Relato de Caso

DETECÇÃO SOROLÓGICA DE ANTÍGENO RhD PARCIAL DFR EM DOADOR

Thais Araújo Cano

O antígeno Rh D é o mais imunogênico do Sistema Rh e possui grande significado clínico na transfusão sanguínea e na doença hemolítica perinatal. Esse antígeno apresenta formas variadas de expressão na membrana eritrocitária caracterizando a presença dos antígenos Rh D parcial e ou Rh D fraco, cuja detecção é de interesse na rotina transfusional. O presente estudo relata identificação de antígeno Rh D parcial tipo DFR em doador através de métodos sorológicos, bem como a importância dos mesmos na determinação do fenótipo Rh D.

Palavras chaves: RhD parcial, métodos sorológicos, transfusão.

Introdução

O Sistema Rh é o mais polimórfico dos grupos sanguíneos, constituído por pelo menos 45 antígenos independentes. È um sistema de grande importância clínica para medicina transfusional devido a alta imunogenicidade dos seus antígenos[1].

Dois genes homólogos *RHD e RHCE* codificam os antígenos D e Cc/Ee respectivamente[2]. As proteínas RhD e RhCE são constituídas de 417 aminoácidos cada, possuem forma transmembranar com seis loops extracelulares e funcionam como transportadoras de amônia [3].

O antígeno RhD é o mais importante do Sistema Rh por ser altamente imunongênico e estar envolvido na doença hemolítica do recém nascido e nas reações transfusionais hemolíticas[4]. A transfusão de uma única unidade de sangue Rh D positivo em paciente RHD negativo está associado com uma imunização acima de 80%[5]. Por esse motivo a tipagem RhD deve ser realizada em todos doadores e receptores para assegurar que pacientes RhD negativo recebam sangue RhD negativo[1].

O antígeno RhD normal é considerado um mosaico de 37 epítopos, onde pelo menos nove desses (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais. No entanto, a proteína RhD pode variar sua expressão de forma quantitativa e ou qualitativa caracterizando os fenótipos RhD fraco e RhD parcial respectivamente [4].

O antígeno RhD fraco apresenta menor expressão da proteína RhD na membrana eritrocitária que decorre de alterações na sua porção intramembranar(segmento não reconhecido pelos anticorpos). Indivíduos com esse fenótipo não produzem anitcorpos

Artigo de conclusão do curso de pós-graduação em Hematologia e Banco de sangue (maio de 2007 a junho de 2008)

anti-D caso recebam transfusão de hemácias RhD normal. Estima-se que a freqüência de RhD fraco na população seja inferior a 1%, sendo mais comum em negros[6].

O antígeno RhD parcial é caracterizado pela ausência de um ou mais epítopos do antígeno RhD. Essas alterações são promovidas por mutações de ponto missense ou rearranjos gênicos entre genes *RHD e RHCE*, modificando qualitativamente a proteína RhD na porção extracelular [6]. Portanto, indivíduos com fator RhD parcial perdem a expressão de alguns epítopos e são capazes de desenvolver aloanticorpos ao entrar em contato com hemácias RhD positivo[4].

Na rotina de banco de sangue, é importante esclarecer a expressão do antígeno RhD na classificação de doadores e receptores para definição da conduta transfusional a ser adotada, pois a não detecção das variantes RhD em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D nos pacientes RhD negativo transfundidos com estas hemácias [7,8]. E ainda, doadores fenotipados como RhD parcial devem ser definidos com RhD positivo, porém quando se tornam receptores devem ser considerados Rh D negativo[1,11].

Na prática laboratorial, o reconhecimento de amostras com fraca expressão do fator RhD, depende não só da qualidade dos reagentes utilizados, como de métodos sorológicos bem aplicados e cuidadosamente desenvolvidos.

O objetivo do presente trabalho foi relatar a detecção de antígeno RhD parcial em doador utilizando métodos sorológicos.

Relato do caso

Doador sexo masculino sem história de transfusão pregressa efetuou a doação de sangue no Instituto Goiano de Hemoterapia em Goiânia e sua amostra foi enviada à Central Goiana de Sorologia para realização dos testes de imunohematológicos de tipagem ABO, tipagem Rh e pesquisa de anticorpos irregulares eritrocitários.

A determinação do fator RhD foi feita por reação de hemaglutinação em que uma diluição do concentrado da amostra do doador foi testada com soros anti-D monoclonal e anti-D policlonal, efetuando-se em paralelo um controle Rh. Técnicas diferentes e complementares de hemaglutinação com soro anti-D foram realizadas e os resultados comparados. Foi observado aglutinação de w (fraca) a 1+ pela técnica em tubo, não intensificando em fase de antiglobulina humana. Em microplaca, cuja técnica faz uso de solução de baixa força iônica que age potencializando a reação antígeno-anticorpo, a positividade foi de 2+. Em técnica mais sensível de gel-centrifugação, utilizando cartão LISS/Coombs e soro anti-D policlonal, foi obtida uma reatividade de 3+ .

Por fim, a amostra foi testada em painel de anti-soros monoclonais anti-epítopos de D(gel-centrifugação DiaMed). O resultado foi comparado com a tabela de interpretação do kit e definido como antígeno RhD parcial tipo DFR, o qual expressa os epítopos epD3, epD4 e epD9 e não expressa epD8[9] .

Discussão

A incidência de D parcial difere de população para população[2], fato este que pode ser explicado pelas variações genéticas nas populações e pelas diferentes técnicas e reagentes empregados[10].

No presente caso, os resultados obtidos através dos testes de hemaglutinação em tubo para determinação de fator RhD apresentaram intensidade de aglutinação de

w(fraca) a 1+ mesmo em fase de antiglobulina humana. Em estudo realizado por Barros et al, utilizando-se a mesma técnica, demonstrou que antígenos RhD fraco que apresentavam grau de aglutinação inferior a 1+ pelo teste de antiglobulina humana com anti-D IgG estavam na sua maioria associados ao antígeno RhD parcial.

A detecção sorológica da maior parte das variantes RhD de baixa densidade antigênica se torna possível, quando durante os procedimentos técnicos, uma atenção maior é dispensada aos variados graus de aglutinação da amostra com reagentes anti-D e aos padrões atípicos ou discrepantes daqueles observados em tipagens de RhD normal.

Diante da análise dos resultados apresentados pela amostra e da hipótese da presença de RhD parcial, foi necessário para conclusão do fenótipo do doador conduzir um painel de anti-soros monoclonais anti-epítopos de D, o qual possibilitou a identificação do antígeno como sendo RhD parcial DFR.

Apesar de o kit RhD parcial ser disponível para classificação de categorias de D parcial mais comumente encontradas, a identificação de todas as categorias requer análises moleculares. No entanto, a maioria de D parciais clinicamente relevantes na medicina transfusional pode ser identificada pelo Kit D parcial[2]. Além disso, a realização de fenotipagem estendida através painel pode permitir a diferenciação entre D fraco e algumas categorias de D parcial[11], o que antes era possível somente por genotipagem. Pelo perfil da amostra no painel, observa-se que os tipos mais comuns de D fraco apresentam fraca reatividade com todos os anti-soros, enquanto D parcial demonstra maior reatividade e aglutinação apenas com aqueles anti-soros correspondentes aos epítopos presentes[11].

Embora a literatura ressalte o emprego da biologia molecular para a determinação dos tipos de antígenos RhD, sua aplicação deve ser mais direcionada à confirmação de fenótipos pré-definidos e casos inconclusivos devido a limitações dos testes de hemaglutinação, pois são poucos os laboratórios que dispõem de técnicas moleculares e por isso a classificação sorológica ainda é extremamente importante.

Referências Bibliográficas

1. Avent ND, Reid M. E. The blood group system: a review. Blood 2000; 95: 375-387.
2. Kulkarni S, Colah R, Goradshakar A, Gupte S, Vasantha K, Mohanty D, Ghosh K. Frequency of partial D in Western Indian. Transfusion Medicine 2008, 18: 91-96.
3. Flegel WA, Wagner F.F. Molecular biology of partial D and weak D. Implications for blood bank practice. Clin Lab2002; 48: 53-59.
4. Barros C, Otta M, Walkim V, Zaqueroni M, Baleotti W, Castilho L. Avaliação de reagentes na detecção dos antígenos D fraco e D parcial. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2006, 28: 269-274.
5. Wagner FF, Gassner C, Smuller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Three molecular strutures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematological feature. Blood 1998; 91: 2157-68.
6. Girello, AL. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. Editora SENAC, São Paulo 2002; 114-115.
7. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D types 2 RBCs. Transfusion 2000; 40: 428-34.
8. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. Vox Sang 2005; 88: 130-35.

9. Lomas C, Grassman W, Ford D, et al FPTT is a low incidence Rh antigen associated with a new partial RhD phenotype DFR. Transfusion 1994; 34: 612-616.
10. Tippet P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen.Vox Sang 1996; 70: 123-31.
11. Bromilow I. Considerações sobre a fenotipagem RhD. Editorial DiaMed.