

Artigo / Article

Uso da genotipagem de grupos sanguíneos na elucidação de casos inconclusivos na fenotipagem eritrocitária de pacientes atendidos na Fundação Hemominas

Blood group genotyping to solve inconclusive phenotyping cases of patients from the Hemominas Foundation

Marina L. Martins¹Karina V. D. Cruz²Maria Clara F. Silva³Zilma M. Vieira⁴

A determinação do perfil de antígenos eritrocitários em doadores de sangue e pacientes que recebem transfusão sanguínea é importante na prevenção de aloimunização. Pacientes recentemente transfundidos ou com anemia hemolítica autoimune nem sempre conseguem ser fenotipados, e para estes casos a genotipagem vem se apresentando como uma ferramenta auxiliar na tipagem sanguínea. Neste estudo foram padronizadas técnicas de PCR alelo específicas ou de PCR-RFLP para a genotipagem dos alelos de grupos sanguíneos Rh (RHD, RHCE*C/c, RHCE*E/e), Kell (KEL*1/KEL*2), Kidd (JK*A/JK*B) e Duffy (FY*A/FY*B e FY*B(-33T>C)), importantes na medicina transfusional. Elas foram empregadas com sucesso para a tipagem de 36 pacientes que não puderam ser fenotipados ou que apresentaram resultados inconclusivos na fenotipagem eritrocitária. Vinte destes pacientes eram aloimunizados por diferentes antígenos, sendo o anticorpo anti-E o mais frequente (55%). O uso da genotipagem também mostrou-se útil na identificação de anticorpos irregulares. Por sua precisão, facilidade de execução e viabilidade de custo, as técnicas para tipagem de DNA para estes sistemas sanguíneos foram implantadas em nosso Serviço a partir de 2007 e vêm sendo usadas na prática transfusional, contribuindo para aumento da segurança dos pacientes cronicamente transfundidos ou com anemia hemolítica autoimune, como, por exemplo, pacientes com anemia falciforme. Além disso, ela vem permitindo o melhor uso de unidades de sangue com fenótipos menos frequentes na nossa população de doadores de sangue. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(4):252-259.

Palavras-chave: Genotipagem de grupos sanguíneos; aloimunização; transfusão.

Introdução

Os sistemas de grupos sanguíneos são caracterizados por antígenos na membrana eritrocitária, com características funcionais e polimórficas definidas. Atualmente, já foram descritos 30 sistemas de grupos sanguíneos, de acordo com

a ISBT (International Society for Blood Transfusion).¹ Na medicina transfusional, a compatibilidade para o sistema ABO e para o antígeno D do sistema Rh é fundamental na prevenção de reações hemolíticas, embora seja desejável que outros antígenos sejam compatibilizados, especialmente C, c, E, e do sistema Rh, assim como os principais antígenos dos

¹Bióloga, Gerência de Desenvolvimento Técnico Científico, Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

²Bióloga, Serviço de pesquisa, Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

³Bióloga, Laboratório de Imuno-hematologia, Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

⁴Bioquímica, Hemocentro de Belo Horizonte, Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais – Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

Correspondência: Marina Lobato Martins

Gerência de Desenvolvimento Técnico Científico, Fundação Hemominas – Belo Horizonte-MG.

Alameda Ezequiel Dias, 321 – Santa Efigênia

30130-110 – Belo Horizonte-MG – Brasil

Tel.: (55 31) 3248-4587

E-mail: pesquisa@hemominas.mg.gov.br

Doi:10.1590/S1516-84842009005000065

sistemas Kell, Kidd, Duffy e MNS.^{2,3,4} O conhecimento das bases genéticas dos polimorfismos dos grupos sanguíneos, adquirido nos últimos anos, permitiu o desenvolvimento de diversos protocolos para deduzir o fenótipo eritrocitário, usando técnicas de biologia molecular, com aplicação na prática transfusional.^{5,6} Essas metodologias são vantajosas, em muitos casos, em relação aos métodos sorológicos utilizados na fenotipagem eritrocitária, como: identificação do risco para a doença hemolítica do recém-nascido, determinação dos grupos sanguíneos quando os anticorpos (reagentes) não estão disponíveis, identificação de variantes raras, auxílio na identificação de anticorpos irregulares e, principalmente, na conclusão do grupo sanguíneo em pacientes que receberam transfusão recente ou apresentam resultado positivo no teste direto de antiglobulina humana (TAD). Na hemoterapia, a determinação correta do grupo sanguíneo é importante não apenas para prevenir problemas devido a transfusões incompatíveis, mas também para permitir um melhor uso das unidades de hemocomponentes com fenótipos menos frequentes, já que a frequência dos grupos sanguíneos depende da etnicidade da população.⁷

Nesse estudo, foi utilizada PCR-ASP (*polymerase chain reaction-allele-specific primers*) e PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) para genotipar os alelos que codificam os principais antígenos dos sistemas Rh (D, C, c, E, e), Kell (K, k), Kidd (Jk^a, Jk^b) e Duffy (Fy^a, Fy^b) em amostras de pacientes da Fundação Hemominas que apresentavam fenotipagem inconclusiva. Os

resultados exemplificam as principais vantagens do uso das técnicas de biologia molecular como ferramenta auxiliar na rotina imuno-hematológica e demonstram a viabilidade da sua utilização na rotina de um grande hemocentro público brasileiro.

Casuística e Método

População de estudo

As técnicas de genotipagem foram utilizadas para a tipagem sanguínea em 36 pacientes, 29 deles portadores de doença falciforme. Para 27 pacientes, o fenótipo não foi definido (a fenotipagem não foi realizada) ou não foi confiável devido a transfusão recente, teste direto de antiglobulina humana positivo ou anemia hemolítica autoimune (Tabela 3). Outros nove tinham resultados de fenotipagem divergentes ou inconclusivos (Tabela 4). Foram coletadas amostras de sangue total em EDTA e o DNA foi obtido usando-se o kit QIAamp DNA Blood (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

Testes sorológicos

A fenotipagem eritrocitária para os antígenos dos sistemas Rh (D, C, c, E, e), Kell (K, k), Duffy (Fy^a, Fy^b) e Kidd (Jk^a, Jk^b) foi realizada pela metodologia de aglutinação em coluna-gel-teste (Diamed AG, Morat, Switzerland) com anticorpos policlonais ou monoclonais. A pesquisa e identi-

Tabela 1. Iniciadores usados na PCR alelo específica para genotipar os alelos do sistema sanguíneo Rh

| Grupo sanguíneo Rh | Iniciadores ^{8,9,10} | Produto |
|--------------------|--|---------|
| exon 3 | R364: 5'- TCGGTGCTGATCTCAGTGGA -3' | 111 pb |
| | R474M: 5'- ACTGATGACCATCCTCATGT -3' | |
| exon 4 | R496: 5'- CACATGAACATGATGCACA -3' | 126 pb |
| | R621: 5'- CAAACTGGGTATCGTTGCTG -3' | |
| exon 5 | R648: 5'- GTGGATGTTCTGGCCAAGTT -3' | 157 pb |
| | Rex5AD2: 5'- cacCTTGCTGATCTTACC -3' | |
| exon 7 | R973: 5'- AGCTCCATCATGGGCTACAA -3' | 96 pb |
| | R1068: 5'- ATTGCCGGCTCCGACGGTATC -3' | |
| exon 9 | Rex9SD2: 5' - aacagGTTTGCTCCTAAATATT -3' | 71 pb |
| | R1219M: 5' - AAAGTTGGTTCATCAAAATATTTAACCT -3' | |
| RHD _ψ | RHDIN3F: 5' - GTGAACCTGGGAGGCAAATG - 3' | 250 pb |
| | RHD _ψ 4R: 5- AATAAAACCCAGTAAGTTCATGTGG - 3' | |
| RHCE | RHCE*C | 320 pb |
| | C/for: 5'- CAGGGCCACCACCATTTGAA -3' | |
| | C/rev: 5'- GAACATGCCACTTCACTCCAG -3' | |
| RHCE*c | C-2-201: 5'- GGCTTGGGCTTCTCACCTCA -3' | 149 pb |
| | C-2-307: 5'- AGTGTGATGACCACCTTCCCAGG -3' | |
| RHCE*E | E-5-676: 5'- GATGTTCTGGCCAAGTGCAACTCTC -3' | 158 pb |
| | E-5-787: 5'- CTGCTCACCATGCTGATCTTCCT -3' | |
| RHCE*e | D-5-676: 5'- ATGTTCTGGCCAAGTGCAACTCTG -3' | 158 pb |
| | E-5-787: 5'- CTGCTCACCATGCTGATCTTCCT -3' | |

Tabela 2. Iniciadores e enzimas de restrição usados na PCR-RFLP para genotipagem dos sistemas Kell, Kidd e Duffy (incluindo a região GATA)

| Alelos dos grupos sanguíneos | Iniciadores ¹¹ | Enzima de restrição | RFLP |
|------------------------------|---|---------------------|--|
| Kell | | | |
| <i>KEL*1</i> (698T) | <i>KELS</i> : 5'- AAGCTTGGAGGCTGGCGCAT -3' | Bsm I (5 U) | <i>KEL*1/KEL*1</i> : 100 + 56 pb |
| <i>KEL*2</i> (698C) | <i>KELR</i> : 5'- CCTCACCTGGATGACTGGTG -3' | | <i>KEL*1/KEL*2</i> : 156 + 100 + 56 pb |
| | | | <i>KEL*2/KEL*2</i> : 156 pb |
| Kidd | | | |
| <i>JK*A</i> (838G) | <i>JKIS</i> : 5'- TGAGATCTTGGCTTCCTAGG -3' | Mnl I (5U) | <i>JK*A/JK*A</i> : 78 + 62 + 48 + 22 pb |
| <i>JK*B</i> (838A) | <i>JK2</i> : 5'- ATTGCAATGCAGGCCAGAGA -3' | | <i>JK*A/JK*B</i> : 84 + 78 + 62 + 48 + 22 pb |
| | | | <i>JK*B/JK*B</i> : 84 + 78 + 48 pb |
| Duffy | | | |
| <i>FY*A</i> (125G) | <i>FYAB1</i> : 5'- TCCCCCTCAACTGAGAACTC -3' | Ban I (5 U) | <i>FY*A/FY*A</i> : 210 + 96 + 86 pb |
| <i>FY*B</i> (125A) | <i>FYAB2</i> : 5'- AAGGCTGAGCCATACCAGAC -3' | | <i>FY*A/FY*B</i> : 306 + 210 + 96 + 86 pb |
| | | | <i>FY*B/FY*B</i> : 306 + 86 pb |
| GATA | | | |
| <i>FY*B</i> (-33T) | <i>FYN1</i> : 5'- CAAGGCCAGTGACCCCCA TA -3' | Sty I (10 U) | <i>FY*B/FY*B</i> : 108 + 81 pb |
| <i>FY*B</i> (-33T>C) | <i>FYN2</i> : 5'- CATGGCACCGTTTGGTTCAG -3' | | <i>FY*B/FY*B</i> (-33T>C): 108 + 81 + 61 + 20 pb |
| | | | <i>FY*B</i> (-33T>C)/ <i>FY*B</i> (-33T>C): 108 + 61 + 20 pb |

O alelo *FY*B*(-33T>C) representa o alelo *FY*B* silencioso

ficação de anticorpos irregulares foi realizada pela metodologia de hemaglutinação em coluna-gel-teste, empregando-se hemácias fenotipadas (DiaMed AG, Cressier sur Morat, Switzerland). Quando necessário, foram também realizados testes diretos de antiglobulina humana poli ou monoespecíficos, testes de adsorção e eluição de anticorpos, e testes indiretos da antiglobulina humana com hemácias fenotipadas selecionadas.

Genotipagem *RHD*, *RHDΨ* e *RHCE*

PCR multiplex foi realizada para amplificar os exons 3, 4, 5, 7 e 9 do gene *RHD* (Figura 1). A amplificação do gene *RHD* foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA genômico em uma reação de 25 µl contendo 1X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN Multiplex PCR Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) e 2 µM de cada iniciador⁸ (Tabela 1). A PCR foi feita em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 95°C por 15 min, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 90 seg e 72°C por 90 seg, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo. Amostras que apresentavam amplificação de exons *RHD*, exceto dos exons 4 e 5, foram submetidas à PCR para identificação do pseudogene *RHD* (*RHDΨ*), uma vez que os iniciadores utilizados para amplificação destes exons não reconhecem estas sequências no *RHDΨ*. A PCR para *RHDΨ* foi realizada utilizando-se 100 ng de DNA genômico numa reação de 20 µl, contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,75 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 0,8 U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA), e 5 pmol dos iniciadores⁹ *RHDi3F* e *RHDΨ4R* (Tabela 1). As condições de amplificação foram de 30 ciclos a 94°C por 45 seg., 58°C por 60 seg., e 72°C por 60 seg., em

termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA).

A visualização do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose a 2% e coloração com brometo de etídeo. O gene *RHCE* foi analisado por meio de PCRs individuais utilizando-se iniciadores¹⁰ específicos para cada alelo (Tabela 1). Nesses casos, 100 ng de DNA genômico foram utilizados em reações de 20 µl contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 0,8 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), e 2 pmol de cada iniciador. As concentrações de MgCl₂ para as diferentes reações foram: 1,5 mM para *RHCE*c* e *RHCE*e*, e 1,6 mM para *RHCE*c* e *RHCE*e*. As mesmas condições de temperatura foram usadas para *RHCE*c*, *RHCE*e* e *RHCE*e*: 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 66°C por 30 seg., e 72°C por 30 seg. Para a PCR do alelo *RHCE*c*, as condições foram: 35 ciclos de 95°C por 1 min., 65°C por 1 min., e 72°C por 1 min.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo.

Genotipagem dos sistemas Kell, Kidd e Duffy

Os principais alelos dos sistemas Kell, Kidd e Duffy foram genotipados por PCR-RFLP (Tabela 2). Para todas as PCRs, 100 ng de DNA genômico foram usados em reações de 20 µl contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ (exceto para Kidd: 2 mM), 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 0,8 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), e 2 pmol de cada iniciador¹¹ específico. As reações foram realizadas em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA), usando-se 35 ciclos de 94°C por 45 seg., 62°C (63°C para Duffy) por 30 seg., e 72°C por 45 seg. Para a RFLP, cada produto de amplificação foi digerido com uma enzima de restrição específica

Tabela 3. Definição do grupo sanguíneo pela genotipagem de pacientes com fenótipos inconclusivos ou não definidos devido à transfusão recente e/ou TAD positivo

| paciente | caso | fenótipo | anticorpos irregulares | Genótipo* |
|----------|-----------------------------------|-------------------------------|--|--|
| 1 | | dccee, kk, Fy(a-b+), Jk(a+b-) | anti-D, anti-C | <i>RHD</i> -, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 2 | | Dccee, kk, Fy(a+b-), Jk(a+b+) | anti-C, anti-E suspeita de anti-Jk ^a | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 3 | | DCcEe, kk, Fy(a+b-), Jk(a+b+) | anticorpo de especificidade não determinada | <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 4 | | DccEe, kk, Fy(a-b-), Jk(a+b-) | anti-e, anti-C, anti-K; suspeita de anti-Jk ^b e anti-Fy ^b | <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B(-33T>C)/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 5 | | DCcee, kk, Fy(a+b-), Jk(a+b+) | nenhum | <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 6 | transfusão recente | não definido | anti-E | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 7 | | | anti-c | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 8 | | | anti-D, anti-C, anti-E, anti-K; suspeita de anti-Fy ^b e anti-Jk ^a | <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 9 | | | anti-D, anti-c, anti-K; suspeita de anti-Jk ^b | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 10 | | | | <i>RHD</i> -, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 11 | | | | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 12 | | | | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 13 | | | | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B(-33T>C)/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 14 | | | | <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *E/E, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B(-33T>C)/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 15 | | | | <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 16 | TAD positivo | DCcEe, kk, Fy(?), Jk(a+b+) | anti-c, anti-E suspeita de anti-Jk ^a | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 17 | | não definido | anti-E | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 18 | | | anti-E; suspeita de anti-Jk ^a | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B(-33T>C)/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 19 | | | nenhum | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *B/ <i>JK</i> *B |
| 20 | transfusão recente e TAD positivo | DCcee, kk, Fy(a+b+), Jk(a+b-) | anti-E, anti-K, anti-S | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 21 | | DCcee, kk, Fy(a+b+), Jk(a+b-) | nenhum | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 22 | | DCcEe, kk, Fy(a+b-), Jk(a+b-) | anti-Fy ^b , anti-K, anti-Le ^a , anti-Jk ^b | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *A, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 23 | | não definido | anti-C, anti-E, anti-M | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 24 | | | autoanticorpos da classe IgG; suspeita de anti-C | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B(-33T>C)/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 25 | | | anti-C, anti-E, anti-K, anti-Le ^x | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 26 | | | história transfusional não informada | nenhum |
| 27 | | nenhum | <i>RHD</i> +, <i>RHCE</i> *C/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A | |

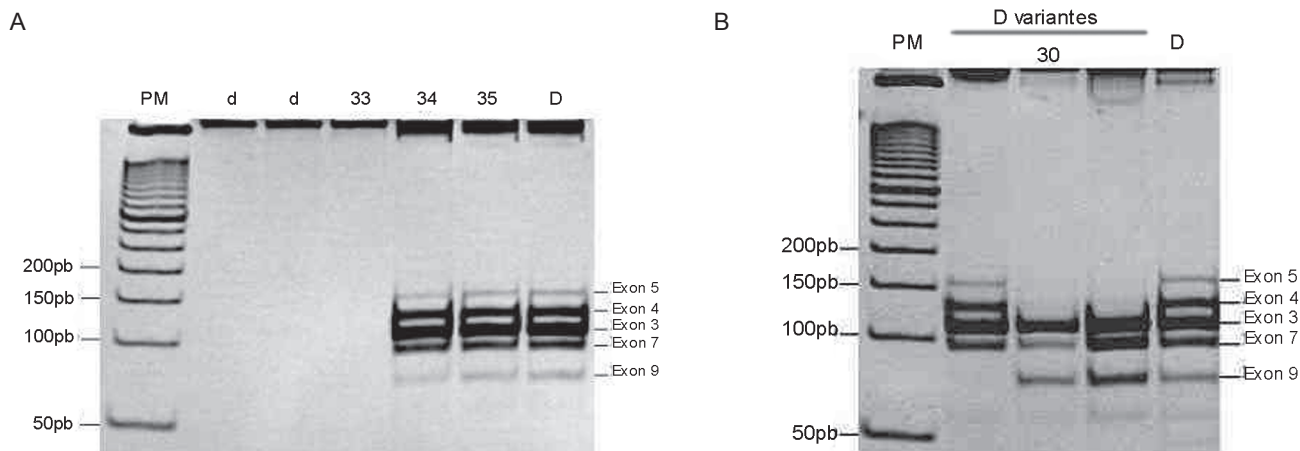


Figura 1. Genotipagem do gene *RHD* de pacientes com anemia falciforme. Eletroforese em gel de poliacrilamida de PCR multiplex para amplificação dos exons 3 (111 pb), 4 (126 pb), 5 (157 pb), 7 (96 pb) e 9 (71 pb) do gene *RHD* para a identificação de pacientes com fenótipo D negativo (d) ou D positivo (D). A) O paciente nº 33 foi classificado como D negativo (ausência de amplificação de todos os exons) e os pacientes nº 34 e 35 como D positivo (amplificação de todos os exons). B) Amostras D variantes (D fraco ou D parcial), com ausência de amplificação de alguns exons *RHD*. O paciente nº 30 apresentou amplificação para os exons 3, 7 e 9, e foi considerado D positivo (D fraco ou D parcial). PM: DNA ladder 50 pb.

Tabela 4. Definição do grupo sanguíneo pela genotipagem em pacientes com resultados de fenotipagem indeterminados ou divergentes

| paciente | caso | fenótipo | anticorpos irregulares | genótipo |
|----------|---|---------------------------------|--|--|
| 28 | prova cruzada incompatível | Dccee, kk, Fy(a-b+), Jk(a+b+) | anti-C, anti-E, anti-K, anti-Fy ^a | <i>RHD+</i> , <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *B |
| 29 | resultados indeterminados para C, E e Jk | DC?cE?e, kk, Fy(a+b+), Jk(a?b?) | nenhum | <i>RHD+</i> , <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *B/ <i>JK</i> *B |
| 30 | resultado indeterminado para RhD e TAD positivo | D?ccee, kk, Fy(a+b-), Jk(a+b+) | nenhum | <i>RHD+</i> (exons 3, 7, 9), <i>RHD</i> _ψ - |
| 31 | RhD positivo com presença de anti-D | Dccee, kk, Fy(a-b-), Jk(a+b-) | anti-D | <i>RHD+</i> (exons 3, 4, 9), <i>RHD</i> _ψ +, <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e |
| 32 | RhD fraco com anti-D | D?ccee, kk, Fy(a-b-), Jk(a+b-) | anti-D, anti-C, anti-E | <i>RHD+</i> (exons 4, 5, 9), <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *e/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *B (-33T>C)/ <i>FY</i> *B(-33T>C), <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |
| 33 | RhD indeterminado | | anti-D | <i>RHD</i> - |
| 34 | (dupla população de hemácias) | | nenhum | <i>RHD+</i> |
| 35 | RhD indeterminado (dupla população de hemácias), TAD positivo | indeterminado | autoanticorpos das classes IgG e IgM | <i>RHD+</i> |
| 36 | resultados divergentes para Duffy | DccEe, kk, Fy(a?b+), Jk(a+b-) | anti-e | <i>RHD+</i> , <i>RHCE</i> *c/c, <i>RHCE</i> *E/e, <i>KEL</i> *2/ <i>KEL</i> *2, <i>FY</i> *A/ <i>FY</i> *B, <i>JK</i> *A/ <i>JK</i> *A |

(Tabela 2) por cinco horas. Os produtos foram então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (Kell e Duffy, incluindo a região GATA) ou 12% (Kidd) e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo.

Resultados

Definição do fenótipo eritrocitário pela genotipagem em casos de fenotipagem inconclusiva ou não realizada

Em nove pacientes fenotipados para os principais antígenos dos sistemas Rh, Kell, Kidd e Duffy por métodos

sorológicos, os resultados não foram confiáveis devido a transfusão recente (menos de três meses), não informada no formulário de solicitação dos testes ou por apresentarem resultado positivo no teste direto de antiglobulina (TAD). Outros 18 pacientes nunca haviam sido fenotipados por causa de positividade no TAD e/ou devido à infusão de transfusão recente, ou por terem história transfusional não conhecida (Tabela 3).

Outros nove pacientes apresentaram resultados divergentes em dois testes de fenotipagem para Duffy (Fy^a e Fy^b), realizados em diferentes circunstâncias, ou resultados

indeterminados devido à presença de dupla população de hemácias na fenotipagem dos antígenos C e E do sistema Rh e Jk^a e Jk^b do sistema Kidd (Tabela 4). Em todos os casos, a genotipagem foi imprescindível na conclusão do grupo sanguíneo dos pacientes, possibilitando uma compatibilidade pré-transfusional mais eficiente e aumento da segurança transfusional.

Uso da genotipagem na definição de anticorpos irregulares

Conforme mostrado nas Tabelas 3 e 4, vinte pacientes apresentaram anticorpos irregulares contra os antígenos D (30%), C (45%), c (10%), E (55%), e (10%), K (30%), Fy^a (5%), Fy^b (5%), e Jk^a (5%). Dos pacientes aloimunizados, 55% (11/20) apresentaram anticorpos irregulares apenas contra antígenos do sistema Rh, enquanto 40% (8/20) desenvolveram também anticorpos contra antígenos de outros sistemas. Apenas um paciente (nº 22) desenvolveu múltiplos aloanticorpos, mas nenhum deles com especificidade para os antígenos do sistema Rh, o que está de acordo com o resultado de sua genotipagem (*RHD+*, *RHCE*C/c*, *RHCE*E/e*), que demonstrou a presença de todos os alelos analisados neste sistema. Alguns pacientes mostraram presença de autoanticorpos, ou de anticorpos cujas especificidades não puderam ser determinadas pelas técnicas sorológicas empregadas.

Dois dos pacientes estudados (nº 4 e nº 36) desenvolveram anticorpos de especificidade anti-e, embora tenham sido fenotipados como e+. Nestes pacientes, havia discrepâncias nas informações sobre as datas das últimas transfusões. A genotipagem confirmou os resultados da fenotipagem, de modo que os anticorpos identificados puderam ser classificados como autoanticorpos de especificidade anti-e. Isto porque os pacientes, além de serem e+, apresentaram TAD positivo e os anticorpos eluídos de suas hemácias tinham especificidade anti-e. Nesse caso, a genotipagem auxiliou na identificação do anticorpo e definiu a seleção do hemocomponente compatível como E+e-. Um desses pacientes (nº 36) mostrou também resultados divergentes na fenotipagem para Duffy. A genotipagem definiu o fenótipo como Fy(a-b+).

A definição da especificidade de anticorpos irregulares pela genotipagem dos alelos de grupos sanguíneos também foi possível em outro paciente (nº 25) que não foi fenotipado devido à transfusão recente e TAD positivo. Após a realização do painel de hemácias e testes complementares, a presença do anticorpo anti-C não pôde ser descartada. Este paciente foi genotipado como *RHD+*, *RHCE*C/c*, *RHCE*E/e*, eliminando assim a possibilidade da presença do alo-anticorpo anti-C e excluindo a necessidade de sua compatibilização pré-transfusional. Para outros três pacientes (nº 2, 16 e 18), foi eliminada a suspeita da presença de anti-Jk^a, já que os mesmos foram genotipados como *JK*A/JK*B*.

Finalmente, outros dois pacientes (nº 31 e 32) foram

fenotipados como RhD positivo, mas desenvolveram anticorpos irregulares com especificidade anti-D. Um deles (nº 31) mostrou amplificação dos exons 3, 4 e 9 do gene *RHD*, e ausência de amplificação dos exons 5 e 7, além de amplificação para o *RHDΨ*. Este resultado é compatível com o alelo DBT-1, um híbrido *RHD-CE(5-7)-D*, que leva a um fenótipo D parcial. Isto pode explicar o resultado da fenotipagem e a presença do anticorpo anti-D. O segundo paciente (nº 32) apresentou amplificação dos exons 4, 5 e 9, sem presença de *RHDΨ* e foi genotipado como homocigoto para os alelos *RHCE*c* e *RHCE*e*. Este paciente tinha anticorpos irregulares anti-C e anti-E, além do anti-D. De acordo com seu padrão de amplificação dos exons *RHD*, e a descrição de alelos *RHD* no banco de dados *Rhesus base* (<<http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/>>), esse paciente se enquadra como D categoria IV (D^{IV}), o que justifica a presença do aloanticorpo anti-D.

Melhor uso de unidades de hemocomponentes com fenótipos menos frequentes pela realização da genotipagem

Dos quatro pacientes analisados que mostraram resultados indeterminados para o antígeno RhD (Tabela 4), dois (nº 34 e 35) apresentaram a amplificação de todos os exons *RHD* (Figura 1) e foram definidos como RhD positivos, e podem agora, com segurança, ser transfundidos com sangue RhD positivo. O paciente nº 30 apresentou amplificação apenas dos exons *RHD* 3, 7 e 9, e foi negativo para o alelo *RHDΨ*, o que sugere se tratar de um indivíduo D fraco ou D parcial (Figura 1). Vários alelos já descritos concordam com esse padrão de amplificação, inclusive o D fraco tipo 4.2 (DAR), cujos portadores são passíveis de aloimunização anti-D.¹² Sendo assim, esse paciente, em casos de necessidade de transfusão de hemocomponentes contendo hemácias, deverá receber unidades RhD negativas, até a completa definição acerca de seu genótipo. Já o paciente nº 33 mostrou ausência de amplificação de todos os exons *RHD* avaliados e foi classificado como RhD negativo (Figura 1).

Outro exemplo da vantagem dos testes moleculares pode ser observada no sistema Duffy, em que a presença do alelo *FY*B(-33T>C)* permite o uso de sangue Fy(b+) em indivíduos fenotipados como Fy(b-), sem risco de aloimunização. Nossos resultados mostraram que 42% (13/31) dos casos analisados para o sistema Duffy foram genotipados como portadores do alelo *FY*B(-33T>C)*, em homocigose ou em heterocigose. Estes indivíduos podem, portanto, receber sangue Fy(b+), o que aumenta a disponibilidade de doadores compatíveis para eles, já que em nosso Serviço apenas 35% dos doadores fenotipados são Fy(b-), enquanto 65% são Fy(b+).

Discussão

O conhecimento atual sobre genética dos grupos sanguíneos tem permitido o uso das técnicas de biologia

molecular como uma importante ferramenta na prática hemoterápica. Além da acurácia na determinação do fenótipo eritrocitário, a genotipagem de grupos sanguíneos pode auxiliar na identificação de anticorpos irregulares, bem como na economia de unidades de sangue de fenótipos menos frequentes na população. Isto pôde ser exemplificado pelos resultados encontrados nos pacientes portadores de anemia falciforme, cujos fenótipos RhD eram indeterminados e puderam ser concluídos como RhD positivo pela genotipagem. Estes pacientes, que antes recebiam transfusões com hemocomponentes RhD negativo, passaram a receber sangue RhD positivo com segurança.

A eficiência dos testes moleculares na genotipagem de grupos sanguíneos deve considerar a complexidade dos sistemas, em relação aos polimorfismos de seus alelos. Neste estudo, para a genotipagem do gene *RHD* foi adotada a avaliação de cinco exons. O uso de várias regiões é vantajoso por aumentar a confiabilidade na conclusão do genótipo e consequentemente, dedução do fenótipo, evitando o risco de resultados falso-negativos. Outro aspecto importante é que o padrão de amplificação dos exons *RHD* pode ser um indicativo de fenótipos RhD variantes. A amplificação dos exons 4, 5 e 7, que correspondem respectivamente às alças extracelulares 3, 4 e 6 da proteína D, foi interpretada como identificação da presença do alelo *RHD*, já que eles contêm as diferenças entre os genes *RHD* e *RHCE*.^{13,14} A não amplificação dos exons *RHD* 4 e 5 nesse protocolo pode indicar a presença do *RHD Ψ* , que implica num fenótipo RhD negativo. Assim, em nossos resultados, se a amostra não amplificou os exons 4 e 5 do gene *RHD*, mas amplificou os outros, a mesma foi submetida à PCR para *RHD Ψ* . Em um estudo na população brasileira, que é considerada miscigenada, a frequência do *RHD Ψ* e do híbrido *RHD-CE-D^s* entre 206 indivíduos D negativos estudados foi de 11% e 2% respectivamente, enquanto o gene *RHD* estava completamente ausente nos 87% dos indivíduos restantes.¹⁵ No presente estudo, apenas um paciente (nº 31) apresentou o alelo *RHD Ψ* .

A aloimunização é comum em pacientes politransfundidos. Em nosso estudo, 55% dos pacientes estudados apresentaram anticorpos irregulares, dos quais o mais frequente foi o anti-E. Estes pacientes não haviam sido submetidos à fenotipagem estendida, ou seja, além do sistema ABO e antígeno D. Embora não obrigatória pela legislação vigente, a frequência de aloimunização pode ser diminuída com o uso da fenotipagem estendida para doadores e pacientes,¹⁶ que pode ser auxiliada pela genotipagem.

A genotipagem de grupos sanguíneos já vem sendo utilizada com êxito na medicina transfusional. Atualmente, muito se tem falado sobre novas metodologias de genotipagem, especialmente as que permitem sua utilização em larga escala. Nosso estudo demonstra que mesmo as técnicas moleculares convencionais (PCR alelo-específica e PCR-RFLP) podem ser usadas com sucesso em um banco de

sangue de grande porte, no esclarecimento de casos em que as técnicas sorológicas são ineficazes para conclusão dos resultados. O sucesso dessa metodologia reside principalmente na ausência da necessidade de equipamentos especializados e de alta tecnologia, o que frequentemente inviabiliza a aplicação de determinadas técnicas. Ao contrário, a metodologia empregada neste estudo necessita apenas de equipamentos e insumos básicos de biologia molecular. Além disso, os custos não são elevados, o que permite seu uso rotineiro como metodologia auxiliar na hemoterapia. No Brasil, esta abordagem vem sendo introduzida aos poucos em algumas instituições de reconhecida competência na Hemoterapia, mas sua disponibilização deve tornar-se mais generalizada, através da formação de centros de referência para atendimento das diversas unidades hemoterápicas. Este estudo mostra que é possível implantar o aprimoramento tecnológico para aplicação de novos métodos diagnósticos no atendimento aos pacientes da rede SUS. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro serviço público de saúde de Minas Gerais a usar técnicas de genotipagem de grupos sanguíneos para atendimento a seus pacientes.

Abstract

*The determination of the blood group antigen profile of blood donors and transfusion patients is important to avoid alloimmunization. The knowledge of blood group polymorphisms acquired over the last few years has permitted the development of molecular methods that are able to predict blood group phenotypes. For patients who have recently been transfused or those who present with autoimmune hemolytic anemia, genotyping is an important tool in blood typing. We used molecular biology (allele-specific PCR and PCR-RFLP) to genotype Rh (RHD, RHCE*C/c, RHCE*E/e), Kell (KEL*1/KEL*2), Kidd (JK*A/JK*B) and Duffy (FY*A/FY*B and FYB(-33T>C)) alleles and solved the inconclusive blood types of 36 patients. Twenty patients had developed irregular antibodies of different red blood cell antigens, most frequently anti-E (55%). The definition of irregular antibodies was feasible by genotyping. Due to their accuracy, simplicity and economic viability, these tests have been used in the clinical practice in our Institution since 2007, contributing to the management of chronically transfused patients. Additionally, these tests allow a better use of less common blood units related to the ethnicity of the blood donor population. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; 31(4):252-259.*

Key words: Blood group systems; DNA genotyping; transfusion.

Agradecimentos

À Fundação Hemominas, Fapemig, SES/MG e Decit/MS pelo financiamento. À Fapemig pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica.

Referências Bibliográficas

1. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, Henry S, Jørgensen J, Judd WJ, *et al*. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang*. 2004;87(4):304-16.
2. Castro O, Sandler SG, Houston-Yu P, Rana S. Predicting the effect of transfusing only phenotype-matched RBCs to patients with sickle cell disease: theoretical and practical implications. *Transfusion* 2002;42:684-690.
3. Osby M, Shulman IA. Phenotype matching of donor red blood cell units for nonalloimmunized sickle cell disease patients: a survey of 1182 North American laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; 129(2):190-3.
4. Schonewille H, van de Watering LM, Loomans DS, Brand A. Red blood cell alloantibodies after transfusion: factors influencing incidence and specificity. *Transfusion*. 2006;46(2):250-6.
5. Daniels G, van der Schoot CE, Olsson ML. Report of the First International Workshop on molecular blood group genotyping. *Vox Sang*. 2005;88(2):136-42.
6. Westhoff CM. Molecular testing for transfusion medicine. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):471-5.
7. Castilho L, Rios M, Bianco C, Pellegrino J Jr, Alberto FL, Saad ST, *et al*. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002; 42(2):232-8.
8. Maaskant-van Wijk PA, Faas BH, de Ruijter JA, Overbeeke 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(11-12):1015-21.
9. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, *et al*. The presence of an RHD pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in africans with the Rh D-negative blood group phenotype. *Blood*. 2000;95(1):12-8.
10. Gassner C, Schmarda A, Kilga-Nogler S, Jenny-Feldkircher B, Rainer E, Müller TH, *et al*. RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion*. 1997;37 (10):1020-6.
11. Reid ME, Rios M, Powell VI, Charles-Pierre D, Malavade V. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion*. 2000;40(1):48-53.
12. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):476-83.
13. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95(2):375-87.
14. Flegel WA. Molecular genetics of RH and its clinical application. *Transfus Clin Biol*. 2006;13(1-2):4-12.
15. Rodrigues A, Rios M, Pellegrino J Jr, Costa FF, Castilho L. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-D(s) gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(7):767-73.
16. Martins PRJ, Alves VM, Pereira GA, Moraes-Souza H. Frequência de anticorpos irregulares em politransfundidos no Hemocentro Regional de Uberaba-MG, de 1997 a 2005. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30:272-276.

Suporte Financeiro: Fundação Hemominas, Fapemig, SES/MG e Decit/MS

Avaliação: Editor e dois revisores externos

Recebido: 29/10/2008

Aceito após modificações: 02/12/2008