



Bio-Rad Laboratórios – Brasil

Como resolver as discrepâncias na Fenotipagem RhD?¹

Autoria: Ana Lúcia Girello (Byoline Corporation)

Co-autoria e Revisão Técnica:

Cristina Altobeli de Brito (Byoline Corporation)

¹Este material didático foi escrito e publicado em abril de 2025, seguindo as normas, recomendações e diretrizes nacionais e internacionais vigentes.

BIO-RAD



APRESENTAÇÃO

Alô, imuno-hematologistas!

Se você já se deparou com uma discrepância RhD e sentiu que estava diante de um enigma mais complicado do que *sudoku* em japonês, saiba que você não está sozinho, pois estamos juntos neste desafio!

Por que isso importa?

Resolver discrepâncias na fenotipagem RhD não é apenas uma questão técnica: é sobre garantir segurança transfusional, evitar erros críticos e proporcionar um trabalho eficiente. Afinal, cada amostra biológica é uma história única de um **"indivíduo"** e depende do nosso rigor analítico.

E é por isso que seguir um fluxo assertivo de técnicas não é só importante – é essencial. Com um direcionamento claro, você:

- Evita testes aleatórios: quantas vezes você sentiu que estava *"tentando de tudo"*, mas não conseguiu resolver o caso?
- Economiza reagentes, amostras e tempo, aumentando a eficiência do processo, o que, no fim das contas, significa: pacientes atendidos com segurança!

Como resolver este quebra-cabeças chamado Rh?

Esse fluxograma foi desenvolvido para ser sua bússola no meio do caos! Ele guia você, recriando um passo a passo no uso das técnicas sorológicas, para identificar o ponto exato da discrepância e elucidar o enigma. Desde verificar reagentes até validar resultados com precisão, cada etapa foi pensada para facilitar sua rotina e melhorar seus resultados.

Respire fundo, ajuste o jaleco e vamos juntos explorar o mundo da fenotipagem RhD com assertividade e confiança. Com um guia claro, o caos vira solução, e você se torna o especialista da bancada!

Lembre-se: não se trata apenas de "resolver o problema", mas sim de fazer isso de forma metódica, segura e com excelência. Apertem os cintos e boa viagem!

Fenotipagem RhD**EXAMES COM DISCREPÂNCIAS? DÚVIDAS?****NÃO****LIBERAR O LAUDO****SIM****QUAL TIPO ?**

Resultado divergente do anterior

Checar identificação da amostra, dados clínicos e histórico

Erros de registro/transcrição

Avaliar Reagentes (mudanças de clones, perdas de reatividade) e possível erro técnico

- Identificar e prosseguir com a resolução do item em desacordo
- Retestar

Controle Rh positivo**Checar dados clínicos e realizar o TAD**

C3d

Qual a classe?

IgG

Utilizar cartão AGH monoespecífico IgG

IgM

Lavar hemácias com salina aquecida

Tratar com DTT 0,01M

Tratar com Difosfato de Cloroquina.
ou
Se $\leq 2+$ utilizar bloqueio de IgG

Grupo Sanguíneo RhD definido

LIBERAR O LAUDO

Resultado muito fraco (pó) em AGH

Fixação e Eluição com anti-D

Dupla População

Quimera /TMO/ Politransusão?

Avaliar possibilidade de fenotipagem de neócitos

Genotipagem

Discrepância entre os anti-D do cartão

Avaliar Variantes de D *
(Vide tabelas de clones Pg.4 e 5)

Painel de anti-D monoclonais

Enviar laboratório de referência

* Avaliar Variantes de D - De forma geral se doador este individuo deverá ser considerado RhD positivo.



Conhecendo os reagentes anti-D

	Cartão	ID Nº	Clones Anti-D	Versão da instrução de uso
	ID-DiaClon ABO/D + Prova Reversa (A,B,DVI-,ctl /A1,B)*	50092	LHM59/20 (LDM3)+175-2	BN001228 V.02
	ID-DiaClon BO/D + Prova Reversa para Doadores (A,B,DVI+,ctl /A1,B)**	51090	ESD1-M + 175-2	B001365 v.03
	ID-DiaClon ABO/Rh para Recém-nascidos (A,B,AB,DVI+,ctl,DAT)**	50961	ESD1-M , 175-2	B001028 v.04
	ID-DiaClon ABD-Confirmação (A,B,D-VI+)**	51051	ESD1-M , 175-2	BN001134 v.01
*Clones do cartão DVI-: Indivíduos D categoria VI (RhD positivo variante) apresentarão resultado negativo com este reagente ID. 50092				
** Clones do cartão DVI+: Indivíduos D categoria VI (RhD positivo variante) apresentarão resultado positivo com estes reagentes ID. 51090, 50961, 51051				

	Cartão com 02 anti-D	ID Nº	Clones Anti-D	Versão da instrução de uso
	ID-DiaClon ABO/D (A,B,AB,DVI+,DVI-,ctl)	50481	ESD1-M+175-2; LHM59/20 (LDM3) + 175-2	B001324 v.01

	Antissoro para pesquisa d fraco em gel	ID Nº	Clones Anti-D	Versão da instrução de uso
	ID-DiaClon Anti-D para confirmação de D fraco através do Teste Indireto da Antiglobulina Humana	09410	ESD1	BN07531 v.01

IMPORTANTE – O teste de antiglobulina direta (TAD) positivo interfere neste teste, podendo levar a resultados falso positivos; para validação dos resultados o TAD da amostra deverá estar negativo.

	TUBO	ID Nº	Clones Anti-D	Versão da instrução de uso
	DiaClon II / Anti-D Blend (IgG+IgM)	11285	BS221/H41 ; 11B7 (IgG/IgG) BS232 (IgM)	BN07531 v.01

SUMÁRIO

1	Qual a importância do antígeno D (<i>RH001- ISBT</i> ²)?.....	7
	Proteína RhD.	7
	Proteína RhCE.	7
2	FENÓTIPOS RHD: QUEM SÃO OS INDIVÍDUOS RHD POSITIVOS E NEGATIVOS?.....	8
	RhD Positivo	8
	RhD Negativo	8
3	FENÓTIPOS VARIANTES: O QUE SÃO OS ANTÍGENOS, E DEL?.....	9
	Antígenos D Fraco.	9
	Antígenos D Parcial.	9
4	AS VARIANTES ALÉLICAS MAIS COMUMENTE OBSERVADAS NO BRASIL.....	10
5	DESAFIOS NA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE ANTÍGENOS D.....	11
	Limitações das Técnicas Sorológicas utilizadas na rotina laboratorial	12
	Tabela de consulta: desafios na rotina laboratorial	13
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS E RECOMENDADAS.....	14

O antígeno D (principal antígeno do sistema Rh) é altamente imunogênico e relevante para a prática transfusional, pois o desenvolvimento de aloanticorpos anti-D está associado as reações transfusionais hemolíticas tardias e doença hemolítica potencialmente grave do feto/recém-nascido.

Bases moleculares do Sistema Rh:

O sistema Rh contém 56 antígenos³, sendo o mais complexo e imunogênico após o sistema ABO.

Duas proteínas são codificadas por dois genes (*RHD* e *RHCE*), ambas com 417 aminoácidos, e que atravessam 12 vezes a membrana eritrocitária. (Modelo proposto por Wagner & Flegel).

Proteína RhD

Onde estão localizados os antígenos D e G.

Proteína RhCE

Que abriga os demais antígenos Rh.

Genes *RHD* e *RHCE* são altamente homólogos, estão localizados no cromossomo 1(1p36-34) em direções opostas. Essa proximidade facilita mutações (rearranjos gênicos, deleções, mutações de ponto) que originam variantes dos antígenos.

O gene *RHD* possui alto polimorfismo, com mais de 200 alelos gênicos já descritos, resultando em diversos fenótipos variantes RhD.

² INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION (ISBT): Working Party of Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology - <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt.html>. Último acesso em 15/04/2025.
³ Consulte atualização permanente em: (Último acesso em 15/04/2025) - * SITE ISBT: <https://www.isbtweb.org/resource/004rhd.html> - RHESUS DATABASE: <https://www.rhesusbase.info/>

1 - RhD Positivo

Indivíduos possuem os genes *RHD* e *RHCE*, expressando ambas as proteínas nas hemácias.

2 - RhD Negativo

Indivíduos não expressam a proteína D nas hemácias, sendo a deleção do gene *RHD* a causa mais comum em diversas populações. Outros mecanismos conhecidos pela não expressão da proteína D são a presença do pseudogene *RHD ψ* (inserção de 37pb no éxon 4, que introduz um códon de parada prematuro, tornando o gene não funcional, comum na população africana e seus descendentes) e os genes híbridos *RHD-CE-D* formados pela recombinação entre os genes *RHD* e *RHCE*.

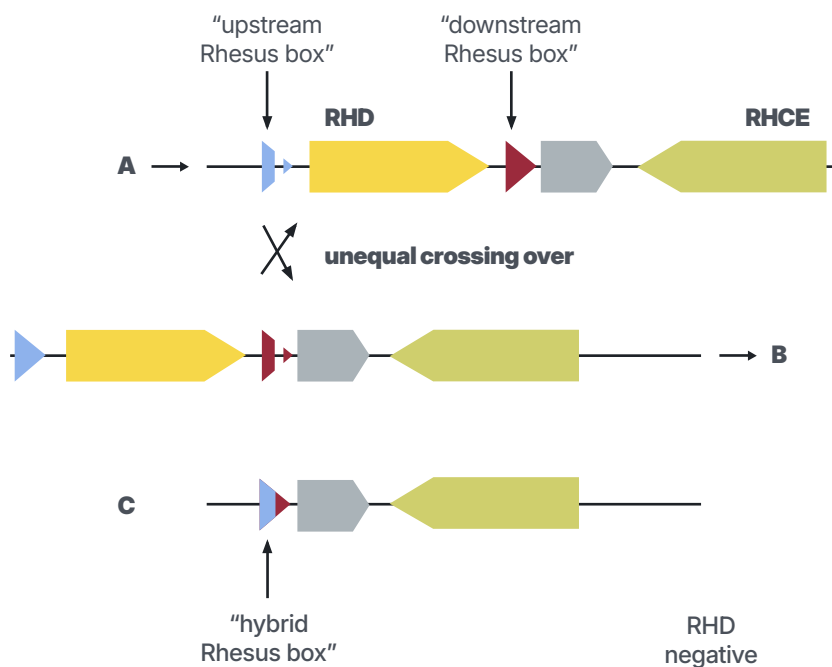


Fig1. Deleção do gene RhD ocorre nos Rhesus boxes em uma região idêntica de 1463 pb, provavelmente causada por um alinhamento cromossomal defeituoso durante a meiose, resultando em um crossing-over desigual entre os Rhesus boxes. O resultado é caracterizado pela presença de Rhesus Box híbrido. Poucos casos podem resultar de rearranjos gênicos ou pontos de mutação levando a códon de parada.

Fonte: The genetics of the Rhesus Blood Group system - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Deletion-of-the-RHD-gene-Deletion-of-the-RHD-gene-resulted-from-recombination-between-an_fig2_23995175 [accessed 20 Apr 2025]

São nos indivíduos RhD Positivos que podemos encontrar “D Variantes”, variações do antígeno RhD derivadas das diversas mutações que podem ocorrer no gene *RHD*.

Nestes casos, as alterações na quantidade de antígeno, presença/ausência de epítomos, ou ambos, tornam praticamente impossível diferenciar “D fracos” de “D parciais” apenas utilizando as técnicas sorológicas de rotina. Já os antígenos classificados como “DEL”, geralmente são tipados em testes sorológicos de rotina como D negativo, somente sendo evidenciados por técnicas de reforço, como adsorção seguida de **eluição**⁵.

Antígenos D Fraco:

Molecularmente, apresentam alterações genéticas na porção transmembranar/intracelular da proteína RhD. Possuem um menor número de proteína RhD (100 a 10.000 sítios antigênicos); geralmente não produzem anti-D quando expostos à antígenos RhD normais.

Sorologicamente, com o advento dos antissoros monoclonais (anti-D), já podem apresentar aglutinação fraca desde à temperatura ambiente ou logo após a incubação à 37°C. Em cartelas de gel teste (ID-System) apresentam reatividades mais fracas (3+, 2+, 1+, w / pó) com os anti-D monoclonais.

Antígenos D parcial:

Molecularmente, apresentam ausência de epítomos originais do antígeno D, substituídos por outras sequências de aminoácidos ocasionados por mutações de ponto missenses ou rearranjos gênicos entre *RHD* e *RHCE*. A proteína RhD alterada difere do antígeno RhD normal, podendo produzir aloanticorpos anti-D ou mesmo não reagir com os reagentes anti-D monoclonais durante a fenotipagem.

Sorologicamente, sua classificação é baseada na reatividade com painel de soros monoclonais anti-D, sendo, portanto, de difícil distinção na rotina sorológica comum, podendo ser classificados apenas como D fracos.

Antígeno DEL: Expressão muito baixa do antígeno D, **não** detectável por testes sorológicos padrão, mais frequentemente encontrado na população oriental. Hemácias DEL podem ser fenotipadas erroneamente como RhD- (negativas) em testes de rotina, porém serão evidenciados em testes de **adsorção-eluição** com anti-D.

⁵Dal deriva o nome D “el”: “elution”. <https://www.rhesusbase.info/>

RHD:Alelos gênicos mais frequentemente encontrados no Brasil

Frequência	Alelo
Alelo mais frequente na população	D Fraco tipo 4.2.2
Alelo mais frequente associado a fenótipo variante	D Fraco tipo 1 D Fraco tipo 2 D Fraco tipo 38 D Fraco tipo 4.0
Alelo menos frequente associado a fenótipo variante	DAU-6 DVII D Fraco tipo 4.2.1
Observações repetidas	DAU-0 DMH
Única observação	DAU-1 DAU-5 DIII tipo 6 DIVa-2 DN8 DOL-2 DV tipo 2 RHD(26dupL) RHD(83insG) RHD(L110P-CE(3-9)-D RHD(S230N) RHD(V281L) D Fraco tipo 18 D Fraco tipo 3 D Fraco tipo 4.1

* Fonte: Site RhesusBase. Disponível em: <https://www.rhesusbase.info/> . Último acesso em 20 abr 2025. RhesusBase foi estabelecido por Franz F. Wagner e W.A. Flegel e é uma compilação de informações publicadas sobre a variabilidade molecular observada no locus RH ("locus Rhesus"). Atualmente, o RhesusBase cobre apenas alelos RHD alterados.

Variantes do antígeno D, como D fraco, D parcial e DEL, podem resultar em resultados fracos nos testes sorológicos, duvidosos ou até mesmo negativos, podendo ocasionar discrepâncias com resultados prévios ou mesmo na retestagem com reagentes diferentes.

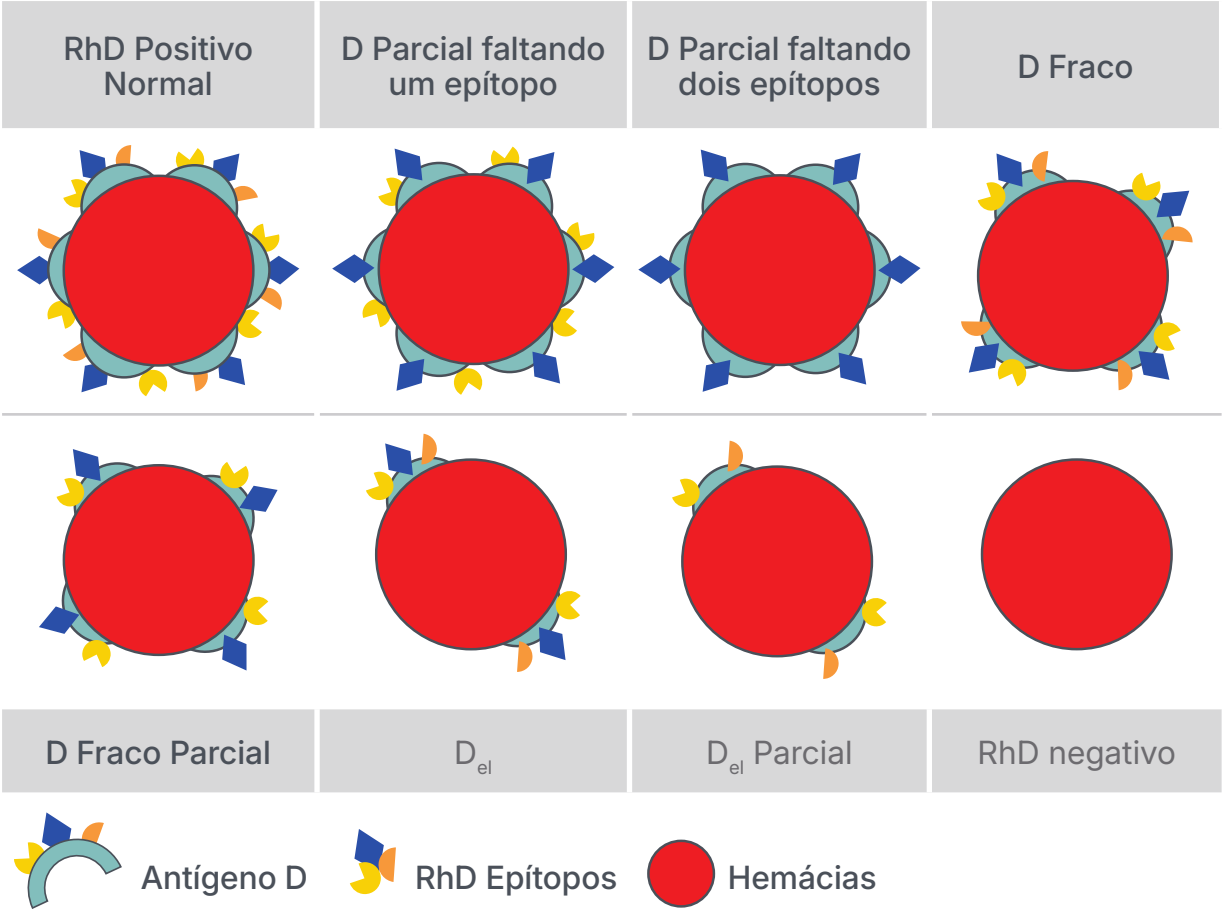


Figura 1. Representação esquemática dos fenótipos RhD e as variantes de RhD+.
Fonte: Mishra G. Serological & molecular techniques for RhD typing and their role in the identification of D variants. Indian J Med Res. 2020 Sep-Dec;51(3):231-8. Disponível em: <https://niih.org.in/bulletin/1641366664.pdf> . Último acesso em 20 abr 2025.



Limitações das Técnicas Sorológicas utilizadas na rotina laboratorial:

- Incapacidade de identificar com precisão fenótipos D fracos e parciais.
- Situações clínicas em que a sorologia é inaplicável.
- Problemas de sensibilidade e especificidade.
- Risco de identificação incorreta em fenótipos DEL.
- Limitações na previsão da zigosidade *RHD*.
- Resultados inconsistentes devido à variabilidade na qualidade dos reagentes e protocolos.

Métodos e reagentes com diferentes sensibilidades e especificidades, estratégias de tipagem que variam entre serviços e países bem como a existência de poucos centros que realizam os testes moleculares rotineiramente são grandes desafios na fenotipagem RhD.



TABELA DE CONSULTA: DESAFIOS NA ROTINA LABORATORIAL

Escolha de Reagentes anti-D	Crucial que identifique a maioria das variantes de RhD, incluindo D parcial (alguns antissoros, a depender do clone, podem não reagir adequadamente com alguns fenótipos D parciais comuns à sua população, conduzindo a resultados falso-negativos).
Implementação de Testes, Técnicas Complementares e Algoritmos para Resolução das Discrepâncias.	● Testes sorológicos rigorosos: antissoros de alta qualidade e validados com controles periódicos. ● Protocolos padronizados para testes do fenótipo D. ● Implementação de testes para confirmação em casos de resultados sorológicos fracos ou discrepantes. ● Metodologias em gel teste (ID-System) com os clones adequados da classe IgG fornecem um método confiável para detecção de antígenos D fracos, com redução de erros operacionais inerentes às técnicas que exigem múltiplas lavagens e leitura subjetiva. ● Integração de metodologias: técnicas sorológicas e moleculares para uma análise abrangente.
Principais Desafios	● Reconhecer e distinguir variantes como D fraco, D parcial e DEL.
Condutas Clínicas e implicações dos erros na fenotipagem RhD	● D fraco: salvo <u>algumas exceções</u>, como por ex: D fraco tipos 4.2, 11, 15 e 21 que potencialmente podem desenvolver anti-D, os demais podem receber sangue RhD+ com segurança. ● D Parcial apresentam risco de desenvolver aloanticorpos anti-D, complicando futuras transfusões e gestações. ● Erros na Fenotipagem RhD: Risco aumentado de aloimunização (desenvolvimento de aloanticorpos anti-D); Não administração de imunoprofilaxia RhD em indivíduos D parciais se classificados como RhD-.

1. **Arnoni CP, Latini FR, Muniz JG, Gazito D, Person RM, Vendrame TAP, et al.** How do we identify RHD variants using a practical molecular approach?. *Transfusion*. 2014;54:962-9.
2. **Avent ND, Reid ME.** The Rh blood group system: a review. *Blood*. 2000;95:375-87.
3. **BRASIL. Gabinete do Ministro. PORTARIA MS/GM Nº 158, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2016.** Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 5 fev. 2016. Seção 1, p.37-57.* Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/index.php/legislacoes/gabinete-do-ministro/6350-158>. Acesso em 15 abril 2025.
4. **Bub CB, Aravechia MG, Costa TH, et al.** Alelos RHD entre gestantes com fenótipos D fracos discrepantes sorológicos de uma população multiétnica e risco de aloimunização. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22221.
5. **Campos FC, Mota MA, Aravechia MG, Torres KB, Bub CB, Kutner JM, et al.** Variant RHD Types in Brazilians With Discrepancies in RhD Typing. *J Clin Lab Anal*. 2016;30:845-8.
6. **Cotorruelo C.** Elucidation of the molecular bases of the Rh system and its contribution to transfusion and obstetric medicine—historical and current perspective: a review. *Ann Blood [Internet]*. 2023;8:0. Available from: [Accessed 2025 Apr 10].
7. **Cruz BR, Chiba AK, Moritz E, Bordin JO.** RHD alleles in Brazilian blood donors with weak D or D-negative phenotypes. *Transfus Med*. 2012;22:84-9.
8. **Daniels G.** Variants of RhD—current testing and clinical consequences. *Br J Haematol*. 2013;161:461-70.
9. **Dezan MR, Oliveira VB, Gomes ÇN, et al.** Alta frequência de genótipos variantes de RHD entre doadores e pacientes de origem mista com fenótipo sorológico D fraco. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22596.



- 10. Flegel, W. A., Denomme, G. A., Queenan, J. T., Johnson, S. T., Keller, M. A., Westhoff, C. M., ... Sandler, S. G. (2020).** It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. *Transfusion*, 60(4), 855–859. doi:10.1111/trf.15741
- 11. GIRELLO, A. L. KUHN, T. I. B. Fundamentos da Imuno-hematologia Laboratorial.** Ed. Senac. 43a ed., 20161.
- 12. Mishra G. Serological & molecular techniques for RhD typing and their role in the identification of D variants.** *Indian J Med Res.* 2020 Sep-Dec;51(3):231-8.
- 13. Person RD de M, Arnoni CP, Muniz JG, Vendrame TA de P, Latini FRM, Cortez AJP, et al..** Serologic strategy in detecting RHD altered alleles in Brazilian blood donors. *Hematol, Transfus Cell Ther [Internet]*. 2020Oct;42(4):365–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.08.004>
- 14. Schmidt LC, Castilho L, Vieira OV, Sippert E, Gaspardi AC, Martins ML, da Silva Malta MC.** Impact of a confirmatory RhD test on the correct serologic typing of blood donors. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2015 Sep-Oct;37(5):302-5. doi: 10.1016/j.bjhh.2015.06.001. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26408363; PMCID: PMC4685092.
- 15. VIZZONI, A.G. Fundamentos e Técnicas em Banco de Sangue.** 1a ed. Ed. Érica, 2015.
- 16. Wagner FF, Flegel WA. The Rhesus Site. Transfus Med Hemother.** 2014 Oct;41(5):357-63. doi: 10.1159/000366176. Epub 2014 Sep 15. PMID: 25538538; PMCID: PMC4264492.
- 17. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA.** Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood.* 1999 Jan 1;93(1):385-93



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

**Grupo de
Diagnóstico Clínico**

Web site bio-rad.com **USA** 1 800 424 6723 **Australia** 61 2 9914 2800 **Austria** 43 1 877 89 01 177 **Belgium** 32 (0)3 710 53 00 **Brazil** 55 11 3065 7550
Canada 1 905 364 3435 **China** 86 21 6169 8500 **Czech Republic** 420 241 430 532 **Denmark** 45 44 52 10 00 **Finland** 358 09 804 22 00
France 33 01 47 95 69 65 **Germany** 49 89 31 884 0 **Hong Kong** 852 2789 3300 **Hungary** 36 1 459 6100 **India** 91 124 4029300
Israel 972 03 963 6050 **Italy** 39 02 216091 **Japan** 81 3 6361 7000 **Korea** 82 2 3473 4460 **Mexico** 52 555 488 7670 **The Netherlands** 31 (0)318 540 666
New Zealand 64 9 415 2280 **Norway** 47 23 38 41 30 **Poland** 48 22 331 99 99 **Portugal** 351 21 472 7700 **Russia** 7 495 721 14 04
Singapore 65 6415 3188 **South Africa** 27 (0) 861 246 723 **Spain** 34 91 590 5200 **Sweden** 46 08 555 12700 **Switzerland** 41 026 674 55 05
Taiwan 886 2 2578 7189 **Thailand** 66 662 651 8311 **United Arab Emirates** 971 4 8187300 **United Kingdom** 44 020 8328 2000