

Artigo / Article

## Avaliação de reagentes anti-D na detecção dos antígenos D fraco e D parcial

### Evaluation of anti-D reagents in the detection of weak D and partial D antigens

Clayton Barros<sup>1</sup>Márcia Otta<sup>2</sup>Valeria L. Wakim<sup>2</sup>Márcia Zaqueroni<sup>2</sup>Wilson Baleotti Júnior<sup>3</sup>Lilian Castilho<sup>1</sup>

Anti-soros monoclonais anti-D IgG e IgM têm sido produzidos para substituir os policlonais na determinação do antígeno D. No entanto, pouco se conhece a respeito da utilização destes reagentes na detecção dos antígenos RhD fraco e RhD parcial. Estudos moleculares e sorológicos que possam esclarecer a expressão do antígeno D são importantes para a seleção adequada dos reagentes anti-D utilizados na fenotipagem RhD. Foram analisados anti-soros anti-D monoclonais IgG e IgM quanto à capacidade de detecção dos antígenos D fraco de alta e baixa densidade antigênica e dos antígenos D parciais que reagem como D fraco em 56 amostras de sangue caracterizadas como D fraco. O anti-D IgM foi analisado pela reatividade de aglutinação à temperatura ambiente enquanto o anti-D IgG foi analisado pela reatividade pelo teste da antiglobulina humana. Os tipos de D fraco foram caracterizados molecularmente, e a densidade antigênica dos antígenos RhD identificados foi determinada por citometria de fluxo. Todas as amostras que continham os tipos de D fracos mais frequentes (DF1, DF3 e DF4) foram detectadas à temperatura ambiente (TA) com anti-D IgM enquanto as amostras DF2 e D parcial foram detectadas com anti-D IgG reativo pelo teste da antiglobulina humana (AGH). Nossos resultados demonstram que o anti-D IgM não detecta antígenos D parciais reativos como D fraco e antígenos D fraco de baixa densidade antigênica e, portanto, pode ser utilizado na rotina de pacientes. O anti-D IgG detecta a maioria dos tipos de D fraco e associações D fraco parcial e deve ser utilizado na rotina de doadores. Rev. bras. hematol. hemoter. 2006;28(4):269-274.

**Palavras-chave:** Reagentes anti-D; D fraco; D parcial; sistema Rh, RhD, RHD.

## Introdução

O antígeno RhD é o mais importante do sistema Rh devido ao seu envolvimento na doença hemolítica perinatal e nas reações transfusionais hemolíticas. O antígeno RhD é considerado como um mosaico composto de 37 epítopos, onde pelo menos nove epítopos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais.<sup>1</sup> Alguns indivíduos RhD-positivo podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítopos ausentes, definindo-se, assim, as categorias do antígeno RhD parcial (D<sup>II</sup>,

D<sup>III</sup>, D<sup>IV</sup>, D<sup>V</sup>, D<sup>VI</sup>, D<sup>VII</sup>, DFR, DBT, R<sup>oHar</sup>) que são diferenciadas umas das outras de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítopos.<sup>2</sup>

A análise molecular das variantes do antígeno RhD mostrou que a perda da expressão de certos epítopos RhD está associada a mutações de ponto no gene *RHD* ou a rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE*. As variantes D<sup>II</sup>, D<sup>IIIa</sup>, D<sup>IVa</sup>, D<sup>VII</sup>, DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, R<sup>oHar</sup>, DAR e DAU ocorrem pela presença de mutações de ponto no gene *RHD* enquanto as variantes D<sup>IIIb</sup>, D<sup>IIIc</sup>, D<sup>IVb</sup>, D<sup>Va</sup>, D<sup>VI</sup>, DFR, DBT e DCS ocorrem pela formação de genes híbridos,

<sup>1</sup>Hemocentro Unicamp – Campinas-SP, Brasil.

<sup>2</sup>Asem-NPBI – São Paulo-SP, Brasil.

<sup>3</sup>Hemocentro Faculdade de Medicina – Marília-SP, Brasil.

**Correspondence:** Lilian Castilho

Hemocentro, Unicamp

Rua Carlos Chagas, 480

Caixa Postal 6198

13081-970 – Barão Geraldo – Campinas-SP, Brasil

Tel.: (55 19) 3788-8749 – Fax: (55 19) 3788-8600

E-mail: castilho@unicamp.br

em que um fragmento do gene *RHD* é substituído por um fragmento genômico do gene *RHCE*. Estes genes codificam proteínas híbridas RhD-CE-D de 417 aminoácidos que conservam alguns epítomos RhD, mas que podem, ocasionalmente, expressar novos epítomos detectáveis sorologicamente. Estas alterações ocorrem nos segmentos extracelulares da proteína RhD, as alças onde estão localizados os epítomos Rh, mudando a sua conformação e a exposição dos epítomos de RhD. Este fato explica por que os indivíduos com o fenótipo RhD parcial perdem a expressão de alguns epítomos do antígeno RhD e podem desenvolver aloanticorpo anti-D, ao entrar em contacto com hemácias RhD-positivo normais.<sup>3-8</sup>

Uma outra variante do antígeno RhD, o antígeno RhD fraco, apresenta fraca expressão do antígeno RhD e, dependendo do anti-soro anti-D utilizado, reage apenas pelo teste da antiglobulina humana. O antígeno RhD fraco surgiu como uma conseqüência de mutações de ponto missenses em diferentes éxons do gene *RHD*.<sup>9</sup> Atualmente, mais de 30 tipos já foram descritos (Site RHESUS: [www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/](http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/)). As substituições dos aminoácidos dos diferentes tipos de RhD fraco estão localizadas nos segmentos transmembranares e intracelulares da proteína RhD. Este fato explica a fraca expressão do antígeno RhD na membrana da hemácia, bem como a ausência de aloanticorpo anti-D na maioria dos indivíduos RhD fracos.<sup>9,10</sup>

O mecanismo relacionado com a expressão reduzida do antígeno RhD fraco não está totalmente esclarecido, e sua expressão difere dependendo do tipo presente na membrana da hemácia. Mutações missenses que ocorrem no gene *RHD* fraco parecem envolver regiões importantes relacionadas com a integração da proteína Rh com a membrana das hemácias ou com a glicoproteína RhAG.<sup>11</sup>

A genotipagem RHD tem sido cada vez mais utilizada para diferenciar os antígenos RhD normal, RhD fraco e RhD parcial devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes de hemaglutinação.<sup>12,13</sup> As técnicas moleculares permitem distinguir as hemácias que perdem ou apresentam epítomos alterados (RhD parcial) daquelas que possuem níveis reduzidos do antígeno RhD (RhD fraco). Esta diferenciação é importante para prevenir a aloimunização em pacientes e gestantes, uma vez que indivíduos com o fenótipo RhD parcial apresentam risco de aloimunização, enquanto que a maioria dos indivíduos RhD fraco não produzem anti-D. No entanto, são poucos os laboratórios que dispõem desta metodologia e, portanto a classificação sorológica ainda é extremamente importante.

O reconhecimento de amostras com fraca expressão do antígeno RhD depende do método e da qualidade do reagente anti-D empregado. A utilização de anti-D monoclonais de baixa afinidade e a dificuldade na obtenção de anti-D policlonais de boa qualidade têm causado discrepâncias entre os resultados da fenotipagem RhD e algumas vezes deixado de detectar antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica.

A não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode causar aloimunização anti-D nos pacientes RhD-negativo transfundidos com estas hemácias.<sup>14,15</sup> Por outro lado, muitos indivíduos classificados sorologicamente como RhD fraco são na verdade RhD parcial.<sup>16,17</sup> Como a diferenciação entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial é difícil de ser caracterizada na rotina sorológica, muitos pacientes têm produzido anti-D pelo fato de terem sido considerados RhD-positivo.

Anti-soros monoclonais anti-D IgG e IgM têm sido produzidos para substituir os policlonais na determinação do antígeno D. No entanto, pouco se conhece a respeito da utilização destes reagentes na detecção dos antígenos RhD fraco e RhD parcial uma vez que não existe um limite bem definido entre os antígenos RhD fraco e RhD parcial que perdem epítomos específicos e podem estar associados à aloimunização anti-D.

Devido à sua importância clínica e considerando que o antígeno RhD é o mais imunogênico do sistema Rh e que apresenta diversas variantes, estudos moleculares e sorológicos que possam esclarecer sua expressão são importantes para a seleção adequada dos reagentes anti-D utilizados na fenotipagem RhD.

## Métodos

### *Reagentes e amostras*

Foram analisados anti-soros anti-D monoclonais IgG (clone MS26) e IgM (clone MS201) (Smart Kit, Asem-NPBI, São Paulo, Brasil) quanto à capacidade de detecção dos antígenos D fraco de alta e baixa densidade antigênica e dos antígenos D parciais que reagem como D fraco em 56 amostras de sangue caracterizadas como D fraco.

### *Fenotipagem RhD*

A fenotipagem RhD foi determinada pelo teste de hemaglutinação clássico em tubo utilizando-se 50 µl do anti-soro anti-D e 50 µl de suspensão de hemácias a 3% em salina.

O anti-D IgM foi analisado pela reatividade de aglutinação à temperatura ambiente enquanto o anti-D IgG foi analisado pela reatividade pelo teste da antiglobulina humana.

### *Extração de DNA*

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico utilizando-se os métodos Easy DNA Kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA) e o Genome Star™ System (Biosystems) de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

### *Genotipagem RHD*

Devido à alta homologia existente entre os genes *RHD* e *RHCE*, a estratégia utilizada na genotipagem RHD levou em consideração as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: intron 4 e éxon 10. No intron 4, o gene *RHCE* possui 600 pb a mais que o gene *RHD*, enquanto na

região 3' não traduzida do exon 10, o gene *RHD* possui 47 pb a mais que o gene *RHCE*. Assim, foram utilizados *primers* 18 que permitem determinar a presença do gene *RHD*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 1). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1

Seqüência dos <i>primers</i> utilizados na genotipagem RHD	
<i>Primers</i>	Seqüências
RH41	5' -GTG TCT GAA GCC CTT CCA TC -3'
RH42	5'-GAA ATC TGC ATA CCC CAG GC -3'
RH43	5'ATT AGC TGG GCA TGG TGG TG 3'
EX10F	5'-TTT CCT CAT TTG GCT GTT GGA TTT TAA -3'
RHD3'-UTR	5'-GTA TTC TAC AGT GCA TAA TAA ATG GTG -3'
RHCE3'-UTR	5'-CTG TCT CTG ACC TTG TTT CAT TAT AC -3'

*Caracterização molecular dos antígenos RhD fraco e RhD parcial com fraca expressão*

A caracterização molecular dos antígenos RhD fraco D parcial HMi e D parcial categoria VI foi realizada por técnicas de PCR alelo-específico<sup>10</sup> e PCR-multiplex,<sup>19</sup> que permitem determinar os tipos mais freqüentes de D fraco e a presença dos genes *DHMi* e *DVI*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% e gel de poliacrilamida a 8% respectivamente (Figuras 2 e 3). As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

A caracterização molecular do antígeno RhD parcial DAR foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR-RFLP previamente descrita.<sup>13</sup> As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na Tabela 3. Os produtos de PCR amplificados foram digeridos *overnight* com a enzima de restrição *Hph* I e os fragmentos analisados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (Figura 4).

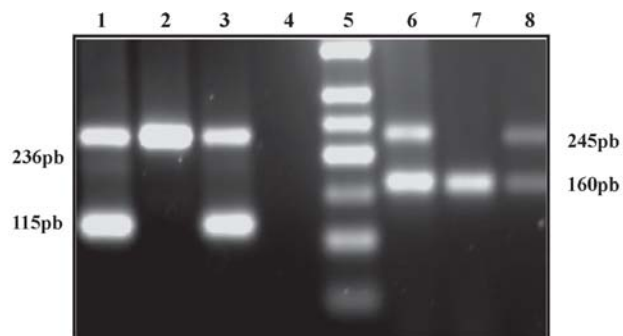


Figura 1. Genotipagem RHD em duas regiões genômicas: intron 4 (Linhas 1 a 3) e exon 10 (linhas 6-8). Linhas 1 e 3: Amostras RHD+, Linha 2: Amostra RHD-. Linha 5: Marcador molecular de 100pb. Linhas 6-8: Amostras RHD +, Linha 7: Amostra RHD-.

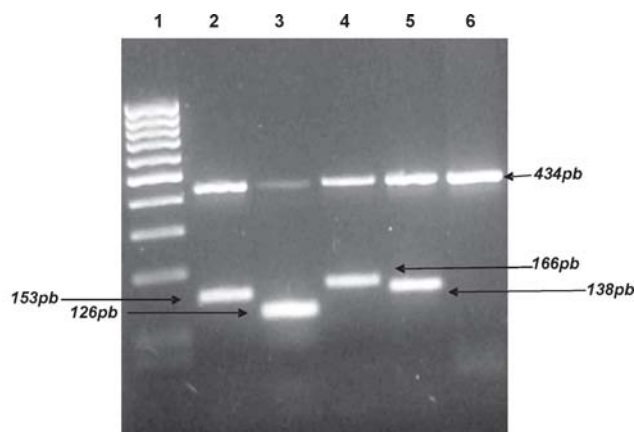


Figura 2. Genotipagem RHD fraco. Linha 1: Marcador molecular de 100 pb. Linha 2: D fraco tipo 1. Linha 3: D fraco tipo 2. Linha 4: D fraco tipo 3. Linha 5: D fraco tipo 4. Linha 6: Controle interno:HG

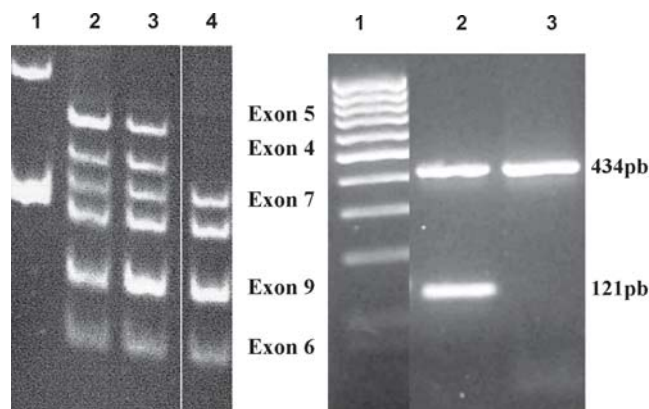


Figura 3. (A): Genotipagem RHD parcial (genes híbridos). Linha 1: Marcador molecular de 100 pb. Linhas 2 e 3: Amostras RHD+ normal. Linha 4: Amostra RHD parcial categoria VI. (B). Genotipagem RHD parcial DHMi. Linha 1: Marcador molecular de 100 pb. Linha 2: Amostra RHD parcial HMi. Linha 3: Controle interno (HG)

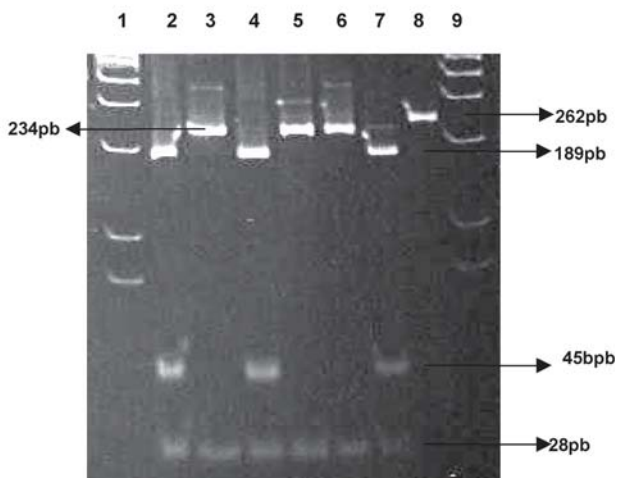


Figura 4. Genotipagem RHD parcial DAR. Linhas 1 e 9: marcador molecular de 100 pb. Linhas 2, 4 e 7: Amostras D parcial DAR. Amostras 3, 5, 6 e 8. Amostras RHD fraco tipo 4.

Tabela 2

Primers utilizados na técnica de PCR alelo-específico para RhD fraco e RhD parcial HMi

Primers	Seqüências	Exon/pb
RHDF1 sense	5'aca cgc tat ttc ttt gca gAC TTA TGG 3'	Exon6/153pb
RHDF1 antisense	5'GGT ACT TGG CTC CCC CGAC 3'	
RHDF2 sense	5'ctc caa atc ttt taa cat taa att atg cat tta aac agC 3'	Exon9/126pb
RHDF2 antisense	5'gtg aaa aat ctt acc TTTCCAGAAAACCTTGGTCATC 3'	
RHDF3 sense	5'aca gag acg gac aca ggA TGA GATG 3'	Exon1/166pb
RHDF3 antisense	5'CTT GAT AGG ATG CCA CGA GCCC 3'	
RHDF4 sense	5'AGA CTA CCA CAT GAA CAT GAT GCA CA 3'	Exon4/138pb
RHDF4 antisense	5' CAG ACA AAC TGG GTA TCG TTG CTC 3'	
RHDF5 sense	5' GGT GCT GGT GGA GGT GAC GGA 3'	Exon3/112pb
RHDF5 antisense	5' gag ctt ttg gcc ctt ttc tccc 3'	
HMi sense	5'AGG AGG CGT GGC TGT GGC TAT 3'	Exon6/108pb
HMi antisense	5'GGT ACT TGG CTC CCC CGAC 3'	
HGH sense	5'TGC CTT CCC AAC CAT TCC CTTA 3'	434pb
HGH antisense	5'CCA CTC ACG GAT TTC TGT TGT GTTTC 3'	

Tabela 3

Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação do antígeno D parcial categoria VI

Primers	Seqüências	Exon/pb
MR364	5 -TCG GTG CTG ATC TCA GTG GA-3	Exon3/111
MR474M	5 -ACT GAT GAC CAT CCT CAT GT-3	
MR496	5 -CAC ATG AAC ATG ATG CAC A-3	Exon4/126
MR621	5 -CAA ACT GGG TAT CGT TGC TG-3	
MR648	5 -G TGG ATG TTC TGG CCA AGT T-3	Exon5/157
Mrex5	5 -cac CTT GCT GAT CTT ACC-3	
MR898	5 -GTG GCT GGG CTG ATC TAC G-3	Exon5/57
Mrex6	5 -tgtctagtttcttac CGG CAA GA-3	
MR973	5 -AGC TCC ATC ATG GGC TAC AA-3	Exon7/96
MR1068	5 -ATT GCC GGC TCC GAC GGT ATC-3	
Mre9SD2	5 -aacagGT TTG CTC CTA AAT ATT-3	Exon9/71
MR1219	5 -A AAC TTG GTC ATC AAA ATA TTT AAC CT-3	

Tabela 4

Primers utilizados na técnica de PCR para a determinação do antígeno D parcial DAR

Primers	Seqüências	Tamanho
EX7F	5' TCA TAC TGT GGT CCG TAA AC-3'	262pb
EX7R	5'CAA TCA TGA CCA TTG CC 3'	

*Citometria de Fluxo*

A densidade antigênica dos antígenos RhD fraco e RhD parcial identificados foi determinada por citometria de fluxo através do citômetro FAScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA), utilizando-se 6 anticorpos anti-D monoclonais BS221,

BS227, BS231, MS26, HM16 and LOR17-8D3 (Third International Workshop on Monoclonal Antibodies against Red Cell and related Antigens, 1996, Nantes, France).<sup>20-22</sup> O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo IgG anti-humano produzido em cabra, fragmento Fab, conjugado com fluoresceína (FITC). A fluorescência obtida nas amostras RhD fraco foi comparada com a de hemácias controles com o fenótipo RhD-positivo R1r (DCcee). O background da fluorescência foi determinado com hemácias RhD-negativo.

**Resultados**

*Resultados da genotipagem RHD, RHD fraco e RHD parcial*

Das 56 amostras estudadas, 40 (71%) foram confirmadas molecularmente como D fraco, 11 (20%) como RhD parcial e 5 (9%) apresentaram associações de RhD parcial e RhD fraco. Os tipos de D fraco e D parcial identificados encontram-se na Tabela 5.

*Resultados da fenotipagem RhD com anti-D monoclonal IgG e anti-D monoclonal IgM (SMART Kit) nas amostras D fraco e D parcial caracterizadas molecularmente*

Todas as amostras que continham os tipos de D fracos mais freqüentes (DF1, DF3 e DF4) foram detectadas à temperatura ambiente (TA) com anti-D IgM. As amostras D fraco tipo 2 e as que apresentaram antígenos D parciais (DAR, D categoria VI e DHMi) foram detectadas com anti-D IgG reativo pelo teste da AGH (Tabela 6).

*Densidades antigênicas obtidas através da citometria de fluxo nas amostras D fraco e D parcial caracterizadas molecularmente*

Com a finalidade de determinarmos a densidade antigênica dos antígenos RhD nos diferentes tipos de antígeno RhD fraco encontrados, realizamos citometria de fluxo em pelo menos duas amostras de cada tipo de RhD fraco. Em nossa análise, observamos que as densidades antigênicas obtidas entre amostras de um mesmo tipo de D fraco são similares, enquanto entre amostras de diferentes tipos ocorre uma

grande variação. O antígeno RhD fraco tipo 2 apresentou menor densidade antigênica, seguido pelos tipos 1, 3 e 4. Entre os antígenos D parciais observamos que o antígeno D parcial DAR apresentou menor densidade antigênica, seguido pelos antígenos DVI e DHMi. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6. Todas as amostras D fraco com



Tabela 5  
Caracterização molecular dos tipos de D fraco e D parcial nas amostras estudadas

Nº Amostras	D fraco				D parcial			D fraco/	D parcial
	DF1	DF2	DF3	DF4	DHMi	DVI	DAR	DF1/HMi	DF4/DAR
56	15	5	7	13	2	4	5	2	3

Tabela 6  
Tipos de D fraco e D parcial, graus de aglutinação e densidades antigênicas

Nº Amostras	Tipos de D fraco e D parcial	Graus de aglutinação		Densidades antigênicas
		Anti-D IgM	Anti-D IgG/AGH	
15	DF1	3+	4+	1273
5	DF2	0	2+	462
7	DF3	3+	4+	1936
13	DF4	4+	4+	2184
5	DAR	0	(+)	988
2	DHMi	0	1+	1112
4	DVI	0	1+	1050
2	DF1/DHMi	(+)	3+	1577
3	DF4/DAR	0	2+	1432

baixa densidade antigênica e as amostras D parcial foram detectadas sorologicamente apenas pelo reagente anti-D monoclonal IgG através do teste da AGH com intensidades de aglutinação de 1+ ou fraca (+).

## Discussão

A grande importância em se caracterizar molecularmente o antígeno RhD fraco deve-se ao fato de não ser possível distinguir sorologicamente o antígeno RhD fraco de alguns antígenos RhD parciais e não se conseguir determinar o tipo de antígeno RhD fraco presente na amostra. De acordo com a literatura, a maioria dos indivíduos que apresentam o fenótipo RhD fraco não desenvolve anticorpos anti-D e pode ser transfundida com sangue RhD-positivo. No entanto, alguns pacientes com RhD fraco tipos 4, 2, 7 e 15 podem se aloimunizar se receber sangue RhD-positivo.<sup>11</sup>

Considerando que os três tipos do antígeno RhD fraco mais frequentes em nosso estudo são os tipos 1, 3 e 4, que não têm sido associados ao risco de aloimunização,<sup>10,12</sup> acreditamos que a transfusão com sangue RhD-positivo em pacientes com o fenótipo RhD fraco ainda pode ser considerada segura. No entanto, não está esclarecido se pacientes que apresentam antígenos RhD fraco com baixa densidade antigênica quando expostos a hemácias RhD normal podem se aloimunizar. Além disto, é importante descartar a presença do antígeno RhD parcial.

Não é possível diferenciar os tipos do antígeno RhD fraco por métodos sorológicos e como nem sempre os laboratórios de Imunohematologia podem dispor de recursos moleculares, associamos cada tipo de RhD fraco caracterizado com o grau de aglutinação obtido na fenotipagem. Embora a reação de aglutinação dependa diretamente do reagente anti-D utilizado, acreditamos que estes resultados podem ser de grande auxílio sorológico na identificação do antígeno RhD fraco e, conseqüentemente, no direcionamento da melhor conduta transfusional para pacientes RhD fraco.

Todos os tipos do antígeno RhD fraco encontrados em nosso estudo foram associados aos graus de aglutinação obtidos à temperatura ambiente com o anti-D IgM e, pelo teste da antiglobulina humana, com o anti-D IgG (Smart Kit, Asem-NPBI, São Paulo, Brasil).

Nossos resultados demonstraram que os tipos de RhD fraco 1, 2, 3 e 4 que foram detectados com o anti-D IgM à TA podem ser considerados como RhD positivo, pois não foram associados ao antígeno RhD parcial. Assim, pacientes que apresentam o fenótipo RhD fraco com esta reatividade podem ser transfundidos com sangue RhD positivo. Apesar deste trabalho ter sido o único que relacionou os tipos de RhD fraco com o grau de aglutinação, a literatura relata<sup>9</sup> que ainda não foi demonstrada aloimunização anti-D em pacientes portadores dos antígenos RhD fraco tipos 1, 2 e 3.

Os antígenos RhD fraco que apresentaram grau de aglutinação inferior a 1+ pelo teste da AGH com anti-D IgG estavam, na sua maioria, associados ao antígeno RhD parcial. Assim, nossa recomendação é que pacientes que apresentam o fenótipo RhD fraco com esta característica devem ser considerados RhD-negativo. Por outro lado, doadores fenotipados como RhD fraco, independentemente do grau de aglutinação, devem ser considerados RhD-positivo pois já foi demonstrado previamente que, mesmo com baixa densidade antigênica, o antígeno RhD fraco pode ser imunogênico.<sup>14,15</sup>

Nossos resultados demonstram que o anti-D IgM não detecta antígenos D parciais reativos como D fraco e antígenos D fraco de baixa densidade antigênica e, portanto pode ser utilizado na rotina de pacientes. O anti-D IgG detecta a maioria dos tipos de D fraco e associações D fraco parcial e, deve ser utilizado na rotina de doadores.

Acreditamos que estas recomendações possam contribuir na seleção adequada do reagente anti-D utilizado na rotina de fenotipagem do antígeno RhD para evitar aloimunização.

## Abstract

*Monoclonal antibodies (MoAb) anti-D IgG and IgM are being developed in order to replace polyclonal antibodies. However, there*

are few studies about the selection of these MoAb to routinely detect weak D and partial D antigens. A total of 56 weak D blood samples were analyzed with anti-D IgG and IgM MoAb in order to evaluate their reactivity. Molecular analyses were also performed to characterize the weak D types and the presence of partial D. Antigen densities were determined by flow cytometry. Weak D type 1, 3 and 4 samples with high antigen density were reactive with the MoAb anti-D IgM at room temperature while weak D type 2 and the partial D samples with low antigen density were detected with MoAb anti-D IgG using the indirect antiglobulin test. Our results show that anti-D IgM does not detect partial D samples reactive as weak D and thus can be used for routine testing of patients. As the anti-D IgG detected all the weak D and partial D with low antigen density, it should be used in the routine testing of donors. *Rev. bras. hematol. hemoter.* 2006; 28(4):269-274.

**Key words:** Anti-D reagents; weak D; partial D; RhD; RHD.

### Referências Bibliográficas

- Lomas-Francis C, Tippett P, Thompson KM, et al. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang* 1984; 57:261-64.
- Tippett P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen. *Vox Sang* 1996; 70:123-31.
- Huang CH, Chen Y, Reid ME, Ghosh S. Genetic recombination at the human RH locus: a family study of the red cell Evans phenotype reveals a transfer of exons 2-6 from the to the RHCE gene. *American Journal Genetic* 1996;59:825-33.
- Rouillac C, Colin Y, Hughes-Jones NC, Boelet MD, Ambrosio AM, Cartron JP, et al. Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid RhD-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood* 1995;85:2.937-44.
- Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the DVI category phenotype. *Blood* 1994;83:1129-35.
- Becker EAM, Faas BHW, Simser S, Overbeeker MAM, Van Rhenen DJ. The genetic basic of a new partial D antigen: DDBT. *British Journal of Haematology* 1996;93:720-27.
- Wagner FF, Gassner C, Smuller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel WA. Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematological feature *Blood* 1998;91:2.157-68.
- Hemker MB, Lighthart PC, Berger L, Van Rhenen DJ, Van Der Schoot CE, Maaskant-Van Wijk PA. DAR, a new RhD variant involving exon 4,5 and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhee variant frequently found in African Black. *Blood* 1999; 94:4.337-42.
- Wagner FF, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher NI, Lonicer CB, Muller TH, et al. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000;95:2.699-2.708.
- Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schönitzer D, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations. *Transfusion* 2001;41:45-52.
- Wagner FF, Flegel WA. The molecular basis of the Rh blood group phenotypes (review). *Immunohematology* 2004;20:23-36.
- Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D. Implications for blood bank practice. *Clin Lab* 2002; 48:53-9.
- Castilho L, Rios M, Rodrigues A, Pellegrino Jr J, Saad STO, Costa FF. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in sickle cell disease patients suggests increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfusion Medicine* 2005;15:49-55.
- Flegel WA, Khull SR, Wagner F.F. Primary anti-D immunization by weak D types 2 RBCs. *Transfusion* 2000;40:428-34.
- 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
- Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec PY, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion* 2004;44:1282-86
- Rodrigues A, Toledo R, Zanelli AP, Oliveira MCV, Ramos R, Fujita C, et al. Molecular characterization of weak D in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Transfusion* 2005; 45 (S): SP340.
- Reid ME, Rios M, Powell D, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000;40:48-53.
- Maaskant-Van Wijk PA, Faas BH, De Ruijter JA, Overbeek MA, Von Dem Borne AE, Van Rhenen DJ, et al. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 1998;38:1015-21.
- Annex 2: Rh antibodies. Third International Workshop and Symposium on monoclonal antibodies against red blood cells and related antigens *Transf Clin Biol* 1996;6:525.
- Flegel WA, Wagner FF. RHD epitope density profiles of RHD variant red cells analysed by flow cytometry. *Transf Clin Biol* 1996;3:429-31.
- Flegel WA, Curin-Serbec V, Delamaire M, et al. Section 1B: Rh flow cytometry. Coordinator's report. Rhesus index and antigen density: an analysis of the reproducibility of flow cytometry determination. *Transf Clin Biol* 2002; 9:33-42.

Avaliação: Editor e dois revisores externos  
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 12/04/2006  
Aceito: 20/06/2006