

## 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<sup>a</sup>, TH Costa<sup>a</sup>, MFM Sirianni<sup>a</sup>,  
LD Santos<sup>a</sup>, MCT Pintão<sup>b</sup>, CB Bub<sup>a</sup>, JM Kutner<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brazil

<sup>b</sup> 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, 25<sup>th</sup> 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

significance for a safe and effective clinical measures to prevent Hemolytic Disease of Newborn (HDN) for women child-bearing age. **Conclusion:** The identification of these rare individuals associated with unusual phenotypes is very important, both for Transfusion purposes and to prevent HDN.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1142>

#### CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE VARIANTES DE RHD EM DOADORES DE SANGUE NO SUL DO BRASIL

CSR Araujo<sup>a,b</sup>, BA Machado<sup>a</sup>, JS Palaoro<sup>a</sup>, CM Wink<sup>a</sup>, BD Silveira<sup>b</sup>, E Leitzke<sup>b</sup>, MA Croce<sup>b</sup>, V Rossato<sup>b</sup>, A Pasqualotti<sup>b</sup>, LM Castilho<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Serviço de Hemoterapia do Hospital São Vicente de Paulo (SHHSVP), Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>b</sup> Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>c</sup> Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi realizar a avaliação molecular em doadores de sangue de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, que apresentaram reações atípicas na fenotipagem RhD. **Material e métodos:** Através da fenotipagem RhD pelas técnicas de aglutinação em coluna (Ortho Clinical) e gel-teste (Bio-Rad) foram encontrados 19 doadores com campo misto e reações mais fracas (1+). Foi realizada a análise molecular destas amostras por técnicas convencionais de PCR, RHD BeadChip (Immucor) e sequenciamento genômico. **Resultados:** Foram encontrados oito (42%) doadores D Fraco tipo 18, quatro (21%) D Fraco tipo 1, três (16%) D Fraco tipo 2, um (5%) D Fraco tipo 3, um (5%) D Fraco tipo DAR, um (5%) D Fraco tipo 38 e um (5%) Del 37. **Discussão:** O antígeno D caracteriza-se como o mais imunogênico do sistema Rh, tendo sua conformação na superfície das hemácias como um mosaico de 37 epítomos. A relevância clínica do reconhecimento desse sistema está relacionada ao seu envolvimento na doença hemolítica perinatal e reações hemolíticas autoimunes. Nesse sentido, mesmo que a grande maioria da população se identifique como RhD positivo ou negativo, existe uma variedade de fenótipos menos comuns como D fraco, D parcial e DEL, que necessitam de técnicas especializadas para seu reconhecimento. Observa-se que a variante RhD fraco tipo 18, embora, geralmente, pouco comum em outras regiões e populações, exibiu uma frequência surpreendentemente elevada entre os doadores de sangue estudados na região sul do Brasil. Esses achados destacam a relevância da caracterização sorológica e molecular do sistema de grupos sanguíneos RhD nesta região específica, uma vez que a prevalência dessa variante pode diferir significativamente de outras áreas geográficas e sugere a possibilidade de um efeito fundador em manifestações fenotípicas de variantes RhD. Muito embora esse estudo tenha tido uma população amostral pequena, as informações obtidas por ele abrem caminhos para que protocolos de genotipagem para as variantes RHD sejam introduzidas na região, dados estatísticos auxiliarão na segurança

transfusional, evitando aloimunização anti-D e reações hemolíticas transfusionais. É crucial o entendimento da distribuição e frequência das variantes Rh no Rio Grande do Sul, para melhor entendimento das diferentes origens raciais da região, o que pode auxiliar ainda mais na elaboração de protocolos para os doadores e pacientes com variantes RhD. **Conclusão:** Nosso estudo salienta a importância de investigação molecular quando identificadas variações sorológicas como campo misto na rotina de fenotipagem RhD, por meio disso é possível encontrar a presença de variantes raras e efeito fundador em determinadas regiões do país.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2023.09.1143>

#### FREQUENCY OF MAIN IRREGULAR ANTIBODIES OF THE RH SYSTEM IDENTIFIED IN THE PERIOD 2015 TO 2019 IN A HEMOTHERAPY SERVICE IN CURITIBA - PR

ACS Maia, J Oliveira, J Fritsch, LCM Silva, P Moraes, PTR Almeida

Instituto Paranaense de Hemoterapia e Hematologia – Grupo Vita, Curitiba, PR, Brasil

**Background:** Alloimmunization is described as an immune response to the recognition of a foreign antigen, causing the immune system to initiate the process of destruction of erythrocytes and formation of irregular antibodies. A total of 354 erythrocyte antigens have already been classified, divided into 44 systems, but not all of them are classified as clinically significant in transfusion practice. The ABO, RH, Kell, Duffy, Kidd and MNS systems are the most important, as they have the potential to cause intravascular or extra-vascular hemolysis. The RH system is of great clinical interest due to its high immunogenicity and high capacity for immune-mediated erythrocyte destruction. **Objective:** To identify the frequency of the main antibodies of the RH system and to evaluate the profile of sensitized patients. **Method:** A retrospective study was conducted from January 2015 to May 2019. The population evaluated were individuals with positive irregular antibody research known as: Anti -D, C, c, E, e. Patients with irregular antibodies, identification of antibodies from other erythrocyte systems and newborn patients with antibodies of probable maternal origin were excluded from the study. Data were analyzed using descriptive statistics to assess the frequency of qualitative variables: age group, gender and antibody found. **Results:** An amount of 667 samples from patients with irregular antibodies were analyzed, and 30% of the sensitization was caused by antigens of the RH system. Regarding identification, the most frequent isolated antibody was Anti-E (38.6%), followed by Anti-D (30.7%), Anti-c (5.3%), Anti-C (4.8%) and Anti-e (1.1%). Antibody associations were also found, the most frequent being Anti -D and Anti -C (13.2%), Anti - E and Anti - c (3.7%) and other associations in less frequency (2.6%). It was possible to observe that alloimmunization is a more frequent condition in patients aged over 60-years (58.2%), and the percentage of women is also higher (72.4%). **Discussion:** Through the presented data, it was possible to observe that alloimmunization is a more frequent event in patients over