5% de significância.

3.4 Crítérios para inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo amostras de doadores, pacientes e gestantes que apresentaram o fenótipo Rh D positivo com reatividade inferior ou igual a duas cruces (2+), na tipagem Rh D realizada pelo teste direto.

Não foram incluídas em nosso estudo amostras de pacientes, gestantes ou doadores que apresentaram o fenótipo Rh D positivo com intensidade de aglutinação igual ou superior a três cruces 3+ na tipagem Rh D

realizada pelo teste direto, ou apresentaram resultado negativo após o teste da AGH.

3.5 Instrumentos para Coleta de Dados

Foram levantados todos os dados como sexo, raça e grupo sanguíneo, através da revisão de registros em livros e computadores, visando a identificação dos doadores, pacientes e gestantes que apresentaram na tipagem Rh D reatividade inferior ou igual a duas cruzes (2+).

3.6 Tipagem ABO/Rh D

Após a coleta das amostras dos doadores, pacientes e gestantes em tubos de 10 mL, sem anticoagulante, foram realizadas as tipagens ABO e Rh D.

O teste foi realizado em duas metodologias distintas, conforme a rotina dos laboratórios:

3.6.1 Técnica de tipagem ABO/Rh D em microplaca para doadores e gestantes utilizando reagente de procedência Diamed:

Primeiramente foram identificados os poços correspondentes aos anti-soros anti-A, anti-B e anti-AB, utilizados para a tipagem ABO direta, os correspondentes às hemácias A₁ e B destinadas à tipagem ABO reversa e os referentes ao anti-soro anti-D e Controle Rh D, responsáveis pela tipagem Rh D.

Foram pipetados 50µL dos anti-soros anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e Controle Rh D nos respectivos poços. Nos poços correspondentes às hemácias A₁ e B, acrescentou-se 100µL do soro do doador ou gestante.

Com o auxílio de uma micropipeta, 50µL da papa de hemácias retirados das amostras, foram diluídos em tubos contendo 1mL de solução

salina. Após a homogeneização dos tubos, foram acrescidos 50µL dessa diluição em cada um dos poços contendo os anti-soros anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e Controle Rh D. Nos poços destinados à tipagem reversa, foram adicionados 50µL das hemácias A₁ e B, os quais já haviam recebido anteriormente o soro do doador ou gestante.

A centrifugação foi realizada à 2000rpm durante 1 minuto, seguida da leitura e anotação dos resultados.

Os resultados foram interpretados de acordo com a intensidade de hemaglutinação visualizada (Quadro 2).

A interpretação dos resultados para o Sistema Rh D foi realizada da seguinte forma:

- Rh D positivo: presença de aglutinação.
- Rh D negativo: ausência de aglutinação. Necessária a realização da pesquisa de Rh D fraco.

Quadro 2: Classificação das reações de hemaglutinação conforme as intensidades

INTENSIDADE DE HEMAGLUTINAÇÃO	OBSERVADO
++++	Botão sólido
+++	Grumos grandes
++	Grumos pequenos
+	Grumos muito pequenos
w (weak)	Sem grumos a olho nu
Negativo	Hemácias suspensas

3.6.2 Técnica de tipagem ABO/Rh D em microtubo para pacientes utilizando reagente de procedência Diamed:

Inicialmente foram devidamente identificados os microtubos. Em seguida, foram pipetados 50µL dos anti-soros anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e Controle Rh D, e 50µL da suspensão de hemácias A₁ e B, nesta respectiva

seqüência, em cada um dos poços dos microtubos. O último poço permaneceu vazio, pois foi utilizado como tampa. Com o auxílio de uma micropipeta, 50µL da papa de hemácias retirados das amostras foram diluídos em tubos contendo 1mL de solução salina. A seguir foram então pipetados 50µL dessa suspensão de hemácias em cada um dos poços do microtubo contendo: anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D e Controle Rh D. E 100µL do soro do paciente nos poços que haviam recebido previamente as hemácias A₁ e B.

Os microtubos foram encaixados uns aos outros em ordem decrescente e centrifugados à 3200rpm durante 15 segundos, seguido da leitura e anotação dos resultados.

Os resultados foram interpretados de acordo com a intensidade de hemaglutinação visualizada (Quadro 2).

A interpretação dos resultados para o Sistema Rh D foi realizada da seguinte forma:

- Rh D positivo: presença de aglutinação.
- Rh D negativo: ausência de aglutinação. Necessária a realização da pesquisa de Rh D fraco.

3.7 Teste para a detecção de Rh D fraco

A Pesquisa de Rh D fraco foi realizada na técnica em microplaca (doadores e gestantes) ou tubo (pacientes) nas amostras que não obtiveram aglutinação pela centrifugação imediata na metodologia da tipagem Rh D descrita anteriormente.

3.7.1 Técnica em tubo para pacientes:

Inicialmente, foram identificados dois tubo correspondentes aos anti-soros anti-D e Controle Rh D.

Com o auxílio de uma pipeta, foram retirados 50µL da papa de hemácias os quais foram diluídos em tubo contendo 1mL de solução salina. Após a homogeneização do tubo, foram acrescentados 50µL dessa diluição em cada um dos tubos. Finalmente, 50µL de cada anti-soro (anti-D e Controle Rh D) foram acrescentados em seus respectivos tubos. A centrifugação foi realizada à 3200rpm durante 15 segundos, seguida de homogeneização e da leitura dos resultados.

A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma:

Presença de aglutinação no tubo correspondente ao anti-D:

- Classificou-se o sangue como Rh D positivo;
- Teste finalizado.

Ausência de aglutinação no tubo correspondente a anti-D:

- Prosseguimento do teste.

Após essa fase, o tubo foi incubado durante 30 minutos em estufa, à 37°C. Seguiu-se a centrifugação à 3200rpm durante 15 segundos, sendo logo após realizada a homogeneização e a leitura dos resultados.

Em seguida, foi iniciado o processo de lavagem das hemácias: inicialmente, foram acrescentados solução salina em cada tubo e realizada a centrifugação à 3200rpm durante 15 segundos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e procedeu-se uma leve homogeneização do material decantado. Todo este processo foi realizado por três sucessivas vezes.

Por último, foram acrescentados 100µL de AGH em cada um dos poços. A centrifugação também foi realizada à 3200rpm durante 15 segundos, seguida de homogeneização e leitura.

Interpretação dos resultados:

Presença de aglutinação: resultado positivo (Rh D fraco)

Ausência de aglutinação: resultado negativo (Rh D negativo)

3.7.2 Técnica em microplaca para doadores e gestantes:

Primeiramente foram identificados dois poços da microplaca correspondentes aos anti-soros anti-D e Controle Rh D.

Com o auxílio de uma micropipeta, foram retirados 50µL da papa de hemácias os quais foram diluídos em tubo contendo 1mL de solução salina. Após a homogeneização do tubo, foram acrescentados 50µL dessa diluição em cada um dos poços. Finalmente, 50µL de cada anti-soro foram acrescentados em seus respectivos poços. A centrifugação foi realizada à 2000rpm durante 1 minuto, seguida de homogeneização e da leitura dos resultados.

A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma:

Presença de aglutinação no poço correspondente ao anti-D:

- Classificou-se o sangue como Rh D positivo;
- Teste finalizado.

Ausência de aglutinação no poço correspondente a anti-D:

- Prosseguimento do teste.

Após essa fase, a microplaca foi incubada durante 30 minutos em estufa, à 37°C. Seguiu-se a centrifugação à 2000rpm durante 1 minuto, logo após foi realizada a homogeneização e a leitura dos resultados.

Em seguida, foi iniciado o processo de lavagem das hemácias: inicialmente, com o auxílio de uma pipeta multicanal foram acrescentados 100µL de solução salina em cada poço e feita a centrifugação à 2000rpm durante 1 minuto. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e realizada uma leve homogeneização do material decantado. Todo este processo foi realizado por três sucessivas vezes.

Por último, foram acrescentados 100µL de AGH em cada um dos poços da microplaca. A centrifugação também foi realizada à 2000rpm durante 1 minuto, seguida de homogeneização e leitura.

Interpretação dos resultados:

Presença de aglutinação: resultado positivo (Rh D fraco)

Ausência de aglutinação: resultado negativo (Rh D negativo)

3.8 Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI)

Após a coleta da amostra dos doadores, pacientes ou gestantes, foi realizada a Pesquisa de Anticorpos Irregulares (PAI).

3.8.1 Preparação das hemácias-teste para a PAI:

- Meio salino

Não houve necessidade da preparação das hemácias em meio salino, pois as mesmas foram adquiridas ressuspensas nesse meio.

- Meio tampão em baixa força iônica – BFI

Primeiramente, foram transferidas hemácias-teste em meio salino DiaCell I e II (Diamed) para tubos de hemólise previamente identificados. Os tubos foram centrifugados à 3400rpm durante 1 minuto e todo o sobrenadante do tubo foi desprezado, deixando apenas a papa de hemácias.

Em seguida, foi feita uma suspensão a 5% (papa de hemácias/ tampão BFI), a qual foi colocada em frascos com tampa e conta-gotas, devidamente etiquetados e identificados, com as informações: procedência, data, lote, validade e a identificação do reagente (BFI).

- Tratamento das hemácias pela papaína

As hemácias a serem tratadas com papaína foram colocadas em tubos

de hemólise previamente identificados. Posteriormente, os tubos de papaína I, II e III foram descongelados e reconstituídos em um só tubo, os quais foram mantidos em temperatura ambiente durante 30 minutos.

Em um tubo de hemólise, foi preparada uma suspensão (volume/volume), contendo papa de hemácias / papaína reconstituída. O tubo foi homogeneizado suavemente e colocado em banho-maria à 37°C durante precisamente 7 minutos. Em seguida, as hemácias foram lavadas com solução salina por quatro vezes. Após a decantação da última lavagem, fez-se uma suspensão a 5% com solução salina.

Os tubos foram então identificados com as informações: procedência, data, lote, validade e a identificação do reagente (Papaína).

3.8.2 Técnica da PAI em gel e tubo para pacientes:

Para a realização da PAI com amostras de pacientes foram realizados as reações salina (em tubo), meio LISS/Coombs (gel) e enzimático (papaína) (gel).

- **Meio Salino**

Inicialmente, foram identificados os tubos de hemólise com: S I (salina I), S II (salina II). Foram colocados 100µL do soro do paciente, em cada um dos tubos correspondentes às hemácias de triagem I e II (DiaCell I+II – Diamed) do meio salino. Foram pipetados 50µL dos reagentes nos tubos respectivamente identificados, e posteriormente, foram homogeneizados. Os tubos foram incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente, e posteriormente foi realizada a leitura.

Os resultados também foram interpretados de acordo com a intensidade de hemaglutinação visualizada (Quadro 2).

- Meio enzimático

Para os testes em meio enzimático foram utilizados os cartões gel-teste, NaCl (Diamed). Foram pipetados 50µL das hemácias de triagem I e II (DiaCell I+II – Diamed) previamente papainizadas em cada poço do cartão. Foram adicionados 25µL do soro do paciente em cada poço.

Os cartões foram incubados durante 15 minutos em estufa à 37°C. Após a incubação, os cartões foram centrifugados durante 10 minutos à 910rpm e posteriormente foi realizada a leitura.

- Meio à baixa força iônica (LISS/Coombs)

Para os testes em meio à baixa força iônica foram utilizados os cartões gel-teste, LISS/Coombs (Diamed). Foram pipetados 50µL das hemácias de triagem I e II (DiaCell I+II – Diamed) ressuspensas em LISS (Diamed) em cada poço do cartão. Posteriormente, foram adicionados 25µL do soro do paciente em cada poço. Os cartões foram incubados, então durante 15 minutos em estufa à 37° C, em seguida centrifugados durante 10 minutos à 910rpm, e posteriormente foi realizada a leitura.

Interpretação dos resultados:

Positivo: Células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel.

Negativo: Botão compacto de células no fundo do poço.

3.8.3 Técnica da PAI em microplaca para doadores e gestantes:

- Meio Salino

Em cada um dos dois poços da microplaca foram adicionados 100µL do soro do doador ou gestante e 50µL das hemácias de triagem I e II (DiaCell I+II – Diamed). A microplaca permaneceu incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente e em seguida foram realizadas, a centrifugação à 800rpm durante um minuto, a homogeneização e finalmente a leitura.

- Meio enzimático

Em cada um dos dois poços da microplaca foram adicionados 100µL do soro do doador ou gestante e 50µL das hemácias de triagem I e II (DiaCell I+II – Diamed), previamente tratadas com a enzima papaína. A microplaca permaneceu incubada em estufa à 37°C durante 26 minutos. Logo em seguida foi realizada a centrifugação à 800rpm durante 1 minuto, a homogeneização e a leitura.

- Meio à baixa força iônica

Em cada um dos dois poços da microplaca foram adicionados 100µL do soro do doador ou gestante e 50µL das hemácias de triagem I e II (DiaCell I+II – Diamed), ressuspensas em LISS. A microplaca permaneceu incubada durante 15 minutos à 37°C e em seguida foram realizadas três sucessivas lavagens com solução salina. Por último foram adicionados 100µL da AGH a cada poço, realizada a centrifugação à 2000rpm durante 1 minuto, seguida da homogeneização e da leitura.

Interpretação dos resultados:

- Presença de aglutinação: Teste positivo
- Ausência de aglutinação: Teste negativo

3.9 Identificação de Anticorpos Irregulares (IAI)

Nas técnicas em que a PAI apresentou-se positiva foi realizada a Identificação dos Anticorpos Irregulares.

- Meio Salino

Inicialmente, foram adicionados 100µL do soro a ser testado em cada um dos tubos identificados previamente de 1 a 12, sendo o tubo de número 12 correspondente ao autocontrole. Foi acrescentado aos tubos de 1 a 11 50µL das hemácias do respectivo painel (Diamed), pronto para uso. No tubo correspondente ao autocontrole foi adicionado 100µL do soro a ser testado e 50µL da suspensão de hemácia (5%) a ser testada. O mesmo foi incubado durante 60 minutos em temperatura ambiente seguida da leitura dos resultados.

- Meio Enzimático

Primeiramente, os poços dos cartões foram enumerados de 1 a 12. Em seguida, nos onze primeiros poços, foi acrescentado 50µL de cada uma das hemácias papainizadas (Diamed). Já no poço 12, acrescentou-se 50µL da suspensão de hemácias a serem testadas diluídas a 1% em LISS (Diamed) e 25µL de bromelina. Posteriormente, em cada um foi depositado 25µL do soro a ser testado.

Os cartões foram incubados à 37°C durante 15 minutos. A centrifugação foi realizada à 910rpm durante 10 minutos e em seguida foi efetuada a leitura.

- Meio LISS/Coombs

A técnica foi realizada da mesma maneira que as anteriores, adicionando-se 50µL das hemácias do painel LISS/Combs (Diamed) e 25µL do soro a ser testado. No poço 12, foi acrescentada 50µL da suspensão de hemácias a serem testadas diluída a 1% em LISS e 25µL do soro a ser testado.

Os cartões foram incubados à 37°C durante 15 minutos. A centrifugação foi realizada à 910rpm durante 10 minutos e em seguida foi efetuada a leitura.

Interpretação do resultado:

Positivo: Células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel.

Negativo: Botão compacto de células no fundo do poço.

3.10 Tipagem Rh D com reagentes monoclonal (anti-D IgG e IgM) e policlonal de procedência Fresenius Kabi:

Primeiramente foram identificados os tubos, em seguida, foi pipetado 50µL dos reagentes anti-D (sendo, um deles monoclonal IgM+IgG e outro policlonal) em cada tubo, e seus respectivos controles. Foi feita uma suspensão com as hemácias do paciente/doador/gestante em solução salina à 5% e pipetados 50µL dessa suspensão nos tubos contendo: anti-D policlonal, anti-D monoclonal de procedência Fresenius Kabi e os seus respectivos Controles Rh D. Os tubos foram então centrifugados à 3200rpm durante 15 segundos, homogeneizados e foi efetuada a leitura dos resultados.

Os resultados também foram interpretados de acordo com a intensidade de hemaglutinação visualizada (Quadro 2).

3.11 Kit ID-Partial Rh D-Typing (Painel de reagentes anti-D) - Diamed

Inicialmente, foi efetuada uma diluição com 1ml de LISS e de 10-12,5µL de concentrado de hemácias testadas. O cartão “ID-Partial Rh D-Typing” foi identificado com o nome do paciente, gestante ou doador. Em seguida, foram pipetados 50µL da suspensão de hemácias em cada poço e foram adicionados 25µL de cada anti-D (1-6) nos respectivos poços.

O cartão foi incubado durante 15 minutos à 37°C e posteriormente centrifugado durante 10 minutos. Finalmente, foi realizada a leitura e anotado os resultados.

Interpretação do resultado:

Positivo: Células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel.

Negativo: Botão compacto de células no fundo do poço.

No caso de Rh D parcial, os resultados encontrados são comparados com a tabela de interpretação e, assim o tipo ou categoria do antígeno Rh D parcial pode ser caracterizado.

3.12 Fenotipagem eritrocitária

Após a identificação do tipo ou categoria do antígeno Rh D parcial, os pacientes, gestantes ou doadores foram fenotipados para alguns dos antígenos do sistema Rh (C,c, E e e), além do antígeno K₁, sendo possível relacionar a frequência de determinados fenótipos com as categorias do antígeno Rh D parcial.

A fenotipagem eritrocitária dos antígenos do sistema Rh e o antígeno K₁ foi determinada pelo teste de hemaglutinação em gel, utilizando-se cartões específicos. Após a identificação dos cartões, 25µL das hemácias a serem testadas diluídas a 5% em Diluente 2-Bromelina (Diamed), foram adicionados aos microtubos do cartão. A seguir, os cartões foram centrifugados à 910rpm durante 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura.

Interpretação dos resultados:

Positivo: Células aglutinadas formando uma linha vermelha na superfície do gel ou dispersas ao longo do gel.

Negativo: Botão compacto de células no fundo do poço.

O fenótipo Rh D fraco tem sido objeto de discussão e controvérsias entre especialistas em medicina transfusional, desde sua descoberta em 1946. Muitos antígenos Rh D fraco podem ser detectados apenas por métodos sorológicos de alta sensibilidade, como o teste da AGH ou a técnica de absorção/eluição (FLEGEL, 2006).

Neste trabalho, utilizando a metodologia de tubo ou microplaca, todas as amostras que foram negativas para o antígeno Rh D quando testadas com o reagente anti-D monoclonal Diamed (clone Th28 e MS26) foram submetidas a testes adicionais. De um total de 13.616 amostras testadas, foram encontradas 11.835 amostras (86,92%) Rh D positiva, sendo 7.513 amostras de doadores e 4.322 amostras de pacientes ou gestantes, e 1.709 amostras (12,55%) Rh D negativa das quais 1.204 amostras de doadores e 505 amostras de pacientes e gestantes. Encontramos 72 amostras (0,53%) com antígeno Rh D fraco ou Rh D parcial, sendo 55 amostras de doadores e 17 amostras de pacientes e gestantes. Os resultados estão descritos na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Frequência de amostras Rh D positivas, Rh D negativas, Rh D fraco e/ou Rh D parcial do Hemocentro de Botucatu

	Doadores	Pacientes e gestantes	Total
Rh D positivo	7513 (63,48%)	4322 (36,51%)	11835 (86,92%)
Rh D negativo	1204 (70,45%)	505 (29,55%)	1709 (12,55%)
Rh D fraco ou parcial	55 (75,39%)	17 (24,64%)	72 (0,53%)
Total	8772 (64,42%)	4844 (35,58%)	13616 (100%)

Segundo Urbuniak *et al.* (1981), a incidência de Rh D fraco pode variar de acordo com a população e atinge cerca de 0,2% a 1% dos indivíduos brancos.

No trabalho realizado por Bhatia *et al.* (1977), na Índia, verificou-se que em populações caucasianas a incidência do antígeno Rh D positivo é de 85% e de Rh D fraco de 0,3% a 0,5%. Porém, Srikrishna *et al.* (2001) em

recente estudo, demonstrou uma incidência de 0,15% neste mesmo país, que pode estar relacionada diretamente com os reagentes e as técnicas utilizadas.

Estudos realizados antes da introdução de reagentes anti-D monoclonais mostraram que a incidência de Rh D fraco relatada na Europa era de 0,23% a 5%, e nos Estados Unidos de 3% (STROUP, 1988). Jenkins *et al.* em 2005, testaram 1.005 amostras de doadores Rh D positivos utilizando dois reagentes anti-D diferentes (1 Blend e 1 policlonal) e relataram uma incidência de 0,4% de doadores Rh D fraco fenotipados como Rh D positivo.

Denomme *et al.* (2005) publicaram um trabalho no Canadá, no qual foram utilizados dois reagentes anti-D monoclonais, mostrando a importância de se testar as amostras da rotina pré-natal e de receptores com mais de um reagente anti-D. Neste estudo, foram testadas 33.864 amostras em um período de 18 meses, sendo que 57 delas demonstraram discrepância entre os dois reagentes anti-D comerciais de procedências diferentes. Os autores verificaram uma incidência de 0,17% de indivíduos com variantes do antígeno Rh D.

Os dados citados na literatura condizem com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que as frequências de variantes Rh D apresentadas são semelhantes às encontradas em nosso estudo. Atualmente, o uso de potentes reagentes anti-D monoclonal associados com diferentes técnicas pode alterar a incidência de Rh D fraco.

Através da utilização do painel de anti-soros monoclonais (Kit ID-Partial Rh D-Typing, Diamed) foi possível identificar diferentes categorias de Rh D parcial e diferenciá-las das amostras Rh D fraco. Do total de 72 amostras testadas, 29 (40,28%) foram classificadas como Rh D fraco e 36 (50%) como Rh D parcial. Apenas 7 amostras (9,72%) apresentaram perfil não definido com painel de reagentes anti-D monoclonais utilizado (Gráfico 1).

Observamos na literatura divergência a respeito da frequência de Rh D fraco e Rh D parcial em relação aos dados encontrados em nosso trabalho. Segundo Garratty (2005), 90% das variantes Rh D são Rh D fraco tipos 1, 2 e 3

e apenas de 5 à 10% apresentam o fenótipo Rh D parcial. Estes dados não vêm de encontro com os nossos achados, provavelmente, pelo fato do critério de inclusão em nosso estudo ter selecionado apenas amostras Rh D positivas com intensidade inferior ou igual a 2+ na fase direta. Com o critério utilizado foi possível selecionarmos principalmente as amostras Rh D parcial e Rh D fraco, cuja característica é a presença fraca aglutinação na fase direta do teste. Devido a não terem sido testadas em nosso trabalho as amostras Rh D positivas com intensidade de aglutinação forte na fase direta dos testes, talvez não tenhamos identificado todas as amostras Rh D parcial presentes em nossa população. Pelo fato do fenótipo Rh D fraco, dependendo do número de sítios antigênicos poder muitas vezes apresentar-se como Rh D negativo em testes de rotina e como não foram analisadas em nosso estudo amostras Rh D negativas talvez não tenhamos também identificado todas as amostras com fenótipo Rh D fraco.

A diferença étnica entre as populações dos diferentes trabalhos encontrados na literatura, pode ser outra causa de divergência na incidência de Rh D fraco e Rh D parcial, pois no estudo de Garratty (2005) a população estudada foi de origem caucasiana, enquanto que em nosso estudo a população é miscigenada.

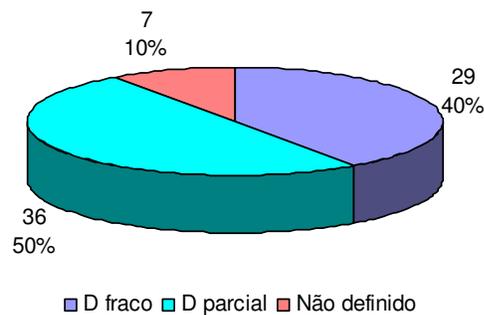


Gráfico 1: Frequência de indivíduos Rh D fraco e Rh D parcial do Hemocentro de Botucatu

Não é possível diferenciar os tipos do antígeno Rh D fraco e alguns subtipos de Rh D parcial por métodos sorológicos e como nem sempre os laboratórios de Imunohematologia podem dispor de recursos moleculares,

buscamos a associação de técnicas sorológicas para a identificação do maior número possível de variantes Rh D. Por esse motivo, as 72 amostras selecionadas, após a realização do teste com reagente monoclonal Diamed e seu respectivo controle, foram testadas com outro reagente monoclonal de diferente procedência (Reagentes Fresenius Kabi – clone MS201 e MS26) e um reagente policlonal (Reagente Fresenius Kabi). Através destes testes pudemos observar o grau de aglutinação obtido na fenotipagem Rh D. Embora a reação de aglutinação dependa diretamente do reagente anti-D utilizado, acreditamos que estes resultados podem ser de grande auxílio identificação sorológica do antígeno Rh D fraco e Rh D parcial e, conseqüentemente, no direcionamento da melhor conduta transfusional para pacientes Rh D fraco ou Rh D parcial.

Todos os antígenos Rh D fraco e Rh D parcial encontrados em nosso estudo foram associados com os graus de aglutinação obtidos à temperatura ambiente, à 37°C e, pelo teste da AGH. Com isso foi possível verificarmos a diferença de reatividade dos reagentes nas três fases da reação.

O teste estatístico utilizado para a análise dos dados foi o Teste de Goodman para contrastes dentro de populações multinomiais (GOODMAN, 1965). Para a interpretação das letras deve-se proceder da seguinte maneira: duas proporções seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula não diferem quanto aos respectivos grupos, na categoria de resposta em consideração.

Na tabela 2 analisamos a reatividade do reagente policlonal de procedência Fresenius em relação ao reagente monoclonal de procedência Diamed, nas três fases da reação. Verificamos que na primeira fase da reação 46,51% das amostras (20 amostras) apresentaram menor reatividade com o reagente policlonal em relação ao monoclonal de outra procedência (PF<MD) (Policlonal Fresenius<Monoclonal Diamed). A mesma quantidade, 20 amostras (46,51%) apresentaram o mesmo grau de aglutinação com ambos os reagentes (PF=MD). Apenas 3 amostras (6,98%) mostraram uma maior reatividade, nesta

primeira fase, com o reagente policlonal (PF>MD). Na segunda fase da reação verificamos um predomínio da resposta PF<MD, onde encontramos 69,77% das amostras (30 amostras) com esta resposta. Observamos ainda nesta segunda fase uma queda no número de amostras, visto que 11 amostras (25,58%) apresentaram reatividade igual com os reagentes (PF=MD). Apenas 4,65% das amostras (2 amostras) reagiram melhor com o reagente policlonal Fresenius em relação ao reagente monoclonal Diamed (PF>MD). Na terceira fase do teste, encontramos um equilíbrio, pois as três respostas analisadas não diferiram entre si, representadas pelas letras iguais. Desse modo, pudemos verificar que ambos os reagentes analisados apresentaram as mesmas respostas de reatividade nesta fase da reação.

Portanto, o reagente monoclonal Diamed mostrou-se mais eficiente no reconhecimento de variantes Rh D nas duas fases iniciais, entretanto, na terceira fase os dois reagentes reagiram igualmente.

Tabela 2: Frequência da reatividade do reagente Fresenius policlonal em relação ao reagente monoclonal Diamed no Hemocentro de Botucatu

Fase	Poli Fresenius / Mono Diamed	Frequência	p-valor
1 ^a	PF<MD	20 (46,51%) b	p<0,05
	PF=MD	20 (46,51%) b	
	PF>MD	3 (6,98%) a	
2 ^a	PF<MD	30 (69,77%) c	p<0,05
	PF=MD	11 (25,58%) b	
	PF>MD	2 (4,65%) a	
3 ^a	PF<MD	12 (27,91%) a	p>0,05
	PF=MD	19 (44,19%) a	
	PF>MD	12 (27,91%) a	

PF= Reagente Policlonal de procedência Fresenius.

MD= Reagente Monoclonal de procedência Diamed.

Letras diferentes em cada fase indicam que houve diferença significativa (p<0,05)

Comparamos também a reatividade dos reagentes Fresenius, nas três fases da reação, sendo um policlonal e outro monoclonal. Os resultados encontrados foram descritos na tabela 3. Na primeira fase da reação verificamos que os resultados encontrados diferiram significativamente um do outro, indicado pelas letras diferentes. Houve um predomínio da resposta PF<MF

(Policlonal Fresenius<Monoclonal Fresenius), demonstrando que 80,65% das amostras (50 amostras) obtiveram maior grau de aglutinação com o reagente monoclonal em relação ao reagente policlonal. O restante das amostras, 18,46% (12 amostras), apresentou intensidade de aglutinação exatamente igual entre os reagentes. Nenhuma amostra, nesta fase, obteve maior reatividade com o reagente policlonal. Na segunda fase, a mesma relação se manteve. Com predomínio de melhor grau de aglutinação com reagente monoclonal, onde encontramos 69,35% das amostras (43 amostras) com esta resposta (PF<MF). Em seguida, obtivemos uma resposta de igualdade no grau de aglutinação (PF=MF) com os dois reagentes em 29,03% das amostras (18 amostras). E apenas 1,61% das amostras (1 amostra) mostrou-se mais reativa com o reagente policlonal (PF>MF). Porém na terceira fase, a relação encontrada foi diferente. A resposta predominante foi a de igualdade de reatividade de aglutinação (PF=MF) com os dois reagentes em 61,29% das amostras (38 amostras). Entretanto, as outras duas respostas (PF<MF e PF>MF) não diferiram significativamente entre si, sendo indicadas pela mesma letra “a”.

De acordo com os resultados acima, verificamos que apesar do reagente monoclonal ter se mostrado mais eficiente nas primeiras fases da reação, na terceira fase ambos reagiram de forma semelhante.

Segundo Jong (2007), na Holanda, quando há dificuldade na detecção do antígeno Rh D, é realizada a tipagem com um reagente anti-D monoclonal e outro anti-D policlonal. Os receptores são tipados duas vezes na rotina laboratorial, mesmo sem ter ocorrido qualquer discrepância. No caso do resultado da tipagem ser positivo para o DVI, os receptores são considerados Rh D negativos e o sangue do cordão ou sangue do doador, são considerados DVI positivos.

Na Áustria utiliza-se na rotina laboratorial um anti-soro anti-D policlonal e o reagente anti-CDE. Se a reação com o anti-D for negativa e com o

anti-CDE for positiva, realiza-se a técnica da AGH para detecção de Rh D fraco (JONG, 2007).

Países como a Noruega e a Suíça, bem como o Canadá e os EUA, têm protocolos muito diferentes dos padrões europeus. No Reino Unido, por exemplo, não é obrigatória a realização da técnica de AGH na tipagem Rh D em doadores, enquanto que nos EUA a mesma deve fazer parte da rotina laboratorial. Há assim protocolos distintos de tipagem Rh D, em diferentes países (BROMILOW, 2007).

Tabela 3: Frequência de reatividade de reagente Fresenius monoclonal em relação ao reagente Fresenius policlonal no Hemocentro de Botucatu

Fase	Mono Fresenius/Poli Fresenius	Frequência	p-valor
1 ^a	PF<MF	50 (80,65%) c	p<0,05
	PF=MF	12 (18,46%) b	
	PF>MF	0 a	
2 ^a	PF<MF	43 (69,35%) c	p<0,05
	PF=MF	18 (29,03%) b	
	PF>MF	1 (1,61%) a	
3 ^a	PF<MF	16 (25,81%) a	p<0,05
	PF=MF	38 (61,29%) b	
	PF>MF	8 (12,03%) a	

PF= Reagente Policlonal de procedência Fresenius.

MF= Reagente Monoclonal de procedência Fresenius.

Letras diferentes em cada fase indicam que houve diferença significativa (p<0,05)

De acordo com os nossos resultados, se considerarmos que o reagente mais adequado para a rotina de doadores é aquele que identifica o maior número de antígenos Rh D da forma mais eficiente possível, o reagente monoclonal Diamed seria o mais adequado para esta rotina, tendo em vista que o mesmo apresentou melhores intensidades de aglutinação na primeira fase da reação. Assim, comprovamos que os reagentes monoclonais (Blend) utilizados se mostraram mais potentes do que os reagentes policlonais, os quais identificaram hemácias com variantes Rh D com maior dificuldade, ou seja, com a necessidade de fases posteriores à leitura imediata. Tais dados corroboram com os encontrados por Kumar (2005), o qual afirma que os reagentes monoclonais

de alta potência detectam células Rh D positivas que dificilmente poderiam ser detectadas com reagentes policlonais menos sensíveis.

Segundo os resultados encontrados em nosso estudo, se adotarmos o protocolo de que para a rotina de doadores será necessária a realização dos testes até a fase de AGH, tanto o reagente monoclonal (Diamed e Fresenius), quanto o reagente policlonal (Fresenius) se mostraram igualmente eficientes para este fim. Visto que na terceira fase (reação com AGH) verificamos que as respostas apresentaram-se equilibradas. Entretanto, apesar do reagente policlonal não ser tão efetivo na fase direta, devemos lembrar que este reagente é capaz de identificar um maior número de epítomos, reconhecendo assim, o maior número de variantes Rh D, possibilitando a diferenciação entre Rh positivo normal e outras variantes Rh D.

No estudo realizado por Kulkarni (2007), o reagente anti-D IgG policlonal mostrou qualidade na detecção do antígeno Rh D, pois com a utilização deste reagente todas as variantes puderam ser confirmadas utilizando-se o teste da AGH. Neste mesmo estudo verificou-se, que a maioria dos anti-D monoclonal apresentaram uma reação positiva intensa com células variantes Rh D, demonstrando desse modo que a maioria dos Rh D parcial de nossa população pode ser detectada como Rh D positivo.

Ao comparamos a reatividade dos reagentes monoclonais de procedências diferentes, sendo um Diamed e outro Fresenius, encontramos os resultados descritos na tabela 4. Na primeira fase da reação, verificamos que apenas 2,33% das amostras (1 amostra) mostraram reatividade inferior com o reagente monoclonal Fresenius (MF<MD) (Monoclonal Fresenius<Monoclonal Diamed), apresentando diferença significativamente menor em relação as outras duas respostas (MF=MD e MF>MD), nesta mesma fase. Utilizando-se os dois reagentes (Diamed e Fresenius), encontramos em 41,86% das amostras (18 amostras) a mesma intensidade de aglutinação, MF=MD. A maioria das amostras testadas, 55,81% das amostras (24 amostras), apresentaram uma maior

intensidade de aglutinação com o reagente monoclonal da Fresenius (MF>MD). Na segunda fase da reação, apesar de ter ocorrido um aumento da resposta MF<MD, e uma queda na resposta MF>MD, essa alteração não foi suficiente para mudar a relação que já existia na primeira fase. Encontramos apenas 13,95% das amostras (6 amostras) com melhor reatividade na utilização do reagente monoclonal Diamed do que com o monoclonal Fresenius (MF<MD), resultado este considerado significativamente diferente e inferior às outras duas respostas (MF=MD e MF>MD) obtidas nesta fase. Obtivemos 41,86% das amostras (18 amostras) com resposta de igualdade entre a reatividade dos reagentes (MF=MD) nesta fase e, 44,19% das amostras (19 amostras) melhor reativas com o reagente monoclonal Fresenius (MF>MD). Na terceira fase, verificamos um equilíbrio entre as respostas MF<MD e MF>MD, onde encontramos 20,93% das amostras (9 amostras) com resultados melhores com a utilização do reagente monoclonal Diamed (MF<MD), porém esta resposta não diferiu dos resultados encontrados na resposta MF>MD, onde 25,58% amostras (11 amostras) apresentaram melhor reatividade com o reagente monoclonal Fresenius (MF>MD). Observamos ainda nesta fase que houve um predomínio da igualdade (MF=MD), onde 53,49% das amostras (23 amostras) demonstraram a mesma intensidade de aglutinação com ambos os reagentes testados.

Com os dados encontrados em nosso trabalho observamos que o reagente monoclonal Fresenius reagiu melhor do que o reagente monoclonal Diamed, nas duas primeiras fases da reação, porém na última fase houve um equilíbrio entre as respostas MF<MD e MF>MD, e um predomínio da igualdade da resposta, MF=MD.

Tabela 4: Frequência da reatividade de reagente Fresenius monoclonal em relação ao reagente Diamed no Hemocentro de Botucatu

Fase	Mono Fresenius/Mono Diamed	Frequência	p-valor
1 ^a	MF<MD	1 (2,33%) a	p<0,05
	MF=MD	18 (41,86%) b	
	MF>MD	24 (55,81%) b	
2 ^a	MF<MD	6 (13,95%) a	p<0,05
	MF=MD	18 (41,86%) b	
	MF>MD	19 (44,19%) b	
3 ^a	MF<MD	9 (20,93%) a	p<0,05
	MF=MD	23 (53,49%) b	
	MF>MD	11 (25,58%) a	

MF= Reagente Monoclonal de procedência Fresenius.

MD= Reagente Monoclonal de procedência Diamed.

Letras diferentes em cada fase indicam que houve diferença significativa (p<0,05)

De acordo com Jones *et al.* (1995), o protocolo de utilização dos reagentes adequados para tipagem Rh D depende de qual variante Rh D necessita ser detectada. A frequência das categorias de Rh D parcial variam de acordo com a população, portanto para a escolha da conduta mais adequada deve-se conhecer também a população.

Atualmente na Holanda, utiliza-se o seguinte protocolo de tipagem Rh D em doadores de sangue: nas primeiras duas doações, o doador é testado com dois reagentes anti-D, monoclonal e Blend e, se ambos forem negativos, realiza-se o teste da AGH para se detectar a presença do antígeno Rh D fraco, e nas doações posteriores, é utilizado apenas um reagente anti-D monoclonal. De acordo com o protocolo utilizado neste país para receptores o teste da AGH deve ser sempre realizado (JONG, 2007).

A Pesquisa e Identificação de Anticorpos Irregulares também podem ser úteis na identificação de uma variante Rh D, pois indivíduos que são fenotipados como Rh D positivos e apresentam aloanticorpo anti-D no soro, têm em seu fenótipo uma variante Rh D, a qual não foi detectada anteriormente. Porém, em nosso estudo, não encontramos nenhuma amostra Rh D positiva com presença de aloanticorpo anti-D em seu soro, apesar de atualmente em nossa rotina laboratorial, termos como conduta, a transfusão de concentrado de

hemácias Rh D positivo em indivíduos que apresentem reatividade apenas na fase de AGH. Esse protocolo é utilizado para a manutenção do estoque de sangue Rh D negativo.

O Kit ID-Partial Rh D-Typing, utilizado em nosso estudo, consiste de um painel de anticorpos monoclonais, o qual possibilitou a identificação e diferenciação das seguintes categorias de Rh D parcial: II, III, V, VII, DFR. Os resultados obtidos estão descritos no gráfico 2. Foram encontradas apenas uma amostra (2,33%) Rh D categoria II, 8 amostras (18,60%) Rh D categoria III, 5 amostras (11,63%) Rh D categoria V, 3 amostras (6,98%) Rh D categoria VII e o maior valor encontrado foi o da categoria DFR com 19 amostras (44,19%). Esse Kit também possibilitou a identificação de 29 amostras (40,28%) Rh D fraco, porém não sendo possível a diferenciação entre seus subtipos.

Jong (2007) em estudo realizado na Holanda levantou a frequência dos subtipos de Rh D parcial encontrados nesta população, sendo que os mesmos, não vêm de encontro com a detectada em nosso estudo. Segundo este autor, foram encontradas 3% de amostras DIII, 1% DIVa, 4% DVa, 27% DVI, 6% DVII, 9 % DFR, 3% RoHar, 40% DAR e 7% perfil não definido.

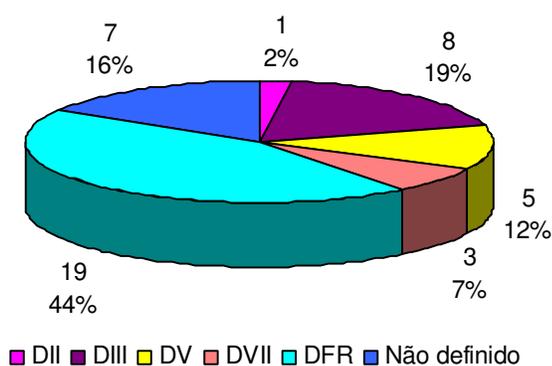


Gráfico 2: Frequência dos subtipos de Rh D parcial no Hemocentro de Botucatu

Através dos nossos livros de registros e dados armazenados em nossos bancos de dados, foi possível encontrarmos registros dos indivíduos selecionados quanto ao tipo sanguíneo ABO, sexo e raça.

Segundo Mollison *et. al.* (1997), a frequência do grupo sanguíneo ABO encontrada na população em geral é de 41% A, 9% B, 4% AB e 46% O. Na população da área de abrangência de Botucatu analisada em nosso trabalho, encontramos dados semelhantes aos descritos por Mollison (1997), sendo: 35,7% de indivíduos A, 10,47% indivíduos B, 3,36% AB e 50,47% O.

Analisamos também a frequência do grupo sanguíneo ABO entre os indivíduos caracterizados como variantes Rh D (72 amostras), o qual mostrou-se semelhante à encontrada na população total analisada (13.616 amostras), e também semelhante a frequência descrita por Mollison (1997). Encontramos nas variantes Rh D de nosso estudo 33,33% de indivíduos A, 13,89% B, 4,17% AB e 48,61% O (Gráfico 3).

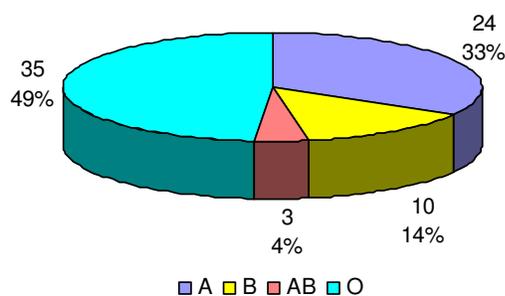


Gráfico 3: Frequência ABO em indivíduos Rh D fraco e Rh D parcial no Hemocentro de Botucatu

Observamos em nosso estudo que as frequências de indivíduos do sexo feminino e masculino em amostras caracterizadas como Rh D fraco são iguais, não apresentando diferença significativa de qualquer um dos sexos quando os relacionamos com a alteração na expressão do antígeno Rh D. Das 28 amostras Rh D fraco, 14 amostras (50%) foram do sexo feminino, sendo que o mesmo resultado foi encontrado no sexo masculino (14 amostras). Já entre as amostras Rh D parcial e amostras com o fenótipo não definido encontramos diferença entre os sexos, com prevalência do sexo masculino em ambos os casos. Do total de amostras Rh D parcial (36 amostras), apenas 13 amostras

(36,11%) foram do sexo feminino e as 23 amostras (63,89%) restantes foram do sexo masculino. Dentre as 7 amostras com perfil Rh D não definido 3 amostras (42,86%) foram do sexo feminino e 4 amostras (57,14%) do sexo masculino (Gráfico 4).

A população nacional apresenta uma frequência de 100 mulheres para cada 99,6 homens, portanto verificamos que as frequências do fenótipo Rh D parcial e do perfil não definido em relação ao sexo divergem da encontrada na população nacional, havendo uma prevalência do sexo masculino no fenótipo Rh D parcial.

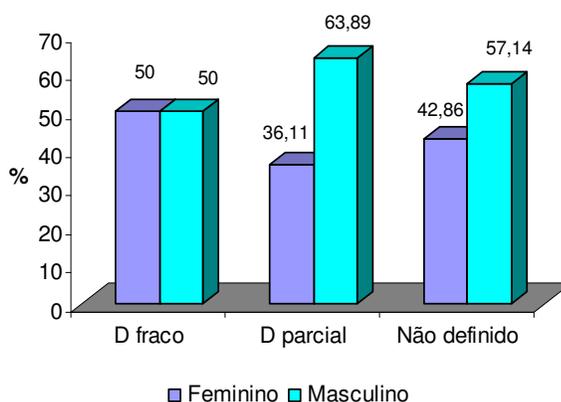


Gráfico 4: Frequência do sexo em indivíduos Rh D fraco e Rh D parcial no Hemocentro de Botucatu

Quando comparada a expressão alterada do antígeno Rh D com a frequência racial, pudemos observar, que tanto a incidência de Rh D fraco quanto a de Rh D parcial são mais evidentes em indivíduos da raça branca. Dos 26 indivíduos Rh D fraco analisados em nosso estudo, 25 indivíduos (96,15%) pertenciam a raça branca e, apenas 1 indivíduo (3,85%) à raça negra. Nos indivíduos Rh D parcial, observamos que dos 34 indivíduos analisados caracterizados como Rh D parcial, 29 indivíduos (85,29%) pertenciam à raça branca, enquanto que 5 indivíduos (14,71%) pertenciam à raça negra. Os indivíduos com perfil não definido (6 amostras), ou seja onde não foi possível a

diferenciação entre Rh D fraco e Rh D parcial, através do Kit ID-Partial Rh D-Typing, são pertencentes à raça branca (Gráfico 5).

No fenótipo Rh D parcial encontramos um pequeno aumento da incidência da raça negra em relação a incidência da mesma no fenótipo Rh D fraco, isso pode ser explicado devido aos genes híbridos presentes na maioria dos fenótipos Rh D parcial e que são comuns em indivíduos de origem africana.

Kumar (2005) registra a incidência de variantes Rh D em populações caucasianas, porém foi encontrado outro estudo que registram maior incidência na raça negra (GIRELLO, 2002). Portanto não há na literatura um consenso sobre qual raça apresenta maior incidência de variantes Rh D, podendo ocorrer variações entre as populações, entretanto em nosso estudo verificamos uma prevalência da raça branca.

Segundo Moulds (2006b), estima-se que 0,2% a 1% dos caucasianos possuam hemácias com expressão alterada de D, mas o número de amostras classificadas como variantes Rh D depende das características do reagente utilizado para a fenotipagem Rh D.

Rodrigues (2005) observou em seu estudo que o fenótipo Rh D parcial categoria IVa e Rh D fraco tipo 4 estão presentes em africanos e seus descendentes e geralmente ocorrem com o haplótipo *Dce* (Ro).

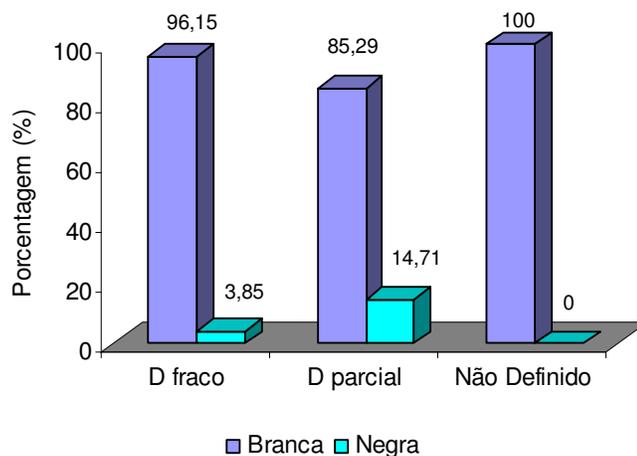


Gráfico 5: Frequência racial em indivíduos Rh D fraco e Rh D parcial no Hemocentro de Botucatu

Os reagentes de procedência Diamed utilizados em microplaca e em tubo possuem clones IgM diferentes, porém são capazes de identificar os mesmos epítomos antigênicos. Em nosso estudo comparamos o reagente Diamed utilizado em microplaca e o reagente Diamed utilizado em tubo (Tabela 5). Na primeira fase da reação verificamos que o reagente Diamed tubo reagiu melhor (DM<DT, Diamed Microplaca<Diamed Tubo) em 56,25% das amostras (9 amostras) testadas, entretanto observamos diferença significativa em relação a resposta de igualdade entre as reações (DM=DT), obtida em 37,5% das amostras (6 amostras). Apenas 1 amostras (6,25%), apresentou reatividade superior com o reagente monoclonal Diamed microplaca (DM>DT), nesta fase. Já na segunda e na terceira fase da reação encontramos um equilíbrio entre os resultados, pois não encontramos diferença significativa entre eles, demonstrando que os reagentes reagiram de forma igual nestas duas últimas fases.

Não foram encontrados relatos na literatura, onde há a comparação das técnicas em microplaca e em tubo.

Tabela 5: Frequência de reatividade do anti-soro anti-D microplaca em relação a reatividade do anti-soro anti-D tubo

Fase	Diamed microplaca/Diamed Tubo	Frequência	p-valor
1 ^a	DM<DT	9 (56,25%) b	p<0,05
	DM=DT	6 (37,5%) ab	
	DM>DT	1 (6,25%) a	
2 ^a	DM<DT	7 (58,33%) a	p>0,05
	DM=DT	2 (16,67%) a	
	DM>DT	3 (25%) a	
3 ^a	DM<DT	1 (8,33%) a	p>0,05
	DM=DT	6 (50%) a	
	DM>DT	5 (41,67%) a	

DM=Reagente de procedência Diamed para técnica em microplaca.

DT= Reagente de procedência Diamed para técnica em tubo.

Letras diferentes em cada fase indicam que houve diferença significativa (p<0,05)

Nas amostras de doadores, pacientes e gestantes caracterizados como Rh D fraco ou Rh D parcial realizamos a imunofenotipagem para os antígenos “C”, “c”, “E”, “e” e “K₁”. Os resultados obtidos foram descritos no gráfico 6. Verificamos em 100% das amostras Rh D fraco e Rh D parcial a presença dos

antígenos “c” e “e”. A incidência do antígeno “C” nas amostras analisadas foi de 65,52% (19 amostras) em indivíduos Rh D fraco e de 41,67% (15 amostras) em indivíduos Rh D parcial. O antígeno “E” esteve presente em apenas 8,34% das amostras (3 amostras) Rh D parcial.

De acordo com Issit (1985), a frequência destes antígenos na população caucasiana está em torno de: 70% “C”, 80% “c”, 98% “e”, 30% “E” e 9% K₁.

Comparando-se os dados apresentados por Issit (1985) com os resultados encontrados em nosso estudo verificamos uma redução da incidência do antígeno “C”, tanto nas amostras Rh D fraco quanto nas amostras Rh D parcial. Encontramos em 65,52% das amostras (19 amostras) o fenótipo Rh D fraco (valor próximo ao registrado por Issit), e em 41,67% das amostras (15 amostras) o fenótipo Rh D parcial. Ao compararmos essa frequência encontrada em nosso trabalho com descrita por Issit (1985) em relação aos outros antígenos do Sistema Rh e Kell, verificamos que o antígeno “c” apresentou uma maior incidência em nosso estudo. De todos antígenos Rh estudados nos fenótipos Rh D fraco e Rh D parcial, o antígeno “e” apresentou valores próximos ao registrados por Issit (1985). Porém nas amostras com perfil não definido em nosso estudo, esta incidência mostrou-se aproximadamente 12% inferior à encontrada por Issit (1985).

Ao compararmos o antígeno “E” em nosso estudo, em relação aos dados relatados por Issit (1985) verificamos que este antígeno apresentou incidência muito inferior, nas variantes estudadas. O antígeno K₁ também apresentou valores inferiores aos citados na literatura (Issit 1985), porém apenas os fenótipos Rh D fraco e Rh D parcial, as amostras com perfil não definido, apresentaram valores acima do esperado.

As amostras com perfil não definido foram as que mais se aproximaram dos valores descritos por Issit (1985).

Não podemos analisar as combinações de fenótipos isoladamente da raça, pois as combinações em que o alelo *D fraco* ocorre, variam com a raça. Beiguelman (2003) relatou que a combinação *cDe* é considerada como característica das populações negróides, enquanto que as combinações *CDe* e *cDE* são aceitas como exclusivas das populações caucasóides. Em vista disso podemos presumir que o fenótipo *CcDee* pode ocorrer em negróides e caucasóides.

O fenótipo mais comum entre os Caucasianos é *D+C+c+E-e+*, escrito mais freqüentemente como *Dce/dce*. Na população Africana, entretanto, o haplótipo *Dce* é mais comum do que o *dce*, então o provável genótipo de *D+C+c+E-e+* seria *DCe/Dce* (DANIELS & BROMILOW, 2007).

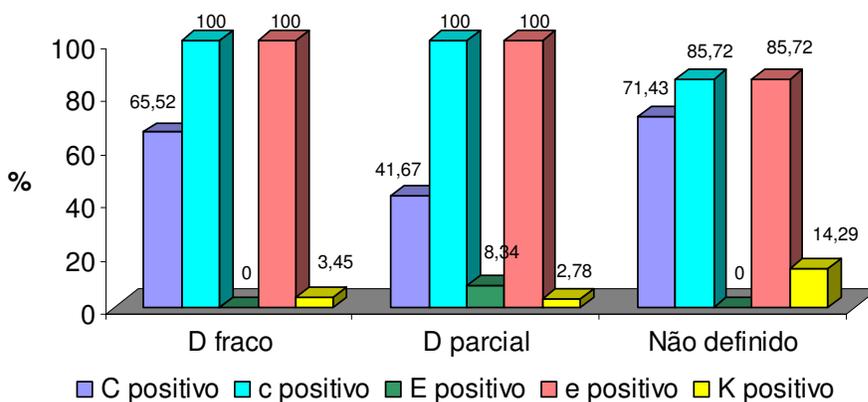


Gráfico 6: Frequência dos antígenos do Sistema Rh em indivíduos Rh D fraco e Rh D parcial no Hemocentro de Botucatu

Relacionamos também a frequência dos antígenos do Sistema Rh (C, c, E, e e) e antígeno K_1 com as categorias de Rh D parcial encontradas (Gráfico 7), com isso verificamos que foram encontradas apenas 1 amostra caracterizada como categoria DII, a qual apresentou o fenótipo *CcEeKneg*. Entretanto foram encontradas 8 amostras caracterizadas como categoria DIII, e destas 8 amostras, apenas 4 amostras (50%) apresentaram o antígeno “C”, todas as 8 amostras possuíam os antígenos “c”, “e” e não possuíam o antígeno “ K_1 ”, e apenas 1

amostra (12,5%) apresentou o antígeno “E”. Foram encontradas também 5 amostras consideradas DV, onde 2 delas (40%) apresentaram o antígeno “C”, nenhuma das amostras possuía os antígenos “E” e “K₁”, porém todas as 5 amostras (100%) apresentaram o antígeno “c” e “e” positivos. Nas 3 amostras caracterizadas

como DVII, apenas uma amostra (33,33%) apresentou o antígeno “C”, para os outros antígenos as proporções se mantiveram as mesmas das encontradas nas amostras caracterizadas como DV. Porém, foram encontradas 19 amostras identificadas como DFR, sendo que 7 destas amostras (36,84%) obtiveram o antígeno “C”, todas as 19 amostras (100%) foram consideradas antígenos “c” e “e” positivos, apenas uma amostras apresentou o antígeno “E”, ocorrendo o mesmo em relação ao antígeno “K₁”.

Através destes dados constatamos que as frequências dos antígenos C, c, E, e e K₁ encontradas em nosso estudo, diferem bastante das frequências relatadas por Issit (1985) em uma população caucasiana, podendo, então haver relação das variantes Rh D com os antígenos do Sistema Rh (C, c, E, e e) e antígeno K₁.

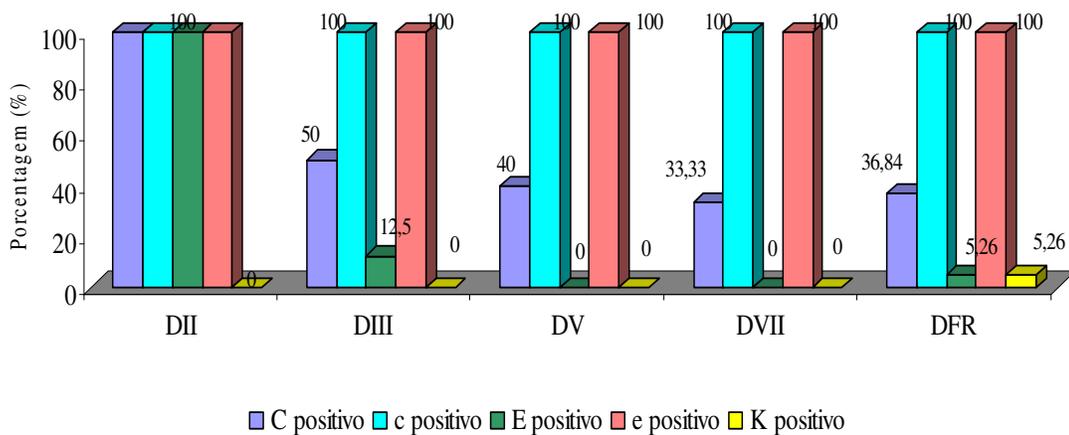


Gráfico 7: Frequência dos antígenos do Sistema Rh nas categorias de Rh D parcial no Hemocentro de Botucatu

Alguns países obrigam a repetição do teste para a pesquisa de Rh D fraco em todas as doações, enquanto outros realizam o teste uma ou duas vezes e nas doações seguintes utilizam os registros informatizados para a confirmação. Porém em todos os países, apenas dois tipos de rótulos são liberados na bolsa: positivo e negativo.

Segundo Barros (2006), quando os resultados dos testes diferem com a utilização de diferentes reagentes, a conduta para a conclusão da tipagem do antígeno Rh D seria a verificação de que o indivíduo é um doador ou um paciente. Testes moleculares são muito úteis para a confirmação da discrepância da tipagem de Rh D, mas isto nem sempre é necessário se um trabalho sorológico completo for realizado. A maioria dos autores concordam que após serem sorologicamente ou molecularmente confirmada, as variantes de Rh D poderiam ser consideradas como Rh D positivo para doadores, independentemente do grau de aglutinação, pois mesmo com baixa densidade antigênica, o antígeno Rh D fraco pode ser imunogênico. Para pacientes a recomendação é que os mesmos devem ser considerados Rh D negativo. Entretanto, rotular um indivíduo como Rh D positivo em uma situação e Rh D negativo em outra tem causado insegurança aos profissionais da área.

Com o objetivo de se estabelecer protocolos de liberação de resultados, Westhoff (2005), modificou a interpretação da tipagem Rh D, incluindo no sistema de computação do hospital, POS, NEG e DEP. Com a seguinte explicação marcada: “O tipo Rh é **dependente** (DEP) do reagente utilizado, testes realizados e/ou técnicas utilizadas, para o indivíduo que pode ter sido previamente relatado como Rh D positivo ou Rh D negativo. Neste caso, o paciente deve ser tratado como Rh D negativo, as gestantes candidatas a recebimento Imunoglobulina Imune Rh deverão receber sangue Rh D negativo, e o doador de sangue, deverá ser tratado como Rh D positivo.”

Baseado nos dados obtidos em nosso estudo sugerimos as seguintes recomendações para a fenotipagem Rh D em receptores, gestantes, doadores e

recém-nascidos. Se o grupo a ser testado for de doadores, o protocolo deve indicar a utilização de dois anti-soros de diferentes procedências monoclonais Blend ou um monoclonal Blend e outro policlonal, realizando os testes sempre até a fase de AGH. Esta conduta torna-se coerente, tendo em vista que, neste grupo o objetivo é identificar todas as hemácias com qualquer quantidade de antígeno Rh D ou expressão do epítipo Rh D como Rh D positivo, pois todos os tipos de sangue Rh D positivo são potencialmente imunogênicos, podendo causar aloimunização em receptores Rh D negativo. Porém, como não existe uma combinação de reagentes capaz de detectar todas as variantes Rh D, torna-se importante que se conheça as variantes mais freqüentes na população estudada e se identifique principalmente as variantes que induzem com maior freqüência à aloimunização. A detecção da maioria dos Rh D fracos e Rh D parciais em doadores de sangue aumentam a segurança transfusional e reduzem os riscos de aloimunização.

Apesar do reagente policlonal ser eficaz na identificação de Rh D fraco e Rh D parcial na rotina de doadores, sendo capaz de reconhecer todos os epítipos do antígeno Rh D, não é recomendável o uso desse reagente na rotina. Essa conduta se justifica pelo fato dos reagentes anti-D policlonais estarem em extinção no mercado e em razão da segurança transfusional, evitando a transfusão de sangue Rh D positivo em receptores Rh D negativo. Estes anti-soros são mais caros que os monoclonais, devido à matéria prima utilizada para sua produção ser escassa e o processo de produção muito complexo. Quanto à questão da biossegurança, lembramos da falta de segurança que estes anti-soros geram para o próprio trabalhador, pois sendo de origem humana apresentam risco de contaminação viral, bacteriana ou outra.

A mesma conduta utilizada em doadores é indicada para a fenotipagem Rh D de recém-nascidos, pois eles podem aloimunizar a mãe durante o parto, deste modo seria necessária a administração da imunoglobulina Rh logo após o parto para que ela não produza anticorpo anti-D em uma

próxima gestação (podendo causar DHPN), ou após uma transfusão incompatível (reação transfusional hemolítica).

Para receptores, o melhor protocolo seria o da utilização de dois anti-soros de diferentes procedências monoclonais anti-D IgM, apenas na fase direta. Neste caso torna-se importante a não detecção das variantes Rh D que apresentem risco de desenvolverem anti-D, sendo então classificadas como Rh D negativa. Portanto o reagente mais adequado é aquele que reconheça fenótipos Rh D fraco, porém não reconheça fenótipos Rh D parcial.

Receptores Rh D parcial devem ser transfundidos com hemácias Rh D negativas, independente da categoria do antígeno Rh D parcial presente. E receptores Rh D fraco podem ser considerados Rh D positivo e serem transfundidos com hemácias Rh D positivas.

Os cuidados a serem tomados no que diz respeito a tipagem Rh em gestantes são maiores. A detecção de gestantes Rh D fraco ou Rh D parcial torna-se importante, pela possibilidade de se poder prevenir a produção de anti-D, desde que as mesmas não estejam imunizadas por transfusão ou gestações anteriores. Para as fenotipagens Rh D em gestantes recomendamos a utilização de dois anti-soros de procedências diferentes sendo um monoclonal IgM (apenas a fase direta) e outro Blend (até a fase de AGH). Havendo discrepância entre os resultados dos testes com os dois anti-soros, aconselhamos a utilização do painel de reagentes monoclonais para a identificação da variante Rh D. Se a gestante expressar o fenótipo Rh D fraco, não há risco de aloimunização caso o feto seja Rh D positivo, porém se a mãe for Rh D parcial, será necessária a administração profilática de Imunoglobulina Rh para que não haja o risco de aloimunização caso seu feto seja Rh D positivo. Esses procedimentos evitarão a exposição desnecessária da gestante à Imunoglobulina Rh, a qual possui anticorpos de origem humana. Diminuindo assim os custos, devido à redução no número de Imunoglobulinas administradas.

A injeção da Imunoglobulina Rh só tem efeito na prevenção de imunização quando ministrada em dose única e alta (300mg ou mais) a uma parturiente Rh D negativo ou Rh D parcial em até 72 horas após o parto de uma criança Rh D positivo ou Rh D fraco. Entretanto, se essa parturiente apresentar sinais de imunização pelo antígeno Rh D ou Rh D fraco, a Imunoglobulina Rh não poderá impedir a imunização ou um aumento do título do anticorpo anti-D. Antes da administração da Imunoglobulina Rh a uma parturiente deve-se verificar se o seu soro está livre do anticorpo anti-D. Caso contrário essa imunoglobulina não deve ser aplicada (BEIGUELMAN, 2003).

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, bem como nas informações oriundas da literatura, podemos concluir que:

- A incidência de Rh D parcial foi maior do que a incidência de Rh D fraco.

- Os reagentes monoclonais Blend (Diamed e Fresenius) analisados foram mais eficientes na detecção de variantes Rh D em relação ao reagente policlonal (Fresenius).

- Não foi possível através do teste da PAI e da IAI identificar os subtipos do antígeno D, pelo fato de não termos encontrado nenhuma amostra com PAI positiva contendo aloanticorpo anti-D.

- O kit ID-Partial Rh D-Typing (Diamed) mostrou-se eficaz na detecção dos fenótipos DII, DIII, DV, DVII e DFR, pois para a realização de uma transfusão Rh D compatível não é necessária a identificação dos subtipos de Rh D fraco. Apenas a diferenciação entre Rh D fraco e Rh D parcial são suficientes para se definir qual conduta transfusional deverá ser a mais adequada.

- A categoria de Rh D parcial mais encontrada na população estudada foi a DFR.

- O grupo sanguíneo ABO não mostrou relação com a presença ou ausência do fenótipo Rh D fraco ou Rh D parcial.

- Existe uma prevalência do sexo masculino no fenótipo Rh D parcial e um equilíbrio entre os dois sexos no fenótipo Rh D fraco.

- Há uma maior incidência da raça branca em variantes Rh D.

- O teste em microplaca foi melhor reativo na primeira fase da reação da tipagem Rh D, porém na segunda e na terceira fase ambas as técnicas (tubo e microplaca) se mostraram igualmente eficientes.

- O fenótipo Rh “CceeKneg” foi o mais encontrado em variantes Rh D, podendo então, haver uma relação destes antígenos com a expressão alterada do antígeno Rh D.

- É importante a implantação de um programa de computador para liberação dos resultados da tipagem Rh D que diferencie os fenótipos Rh D parcial e Rh D fraco dos fenótipos Rh D positivos e Rh D negativos.

- Fica evidente a necessidade da utilização de uma nova metodologia para a fenotipagem Rh D de receptores (2 reagentes IgM, somente fase direta), doadores (2 reagentes Blend diferentes, até a fase de AGH), gestantes (1 reagente monoclonal IgM, apenas fase direta e outro Blend, até a fase de AGH) e recém-nascidos (2 reagentes Blend diferentes, até a fase de AGH), a fim de se evitar aloimunizações anti-D desnecessárias mantendo uma maior segurança transfusional.

Acreditamos que estas recomendações baseadas em nossos resultados possam contribuir na seleção adequada do reagente anti-D utilizado na rotina de fenotipagem do antígeno Rh D para evitar aloimunização e na conduta transfusional de pacientes fenotipados como Rh D fraco ou Rh D parcial.

ARGALL, C. L.; BALL, J. M.; TRENTELMAN, E. Presence of anti-D antibody in the serum of a D^u patient. **J. Lab. Clin. Med.**, v.41, p. 895-898, 1953.

ASFOUR, M.; NARVIOS, A.; LICHTIGER, B. Transfusion of Rh D-incompatible blood components in Rh D-negative blood marrow transplant recipients. **Med. Gen. Med.**, v. 6, p. 22, 2004.

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

BARROS, C. *et al.* Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n.4, p. 269-274, 2006.

BEIGUELMAN, B. Os sistemas sangüíneos eritrocitários. In: BEIGUELMAN, B. **O Sistema Rh**. Ribeirão Preto.Funpec, 2003. p. 107-149.

BHATIA, H.M. **Procedures in blood banking and immunohaematology**. Mumbai. Blood Group Reference Centre (ICMR), 1977. p.44.

BROMILOW, I. D ou não D: Eis a Questão (DIAMED AG). **ABO Rev. Méd. Transfus.**, v. 31, p.15-21, 2007.

CASTILHO, L. Diversidade Estrutural e Funcional dos Antígenos de Grupos Sanguíneos. In: CASTILHO, L. (Coord.). **26º CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2003a. p.2.

CASTILHO, L. Acompanhamento imunohematológico de pacientes hematológicos. In: CASTILHO, L. (Coord.); **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, p. 23, 2003b.

CASTILHO, L. Sistema de Grupo Sanguíneo Rh. In: BORDIN, J.O.; LANGHI JR., D.M.; COVAS, D.T.(Eds) **Hemoterapia fundamentos e práticas**. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 137-146.

CEPELLINI, R. *et al.* An interaction between alleles at the Rh locus in man which weariness of reactivity of the Rh₀ factor (Du). **Proc. Natt Acad. Sci. USA**, v. 41, p. 283, 1993.

DANIELS, G.; BROMILOW, I. The Rh blood group system. In: DANIELS, G.; BROMILOW, I. **Essential Guide to Blood Groups**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 33-44.

DENOMME, G.A. *et al.* Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. **Transfusion**, v. 45, p.1554-1560, 2005.

FLEGEL, W.A. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. **Curr. Opin. Hematol.**, v.13, p 476-483, 2006.

FROHN, C. *et al.* Probability of anti-D development in D- patients receiving D+ RBCs. **Transfusion**, v. 43, p. 893-898, 2003.

GARRATTY, G. Do we need to be concerned about weak D antigens? **Transfusion**, v. 45, p. 1547-1551, 2005.

GIRELLO, A.L. Sistema Rh (ISBT 004). In: GIRELLO, A.L.; KÜHN, T.I.B.B. **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**. São Paulo: Editora Senac, 2002. p.107-116.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. **Technometrics**. v. 7, n. 2, p. 247-254. 1965.

ISSIT, P. D. **Applied Blood Group sorology**. 3rd ed. Miami: Montgomery Scientific Publications, 1985.

ISSIT, P. D. Race - related Red Cell Alloantibody Problems. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 51, p. 158-67, 1994.

JENKINS, C.M. *et al.* Incidence of weak D in blood donors typed as D positive by the Olympus PK 7200. **Immunoematology**, v.21, n. 4, p. 152-154, 2005.

JONES, J.; SCOTT, M. L.; VOAK, D. Monoclonal anti-D specificity and RhD structure criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. **Transfus. Med.**, v.5, p. 171-184, 1995.

JONG, L. D(etectar)ou não d(etectar) (reagents sanquin). **ABO Rev. Med. Transfus.**, v.31, p. 11-14, 2007.

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.

KUMAR, H. *et al.* Difficulties in Immunohaematology: The Weak D Antigen. **MJAFI**, v. 61, n. 4, p. 348-350, 2005.

LEVINE, P.; VOGEL, P.; ROSENFELD, R.E. Hemolytic disease of the newborn. **Adv. Pediatr.** v. 6, p. 97-156, 1953.

LICHTIGER, B.; SURGEON, J.; RHORER, S. Rh-incompatible platelet transfusion therapy in cancer patients: a study of 30 cases. **Vox Sang.**, v.45, p. 139-143, 1983.

MOLLISON, P.L.; ENGELFRIED, C.P.; CONTRERAS, M. **Blood Transfusion in Clinical Medicine.** 10th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

MOTA, M. *et al.* Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. **Vox Sang.**, v.88, p. 130-135, 2005.

MOULDS, M.K. 2006 Immunohematology Reference Laboratory Conference. **Immunohematology**, v.22, n. 2, p. 78-81, 2006a.

MOULDS, M.K. Review: monoclonal reagents and detection of unusual or rare phenotypes or antibodies. **Immunohematology**, v. 22, p. 52-57, 2006b.

RAMSEY, G. *et al.* Low rates of Rhesus immunization from Rh-incompatible blood transfusions during liver and heart transplant surgery. **Transplantation**, v. 47, p. 993-995, 1989.

REID, M.E. *et al.* Use of LOR-15C9 monoclonal anti-D to differentiate erythrocytes with the partial DVI antigen from those with other partial D antigens or weak D antigens. **Immunohematology**, v. 14, n. 3, p. 89-93, 1998.

RODRIGUES, A; CASTILHO L.M. Caracterização molecular das variantes do sistema Rh em pacientes portadores de anemia falciforme. Resumo de tese, **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, v. 24, n. 2, p. 151-152, 2002.

RODRIGUES, A. **Caracterização molecular dos antígenos RhD (RhD fraco e RhD parcial) e sua aplicação na prática transfusional.** 2005. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SELTAM, A. *et al.* Antibodies to high-frequency antigens may decrease the quality of transfusion support: an observational study. **Transfusion**, v. 43, p. 1563-1566, 2003.

SMALLRIDGE, G. Reagentes anti D (IMMUCOR). **ABO Rev. Med. Transfus.**, v. 32, p.7-11, 2007.

SOLÍS, M.M. *et al.* Incidencia de fenotipos D débiles y D parciales en donantes de sangre de Guanabacoa. **Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.**, v. 13, n. 2, p. 120-123, 1997.

SRIKRISHNA, A. *et al.* The Rh enigma – Problems encountered. **Indian J. Haematol. Blood Transfus.**, v. 19, p. 102-103, 2001.

STRATTON, F. A new Rh allelomorph. **Nature**, v. 158, p. 25-26, 1946.

STROUP, W. M. More on Du, letter to the editor. **Immunoematology**, v. 4 p. 16-17, 1988.

URBUNIAK, S.J.; ROBERTSON, A.E. A successful programme of immunizing Rh negative male volunteers for anti-D production using frozen/thawed blood. **Transfusion**, v. 21, p. 64-69, 1981.

WAGNER, T. *et al.* Anti-D immunization by DEL red blood cells. **Transfusion**, v. 45, p. 520-526, 2005.

WESTHOFF, C.M. Review : the Rh blood group D antigen...dominant, diverse, and difficult. **Immunohematology**, v. 21,p. 155-163, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)