

ANÁLISE DE MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS EM UM LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

MEM Alberti, LB Musial, BR Cruz, DC Kalva

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG),
Ponta Grossa, PR, Brasil

Introdução/objetivos: A determinação do perfil de antígenos eritrocitários em doadores de sangue e pacientes que recebem transfusão sanguínea é importante na prevenção da aloimunização. Para a detecção desses antígenos é realizada a técnica convencional de fenotipagem eritrocitária. Quando essa técnica apresenta limitações, seja devido a expressão fraca ou alterada dos antígenos, ou em paciente politransfundido, é necessário a implantação de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos. O objetivo deste estudo foi comparar as técnicas de fenotipagem e genotipagem eritrocitária realizadas em voluntários da Universidade Estadual de Ponta Grossa. **Materiais e métodos:** Foi realizado um estudo observacional transversal com indivíduos da comunidade universitária. Foram realizadas 37 fenotipagens, pela metodologia de aglutinação em coluna-gel-teste, para antígenos dos sistemas Rh e Kell. Foram selecionados 4 indivíduos, os quais possuíam os fenótipos de relevância a serem estudados, sendo eles: Rhccee, RhCCee, K-k+, K+k+. Posteriormente, foi realizada a extração e quantificação de DNA seguido de amplificação por meio de PCR alelo específico (PCR-AS), e revelação por eletroforese em gel para os antígenos do sistema Rh (C, c, E, e) e do sistema Kell (K, k). **Resultados:** A distribuição dos fenótipos do sistema Rh e Kell encontrados neste estudo foram: 2 (50%) indivíduos RhCCee, 2 (50%) indivíduos Rhccee, 3 (75%) indivíduos K-k+ e 1 (25%) indivíduo K+k+. A genotipagem realizada por PCRAS apresentou os resultados concordantes ao da fenotipagem. **Discussão:** A PCR convencional realizada neste estudo gerou resultados 100% condizentes com a fenotipagem anteriormente realizada. A PCR convencional é um método qualitativo, e o produto dessa reação é visualizado por meio da eletroforese, técnica usada para separar fragmentos de DNA com base no tamanho e carga, sendo revelado em luz UV. Deve ser ressaltado que como alternativa para PCR convencional existe a PCR em tempo real que permite a monitorização em tempo real da amplificação, que é baseado na detecção e quantificação de um composto fluorescente que aumenta proporcionalmente a quantidade de material genético que está sendo amplificado. A PCR em tempo real vem sendo muito utilizada por ser quantitativa, precisa, sensível, rápida e com maior reprodutibilidade. Além disso, essa técnica não possui processamento pós-PCR, minimizando as chances de contaminação cruzada, mas tendo como desvantagem o alto custo do equipamento. Realizar a genotipagem de maneira precisa dos principais antígenos eritrocitários garante segurança transfusional, tendo em vista o potencial que a imunogenicidade tem para acarretar reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica perinatal. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo demonstram a equivalência entre a fenotipagem e a genotipagem, realizada pela PCR convencional, nos indivíduos avaliados. No entanto, realizaremos estudos futuros com maior número de amostras e antígenos eritrocitários para que

determinemos a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade dos testes. Além disso, analisaremos métodos de genotipagem alternativos, como a PCR em tempo real em equipamento QuantStudio 5 (ThermoFisher) recentemente adquirido, que permitirá um procedimento mais rápido, preciso e seguro, visando a aplicação de novos métodos de diagnóstico na rotina imuno-hematológica.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1141>

CHARACTERIZATION OF RHD*D WEAK TYPE 15 PHENOTYPE IN A JAPANESE PREGNANT WOMAN – CASE REPORT

MG Aravechia^a, TH Costa^a, MFM Sirianni^a,
LD Santos^a, MCT Pintão^b, CB Bub^a, JM Kutner^a

^a Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório Fleury, Brazil

Aim: We describe a case of an obstetric patient, asian, whose Red Blood Cells (RBCs) showed a low expression of the RH:1 antigen in the routine tests and the strategies used for the characterization of an unusual RHD variant. **Material and methods:** Japanese, 25th week of pregnancy, showed discrepant results in RhD typing with different anti-D monoclonal antibodies (Clones MS-201/MS26 (Fresenius-Kabi); ESD-1 (Diaclon); Blend MS-201/MS26 (Fresenius-Kabi); P3×61, P3×290, P3×35, P3×61 and P3×21223 B10 (Grifols); RUM-1/ESD1-M (Grifols); D175+D415 (Immucor), NaTH119+LOR-15C9 (Imunoscan). The phenotype C, c, E, e, Cw was performed by Gel Card (DG Gel RH+Kell, Grifols). Screening was performed to detect the most prevalent RHD alleles variants in Asians: RHD*Del1 (c.1227G>A), RHD*DVI.3 (D-CE(3-6)-D); RHD*01.W11 (c.885G>T) and RHD*01.W15 (c.845G>A) according to PCR-Multiplex, PCR-RFLP protocols and Sanger Sequencing method. RHD zygosity genotyping was performed by AS-PCR protocol. The RhD antigen density of the sample was determined by Flow cytometry (Navius EX, Beckman Coulter) using monoclonal IgG anti-D (Clone MS26) and the secondary antibody was goat anti-human IgG, Fab-fragment, FITC-conjugated (Life Technologies). **Results:** The pregnant woman was phenotyped as C+c-E-e+Cw-. Blood sample showed inconsistent hemagglutination reactions (negative/weak/2+) with the anti-D panel. Genomic analyzes defined a single nucleotide change (845G>A) in the exon 6, leading to the amino acid change Gly282Asp located between transmembranous and exofacial RhD protein that is associated with RHD*weak D type 15 phenotype. The low D density found (323 sites/cell) and the hemizygosity status could explain why RHD*01.W15 was mistyped as RhD-negative by some anti-D serum including identification antibody test. **Discussion:** RHD allele that encodes a protein with very weak expression of the D antigen are rare in asian population. These variations in the RhD antigen structure result either in a D partial, Del and weak D phenotype. Although the frequency of the RHD*01.W15 genotype is relatively common in Japanese populations (16%), this is the first case found in a Japanese pregnant woman detected in our service. Accurate identification of RhD Variants is of great