



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIZA APARECIDA MOTA

IDENTIFICAÇÃO DO GENE *RHD* EM DOADORES
VOLUNTÁRIOS DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RHD
NEGATIVO UTILIZANDO *POOLS* DE DNA

RHD ALLELIC IDENTIFICATION AMONG D-
BRAZILIAN BLOOD DONORS AS A ROUTINE TEST
USING POOLS OF DNA

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIZA APARECIDA MOTA

**IDENTIFICAÇÃO DO GENE *RHD* EM DOADORES
VOLUNTÁRIOS DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RHD NEGATIVO
UTILIZANDO POOLS DE DNA**

**RHD ALLELIC IDENTIFICATION AMONG D-
BRAZILIAN BLOOD DONORS AS A ROUTINE TEST
USING POOLS OF DNA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

Doctorate thesis presented at the Faculty of Medical Sciences of University of Campinas – UNICAMP to obtain the title of PhD in Intern Medicine

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Maria de Castilho

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MARIZA APARECIDA MOTA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LILIAN MARIA DE CASTILHO.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

M856i Mota, Mariza Aparecida, 1956 -
Identificação do Gene RHD em doadores voluntários
de sangue fenotipados como RHD Negativo utilizando
pools de DNA / Mariza Aparecida Mota. -- Campinas, SP
: [s.n.], 2012.

Orientador: Lilian Maria de Castilho.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antígenos. 2. Imunohematologia. 3. Genotipagem.
4. Polimorfismo de um único nucleotídeo. I. Castilho, Lilian
Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: RHD allelic identification among D – brazilian blood donors as a routine test using pools of DNA.

Palavras-chave em inglês:

Antigens

Immunohematology

Genotyping

Single nucleotide polymorphism

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Lílian Maria de Castilho [Orientador]

Nelson Hamerschlag

Dante Mario Langhi Junior

Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

Simone Cristina Olenscki Gilli

Data da defesa: 26-06-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Banca examinadora da tese de Doutorado

Mariza Aparecida Mota

Orientador: Profa. Dra. Lílian Maria de Castilho

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Rios Barjas

2. Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Olenscki Gilli

3. Prof. Dr. Nelson Hamershlack

4. Prof. Dr. Dante Mario Langhi Júnior

5. Prof^a. Dr^a. Lílian Maria de Castilho

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/06/2012

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa em Hemoterapia do Hemocentro da Unicamp e no Laboratório de Imuno-Hematologia do Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo. Esta pesquisa recebeu o apoio financeiro da FAPESP (Processo nº2009/05924-0) e doCNPq, Brasil. O Centro de Hematologia e Hemoterapia - Hemocentro UNICAMP faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Brasil (INCT do Sangue – CNPq / MCT / FAPESP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pela minha vida.

Aos meus pais, **Maria Luiza de Almeida Motta** e **Ademar Motta** pelo amor, dedicação e exemplo de coragem e trabalho.

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Lilian Maria de Castilho**, pelos ensinamentos aos longo destes anos que contribuíram e ainda contribuem de maneira ímpar para o meu crescimento profissional, por acreditar em mim e pela amizade irrestrita.

À **Marcia Regina Dezan** pela imensa contribuição na execução deste trabalho, persistência na busca por melhores resultados e, sobretudo pela amizade.

Ao **Dr. José Mauro Kutner**, pela amizade, pela ética e capacidade de análise abrangente e criativa em todas as situações.

Ao meu irmão, **José Mauro de Almeida Motta** pela força e incentivo nos momentos certos.

À **Maria do Carmo Valgueiro**, pela imensa colaboração na execução deste trabalho, pela amizade e estímulo.

Ao **Dr Jordão Pellegrino Junior** pela amizade, correções e sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, **Dr^a Andreza Alice Feitosa Ribeiro, Dr^a Andrea Tieme Kondo, Dr^a Araci Massami Sakashita Dr^a Fabiana Mendes Conti e Dr Ricardo Antonio d'Almeida Pereira** que sempre me apoiaram e incentivaram.

A **Dr^a Flávia Latini** pelo grande auxílio no sequenciamento de algumas amostras.

À **Equipe do Laboratório de Imuno-Hematologia do Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein**, em que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao **Ivan Rocha Manso** pelo amor que ultrapassou o relógio do tempo e soube apoiar nos momentos difíceis.

Mariza

***Somente a moralidade das nossas ações
pode nos dar a dignidade de viver.***

Albert Einstein

Trabalho realizado no Departamento de Hemoterapia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein e no Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP.

RESUMO

Alelos *RHD* que levam à redução da expressão do antígeno D na superfície dos eritrócitos podem levar à tipagem errônea como D- por técnica sorológica e podem causar imunização anti-D quando transfundidos em pacientes. A fim de determinar a ocorrência de tais alelos em doadores de sangue aparentemente D-, foi implementada técnica molecular de rotina utilizando um *pool* de DNAs de doadores de sangue. Um total de 2450 amostras previamente tipadas como D- foram testadas em *pools* de 10 amostras para o polimorfismo *RHD* específico, intron 4 e éxon 7. Nos *pools* que apresentaram resultado de PCR positivo, as amostras foram reavaliadas individualmente utilizando PCR exon-específico, métodos sorológicos e sequenciamento genético. Dentre as 2.450 amostras de doadores D- testadas, 101 (4,1%) carregavam o gene *RHD*. Foi identificada a presença de *RHD* não funcional (*RHD*_ψ, *RHD**CE(2-9)-D e *RHD**CE(3-7)-D), diferentes alelos de D fraco tais como *RHD**weak D type 1, *RHD**weak D type 4.3, *RHD**weak D type 5, *RHD**weak D type 38 e *RHD**DEL. Uma metodologia utilizando a técnica de PCR foi empregada como teste de rotina para o gene *RHD* utilizando *pools* de 10 amostras de DNA de doadores de sangue. Foi possível a integração da genotipagem *RHD* em programas de triagem de rotina utilizando pools de DNA. Como resultado, 19 (0,8%) dos doadores de sangue que carregavam fenótipos D fraco ou D_{el}, com potencial de causar imunização anti-D em receptores, foram reclassificados como D+. Entretanto, seria necessário adaptar a estratégia de genotipagem *RHD* ao espectro de alelos prevalente em cada população.

ABSTRACT

RHD alleles leading to a reduced expression of D antigen of the red blood cell (RBC) surface may be erroneously typed as D negative by serology and may cause anti-D immunizations when transfused to recipients. We have therefore investigated the occurrence of such alleles among apparent D negative blood donors, molecular typing was implemented as a routine test using a pool of DNA. A total of 2,450 pretyped D negative samples was tested in pools of 10 for the *RHD*-specific polymorphism in intron 4 and exon 7. Samples in PCR positive pools were individually reevaluated by exon-specific PCRs, sequencing and serologic methods. Our results showed that among 2,450 serologically D negative blood donor samples tested, 101 (4.1%) carried the *RHD* gene. Nonfunctional *RHD* (*RHD** Ψ , *RHD**CE(2-9)-D and *RHD**CE(3-7)-D), different weak D alleles such as *RHD**weak D type 1, *RHD**weak D type 4.3, *RHD**weak D type 5, *RHD**weak D type 38 and *RHD**DEL were identified. We employed a PCR-based assay for *RHD* as a routine test using pools of 10 DNA blood donor samples. The integration of *RHD* genotyping into the routine screening program using pools of DNA samples was straightforward. As a consequence, 19 (0.8%) blood donors carrying a weak D and D_{el} phenotypes with the potential of causing anti-D immunizations in recipients were reclassified as RhD positive. For each population, it would be necessary to adapt the *RHD* genotyping strategy to the spectrum of prevalent alleles.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIGLA	DESCRIÇÃO
AGH	Teste da antglobulina humana
AS-PCR	Alelo-específico
Bco	Branco
CI	Controle Interno
Ctl	Controle
DII	Antígeno RhD parcial categoria II
DIII	Antígeno RhD parcial categoria III
DIIIa	Antígeno RhD parcial categoria IIIa
DIIIb	Antígeno RhD parcial categoria IIIb
DIIIc	Antígeno RhD parcial categoria IIIc
DIV	Antígeno RhD parcial categoria IV
DIVa	Antígeno RhD parcial categoria IVa
DV	Antígeno RhD parcial categoria V
DVa	Antígeno RhD parcial categoria Va
DVI	Antígeno RhD parcial categoriaVI
DVII	Antígeno RhD parcial categoria VII
DAR	Antígeno RhD parcial DAR
DMH	Antígeno RhD parcial DMH
DNU	Antígeno RhD parcial DNU
DHR	Antígeno RhD parcial DHR
DFR	Antígeno RhD parcial DFR
DHAR	Antígeno RhD parcial DHAR
DHMi	Antígeno RhD parcial DHMi
DBT	Antígeno RhD parcial DBT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DFW	Antígeno RhD parcial DFW
DAU	Antígeno RhD parcial DAU
DCS	Antígeno RhD parcial DCS
DIVb	Antígeno RhD parcial categoria IVb
DNA	Fita de nucleotídeos
epD1	Epítomos D1
epD9	Epítomos D9
ÉXON	Região do gene que codifica aminoácidos
g	Força de centrifugação
<i>g</i>	Grama
GEL	Técnica de hemaglutinação em gel
INTRON	Região do gene que não codifica aminoácidos
IAI	Identificação de anticorpo irregular
kD	Kilo Dalton
Kb	Kilo base
LISS	Tampão de baixa força iônica
mRNA	RNA mensageiro
ml	Mililitro
μl	Microlitro
L	Litro
mM	Milimol
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
PAI	Pesquisa de anticorpo irregular
<i>primers</i>	Sequência de oligonucleotídeos sintéticos
pb	Pares de base

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCR	Reação de cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorfisms</i>
R ₀ H ^{ar}	Antígeno RhD parcial R ₀ H ^{ar}
R ₀	Fenótipo RhDce
R ₁	Fenótipo RhDCe
R ₂	Fenótipo RhDcE
rr	Fenótipo dccee
r ^s	Fenótipo dCcee
Rh	Sistema Rh
<i>RH</i>	Gene <i>RH</i>
<i>RHCE</i> *C/c	Genes alelos Cc
<i>RHCE</i> *c/e	Genes alelos ce
RhC	Antígeno RhC
RhE	Antígeno RhE
Rhc	Antígeno Rhc
<i>RHCE</i>	Gene <i>RHCE</i>
RhCE	Proteína RhCE
RhD	Antígeno RhD
<i>RHD</i>	Gene <i>RHD</i>
RhDel	Fenótipo RhDel
RhD-	Fenótipo RhD negativo
RH1	Antígeno D
RH2	Antígeno C
RH3	Antígeno E
RH4	Antígeno c

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RH5	Antígeno e
<i>RHD_ψ</i>	Pseudogene <i>RHD</i>
RhD+	Fenótipo RhD positivo
<i>RHD-CE-D^s</i>	Gene híbrido <i>RHD-CE-D^s</i>
RhAG	Antígeno RhAG
<i>RHAG</i>	Gene <i>RHAG</i>
Rh30	Proteína Rh30
Rh50	Proteína Rh50
rpm	Rotações por minuto
<i>SMP</i>	<i>Single membrane protein</i>
VS	Antígeno do sistema Rh
V	Antígeno do sistema Rh

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág</i>
TABELA 1: Sequência e concentração de <i>primers</i> utilizados na genotipagem <i>RHD</i> e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR convencional.....	66
TABELA 2: Sequência e concentração de <i>primers</i> utilizados na pesquisa de variantes <i>RHD* fraco tipo 1</i> , <i>RHD*fraco tipo 2 – 5</i> e <i>RHD*HMi</i> e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR- AS e PCR-RFLP.....	67
TABELA 3: Sequência e concentração de <i>primers</i> utilizados na pesquisa de variantes <i>RHD*parcial</i> e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR Multiplex.....	68
TABELA 4: Sequência e concentração de <i>primers</i> utilizados na genotipagem da variante <i>r^s</i> e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional.....	68
TABELA 5: Sequência e concentração de <i>primers</i> utilizados na genotipagem <i>RHD*DEL</i> e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional.....	69
TABELA 6: Sequência e concentração de <i>primers</i> utilizados na determinação da zigosidade do gene <i>RHD</i> e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional.....	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 7:	Variações de temperatura e número de ciclos das técnicas de PCR utilizadas.....	70
TABELA 8:	Associação dos tipos de variantes <i>RHD</i> com os haplótipos <i>RH</i>	77
TABELA 9:	Alelos <i>RHD</i> e resultados da reavaliação sorológica.....	78
TABELA 10:	Comparação de custos entre metodologia sorológica e molecular.....	91

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág</i>
FIGURA 1 : Modelo RH.....	27
FIGURA 2: Modelo do locus Rh proposto por Wagner e Flegel.....	28
FIGURA 3: Estrutura da proteína Rh na membrana eritrocitária.....	30
FIGURA 4: Proteína RhD parcial.....	32
FIGURA 5: Proteína RhD fraco.....	33
FIGURA 6: Proteína RhDel.....	35
FIGURA 7: Árvore filogenética <i>RHD</i> idealizada por Wagner e Flegel,	36
FIGURA 8: Modelo do gene <i>RHD*Ψ</i>	37
FIGURA 9: Modelo do gene híbrido <i>RHD*-CE-RHD</i>	38
FIGURA 10: Ensaio de amplificação intron 4 e éxon 7 do gene <i>RHD</i>	51
FIGURA 11a: Ensaio de validação do <i>pool</i>	52
FIGURA 11b: Ensaio de validação do <i>pool</i>	53
FIGURA 11c: Ensaio de validação do <i>pool</i>	54
FIGURA 12: PCR-Multiplex.....	56
FIGURA 13a: PCR-RFLP.....	57
FIGURA 13b: PCR-AS.....	57
FIGURA 13c: PCR-AS.....	57
FIGURA 13d: PCR-AS.....	57
FIGURA 13e: PCR-AS.....	57
FIGURA 13f: PCR-AS.....	57
FIGURA 14: PCR-AS.....	58
FIGURA 15: PCR-Multiplex.....	59
FIGURA 16: PCR-Multiplex.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 17:	PCR-RFLP.....	60
FIGURA 18:	Sequenciamento de uma amostra caracterizada como <i>RHD*DEL</i>	61
FIGURA 19a:	Fluxo dos ensaios realizados na caracterização sorológica e molecular dos doadores voluntários de sangue.....	64
FIGURA 19b:	Fluxo utilizado para o desmembramento do <i>pool</i> e reavaliação sorológica.....	64
FIGURA 19c:	Fluxo utilizado para o desmembramento do <i>pool</i> e reavaliação sorológica e molecular.....	65
FIGURA 20:	Amplificação do intron 4 e éxon 7 do gene <i>RHD</i> em <i>pool</i> de 10 amostras de DNA.....	72
FIGURA 21:	Resultado molecular nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.....	74
FIGURA 22:	Caracterização molecular dos genes híbridos <i>RHD*CE-D</i> nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.....	75
FIGURA 23:	Resultados da caracterização molecular das variantes <i>RHD* fraco</i> encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados previamente como RhD negativo.....	76
FIGURA 24:	Resultados da caracterização molecular das variantes <i>RHD*DEL</i> encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados previamente como RhD negativo.....	76
FIGURA 25:	Representação gráfica do estoque médio semanal de bolsas RHD-negativas durante o ano de 2011.....	89

	<i>Pág</i>
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVOS.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	42
A. Material.....	43
1. Amostras de sangue de doadores voluntários.....	43
2. Cartões DG Gel.....	43
3. Diluentes.....	43
4. Suspensão de hemácias a 0,8%.....	44
5. Suspensão de hemácias a 3%.....	44
6. Solução para eluição ácida de anticorpos.....	44
7. Antissoros.....	44
8. Kits de extração de DNA.....	45
9. Água livre de nucleases.....	45
10. Primers.....	45
11. dNTP 10mM.....	45
12. Dimetilsulfóxido (DMSO).....	45
13. <i>Taq DNA polymerase</i>	46
14. Elongase enzima Mix.....	46
15. Enzimas de restrição.....	46
16. Tampão Tris –EDTA-Borato (TEB) 10X.....	46
17. Tampão Tris –EDTA-Borato (TEB) 1X.....	46
18. Marcador molecular.....	46
19. Gel de agarose a 1.5%.....	47
20. Gel de agarose a 2%.....	47
21. Gel de poliacrilamida a 12%.....	47

22. RapidTip™	47
23. Big Dye.....	47
B. Métodos.....	48
1. Seleção de doadores voluntários de sangue.....	48
2. Fenotipagem RhD.....	48
2.1 Fenotipagem RhD em gel.....	48
2.2 Fenotipagem RhD em microplaca.....	48
3. Pesquisa do antígeno RhD fraco em tubo.....	49
4. Pesquisa do antígeno RhD fraco em gel.....	49
5. Extração de DNA.....	49
6. Padronização do <i>pool</i> de DNA.....	50
7. Reação em cadeia de polimerase.....	55
7.1. Genotipagem <i>RHD</i>	55
7.2. Genotipagem <i>RHCE</i> *C/c.....	55
7.3. Genotipagem <i>RHD</i> para caracterização molecular dos alelos <i>RHD</i> *fraco e <i>RHD</i> *parcial <i>HMi</i>	56
7.4. Genotipagem <i>RHD</i> *1227A.....	58
7.5. Genotipagem <i>RHD</i> para caracterização molecular das variantes <i>RHD</i> híbridas (<i>RHD</i> *-CE-D)	58
7.6. Genotipagem <i>RH</i> *CE/hex3.....	59
7.7. Zigozidade do gene <i>RHD</i>	60
8. Sequenciamento das amostras não caracterizadas pelo método de PCR convencional.....	61
9. Fluxo dos ensaios realizados na caracterização sorológica e molecular de doadores voluntários de sangue.....	62
10. Desmembramento do <i>pool</i>	63
11. Reavaliação sorológica das amostras de doadores caracterizado pelos métodos moleculares como RhD positivo.....	63

11.1. Pesquisa da fraca expressão do antígeno D por aglutinação.....	63
11.2. Pesquisa da fraca expressão do antígeno D por adsorção e eluição.....	63
12. Fluxo utilizado para o desmembramento do <i>pool</i> e reavaliação sorológica.....	64
13. Fluxo utilizado para o desmembramento do <i>pool</i> e reavaliação sorológico e molecular.....	65
RESULTADOS.....	71
A. Constituição do <i>Pool</i> utilizado para a genotipagem <i>RHD</i>	72
B. Identificação do gene <i>RHD</i> em doadores de sangue fenotipados como RhD negativo.....	73
C. Caracterização variantes <i>RHD</i> em amostras de DNA de doadores de sangue fenotipados como RhD negativo.....	74
1.Caracterização molecular dos genes híbridos <i>RHD*-CE-D</i>	74
2.Caracterização molecular dos tipos de <i>RHD*fraco</i>	75
3.Caracterização molecular das variantes <i>RHD*DEL</i>	75
4.Associação dos tipos de variantes <i>RHD</i> com os haplótipos <i>RH</i>	77
D. Alelos <i>RHD</i> identificados entre os doadores de sangue RhD-negativo e resultados sorológicos.....	78
E. Sequenciamento.....	79
F. Aloimunização.....	79
DISCUSSÃO.....	80
A. Genotipagem <i>RHD</i> utilizando <i>pools</i> de DNA em doadores	

voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.....	81
B. Identificação da presença do gene <i>RHD</i> em doadores de sangue fenotipados como RhD negativo.....	82
C. Caracterização de variantes <i>RHD</i> em amostras de DNA de doadores de sangue fenotipados como RhD negativo.....	83
C.1. Sem risco de aloimunização eritrocitária.....	83
C.2. Com risco de aloimunização eritrocitária.....	84
C.3. Associação dos tipos de variantes <i>RHD</i> encontradas com os haplótipos <i>RH</i>	85
D. Reavaliação sorológica.....	86
E. Avaliação da aloimunização.....	86
F. Avaliação da implementação de um protocolo para caracterização molecular do antígeno RhD em doadores de sangue fenotipados como RhD negativo e seu impacto no gerenciamento do estoque	88
G. Avaliação da implementação de um protocolo para caracterização molecular do antígeno RhD em doadores de sangue fenotipados como RhD negativo e seu impacto no custo.....	90
CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICE.....	105

INTRODUÇÃO

A história do sistema Rh começou em 1939 com Levine e Stetson ao investigarem uma reação hemolítica em uma paciente com histórico de natimorto recente e que havia recebido sangue do seu marido. Sugeriram que a mulher havia sido imunizada pelo antígeno fetal de origem paterna e que o episódio hemolítico havia sido causado pelo anticorpo materno que reagiu com o antígeno das hemácias do marido transfundidas **(DANIELS, 2002)**.

O sistema Rh é o maior e mais complexo de todos os sistemas de grupos sanguíneos constituído atualmente por 51 antígenos **(STORRY et al., 2011)** sendo que cinco antígenos são considerados principais: D(RH1), C(RH2), E(RH3), c(RH4) e e(RH5). Estes antígenos formam oito complexos gênicos, conhecidos como haplótipos RH (*CDe*, *ce*, *cDE*, *cDe*, *cE*, *Ce*, *CDE*, *CE*) **(RACE, 1965)**. Destes, o antígeno RhD é o mais importante do ponto de vista clínico devido ao seu alto grau de imunogenicidade e envolvimento com reações transfusionais hemolíticas, anemia hemolítica auto imune e doença hemolítica do feto e do recém nascido **(MOLLISON et al., 2005, FLEGEL, 2005)**. O gene *RHD* codifica o antígeno RhD enquanto o gene *RHCE* (alelos *RHCe*, *RHcE*, *RHce* e *RHCE*) codifica os antígenos C/c e E/e **(SIMSEK et al., 1994)**.

Os genes *RHD* **(LE VAN KIM et al.,1992; KAJII et al.,1993)** e *RHCE* **(CHÉRIF-ZAHAR et al.,1990)** são altamente homólogos e estão localizados no braço curto do cromossomo 1p36.13-34.3 **(CHÉRIF-ZAHAR et al.,1991; CARRIT et al., 1997)** e organizados em 10 éxons dentro de uma sequência genômica de aproximadamente 60kb.

WAGNER e FLEGEL (2000) estabeleceram a estrutura molecular do locus *RH*, em que os dois genes *RHD* e *RHCE* possuem orientações opostas e encontram-se separados por 30,000 pb. Nesta região, encontra-se outro gene denominado *SMP1* que tem a mesma orientação do gene *RHD* e cuja função no locus *RH* ainda não está totalmente esclarecida. O gene *RHD* está flanqueado por dois segmentos de DNA, denominados caixas *Rhesus*, com um comprimento de aproximadamente 9,000 pb, apresentando 98% de homologia e orientação

idêntica. (Figura 1). De acordo com estes autores, a caixa *Rhesus* conteria a deleção do gene *RHD* com 1,463 pb de extensão e estaria presente na maioria dos indivíduos caucasianos RhD negativo. Esta descoberta possibilitou a padronização de técnicas moleculares para a determinação da zigosidade do antígeno RhD. Mediante estudos realizados com análises das sequências genômicas do locus *RH* de humanos e camundongos, (WAGNER e FLEGEL, 2004) chegaram à conclusão de que o gene *RHD* é o gene duplicado, enquanto os genes *RHCE* e *SMP1* são os genes ancestrais.

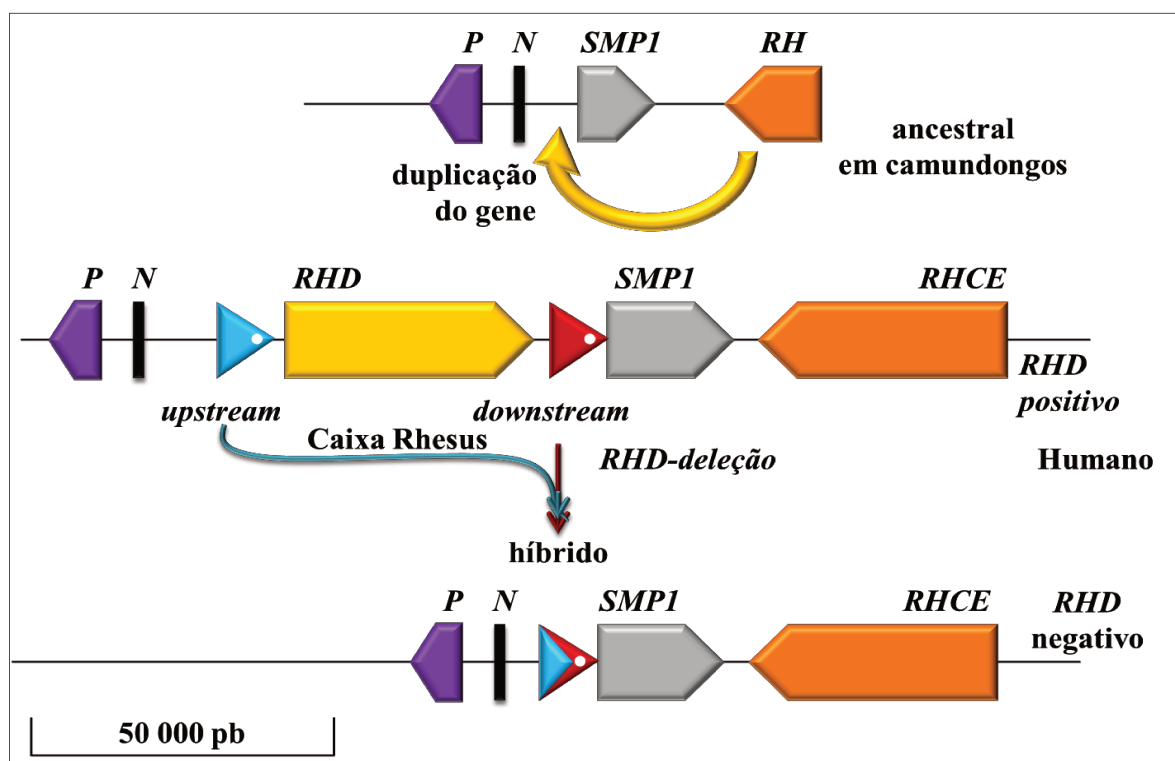


Figura 1 modificada de Wagner e Flegel: Modelo *RH* - Duplicação do gene *RH* e deleção. Na forma ancestral (deduzido do locus *RH* de camundongo) um único gene *RH* tem proximidade com o gene *SMP1* e 2 outros genes, *P29* (*P*) e *NPD014* (*N*) estão localizados acima do gene *SMP1*. Com o evento da duplicação há inversão do gene *RH*, que ocorre entre os genes *N* e *SMP1*. No ponto de inserção do gene *RHD*, o segmento de DNA é duplicado, levando a formação da Caixa *Rhesus* que flanqueia o gene *RHD*.

A deleção do gene *RHD* leva ao aparecimento de Caixa *Rhesus* híbrida e o locus *RH* claramente lembra o *status* ancestral antes de ocorrer a duplicação.

A proximidade entre estes genes facilita a ocorrência de conversão gênica em *cis* durante os rearranjos gênicos entre eles, levando a formação de genes híbridos (partes do gene *RHD* em *RHCE* e vice-versa), responsáveis por algumas variantes dos antígenos RhD e RhCE (Figura 2).

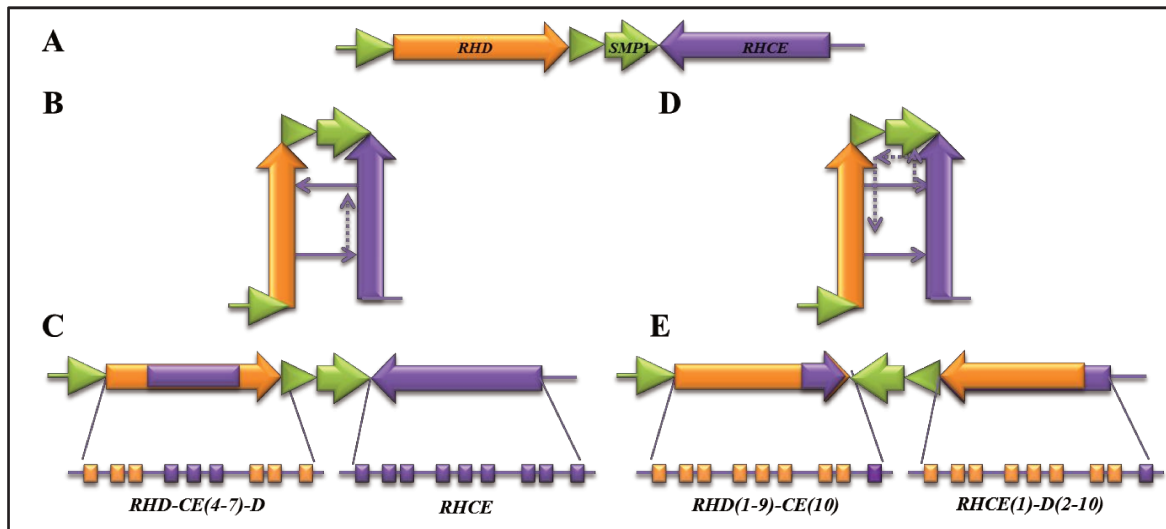


Figura 2: Modelo do locus *RH* proposto por Wagner e Flegel (2000).
A) Os dois genes *RH* tem orientações opostas. **B)** A conversão gênica em *cis* pode ser favorecida pela estrutura *hairpin*. **C)** Como resultado da conversão gênica, parte de um gene *RH* é substituído pelo segmento correspondente do outro gene. **D)** Se a transcrição continua com o molde errado através do *SMP1*, é possível a correção deste molde quando ele entra no segundo gene *RH*. **E)** O resultado de múltiplas conversões gênicas leva a haplótipos com dois alelos híbridos.

O sistema Rh é uma família de proteínas constituída pelos polipeptídeos RhD e RhCE não glicosilados com peso molecular de 30 kD (proteínas Rh ou Rh30)

codificados pelos genes *RHD* e *RHCE* e pela glicoproteína RhAG de peso molecular 50 kD (glicoproteína Rh50) codificada pelo gene *RHAG*. Os antígenos Rh somente são expressos na superfície da membrana eritrocitária quando a glicoproteína RhAG está presente. Na ausência de RhAG, os antígenos Rh não são expressos. A associação das proteínas Rh30 e RhAG dentro de uma mesma família de proteínas baseia-se no fato de ambas apresentarem 36% de homologia na sequência genômica e 50% de identidade nas 12 α hélices transmembranares. Acredita-se que tanta homologia esteja relacionada ao fato de ambas terem sido originadas a partir de um gene ancestral comum (**AVENT e REID, 2000**). As proteínas RhAG e Rh30 compartilham homologia com a família das proteínas transportadoras de amônia e acredita-se que a família das proteínas Rh faça parte deste transporte (**AGRE et al., 1991; AVENT, 2001; CHENG-HEN, 2010**).

Atualmente, muitos estudos estão sendo realizados para confirmar se realmente essa é sua única função, uma vez que, não se sabe até hoje, qual é a verdadeira função da proteína Rh (**WESTHOFF et al., 2004**).

A proteína RhD carrega o antígeno D(RH1), enquanto que a proteína RhCE carrega os antígenos C, c, E, e (RH2 a RH5). Ambas são compostas de 417 aminoácidos (**LE VAN KIM et al., 1992**) e o modelo estrutural atual sugere 6 alças extracelulares, 12 alças transmembranares e 7 intracelulares e as porções carboxi-terminal e amino-terminal estão localizadas na face intracelular (**AVENT et al., 1992**) (Figura 3).

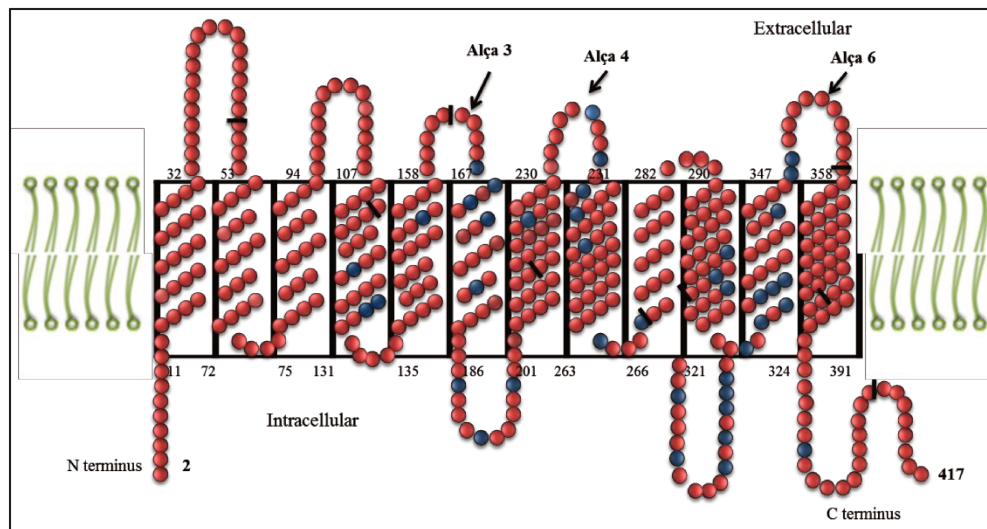


Figura 3: Estrutura da proteína Rh na membrana eritrocitária. Cada aminoácido é representado por um círculo e os círculos em azul representam os aminoácidos que diferem a proteína RhD da RhCE.

O polimorfismo E/e resulta da substituição de um único aminoácido no éxon 5, na quarta alça extracelular, com a substituição de uma Prolina (E) na posição 226, para uma Alanina (e) (**MOURO et al., 1992 e SIMSEK et al., 1994**).

Já o polipeptídeo Rh que carrega os antígenos RhC e Rhc diferem, um do outro, pela substituição de quatro aminoácidos em uma cadeia de 417 aminoácidos, muito embora, apenas a substituição de uma Serina (C) na posição 103 (segunda alça extracelular) para uma Prolina (c) pareça ser crítica para o polimorfismo C/c (**MOURO et al., 1994; WOLTER et al., 1994**). Por outro lado, o polipeptídeo codificado pelo gene *RHD* difere daquele codificado pelo *RHCE*, em 34 a 37 aminoácidos dependendo do alelo *RHCE* considerado. Apenas um número limitado de diferenças ocorre na parte externa; tais diferenças são restritas a alça 3 codificada pelo éxon 4, alça 4 codificada pelo éxon 5 e a alça 6 codificada pelo éxon 7. Essas diferenças podem talvez explicar, em parte, a imunogenicidade do antígeno RhD (**ISSITT, 1996**).

As bases moleculares do polimorfismo do antígeno RhD foram objetos de numerosos trabalhos. O antígeno RhD é considerado como um mosaico composto de 37 epítomos, onde pelo menos nove epítomos (epD1-epD9) já foram definidos por diferentes anticorpos monoclonais (**LOMAS et al.,1984**). Alguns indivíduos RhD positivo podem desenvolver aloanticorpos anti-D dirigidos contra um ou mais dos epítomos ausentes, definindo-se, assim, as categorias do antígeno RhD parcial (DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII, DFR, DBT, R₀^{Har}) que são diferenciadas umas das outras de acordo com a presença ou ausência de um ou mais epítomos (**TIPPETT et al., 1996**).

A análise molecular das variantes de RhD mostrou que a perda da expressão de certos epítomos RhD está associada a mutações de ponto *missenses* no gene *RHD* ou a rearranjos gênicos entre os genes *RHD* e *RHCE*. As variantes DII, DIIIa, DIVa, DVII, DMH, DNU, DHR, DHMi, DFW, DAR e DAU ocorrem pela presença de mutações de ponto *missenses* no gene *RHD*, enquanto as variantes DIIIb, DIIIc, DIVb, DVa, DVI, DFR, DBT, R₀^{Har}, e DCS ocorrem pela formação de genes híbridos, em que parte do gene *RHD* é substituído por parte 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, nas alças onde estão localizados os epítomos Rh (Figura 4), 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 entrarem em contacto com hemácias RhD positivo normais (**HUANG et al.,1996; ROUILLAC et al., 1995; MOURO et al., 1994; BECKER et al., 1996; WAGNER et al., 1998; HEMKER et al., 1999; WAGNER e FLEGEL, 2000**).

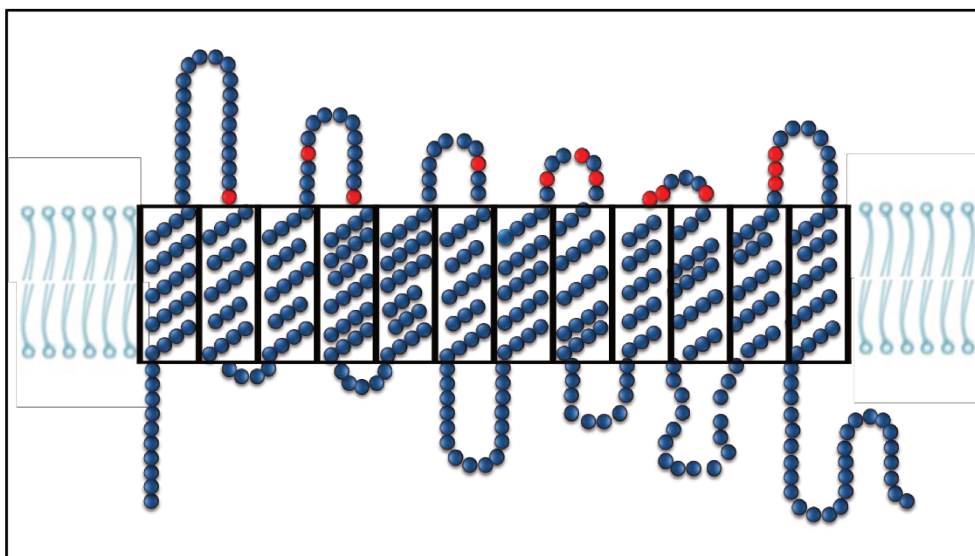


Figura 4: Estrutura da proteína RhD parcial na membrana eritrocitária.

Os antígenos RhD parciais categorias DIII, DAR e DAU não são caracterizados sorologicamente, pelo fato de não existirem anticorpos monoclonais que reconhecem os epítomos específicos expressos por estas variantes. Estudos moleculares demonstraram que elas ocorrem predominantemente em indivíduos de origem africana e seus descendentes (**HUANG et al., 1997; HEMKER et al., 1999, WAGNER et al., 2002; CASTILHO et al., 2005; HUANG et al., 2010**).

Outra variante do antígeno RhD, o antígeno RhD fraco foi descrita por **STRATTON (1946)**. Este antígeno apresenta fraca expressão do antígeno RhD e, dependendo do antissoro anti-D utilizado, reage apenas pelo teste da antiglobulina humana (AGH).

AVENT (1996) e **ROUILLAC (1996)** acharam que o antígeno RhD fraco apresentava uma variação de expressão quantitativa derivada de uma redução dos níveis de mRNA. **WAGNER e FLEGEL (1999)** demonstraram que, na

verdade, o antígeno RhD fraco surgiu como uma consequência de mutações de ponto *missenses* em diferentes éxons do gene *RHD*. Atualmente mais de 70 tipos foram descritos (**Site RHESUS: 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 (Figura 5). 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 fraco (**WAGNER et al.,2000; MULLER et al.,2001**).

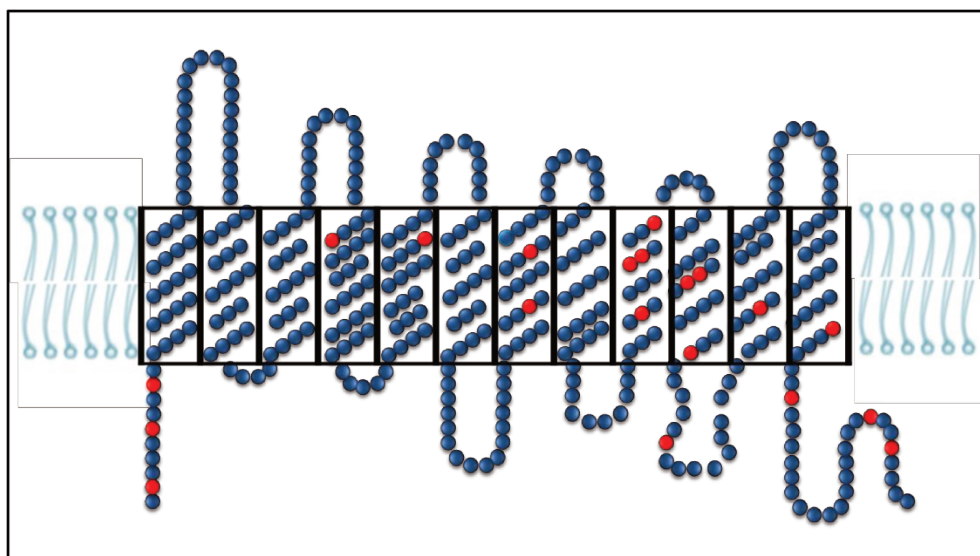


Figura 5: Proteína RhD fraco

A presença do alelo *RHC* em posição *trans* no locus *RH*, também está associada com a expressão fraca do antígeno RhD na hemácia. Algumas vezes este mecanismo encontra-se associado com tipos do antígeno RhD fraco, ocorrendo uma redução ainda maior da expressão deste antígeno na membrana da hemácia, o que dificulta consideravelmente a sua identificação sorológica (**MOTA et al., 2005**).

O mecanismo relacionado com a expressão reduzida do antígeno RhD fraco, não está totalmente esclarecido, e sua expressão difere dependendo do tipo do antígeno RhD fraco 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 (**WAGNER e FLEGEL, 2004**).

O fenótipo RhDel, outra variante do antígeno RhD responsável por uma significativa redução da expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária foi identificada em asiáticos (**QUIN et al., 2005**) (Figura 6). Este fenótipo que ocorre em 10 a 33% dos japoneses e chineses é identificado como RhD negativo pelos testes sorológicos rotineiros, mas adsorvem e eluem o anti-D. O grande problema é que doadores de sangue portadores do fenótipo Del podem estimular o desenvolvimento de anti-D em pacientes RhD negativo. Atualmente, mais de 25 alelos *RH*DEL* diferentes foram identificados e, todos estão relacionados com a presença de alterações moleculares que afetam a inserção da proteína RhD na membrana eritrocitária e com a presença dos antígenos RhC ou RhE. A análise molecular das variantes de RhDel demonstrou que ocorrem principalmente devido a mutações de ponto ou mutação de sítio de *splice* ou deleção éxon 9. Diferentes alelos *RH*DEL* estão associados com a expressão completa ou parcial do antígeno D. O mapeamento dos epítomos com diferentes anti-D monoclonais demonstra que o alelo *RHD(IVS3+1g>a)* está associado ao RhD parcial, destituído de epítomos, em contrapartida os alelos *RHD(K409K)*, *RHD(IVS5-38del4)*, *RHD(X418L)* e *RHD(M295I)* possuem todos os epítomos D sugerindo uma completa expressão do antígeno D (**KÖRMÖCZI et al., 2005**).

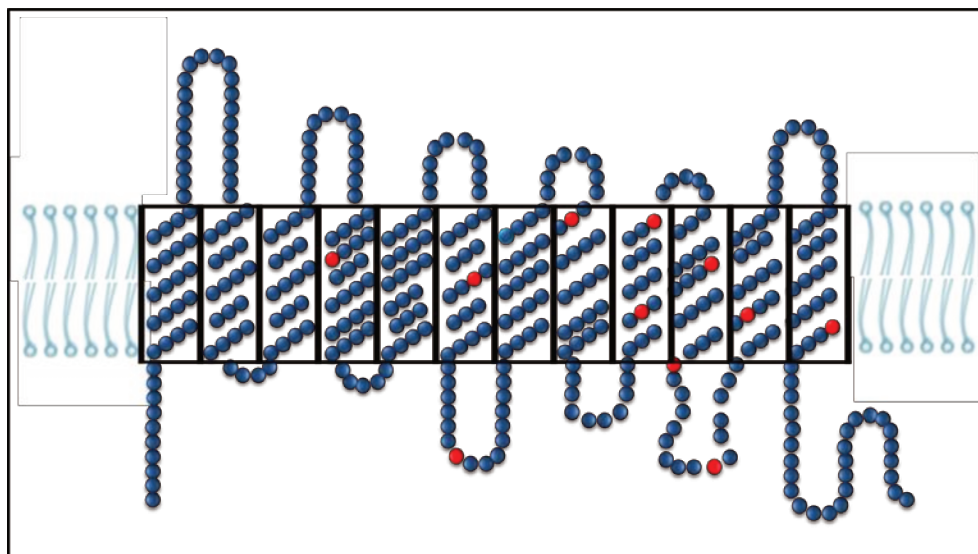


Figura 6: Estrutura da proteína RhDel na membrana eritrocitária.

WAGNER e **FLEGEL (2000)** definiram o modelo da árvore filogenética *RH*, a partir de estudos realizados com alelos *RH* de primatas. Segundo esses autores, os haplótipos *RH* originaram-se a partir da evolução do haplótipo *Dce* (R_0), que seria o haplótipo ancestral. Este teria sofrido eventos moleculares e se dividido em cinco grupos *RHD* independentes.

Os grupos RhD categoria IVa e RhD fraco tipo 4 estão presentes em africanos e seus descendentes e geralmente ocorrem com o haplótipo *Dce* (R_0). Em **2002**, **WAGNER** e **FLEGEL** estudando uma nova variante do antígeno RhD em africanos, identificaram mais um grupo RhD independente, denominado DAU. Assim, estes três grupos formam o grupo dos alelos africanos.

O grupo euroasiático ocorre mais frequentemente com os haplótipos *DCe* e *DcE*.

O quinto e principal grupo envolve o gene *RHD* normal, do qual derivam todos os outros (Figura 7).

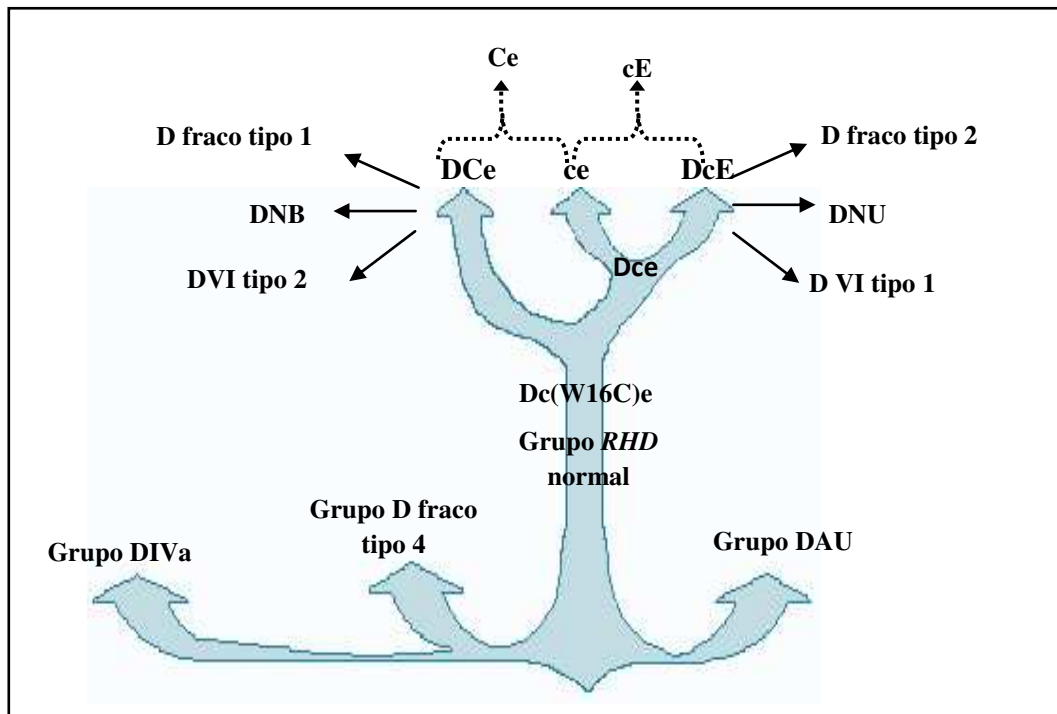


Figura 7: Árvore filogenética *RHD* idealizada por Wagner e Flegel, 2000.

O fenótipo RhD negativo ocorre pela ausência funcional da proteína RhD ou pela presença de uma proteína RhD alterada que não expressa o antígeno D. O mecanismo mais frequente é a deleção do gene *RHD* (COLIN et al.,1991), resultado de um *crossing over* desigual que ocorre na caixa *Rhesus* e é caracterizada pela presença de uma caixa *Rhesus* híbrida. A deleção do gene *RHD* ocorre em 40 % dos caucasianos com o fenótipo RhD negativo e em apenas 18% dos indivíduos africanos com o fenótipo RhD negativo (DANIELS et al.,2000).

Outros mecanismos responsáveis pelo fenótipo RhD negativo são mutações sem sentido de transcrição ou *non sense* levando a presença de códon de terminação prematura (*stop códon*) inserções e deleções que levam a alterações do quadro de leitura e resultam em uma sequência de aminoácidos completamente alterada (GASSNER et al.,2005; FLEGEL et al.,2009)

SINGLETON et al., (2000) verificaram que 66% dos africanos RhD negativo originários da África do Sul apresentavam uma duplicação de 37 pb na região limítrofe entre o intron 3 e o éxon 4 do gene *RHD*, conhecida como pseudogene (*RHD*ψ*). Esta duplicação introduz um códon de terminação na posição 210 e uma alteração no quadro de leitura, levando à produção de uma proteína que não é expressa na membrana eritrocitária (Figura 8). Além disto, foi também observada em 15% destes africanos, a presença de um gene *RHD* híbrido (*RHD*D-CE-D^s*) associado ao fenótipo VS+V- (**FAAS et al, 1997**). Este gene apresenta os éxons 4 a 8 de *RHCE* e codifica uma proteína alterada com fraca expressão dos antígenos RhC e Rhe e ausência da expressão do antígeno RhD (Figura 9).

A maioria dos haplótipos RhD negativo em africanos apresenta uma associação do gene *RHD*ψ* com o alelo *RHCE*ce*. Desta forma, em populações de origem africana, recomenda-se a determinação do pseudogene, quando se realiza a genotipagem *RHD* para deduzir corretamente o fenótipo RhD (**DANIELS et al., 1997, SINGLETON et al.,2000**).

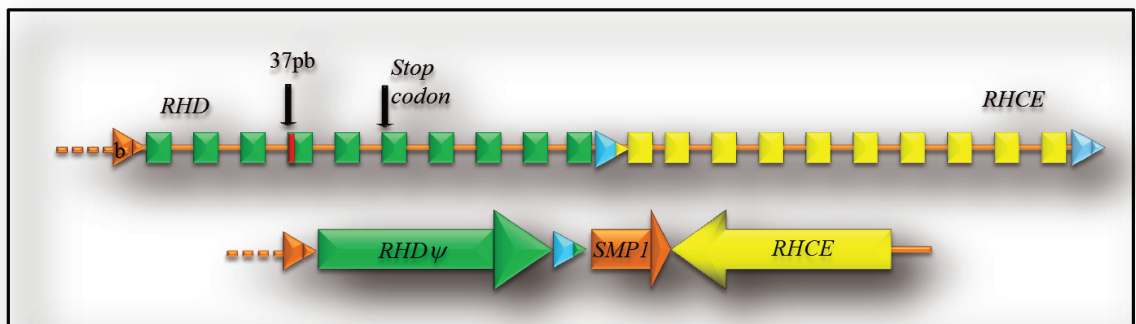


Figura 8: Modelo do gene *RHD*ψ* caracterizado pela inserção de 37pb na junção do intron 3 e éxon 4 resultando em um *stop códon* prematuro.

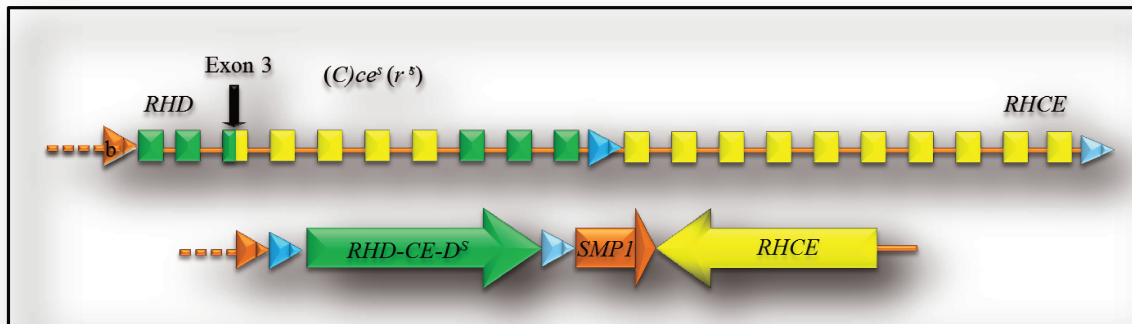


Figura 9: Modelo do gene híbrido *RHD*CE-RHD*

Doadores de sangue portadores de genes *RHD* alterados que levam a diminuição na expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária podem erroneamente ser tipados como RhD negativo pelos métodos sorológicos convencionais e induzir a aloimunização em pacientes RhD negativo (**DENOMME et al.,2008**).

CRUZ et al.,2011 determinou a presença do gene *RHD* em 22 (9,2%) dos 239 indivíduos sorologicamente classificados como RhD negativo e foram encontrados 5 alelos distintos *RHD* com 6 mecanismos moleculares que não codificam o antígeno RhD (*RHD*ψ*, *RHD*-CE-D*, e associação de ambos). Os tipos de RhD fraco mais frequentemente encontrados foram RhD fraco tipo 1,2,3, 4.0/4.1 e RhD fraco tipo 4.2.

Técnicas de adsorção e eluição consideradas mais sensíveis não são geralmente utilizadas na rotina e, portanto, os testes moleculares têm sido considerados uma alternativa para suprir estas limitações (**KÖRMÖCZI et al, 2005**).

Os métodos de genotipagem do gene *RH* baseiam-se atualmente nas técnicas de PCR-AS ou PCR-RFLP (**LE VAN KIM et al., 1994; FAAS et al., 1995; POULTER et al., 1996; COLIN et al., 1991**), buscando identificar as

diferenças nas sequências entre os genes *RHD* e *RHCE* (**SIMSEK et al., 1994; CARRITT et al., 1994; RIOS et al., 1999; REID et al., 2000**).

Como rotina, os métodos que amplificam regiões específicas do intron 4 e éxon 7 ou éxon 10 têm sido utilizados para amplificação simultânea em uma técnica de PCR multiplex na genotipagem do gene *RHD* (**SINGLETON et al., 2000**). A técnica de PCR multiplex tem possibilitado também a caracterização molecular das variantes *RHD* híbridas, ou seja, as variantes que possuem inserção total ou parcial do éxon *RHD* pelo éxon *RHCE* equivalente (**MAASKANT van WIJK et al., 1998**).

Todos os métodos de genotipagem *RHD* são realizados separadamente e, em amostras de DNA individuais, o que aumenta o tempo de execução, o trabalho e o custo dos testes, dificultando sua utilização na rotina e, em larga escala. Como uma das grandes preocupações atuais na prática transfusional é prevenir a aloimunização e evitar desperdício de unidades RhD negativo para pacientes RhD fraco e RhDel sem elevar muito os custos, tem se buscado alternativas seguras e mais baratas para realização da genotipagem *RHD* em doadores de sangue e pacientes.

Neste trabalho, desenvolvemos uma estratégia para genotipagem *RHD* em indivíduos fenotipados como RhD negativo, que emprega um *pool* de amostras de DNA e que pode ser uma importante alternativa para os centros de medicina transfusional.

OBJETIVOS

Tendo em vista a importância do tema e sua aplicação na medicina transfusional, os objetivos foram:

1. Desenvolver uma estratégia para genotipagem *RHD* em indivíduos fenotipados como RhD negativo utilizando *pools* de DNA.
2. Identificar a presença do gene *RHD* em doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.
3. Caracterizar variantes *RHD* em amostras de DNA de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.
4. Associar os tipos de variantes *RHD* encontradas com os haplótipos *RH* presentes.
5. Avaliar os riscos de aloimunização de variantes RhD com baixa densidade antigênica
6. Propor um protocolo viável para genotipagem *RHD* em pacientes e doadores de sangue que possa ser utilizado na prática transfusional.

MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

1. Amostras de sangue de doadores voluntários

Após consentimento informado, foram coletadas 2.450 (duas mil quatrocentos e cinquenta) amostras de sangue, anticoaguladas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), obtidas de doadores de sangue voluntários de São Paulo e região (Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), e de Recife e região (Hemocentro de Pernambuco - HEMOPE), no período de Janeiro de 2008 a Dezembro de 2010.

2. Cartões DG Gel[®]

O cartão DG Gel ABO/Rh (2D), soros anti-D monoclonal IgM (clone P3x61) e anti-D monoclonal IgG e IgM (clones P3x290, P3x35, P3x61, P3x21223B10) (Grifols[®] S.A., Curitiba, PR, Brasil) foram utilizados na realização da fenotipagem RhD no equipamento WADIANA[®] (Grifols[®] S.A., Barcelona, Espanha).

O cartão DG Gel Coombs (AGH: LISS Coombs com antiglobulina humana poliespecífica) (Grifols[®]S.A., Curitiba, PR, Brasil) e soro anti-D *blend* (clones IgG MS26 e IgM MS201) (Fresenius Kabi[®], Itapeirica da Serra, SP, Brasil) foram utilizados na confirmação do antígeno RhD fraco nas amostras de doadores voluntários de sangue provenientes do HIAE.

3. Diluentes

DG Gel Sol (Grifols[®] S.A. ,Curitiba, PR, Brasil) e Diluente 2 (Diamed[®] S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Tampões de baixa força iônica utilizados nas diluições de hemácias, para a realização da fenotipagem RhD e confirmação do antígeno D.

4. Suspensão de hemácias a 0,8%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 0,8% em diluente DG Gel Sol (Grifols® S.A., Curitiba, PR, Brasil). Após lavar três vezes as hemácias em solução fisiológica 0,9% e centrifugação de 1.000g durante 1 minuto, 5µL do concentrado de hemácias obtido foi ressuspensão em 0,5mL de DG Gel Sol (Grifols®S.A., Curitiba, PR, Brasil).

5. Suspensão de hemácias a 3%

Foram preparadas suspensões de hemácias a 3% em solução fisiológica 0,9%. Após lavar três vezes as hemácias com a solução fisiológica 0,9% e centrifugar a 1.000g durante 1 minuto, 15µL do concentrado de hemácias obtido foram ressuspensos em 0,5mL de solução fisiológica 0,9%.

6. Solução para eluição ácida de anticorpos

A solução para eluição ácida de anticorpos (DiaCidel, Diamed®, Lagoa Santa, MG, Brasil) foi utilizada para a realização da técnica de adsorção e eluição de anticorpos ligados às hemácias.

7. Antissoros

Os antissoros empregados na determinação do antígeno RhD foram:

- Anti-D Monoclonal IgG + IgM, (*blend*) clones MS26+MS201 respectivamente (Fresenius Kabi®, Itapicirica da Serra, SP, Brasil).
- Anti-D Monoclonal IgM, clone P3x61 (Grifols® S.A., Curitiba, PR, Brasil).
- Anti-D Monoclonal IgG e IgM, clones P3x290, P3x35, P3x61, P3x21223B10 (Grifols®S.A., Curitiba, PR, Brasil).
- Anti-D Monoclonal IgG, clone MS26 (FreseniusKabi®, Itapicirica da Serra, SP, Brasil).
- Anti-D Policlonal (Diamed®S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

8. Kits de extração de DNA

Para a extração do DNA do sangue periférico foi utilizado o kit comercial *QIAmp DNA blood Mini-kit* (Qiagen®, Valencia, CA, USA), e o etanol 100% foi adquirido da empresa Merck® S.A, São Paulo, SP, Brasil. O equipamento Nanodrop®1000 Spectrophotometer, (Wilmington, DE, USA) foi utilizado para medir o grau de pureza e a concentração do DNA.

9. Água livre de nucleases

A água livre de nucleases utilizada neste trabalho foi adquirida da empresa Applied Biosystems® (Foster City, CA, USA). Este reagente foi utilizado na etapa final da extração de DNA, na reconstituição dos *primers* e nas reações de PCR convencional.

10. Primers

Os *primers* utilizados para os protocolos de PCR convencional foram obtidos das empresas Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA), Bioneer Oligo Synthesis Report® (Daejeon, Daedeok-gu, Coreia), MWG Oligo Synthesis Report® (Miami, FL, USA) e estão descritos nas tabelas 1 a 6. O equipamento Nanodrop®1000 Spectrophotometer, (Wilmington, DE, USA) foi utilizado para medir o quociente de pureza dos primers (1,50 – 1,95 para amplificação PCR ótima).

11. dNTP 10mM

Os nucleotídeos utilizados na reação de PCR foram dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA). A concentração do dNTP 10mM utilizada nas reações de PCR foi obtida diluindo-se 1µL de cada nucleotídeo em 46µL de água deionizada e destilada (ddH₂O).

12. Dimetilsulfóxido (DMSO)

O composto DMSO utilizado na reação de PCR de zigozidade do gene *RHD* foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, USA)

13. *Taq* DNA polymerase

As enzimas *Taq* DNA polymerase utilizadas nas reações de PCR foram obtidas da Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA).

14. Elongase enzima Mix

Esta enzima foi utilizada nas reações de PCR-RFLP obtida da Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA) para amplificação do gene *RHD*.

15. Enzimas de restrição

A enzima de restrição *Pst*-I (MBI Fermentas®, Amherst, NY, USA) foi utilizada para digestão do produto de PCR com a finalidade de determinar a zigozidade do gene *RHD*. A enzima de restrição *Apa*L I (MBI Fermentas®, Amherst, NY, USA) foi utilizada para digestão do produto de PCR com a finalidade de determinar a variante *RHD* fraco tipo 1*.

16. Tampão Tris –EDTA-Borato (TEB) 10X

Este tampão foi preparado dissolvendo-se 108g de Tris (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 55g de ácido bórico (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) e 7,44g de EDTA (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em 1L de água deionizada e destilada (ddH₂O).

17. Tampão Tris -EDTA-Borato (TEB) 1X

O tampão TEB 1X foi preparado diluindo-se 100mL de TEB 10X em 900mL de água deionizada destilada (ddH₂O).

18. Marcador molecular

Foram utilizados marcadores moleculares de 50 pb, 100 pb e 1Kb (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) na análise dos fragmentos de DNA.

19. Gel de agarose a 1.5%

A solução de agarose foi preparada dissolvendo-se 1,5g de agarose (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em 100mL de TEB 1X. Esta solução foi aquecida em forno de micro-ondas durante 2 minutos e, após o resfriamento, foram adicionados 2µL de brometo de etídio (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA).

20. Gel de agarose a 2%

Foram dissolvidas 2g de agarose (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em 100 mL de TEB 1X. Após o aquecimento em forno de micro-ondas durante 2 minutos seguido de resfriamento, foram adicionados 2µL de brometo de etídio (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA).

21. Gel de poliacrilamida a 12%

O gel foi preparado misturando-se em um becker 12,4mL de água destilada e deionizada (ddH₂O), 6,4mL de acrilamida 40% (BioAgency®, São Paulo, Brasil), 2mL de TEB 10X, 200µL de persulfato de amônia 10% (Serva Electrophoresis® Heidelberg, Alemanha) e 8µL de TEMED (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). A solução foi distribuída em 1 par de placas de vidro com suporte próprio e aguardou-se a sua polimerização.

22. *Concert rapid PCR purification system*

Kit utilizado na purificação da reação de PCR para sequenciamento automático (Gibco BRL®, Gaithersburg, MD).

23. Big Dye Terminator (ABI)

Reagente PEB Big Dye BD Half-term (GenPak, Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA) utilizado no preparo das reações para o sequenciamento automático de DNA.

B. MÉTODOS

1. Seleção das amostras de sangue de doadores voluntários

Amostras de sangue de 2.450 doadores voluntários fenotipadas na rotina sorológica como RhD negativo foram separadas para a realização da genotipagem *RHD*.

2. Fenotipagem RhD

A fenotipagem RhD foi determinada pelo teste de hemaglutinação automatizado em gel ou microplaca de acordo com a rotina estabelecida pela instituição de origem. As amostras provenientes do HIAE foram fenotipadas em gel através do equipamento WADIANA® (Grifols® S.A., Barcelona, Espanha) enquanto que as amostras obtidas junto ao HEMOPE foram fenotipadas em microplaca pelo equipamento PK 7.200 (Automated Microplate System, Olympus, CA, USA).

2.1. Fenotipagem RhD em gel

Após a identificação automatizada do cartão DG Gel ABO/Rh (2D) - IgM e IgG + IgM foram adicionados 10 µL das hemácias a 0,8% em DG Gel Sol aos microtubos. Os cartões foram centrifugados a 990 rpm durante 9 minutos. A leitura das reações foi realizada de acordo com os padrões de aglutinação em gel teste pelo equipamento WADIANA® (Grifols® S.A., Barcelona, Espanha)

2.2. Fenotipagem RhD em microplaca

Após a identificação da microplaca, foram dispensados automaticamente 50 µL dos antissoros anti-D policlonal (Diamed® S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) e 50 µL dos antissoros anti-D monoclonal IgG + IgM (*blend*) e 30µL das hemácias a 3% tratadas com enzima papaína (Diamed® S.A., Lagoa

Santa, MG, Brasil). O procedimento foi realizado de acordo com as especificações do equipamento PK7.200 (Automated Microplate System, Olympus, CA, USA) e a leitura das reações de acordo com os padrões de aglutinação em microplaca.

3. Pesquisa do antígeno RhD fraco em tubo

A pesquisa do antígeno RhD fraco em tubo foi realizada pela técnica indireta da antiglobulina humana, utilizando-se 50 µL do antissoro anti-D monoclonal (*blend*) (Fresenius Kabi®, Itapeirica da Serra, SP, Brasil) e 50µL de suspensão de hemácias a 3%. Após a incubação da reação a 37°C por 30 minutos, os tubos foram lavados três vezes com solução fisiológica 0,9% e foi adicionado 100µL de soro antiglobulina humana (Diamed® S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Após a centrifugação a 3.500 rpm por 15 segundos foi realizada a leitura das reações de acordo com os padrões de aglutinação em tubo.

4. Pesquisa do antígeno RhD fraco em Gel

Após identificação dos cartões DG Gel Coombs foram adicionados 50µL das hemácias a 0,8% em DG Gel Sol e 25 µL do anti-D monoclonal (*blend*) (Fresenius Kabi®, Itapeirica da Serra, SP, Brasil) nos microtubos. A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos e, a seguir, os cartões foram centrifugados a 990 rpm por 9 minutos. A leitura das reações foi realizada de acordo com os padrões de aglutinação em gel teste.

5. Extração de DNA

O DNA foi extraído individualmente de leucócitos de sangue periférico, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração a concentração do DNA foi avaliada através de leitura óptica de absorbância (DO260/280nm) em ng/µL através de um equipamento de espectrofotometria (Nanodrop®1000 Spectrophotometer, (Wilmington, DE, USA). A concentração do

DNA foi padronizada em 100 ng/ μ L e o quociente de pureza do DNA foi considerado aceitável quando a leitura de absorbância foi maior ou igual a 1.8.

6. Padronização do *pool* de DNA

Amostras de DNA de doadores voluntários previamente fenotipados como RhD negativo foram analisadas em *pools* de 10 e 20 amostras para a presença do gene *RHD*, através da amplificação do intron 4 e éxon 7 do gene *RHD*.

Na fase de padronização do *pool* de 10 amostras de DNA selecionamos 1 amostra fenotipada e genotipada como RhD-positivo e 9 amostras fenotipadas e genotipadas como RhD-negativo. Para constituição deste *pool*, utilizamos 1 μ L de DNA de cada amostra, ou seja 1 μ L de DNA RhD positivo e 9 μ L de DNA RhD negativo e avaliamos se a amostra RhD positivo era amplificada nas regiões do intron 4 e éxon 7 do gene *RHD* que foram selecionadas para o nosso ensaio de PCR (Figura 10, ensaio 1). Com a finalidade de avaliar a ocorrência de amplificação inespecífica, constituímos um *pool* com 10 μ L de DNA de diferentes doadores RhD negativo (ensaio 2). Para avaliação da inibição da amplificação pelas concentrações de DNA, constituímos mais 2 *pools*, um que utilizou 9 μ L de DNA de diferentes doadores RhD positivo e 1 μ L DNA de doador *RHD* negativo (ensaio 3) e outro que utilizou 10 μ L de DNA de diferentes doadores positivo (ensaio 4).

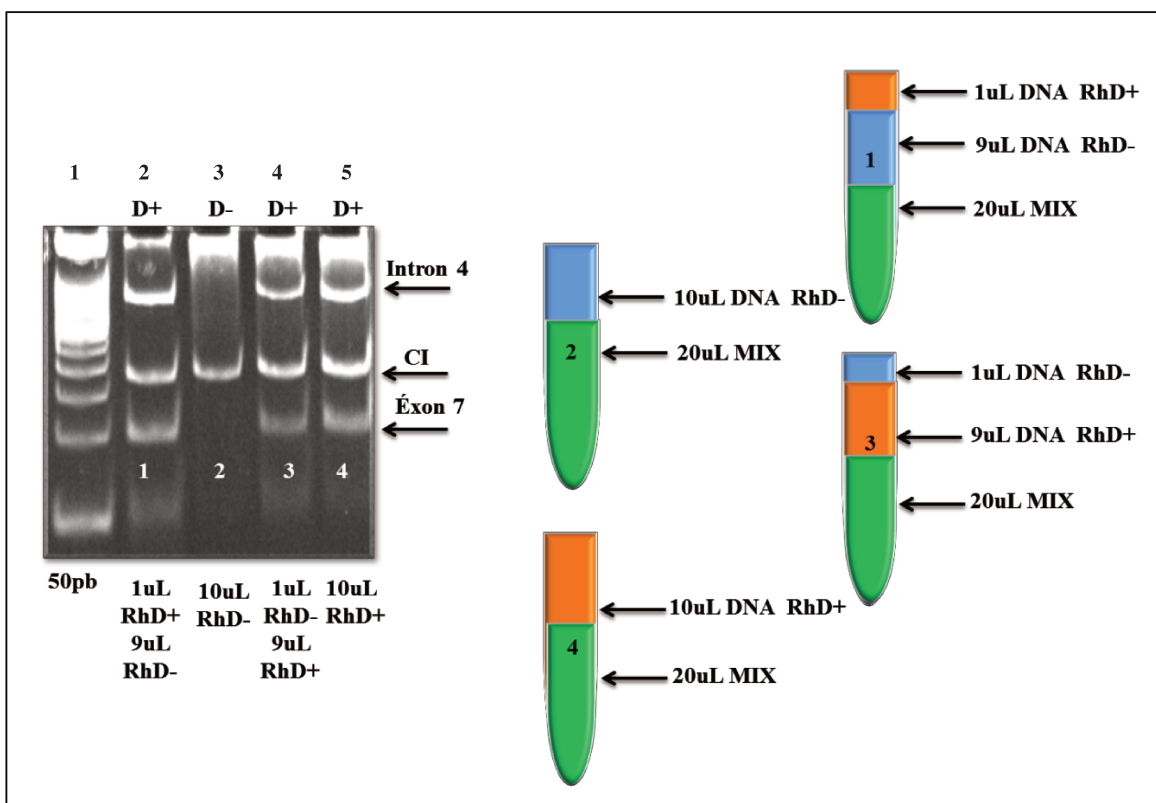


Figura 10: Ensaio de amplificação do intron 4 e éxon 7 do gene *RHD* em *pool* de 10 amostras de DNA por PCR- Multiplex. Pista 1: marcador molecular de 50pb. Pista 2: amostra com genótipo *RHD*+. Pista 3: amostra com genótipo *RHD*-. Pista 4: amostra com genótipo *RHD*+. Pista 5: amostra com genótipo *RHD*+

O mesmo protocolo foi empregado na constituição do *pool* de 20 amostras de DNA com a diferença que utilizamos 1µL de DNA RhD positivo e 19 µL de DNA RhD negativo.

Os ensaios de validação foram realizados para os *pools* de 10 amostras de DNA utilizando-se 3 *pools* (1, 2 e 3) que foram subdivididos nos *pools* (1A, 2A, 3A – 1B, 2B, 3B – 1C, 2C, 3C) e cada reação de PCR foi realizada em triplicata. As amostras de DNA que compuseram os *pools* 1, 2 e 3 eram de diferentes doadores e cada *pool* era formado por 10 amostras de DNA sendo 1 amostra RhD positivo e 9 amostras RhD negativo (Figura 11).

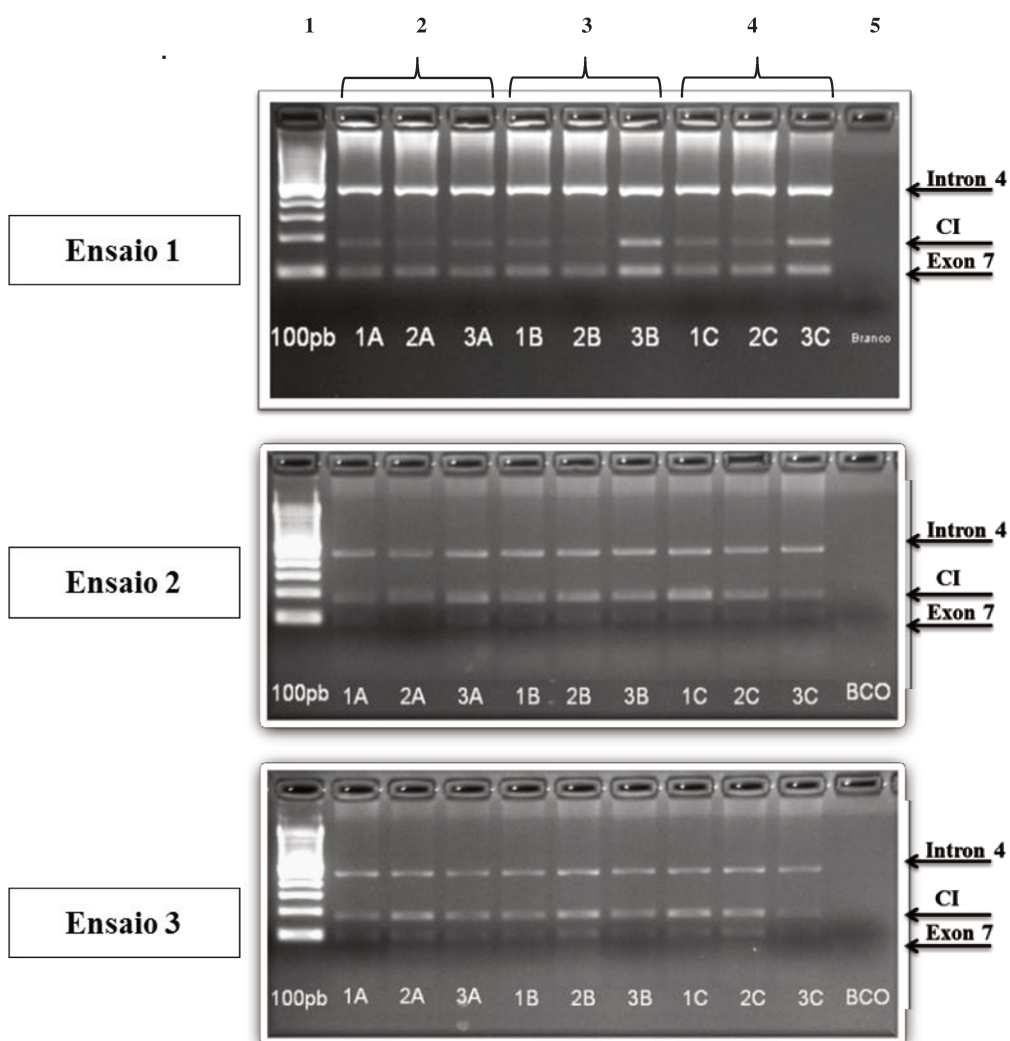


Figura 11a: Ensaio de PCR realizados em triplicata (1º ensaio) utilizando 3 *pools* de DNA diferentes. PCR- Multiplex para genotipagem *RHD*. Pista 1: marcador molecular de 100pb. Pista 2: amostras 1A , 2A, 3A com genótipo *RHD*+. Pista 3: amostra 1B , 2B, 3B com genótipo *RHD*+. Pista 4: amostras 1C , 2C, 3C com genótipo *RHD*+. Pista 5: branco.

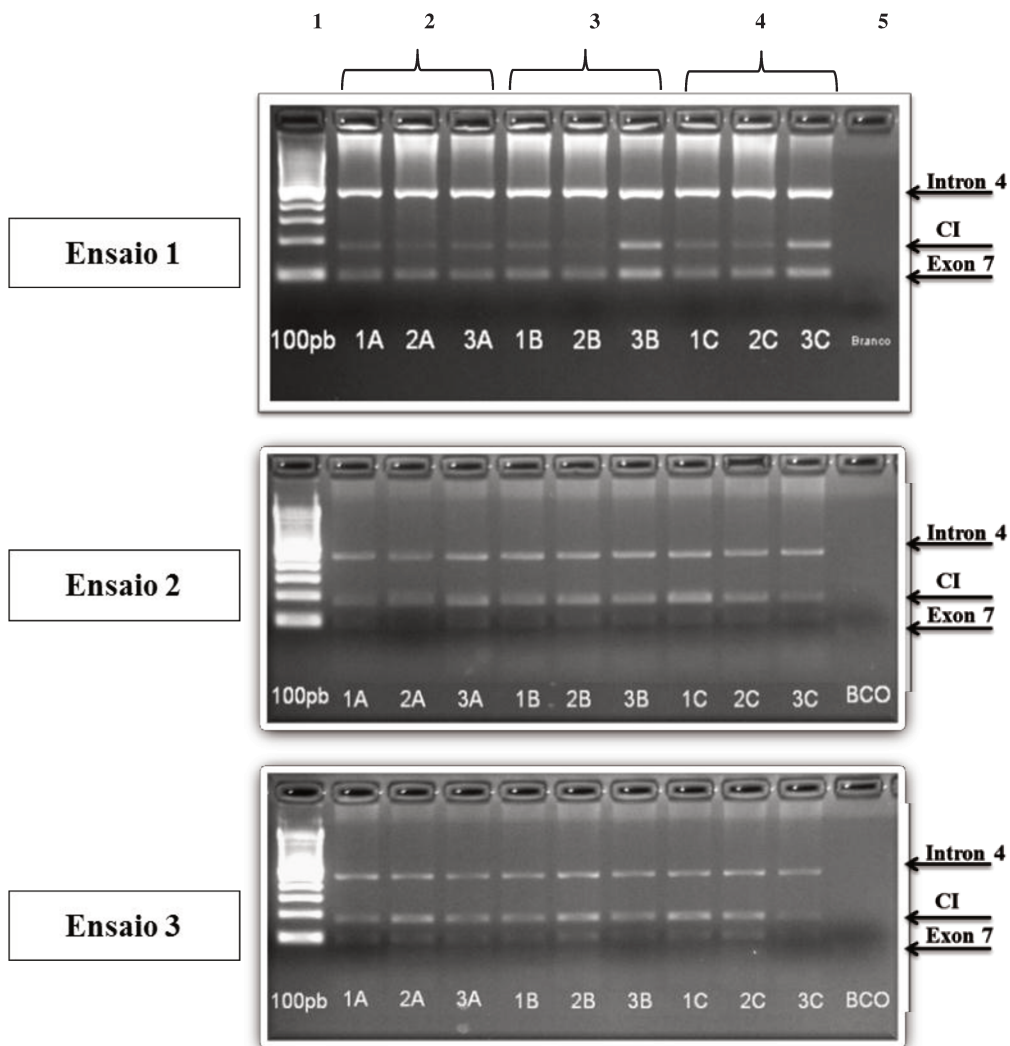


Figura 11b: Ensaios de PCR realizados em triplicata (2º ensaio) utilizando 3 *pools* de DNA diferentes. PCR- Multiplex para genotipagem *RHD*. Pista 1: marcador molecular de 100pb. Pista 2: amostras 1A , 2A, 3A com genótipo *RHD*+. Pista 3: amostra 1B , 2B, 3B com genótipo *RHD*+. Pista 4: amostras 1C , 2C, 3C com genótipo *RHD*+. Pista 5: branco.

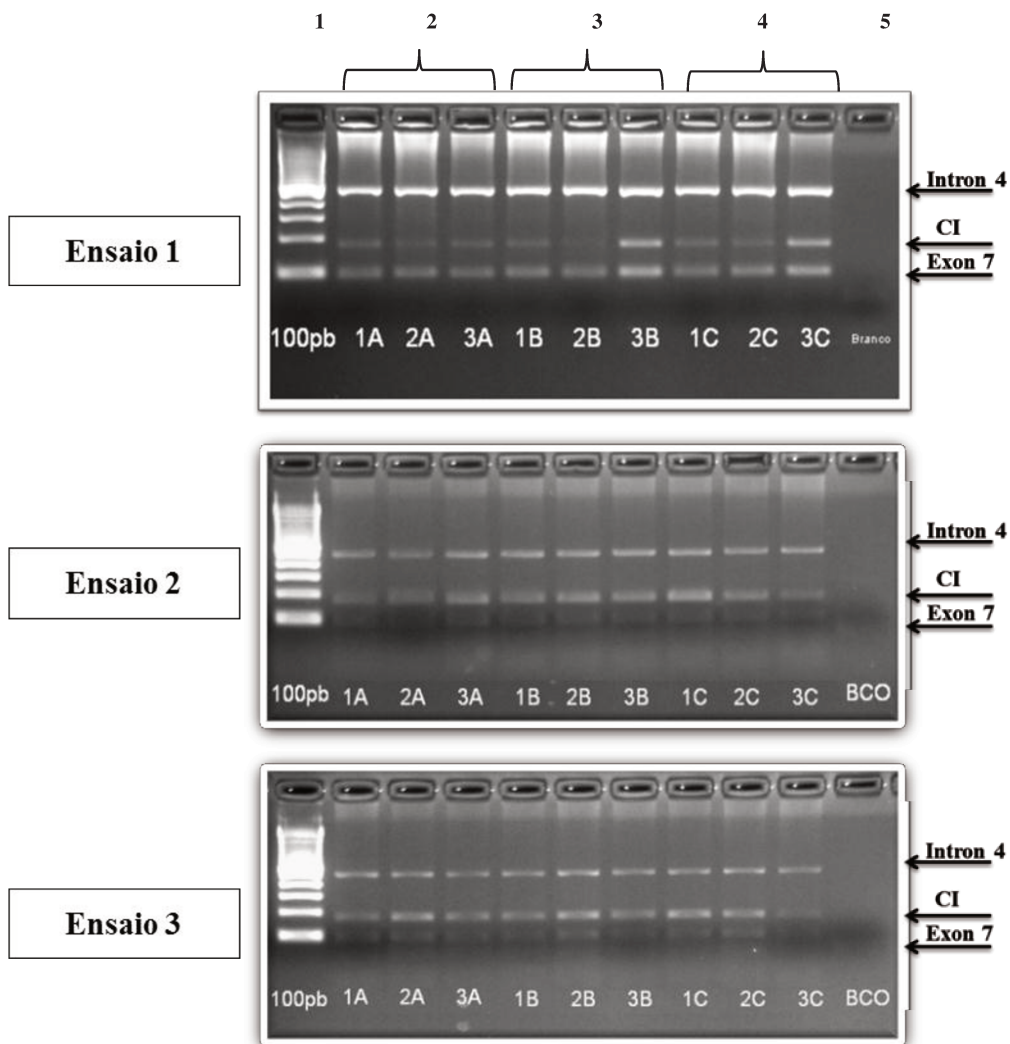


Figura 11c: Ensaios de PCR realizados em triplicata (3º ensaio) utilizando 3 *pools* de DNA diferentes. PCR- Multiplex para genotipagem *RHD*. Pista 1: marcador molecular de 100pb. Pista 2: amostras 1A , 2A, 3A com genótipo *RHD*+. Pista 3: amostra 1B , 2B, 3B com genótipo *RHD*+. Pista 4: amostras 1C , 2C, 3C com genótipo *RHD*+. Pista 5: branco.

7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para determinação do gene *RHD*.

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou-se 1 µL de DNA de cada doador, 0,4 µL de cada *primer*, 1 µL de dNTPs, 0,5 µL de Taq DNA polimerase e tampão para um volume final de 30 µL quando a reação foi constituída de um *pool* de 10 amostras, 25 µL quando a reação foi constituída de um *pool* de 5 amostras e 21 µL nas reações de PCR individuais.

Todas as reações de PCR incluíram um protocolo padrão com variações na temperatura de anelamento e o número de ciclos descritos na tabela 7 realizados em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (PE Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). A análise final do tamanho dos fragmentos obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

7.1. Genotipagem *RHD*

Os genes *RHD* e *RHCE* apresentam alta homologia, portanto a estratégia utilizada na genotipagem *RHD* considerou as diferenças existentes entre eles em duas regiões genômicas: intron 4 e éxon 7. No intron 4, o gene *RHCE* possui 600 pb a mais do que o gene *RHD*, enquanto que na região 3' não traduzida do éxon 7, o gene *RHD* possui 47 pb a mais do que o gene *RHCE*. Assim, foram utilizados *primers* que permitiram determinar a presença do gene *RHD*, pela análise direta do produto de PCR, após eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Figura 12). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na tabela 1.

7.2. Genotipagem *RHCEC/c**

A genotipagem *RHCE**C/c e a determinação do pseudogene *RHD* foram realizadas utilizando-se uma técnica de PCR Multiplex que permite a

amplificação dos alelos *RHCE**C/c na presença do gene *RHD* e a detecção da duplicação de 37pb no gene *RHD* conhecida como pseudogene *RHD* ou *RHD** Ψ (SINGLETON et. al.,2000) (Figura 12). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na tabela 1.

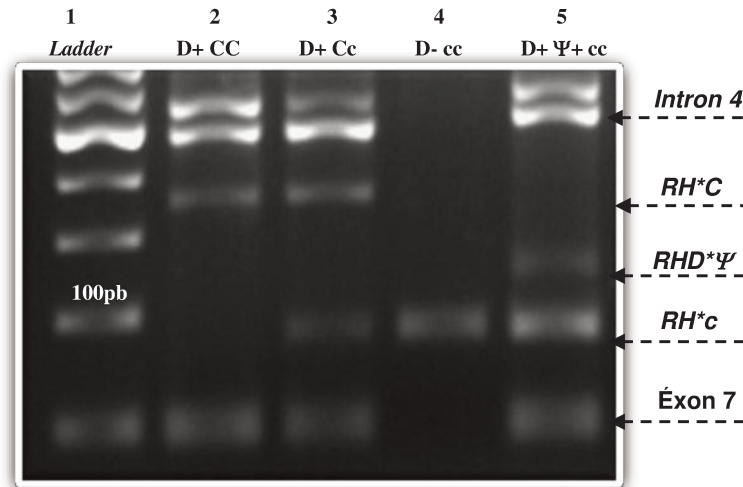


Figura 12: PCR- Multiplex para genotipagem *RHD*,*RHCE**Cc e *RHD** Ψ . Pista 1: marcador molecular de 100pb. Pista 2: amostra com genótipo *RHD*+/*RHCE**CC. Pista 3: amostra com genótipo *RHD*+/*RHCE**Cc. Pista 4: amostra com genótipo *RHD*-/*RHCE**cc. Pista 5: amostra com genótipo *RHD*/*RHD** Ψ /*RHCE**cc.

7.3. Genotipagem *RHD* para caracterização molecular dos alelos *RHD**fraco e *RHD**parcial HMi

A caracterização dos alelos *RHD**fraco e *RHD**HMi foi realizada utilizando-se uma técnica de PCR-AS (MULLER et al.,2001) e técnica de PCR-RFLP (WAGNER et al.,1999) com o objetivo de identificar os tipos do antígeno RhD fraco que ocorrem com maior frequência e detectar o antígeno RhD parcial HMi que pode apresentar fraca reatividade sorológica semelhante ao RhD fraco. A reação de PCR e os protocolos utilizados foram previamente descritos (MULLER et al., 2001). A análise final dos produtos de PCR obtidos foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 1,5% e 2%. (Figuras 13a, 13b, 13c, 13d, 13e, 13f). As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na tabela 2.

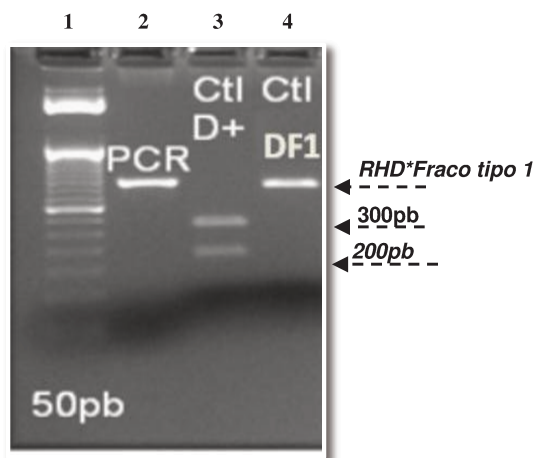


Figura13a: PCR RFLP para genotipagem *RHD*fraco* tipo 1. Pista 1: marcador molecular 50pb. Pista 2: PCR. Pista 3: Controle *RHD+*. Pista 4: Controle *RHD*fraco* tipo 1

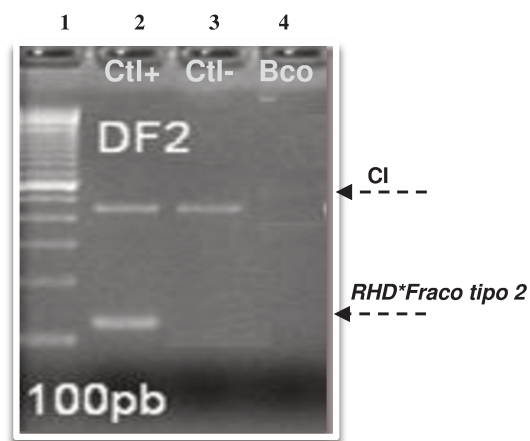


Figura13b: PCR-AS para genotipagem *RHD*fraco* tipo 2. Pista 1: marcador molecular 100pb. Pista 2: Controle *RHD+*. Pista 3: Controle *RHD*fraco* tipo 2. Pista 4: branco

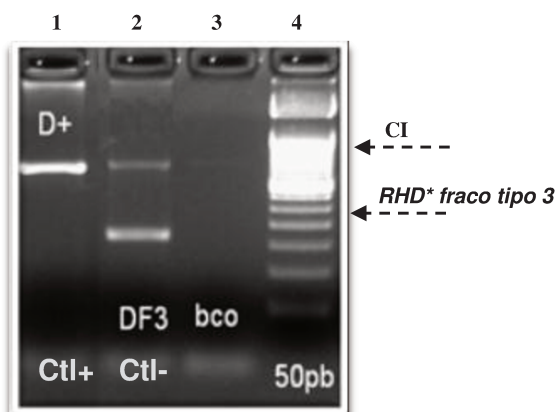


Figura13c: PCR-AS para genotipagem *RHD*fraco* tipo 3. Pista 1: marcador molecular 50pb. Pista 2: Controle *RHD+*. Pista 3: Controle *RHD*fraco* tipo 3. Pista 4: branco

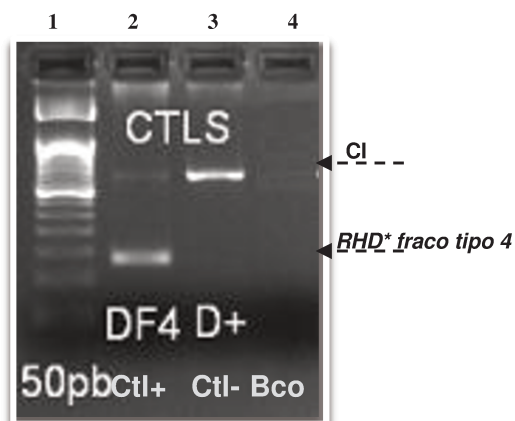


Figura13d: PCR-AS para genotipagem *RHD*fraco* tipo 4. Pista 1: marcador molecular 50pb. Pista 2: Controle *RHD+*. Pista 3: Controle *RHD*fraco* tipo 4. Pista 4: branco

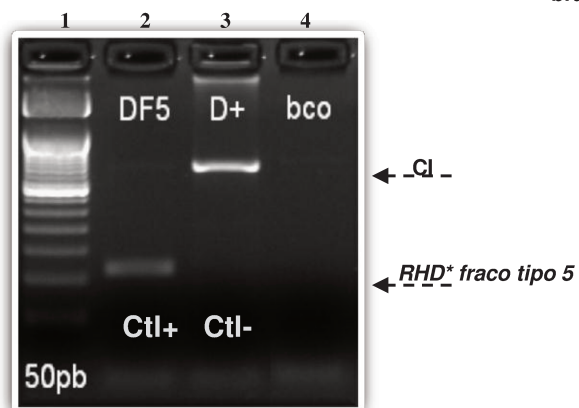


Figura13e: PCR-AS para genotipagem *RHD*fraco* tipo 5. Pista 1: marcador molecular 50pb. Pista 2: Controle *RHD+*. Pista 3: Controle *RHD*fraco* tipo 5. Pista 4: branco

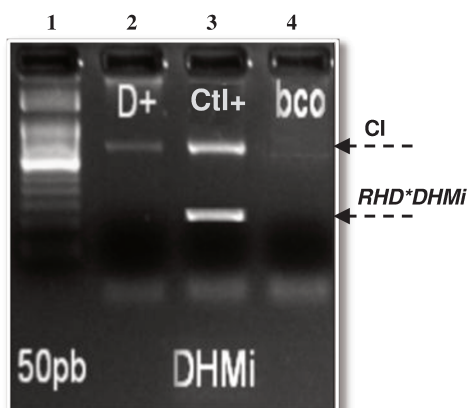


Figura13f: PCR-AS para genotipagem *RHD*HMi*. Pista 1: marcador molecular 50pb. Pista 2: Controle *RHD+*. Pista 3: Controle *RHD*HMi*. Pista 4: branco

7.4. Genotipagem *RHD*1227G>A*

Para identificação da mutação *RHD*1227A*, mais frequentemente encontrada entre os fenótipos Del já descritos utilizou-se a técnica de PCR-AS previamente descrita por **CHEN et al., 2004**. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 14). As sequências dos *primers* estão descritas na tabela 5.

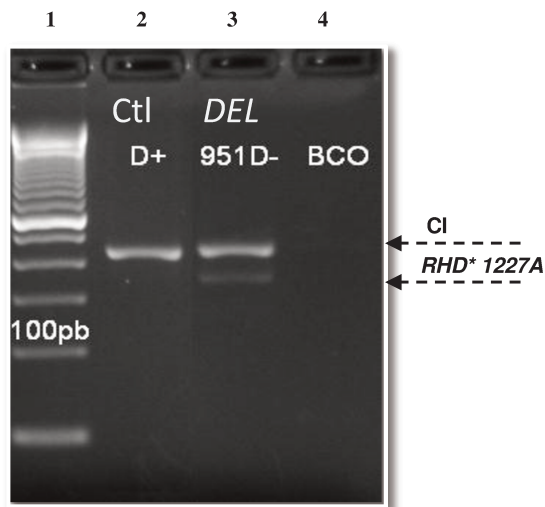


Figura 14: PCR-AS para genotipagem *RHD*DEL1*. Pista 1: marcador molecular de 100pb. Pista 2: amostra com genótipo *RHD+*. Pista 3: amostra com genótipo *RHD*DEL*. Pista 4: branco.

7.5. Genotipagem para caracterização molecular das variantes *RHD* híbridas (*RHD*D-CE-D*)

A caracterização molecular dos genes híbridos *RHD*D-CE-D* foi realizada pela técnica de PCR Multiplex (**MAASKANT-VAN WIJK et al., 1998**) que amplifica 6 éxons específicos do gene *RHD* (éxons 3, 4, 5, 6, 7 e 9) (Figura 15). As sequências dos *primers* utilizados estão descritas na tabela 3.

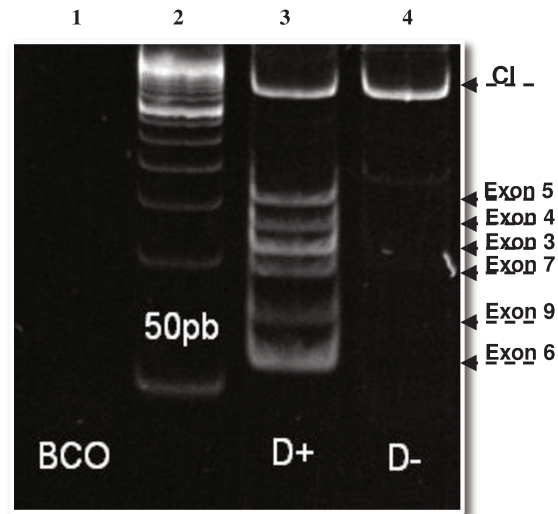


Figura 15: PCR-Multiplex para genotipagem *RH*D-CE-D*. Pista 1: branco. Pista 2: marcador molecular de 50pb. Pista 3: amostra com genótipo *RHD+*. Pista 4: amostra com genótipo *RHD-*.

7.6. Genotipagem *RH*CE/hex3*

Das 1.500 amostras de doadores de sangue voluntários de São Paulo e região que foram fenotipadas como RhD-negativo, 35 (2,3%) apresentaram o antígeno C. Como a presença do antígeno C em indivíduos fenotipados como RhD-negativo pode estar associada ao gene híbrido *RH*D-CE-D* que silencia a expressão do gene *RHD* e leva ao fenótipo (C)ce^s (r^{ss}) estas amostras foram analisadas individualmente por um PCR específico que amplifica o éxon 3 do gene *RHD*.

A caracterização molecular do éxon 3 (hex3) híbrido, do gene *RHD*D-CE(3-7)-D*, foi realizada utilizando a técnica de PCR-Multiplex descrita por **MARTINE et al., 2002** com *primers* específicos para amplificar o éxon 3 do gene *RHCE*. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 16). As sequências dos *primers* estão descritas na tabela 4.

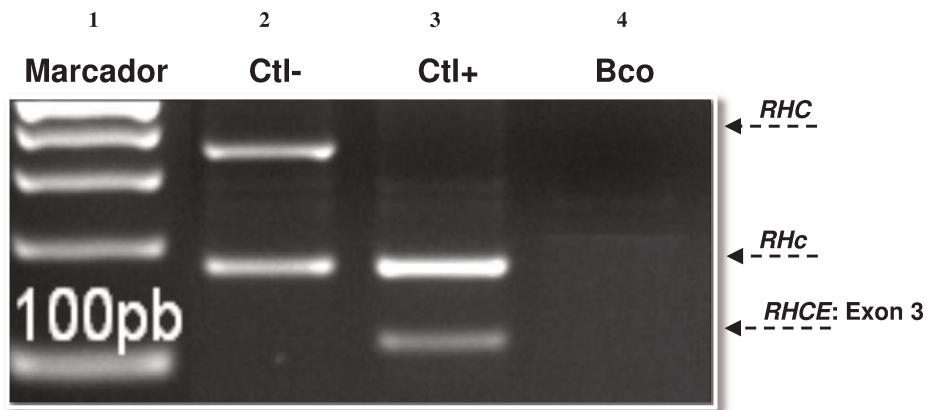


Figura 16: PCR-Multiplex para genotipagem do éxon 3 híbrido. Pista 1: marcador molecular de 100pb. Pista 2: amostra com genótipo *RHCE*Cc*. Pista 3: amostra com genótipo Exon 3+. Pista 4: branco.

7.7. Zigozidade do gene *RHD*

A zigozidade do gene *RHD* foi determinada em todas as amostras que amplificaram o intron 4 e/ou éxon 7 através da técnica de PCR-RFLP. A análise dos fragmentos foi realizada após eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 17). As sequências dos *primers* estão descritas na tabela 6.

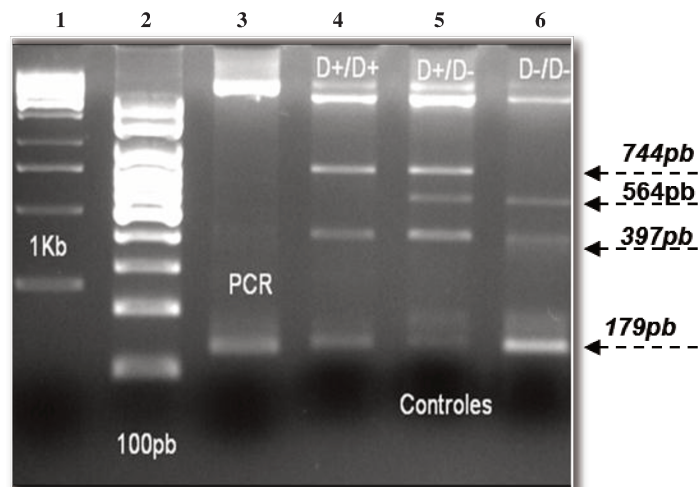


Figura 17: PCR-RFLP para genotipagem zigozidade *RHD*. Pista 1: marcador molecular de 1Kb. Pista 2: marcador molecular de 100pb. Pista 3: PCR. Pista 4: amostra com genótipo homozigoto *RHD*. Pista 5: amostra com genótipo heterozigoto *RHD*. Pista 6: amostra com genótipo *RHD*-.

8. Sequenciamento das amostras não caracterizadas pelo método de PCR convencional

Reações de sequenciamento foram utilizadas para caracterizar as amostras que não foram definidas pelas técnicas de PCR utilizadas. O sequenciamento foi realizado no produto amplificado de DNA genômico utilizando-se *primers* específicos previamente descritos para amplificação dos 10 éxons do gene *RHD* (LEGLER et al., 2001).

Os produtos de PCR foram eluídos do gel de agarose a 1% utilizando-se o kit de extração *Concert rapid gel extraction system* ou purificados direto do tubo de PCR com o auxílio do *Concert rapid PCR purification system* e sequenciados diretamente em ambas direções utilizando-se o reagente Big Dye BD Half-term (GenPak, Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA) em um sequenciador automático (Figura 18).

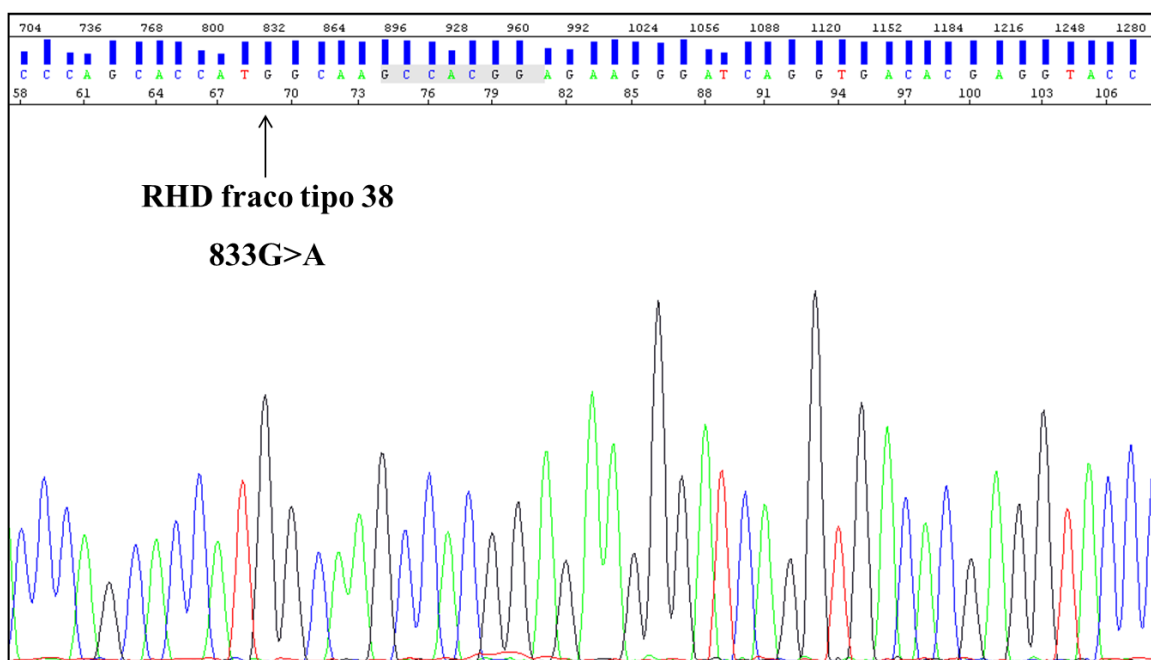
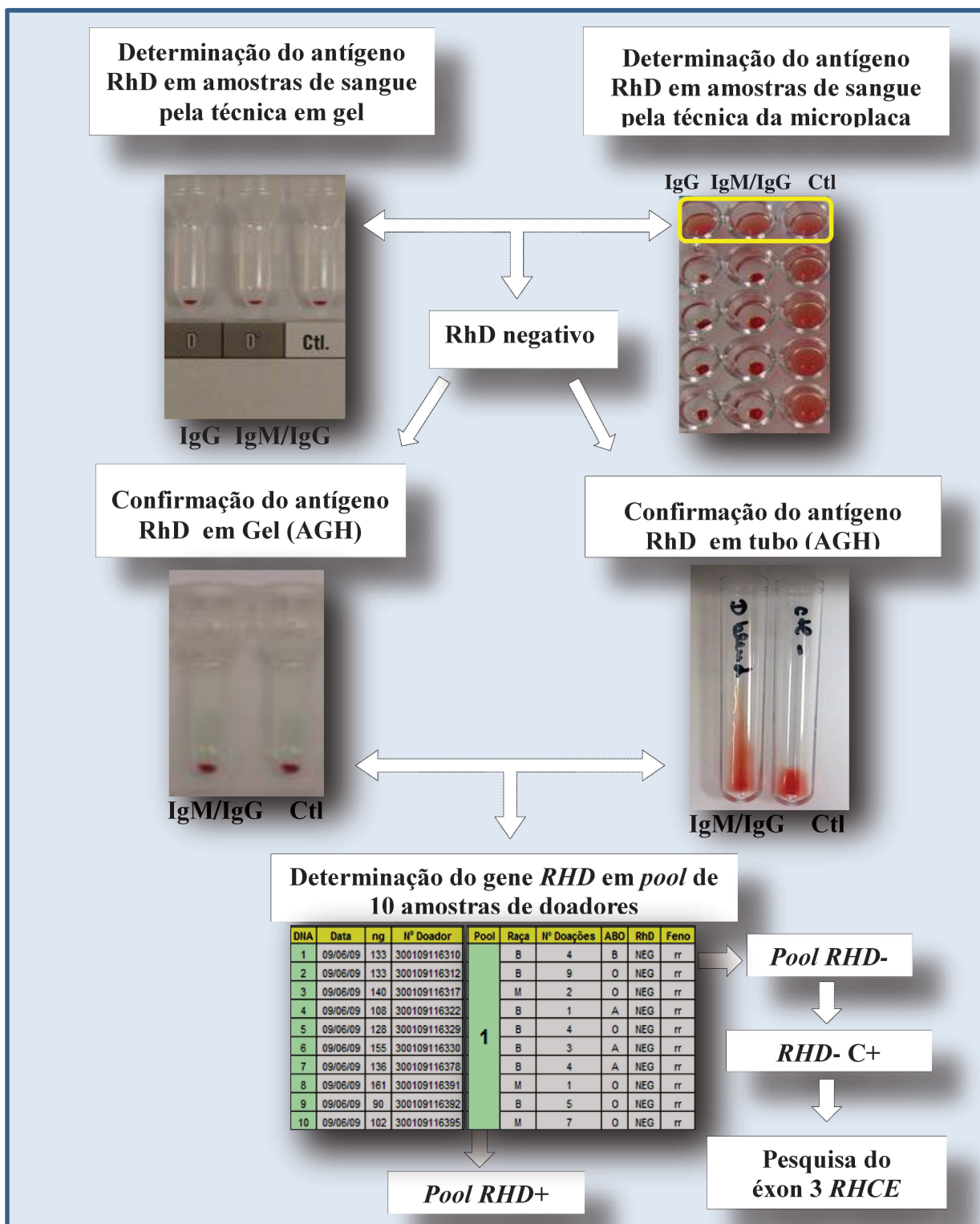


Figura 18: Sequenciamento de uma amostra caracterizada como *RHD**fraco tipo 38

9. Fluxo dos ensaios realizados na caracterização sorológica e molecular de doadores voluntários de sangue (Figura 19a)



10. Desmembramento do *pool*

Os pools de DNA que apresentaram amplificação para o gene *RHD* foram desmembrados inicialmente em 2 *pools* de 5 amostras de DNA denominados A e B. O *pool* positivo foi então aberto para análise molecular individual das amostras, realizando-se as genotipagens *RHD* acima descritas para caracterização da variante presente (Figura 20).

11. Reavaliação sorológica das amostras de doadores caracterizadas pelos métodos moleculares como *RHD* positivo (Figura 20).

11.1. Pesquisa da fraca expressão do antígeno RhD por aglutinação

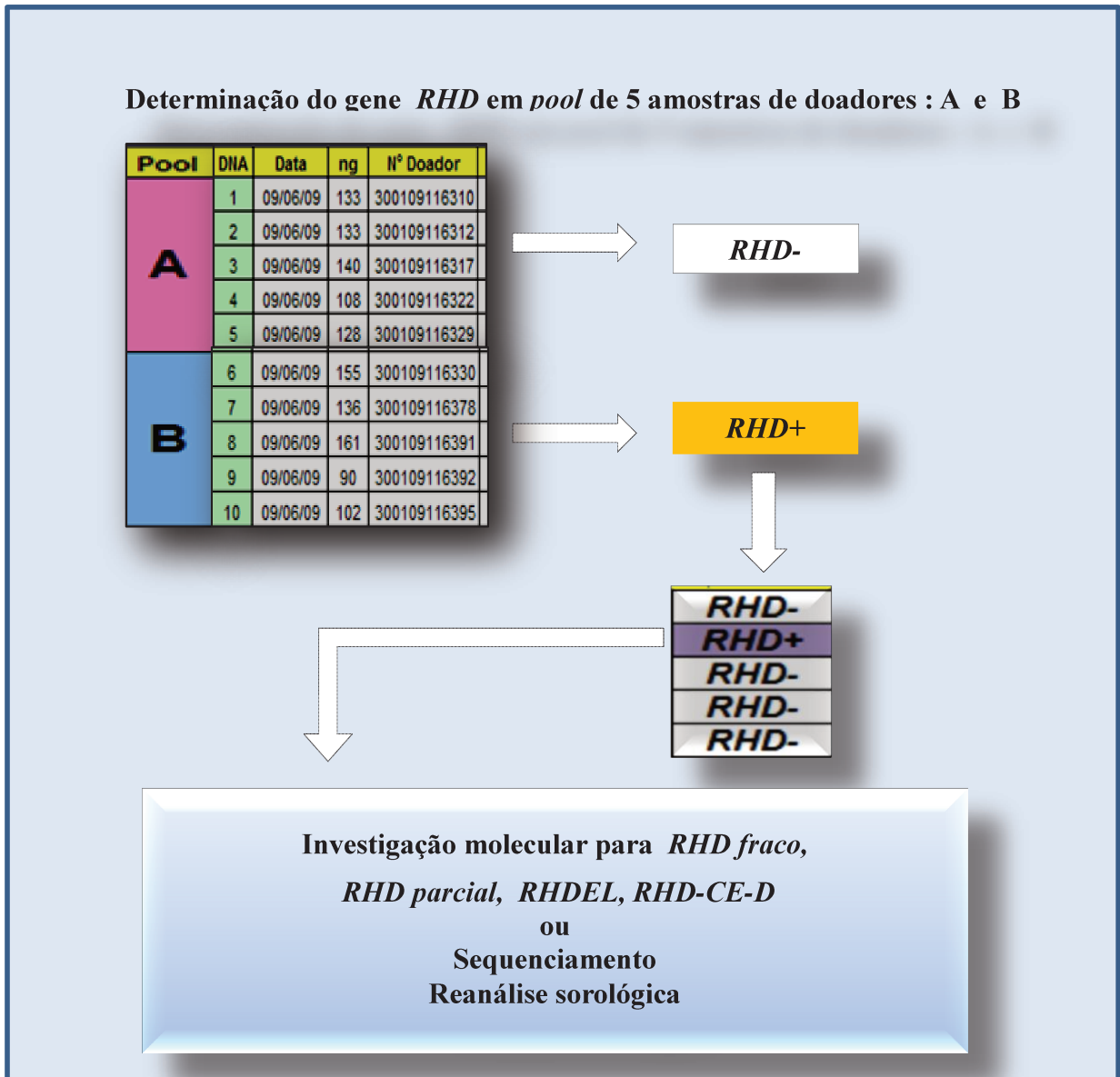
Todas as amostras caracterizadas pelos estudos moleculares como *RHD* positivo (*RHD fraco* ou *RHD*DEL*) foram reavaliadas pelos métodos sorológicos de aglutinação em tubo e em gel utilizando-se o teste indireto da antiglobulina humana e um soro anti-D Monoclonal IgG, clone MS26 (Fresenius Kabi®, Itapecirica da Serra, SP, Brasil)

11.2. Pesquisa da fraca expressão do antígeno RhD por adsorção e eluição

A pesquisa da fraca expressão do antígeno RhD foi realizada pela técnica de adsorção e eluição, utilizando-se 1ml das hemácias do doador, previamente lavadas por três vezes com solução fisiológica 0,9%, e 1mL de anti-D monoclonal IgG clone MS26 (Fresenius Kabi®, Itapecirica da Serra, SP, Brasil). A reação foi incubada a 37°C por 60 minutos e após a incubação, as hemácias foram lavadas seis vezes com solução fisiológica 0,9% e uma vez com a solução de lavagem do kit (DiaCidel) (Diamed® S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil). Paralelamente, uma alíquota do sobrenadante da última lavagem foi guardada para ser testada como controle negativo da reação. Após a adsorção foi realizado o teste direto da antiglobulina nas hemácias do doador e a seguir foi adicionado nesta amostra

teste 1mL da solução de eluição, seguido de homogeneização para obter o eluato. O eluato e o sobrenadante foram testados com as hemácias de triagem I, II e III (Diamed® S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

12. Fluxo utilizado para o desmembramento do *pool* e reavaliação sorológica (Figura 19b)



**13. Fluxo utilizado para o desmembramento sorológico e molecular
(Figura 19c)**

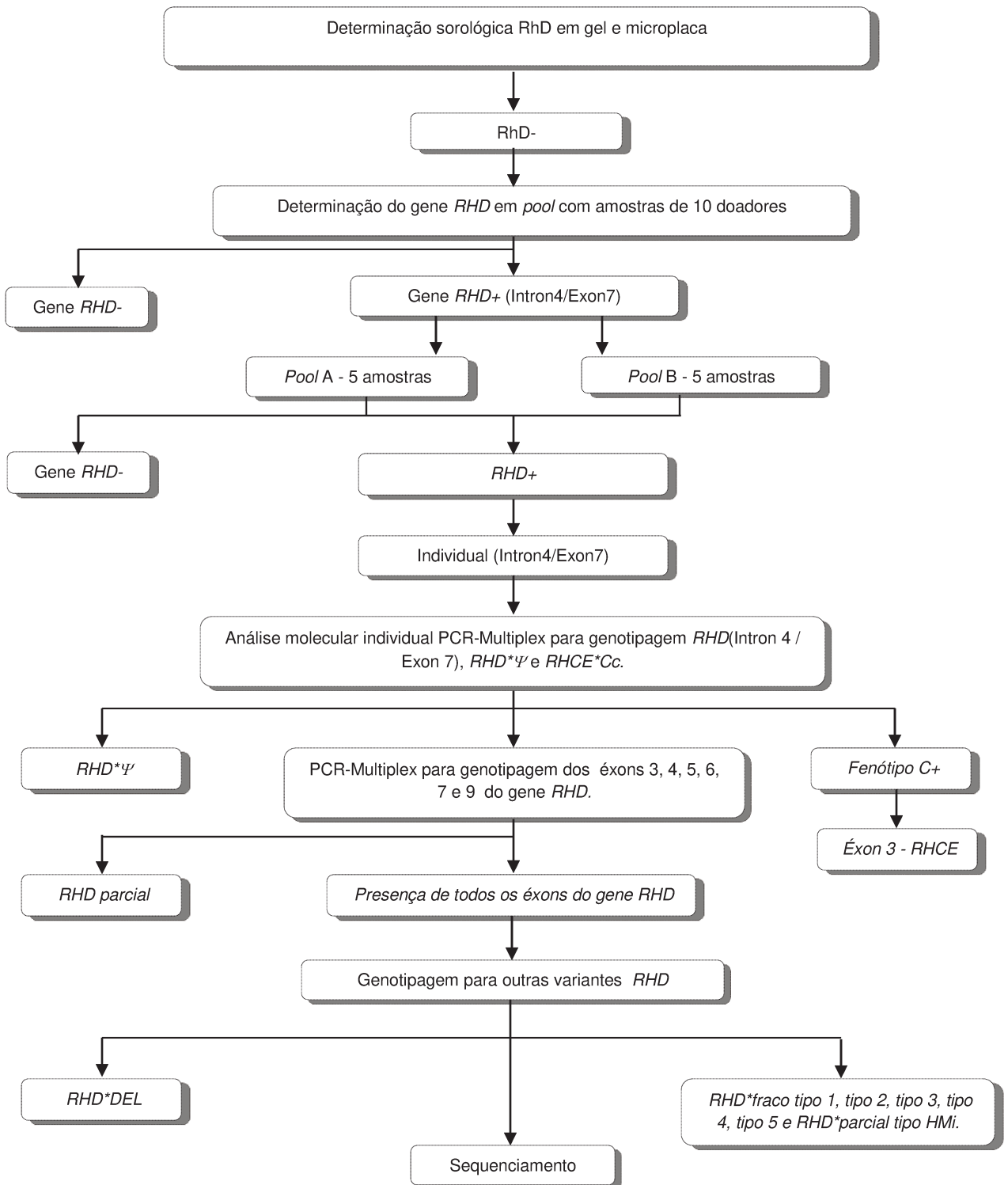


Tabela 1: Sequência e concentração de *primers* utilizados na genotipagem *RHD* (SINGLETON et. al., 2000) e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR convencional.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Concentração (ng/μl)	Especificidade
Exon 7 for	AGCTCCATCATGGGCTACAA	95	100	Éxon7 - <i>RHD</i>
Exon 7 rev	ATTGCCGGCTCCGACGGTATC			
Intron 3 for 1	GGGTTGGGCTGGGTAAGCTCT	498 ou 535	100	Intron 4 - <i>RHD</i>
Intron 4 rev	GAACCTGCTCTGTGAAGTGCT			
Intron 3 / for 2	AACCTGGGAGGCAAATGTT	250	100	Pseudogene - <i>RHD</i>
Exon 4 insert / rev	AATAAAACCCAGTAAGTTCATGTGG			
C for	CAGGGCCACCACCATTTGAA	320	100	<i>RHC</i>
C rev	GAACATGCCACTTCACTCCAG			
c for	TCGGCCAAGATCTGACCG	177	100	<i>RHc</i>
c rev	TGATGACCACCTTCCCAGG			
Beta actina	GCGGGAAATCGTGCGTGACATT	250	100	Controle Interno
	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG			

Tabela 2: Sequência e concentração de *primers* utilizados na pesquisa de variantes *RHD* fraco tipo 1* (WAGNER et al.,1999), *RHD*fraco tipo 2 – 5* e *RHD*HMi* (MULLER et al., 2001) e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR-AS e PCR-RFLP.

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Fragmento (pb)</i>	<i>Concentração (ng/μl)</i>	<i>Especificidade</i>
V270G-F	GAGTGTGATGGGTGCCTAGGATGCTGTGCACCT	153	100	<i>RHD fraco tipo 1</i>
RhD-I6R	CCTGCTGGCCTTCAGCCAAAGCAGAGGAGG			
DF2S	CTCCAAATCTTTTAACATTAAATTATGCATTAAACAGC	126	100	<i>RHD fraco tipo 2</i>
DF2R	GTGAAAAATCTTACCCCAGAAACTTGGTCATC			
DF3S	ACAGAGACGGACACAGGATGAGATG	166	100	<i>RHD fraco tipo 3</i>
DF3R	CTTGATAGGATGCCACGAGCCC			
DF4S	AGACTACCACATGAACATGATGCACA	138	100	<i>RHD fraco tipo 4</i>
DF4R	CAGACAAACTGGGTATCGTTGCTC			
DF5S	GGTGCTGGTGGAGGTGACGGA	112	100	<i>RHD fraco tipo 5</i>
DF5R	GAGCTTTTGGCCCTTTTCTCCC			
DHMiF	AGGAGGCGTGGCTGTGGCTAT	108	100	<i>RHDHMi</i>
DHMiR	GGTACTTGGCTCCCCCGAC			
HGH5580	TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA	434	100	Controle Interno
HGH5967	CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC			

Tabela 3: Sequência e concentração de *primers* utilizados na pesquisa de variantes *RHD*parcial* (MAASKANT-VAN WIJK et al.,1998) e tamanho em pares de base (pb) dos fragmentos obtidos por PCR Multiplex.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Concentração (ng/μl)	Especificidade
R364	TCGGTGCTGATCTCAGTGGA	111	100	Éxon 3
R474M	ACTGATGACCATCCTCATGT			
R496	CACATGAACATGATGCACA	126	100	Éxon 4
R621	CAAACGGGGTATCGTTGCTG			
R648	GTGGATGTTCTGGCCAGTT	157	100	Éxon 5
Rex5AD2	CACCTTGCTGATCTTACC			
R898M	GTGGCTGGGCTGATCTACG	57	100	Éxon 6
Rex6AD3	TGTCTAGTTTCTTACCGGCAAGT			
R973	AGCTCCATCATGGGCTACAA	96	100	Éxon 7
R1068	ATTGCCGGCTCCGACGGTATC			
Rex9SD2	AACAGGTTTGCTCCTAAATATT	71	100	Éxon 9
R1219M	AAACTTGGTCATCAAAATATTAACT			

Tabela 4: Sequência e concentração de *primers* utilizados na genotipagem da variante r^s (MARTINE et al.,2002) e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Concentração (ng/μl)	Especificidade
R364	TCGGTGCTGATCTCAGTGGA	111	100	Exon 3 - RHCE
R474mmC	ACTGATGACCATCCTCATGG			

Tabela 5: Sequência e concentração de *primers* utilizados na genotipagem *RHD*DEL* (CHEN et al.,2004) e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Concentração (ng/μl)	Especificidade
E9s-3	GATGACCAAGTTTTCTGGAAA	348	100	<i>RHDEL</i>
In9as-3 / rev	GTTCTGTCACCCGCATGTCAG			

Tabela 6: Sequência e concentração de *primers* utilizados na determinação da zigozidade do gene *RHD* (LEGLER et al.,2001) e tamanho em pares de base (pb) do fragmento obtido por PCR convencional.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (pb)	Concentração (ng/μl)	Especificidade
Rez7	CCTGTCCCCATGATTGAGTTACC	3.029	100	Zigozidade <i>RHD</i>
Rnb31	CCTTTTTTGTGTTGTTTTGGCGGTGC			

Tabela 7: Variações de temperatura e número de ciclos das técnicas de PCR utilizadas

Genotipagem	Temperatura de anelamento	Nº de ciclos
PCR-Multiplex	1minuto a 94°C , 1 minuto a 65,5°C , 3 minutos e 30 segundos a 72°C	30
PCR-SSP	20 segundos a 94°C, 20 segundos a 62°C, 20 segundos a 72°C	35
PCR-RFLP	30 segundos a 94°C, 30 segundos 62°C, 30 segundos a 72°C	35
Zigozidade <i>RHD</i>	1minuto a 95°C , 1 minuto a 57°C , 45 segundos a 72°C	40

RESULTADOS

A. CONSTITUIÇÃO DO *POOL* UTILIZADO PARA A GENOTIPAGEM *RHD*

A estratégia para a realização da genotipagem *RHD* em doadores de sangue fenotipados como RhD negativo foi baseada na amplificação do intron 4 e éxon 7 do gene *RHD* em uma única reação utilizando-se *pools* de DNA.

Durante a fase de padronização, verificamos que o *pool* poderia ser constituído por 10 ou 20 amostras contendo no mínimo 50ng/μL de DNA. Obtivemos resultados satisfatórios com ambos os *pools*, ou seja, conseguimos amplificar o gene *RHD* quando tínhamos apenas uma amostra de DNA *RHD*⁺ no *pool* de 10 e de 20 amostras. Optamos pela utilização do *pool* de 10 amostras de DNA devido a maior rapidez na sua constituição e por uma questão de logística do estoque de sangue RhD negativo. A **Figura 20** mostra o resultado do *pool* de 10 amostras de DNA em uma análise de 100 doadores. Como podemos observar após o marcador molecular, os *pools* 1 e 2 são controles (positivo e negativo), e os *pools* 3 e 8 são considerados positivos, ou seja mostram amplificação do gene *RHD*.

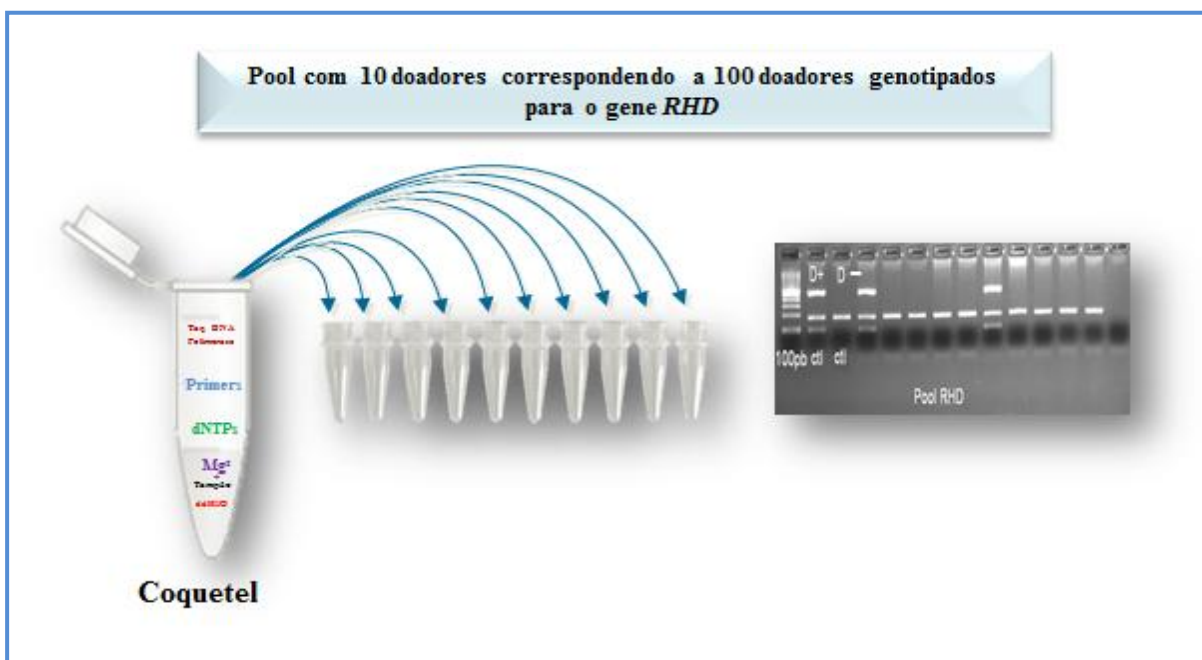


Figura 20: Amplificação do intron 4 e éxon 7 do gene *RHD* em *pool* de 10 amostras de DNA. Presença do gene *RHD* nos *pools* 3 e 8.

B. IDENTIFICAÇÃO DO GENE *RHD* EM DOADORES DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO

A caracterização molecular do gene *RHD* foi realizada em 2.450 amostras de DNA, sendo 1.500 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue de São Paulo e região e 950 amostras de DNA de doadores voluntários de sangue de Recife e região.

As 2.450 amostras de DNA constituíram 245 *pools* (150 HIAE e 95 HEMOPE) e destes, 71 apresentaram a amplificação do intron 4 e/ou éxon 7 do gene *RHD*. Todos os *pools* positivos foram desmembrados para identificação das amostras que apresentavam o gene *RHD*. Estas amostras foram individualmente estudadas por diferentes técnicas moleculares para caracterização do gene inativo ou da variante *RHD* presente.

Das 2.450 amostras estudadas, 101 foram molecularmente caracterizadas como *RHD* positivo (4.1%) e apresentaram o gene *RHD* em heterozigose. O pseudogene *RHD* (*RHD*Ψ*) foi identificado em 78 (3,18%) amostras e os genes híbridos *RHD*D-CE-D* foram detectados em 4 (0,16%) amostras. O pseudogene *RHD* e genes híbridos *RHD*D-CE-D* caracterizam genes *RHD* inativos, ou seja, responsáveis por fenótipos RhD-negativo. Quatorze amostras (0,57%) foram caracterizadas como *RHD*D* fraco e 5 (0,20%), como *RHD*DEL*. Os alelos *RHD*D* fraco e *RHD*DEL* caracterizam genes *RHD* ativos, ou seja, responsáveis pelo fenótipo RhD positivo com fraca expressão. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 21**.

Quando avaliamos os resultados da genotipagem *RHD*, verificamos que 36 doadores de São Paulo e 46 de Recife apresentavam um gene *RHD* inativo (*RHD*Ψ* e *RHD*D-CE-D*). Com relação aos 19 doadores que continham os alelos responsáveis pela expressão de um antígeno RhD fraco ou RhDel, 11 eram de São Paulo e 8 de Recife.

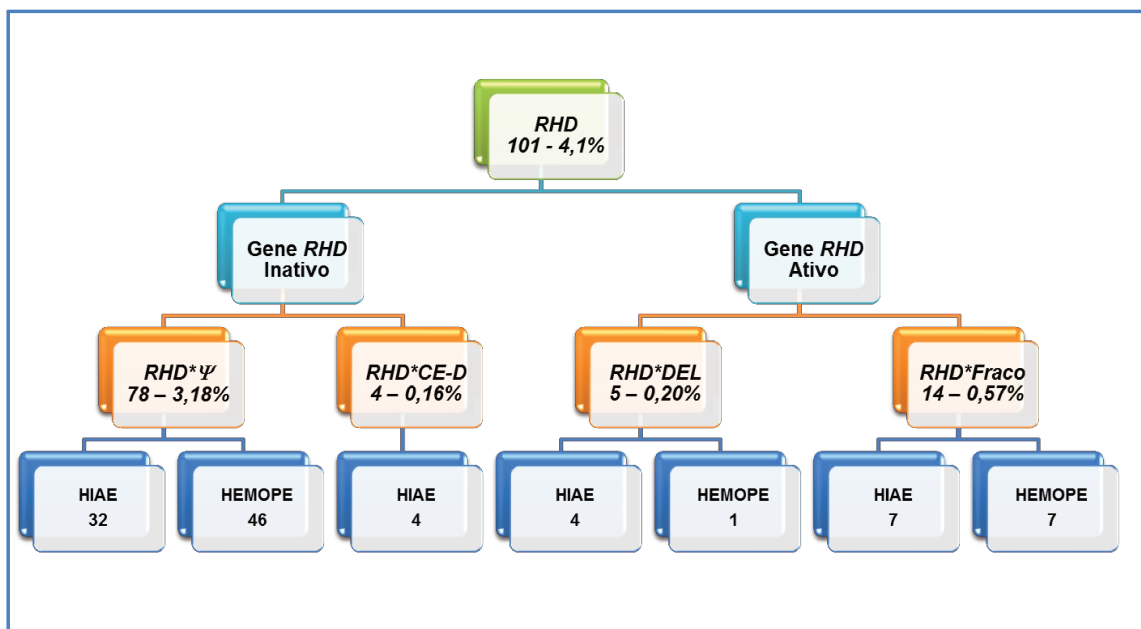


Figura 21. Resultado molecular nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.

C. CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES *RHD* EM AMOSTRAS DE DNA DE DOADORES DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO

1. Caracterização molecular dos genes híbridos *RHD*D-CE-D*

Nossos resultados demonstraram que 4 (0,16%) das amostras fenotipadas como RhD negativo apresentavam genes híbridos *RH*D-CE-D*. Destas, 1 amostra foi caracterizada como *RHD*D-CE(2-9)-D* e 3 como *RHD*CE(3-7)D*. A presença destes genes híbridos silencia a expressão do gene *RHD*. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 22**.

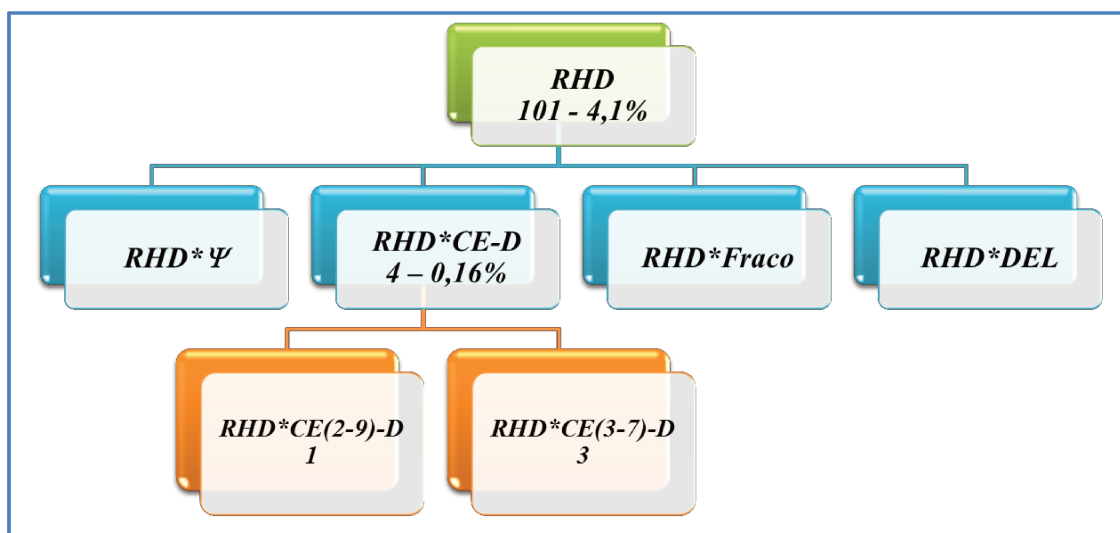


Figura 22. Caracterização molecular dos genes híbridos *RH*D-CE-D* nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.

2. Caracterização molecular dos tipos de *RHD*fraco*

Os resultados da genotipagem do gene *RHD* em doadores voluntários de sangue demonstraram que 0,57% das amostras fenotipadas como RhD negativo eram *RHD*fraco* e o gene *RHD* encontrava-se em heterozigose.

A caracterização molecular e a frequência dos tipos de RhD fraco detectados na população estudada encontram-se na **Figura 23**.

3. Caracterização molecular das variantes *RHD* DEL*

Todas as 5 (0,20%) amostras identificadas molecularmente como *RHD*DEL* eram heterozigotas para o gene *RHD* e apresentaram um polimorfismo de único nucleotídeo (1227G>A) em região de sítio de *splice* que determina o alelo *RHD*DEL* 1. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 24**.

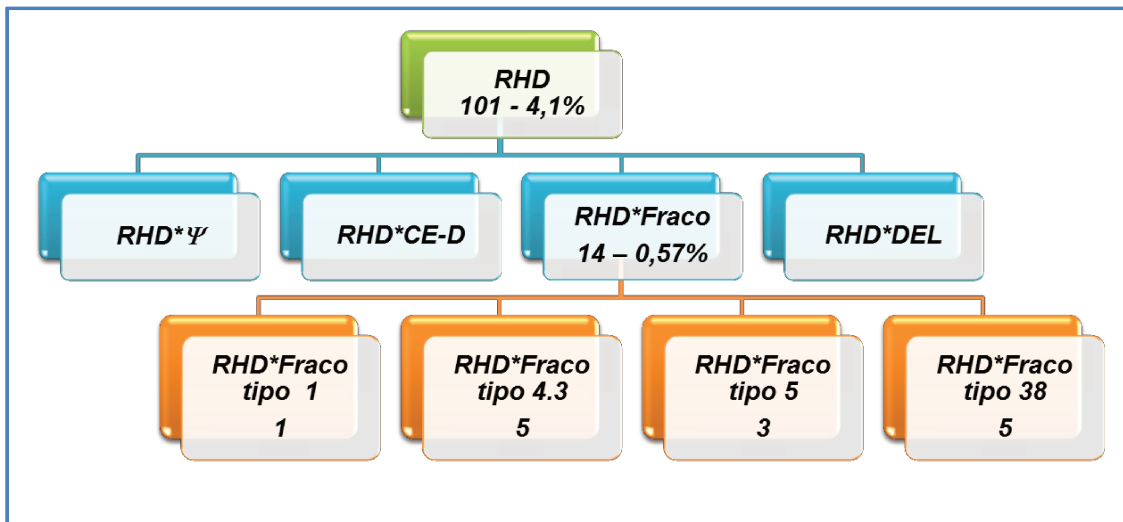


Figura 23. Caracterização molecular dos tipos de *RHD*fraco* encontrados nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.

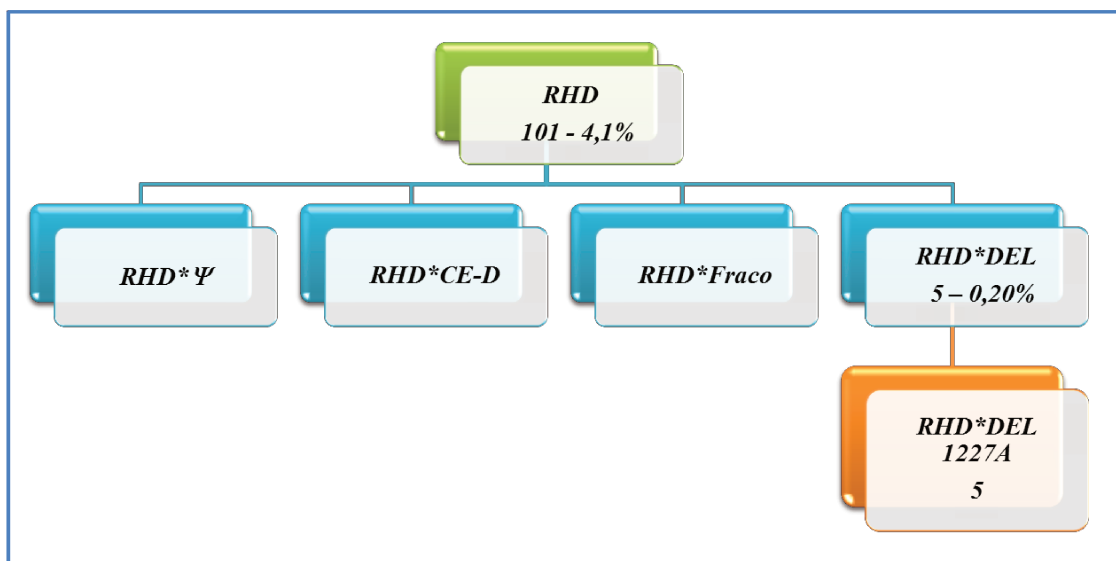


Figura 24. Caracterização molecular das variantes *RHD*DEL* encontradas nas amostras de doadores voluntários de sangue fenotipados como RhD negativo.

4. Associação dos tipos de variantes *RHD* com os haplótipos *RH*

Os tipos de variantes *RHD* identificados foram associados aos haplótipos *RH* determinados molecularmente em 101 amostras. Os resultados demonstram que o pseudogene *RHD*ψ* está frequentemente associado ao haplótipo *ce*. O gene *RHD*D-CE(2-9)-D* ao haplótipo *Ce* em posição trans e, o gene *RHD*D-CE(3-7)-D* associado ao haplótipo *(C)ce^s*. Os alelos *RHD*DEL*, *RHD*fraco tipo 1* e *RHD*fraco D tipo 38* encontram-se associados ao haplótipo *Ce*, o alelo *RHD*fraco D tipo 4.3* está associado ao haplótipo *ce* e o alelo *RHD*fraco D tipo 5* ao haplótipo *cE*. Os resultados obtidos encontram-se na **tabela 8**.

Tabela 8. Associação dos tipos de variantes *RHD* com os haplótipos *RH*

Alelo <i>RHD</i>	N (%)	Polimorfismos detectados	Haplótipo associado
<i>RHD*ψ</i>	78 (3.2)	Inserção de 37-pb	<i>ce</i>
<i>RHD*D-CE(2-9)-D</i>	1 (0.04)	CE exons 2-9	<i>Ce trans</i>
<i>RHD*D-CE(3-7)-D</i>	3 (0.1)	CE exons 3-7	<i>(C)ce^s</i>
<i>RHD*DEL</i>	5 (0.2)	1227G>A	<i>Ce</i>
<i>RHD*fraco D tipo 1</i>	1 (0.04)	809T>C	<i>Ce</i>
<i>RHD*fraco D tipo 4.3</i>	5 (0.2)	602 C>G, 667 T>G, 819 G>A, 872 C>G	<i>ce</i>
<i>RHD*fraco D tipo 5</i>	3 (0.1)	446C>A	<i>cE</i>
<i>RHD*fraco D tipo 38</i>	5 (0.2)	833 G>A	<i>Ce</i>

D. ALELOS *RHD* IDENTIFICADOS ENTRE OS DOADORES DE SANGUE RhD-NEGATIVO E RESULTADOS SOROLÓGICOS

A análise sorológica foi novamente realizada em todas as amostras de sangue dos doadores fenotipados inicialmente como RhD-negativo e que apresentaram variantes do gene *RHD* (RhD fraco e RhDel). Nove amostras caracterizadas molecularmente como D fraco foram identificadas na reavaliação sorológica pelo teste indireto da antiglobulina humana em gel (gel/AGH) como RhD-positivo e como RhD-negativo em tubo/AGH. Os fenótipos RhD fraco tipo 4.3 e RhDel foram detectados somente por adsorção e eluição. A tabela 9 mostra os alelos *RHD* identificados entre os doadores RhD-negativo e os resultados da reavaliação sorológica.

Tabela 9. Alelos *RHD* e resultados da reavaliação sorológica

<i>Alelo RHD</i>	Gel/AGH	Tubo/AGH	Adsorção/Eluição
<i>RHD*ψ</i>	-	-	NR
<i>RHD*D-CE(2-9)-D</i>	-	-	NR
<i>RHD*D-CE(3-7)-D</i>	-	-	NR
<i>RHD*DEL</i>	-	-	+
<i>RHD*fraco D tipo 1</i>	+	-	+
<i>RHD*fraco D tipo 4.3</i>	-	-	+
<i>RHD*fraco D tipo 5</i>	+	-	+
<i>RHD*fraco D tipo 38</i>	+	-	+

NR – Não Realizado

E. SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS

A determinação dos 4 alelos híbridos, *RHD*-CE(2-9)-D* e *RHD*-CE(3-7) D*, dos 5 *RHD*fraco tipo 4.3* e das 5 *RHD*fraco tipo 38* foram realizadas através de sequenciamento.

F. ALOIMUNIZAÇÃO

Em cinco pacientes RhD-negativo que receberam as unidades de sangue caracterizadas como RhD fraco ou RhDel pelo teste molecular, foi possível realizar a rastreabilidade das unidades transfundidas bem como o seguimento pós transfusão com a pesquisa de anticorpo irregular. Foi possível observar que um paciente que recebeu uma unidade de sangue com o fenótipo RhD fraco tipo 1 desenvolveu um alo anti-D. Outra paciente que recebeu uma unidade de sangue com o fenótipo RhD fraco tipo 4.3, também desenvolveu um anticorpo anti-D, duas semanas após a transfusão.

DISCUSSÃO

A. GENOTIPAGEM *RHD* UTILIZANDO *POOLS* DE DNA EM DOADORES VOLUNTÁRIOS DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO

Considerando a complexidade da fenotipagem RhD devido ao grande número de variantes existentes, tem se buscado métodos alternativos para confirmação do fenótipo RhD-negativo. Um dos métodos mais utilizados é a genotipagem que analisa a presença do gene *RHD* em duas regiões (intron 4 e éxon 7). No entanto, a realização da técnica de PCR para 2 regiões do gene em um grande número de amostras dificulta sua realização e aumenta o custo. Assim, procuramos estabelecer uma estratégia de genotipagem *RHD* utilizando *pools* de DNA que possibilitasse a confirmação do fenótipo RhD-negativo em doadores de sangue e que pudesse ser utilizada em uma rotina. Com a realização do *pool* e com a utilização da técnica de PCR proposta, fomos capazes de reduzir o custo por amostra em mais de 50%. Estudos prévios também demonstraram que esta estratégia da utilização de *pools* de DNA para genotipagem *RHD* de doadores RhD negativo pode contribuir significativamente na redução dos custos dos testes moleculares (**GASSNER et al., 2005, FLEGEL et al., 2009**).

Em nosso trabalho, amostras de DNA de doadores de sangue classificados como RhD negativo pela técnica sorológica convencional foram analisadas em *pool* de 10 amostras por uma técnica de PCR multiplex para a presença do gene *RHD*, através da amplificação do intron 4 e éxon 7. O *pool* foi preparado com amostras de DNA extraídas individualmente com o objetivo de facilitar à identificação de uma amostra positiva. Optamos pela realização de *pools* de 10 amostras para que uma eventual demora na análise das amostras não acarretasse dificuldades no estoque de sangue RhD-negativo.

Foram estudadas 2.450 amostras de DNA extraídas de sangue de doadores voluntários de sangue de São Paulo e região e de Recife e região. O processo de miscigenação que ocorreu na população brasileira, a torna única em seu antecedente étnico. A região Sudeste do Brasil possui alta densidade populacional e tem recebido continuamente imigrante da Região Nordeste. Esta região é também caracterizada pela miscigenação entre descendentes de

Europeus e Africanos. No estado de Pernambuco, que constitui a região Nordeste, há predomínio de Ameríndios, Africanos e em menor escala de Europeus (**PENA et al., 2003**). Acreditamos que amostras de DNA de São Paulo e região e Recife e região possam representar a população brasileira.

B. IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *RHD* EM DOADORES DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO

Atualmente existem três mecanismos genéticos associados com o fenótipo RhD negativo. A deleção do gene *RHD*, predominante em Caucasianos, a presença do gene *RHD* Ψ* e de genes híbridos *RHD*-CE-D*, predominantes em Africanos (**SINGLETON et al., 2000; CASTILHO et al., 2002; CHIARONI et al., 2009**). Outros mecanismos genéticos como mutações de ponto, deleções, inserções e rearranjos gênicos podem alterar a expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária e, embora estes indivíduos sejam muitas vezes classificados como RhD negativo sorologicamente, eles de fato expressam o antígeno RhD e podem causar aloimunização (**WAGNER & FLEGEL, 1999; Site Rhesus: www.uni-ulm.de/~flegel/RH**).

Em nosso trabalho, das 2.450 amostras de DNA estudadas, em 101 (4.1%) foi identificado o gene *RHD*. Este resultado é comparável com um estudo multicêntrico realizado na Europa que revelou uma prevalência de 5.2% de positividade para o gene *RHD* entre doadores RhD negativo (**KUMPEL et al., 2006**). Apesar de este estudo ter identificado, na maioria dos indivíduos, o gene *RHD* associado aos antígenos C ou E, verificamos em nosso estudo, uma maior associação dos doadores RhD negativo com o genótipo *ce/ce*.

Quando comparamos os resultados da genotipagem *RHD* nas amostras dos doadores de sangue de São Paulo e de Recife, verificamos que o gene *RHD* inativo (*RHD* Ψ*), associado a indivíduos Africanos, foi mais prevalente na população de doadores de sangue de Recife, enquanto que a maioria dos genes ativos (RhD Fraco e RhDel), associado a indivíduos Caucasianos, eram da população de doadores de sangue de São Paulo. Este resultado demonstra as

diferenças regionais existentes e que a população de doadores de sangue de Recife estudada deve possuir uma maior predominância de descendentes de Africanos quando comparada com a população de doadores de sangue de São Paulo.

C. CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES *RHD* EM AMOSTRAS DE DNA DE DOADORES DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO

C.1. SEM RISCO DE CAUSAR ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA

O gene *RHD* Ψ* foi identificado em 78 (3,18%) das amostras RhD negativo estudadas e os genes híbridos *RHD*D-CE(2-9)-D* e *RHD*D-CE(3-7)-D* foram detectados em 4 (0,16%) amostras. Tanto o *RHD* Ψ* quanto os genes *RHD*D-CE(2-9)-D* e *RHD*D-CE(3-7)-D* são considerados genes inativos e estão associados ao fenótipo RhD-negativo, ou seja, não apresentam risco de causar aloimunização.

Em Africanos, o mecanismo molecular mais frequentemente associado ao fenótipo RhD negativo é a presença do *RHD* Ψ* (**GABRIEL et al., 2009**). Um estudo com 82 Africanos RhD negativo oriundos de Zimbábue e Gana mostrou que 66% da população apresentava o *RHD* Ψ* enquanto que em um outro estudo com indivíduos Africanos americanos e da África do Sul com miscigenação racial, o gene *RHD* Ψ* foi encontrado em 24% e 17% respectivamente. (**SINGLETON et al., 2000**). Uma frequência de 11% foi observada em descendentes Africanos brasileiros RhD negativo (**CASTILHO et al., 2002**), de 7% em uma população de Mali (**FLEGEL et. al., 2003**) e, de 4.6% em uma população brasileira de São Paulo (**CRUZ et al., 2012**) mais próxima da encontrada neste trabalho.

Genes híbridos *RHD*D-CE-D* podem estar presentes em indivíduos de origem Caucasiana e Africana. Eles também são responsáveis pelo fenótipo RhD-negativo. O gene híbrido *RHD*D-CE(3-7)-D* é predominante de indivíduos Africanos (**SINGLETON et al., 2000**), enquanto que o gene *RHD*D-CE(2-9)-D* tem sido associado a populações Européias (**WAGNER et al, 2001**). Em nosso estudo,

três doadores apresentaram o gene híbrido *RHD* D -CE(3-7)-D* presente em Africanos e um doador apresentou o gene híbrido *RHD* D -CE(2-9)-D* predominante em Caucasianos, caracterizando mais uma vez a miscigenação da população brasileira.

Os doadores com a presença do gene *RHD* Ψ* e dos genes híbridos, *RHD-CE-D* são classificados sorologicamente como RhD negativo. Como não existe o risco de causarem aloimunização eritrocitária em receptores RhD negativo, a classificação sorológica destes doadores não foi alterada.

C.2. COM RISCO DE CAUSAR ALOIMUNIZAÇÃO ERITROCITÁRIA

A utilização de reagentes anti-D monoclonais de baixa afinidade e a dificuldade na obtenção de reagentes anti-D policlonais de boa qualidade têm causado discrepâncias entre os resultados da fenotipagem RhD. Algumas vezes estes reagentes não são capazes de detectar antígenos RhD fracos com baixa densidade antigênica. A não detecção destes antígenos em doadores de sangue pode levar a aloimunização anti-D nos pacientes RhD-negativo transfundidos com estas hemácias (**WAGNER et al., 2000**). Neste contexto, devido às limitações dos reagentes utilizados nos testes de hemaglutinação, a genotipagem *RHD* tem sido cada vez mais utilizada para diferenciar os antígenos RhD, D fraco, D_{el} e D parcial (**WHESTOFF et al., 2004**).

Em nosso trabalho, em 19 (0,8%) doadores de sangue fenotipados como RhD negativo eram na realidade D fraco ou Del e poderiam causar a aloimunização anti-D em receptores RhD negativo.

Entre as 14 amostras identificadas como RhD fraco, uma (7,14%) foi classificada como RhD fraco tipo 1 com o antígeno C em posição trans a D, cinco (35,7%) como RhD fraco tipo 4.3, cinco (35,7%) como RhD fraco tipo 38 e, três (21,4%) como RhD fraco tipo 5. De acordo com a literatura, todos estes tipos de RhD fraco, apesar de apresentarem densidades antigênicas muito baixas, podem levar a aloimunização em receptores de sangue RhD negativo. Estes doadores

têm sido “erroneamente” classificados como RhD negativo na rotina sorológica (MULLER et al., 2001, WAGNER & FLEGEL, 2004).

Nossos doadores com estes tipos de RhD fraco foram previamente fenotipados como RhD negativo e os concentrados de hemácias na maioria das vezes transfundidos em pacientes RhD negativo.

Em 14 doadores caracterizados pela biologia molecular como RhD fraco, foi observada uma diferença na composição étnica. Os doadores com fenótipos RhD fraco tipo 1 e tipo 5 eram descendentes de Caucasianos, enquanto que os doadores D fraco tipo 4.3 eram descendentes de Africanos. Quatro doadores com o fenótipo RhD fraco tipo 38, eram de Recife e descendentes de Portugueses. Estes achados estão de acordo com os encontrados na literatura com relação à associação dos tipos de RhD fracos com diferentes grupos étnicos ou populações e reforçam que a origem étnica da população pode direcionar quais alelos *RH* estarão presentes (FLEGEL, 2007, FLEGEL et al, 2009, MOUSSA et al., 2012) .

Entre as cinco amostras identificadas como RhDel, todas foram classificadas como *RHD*DEL 1* (*RHD*1227A* ou *K409K*), mais frequentemente encontrado nas populações Asiáticas e com potencial de induzir a aloimunização (Site Rhesus: www.uni-ulm.de/~flegel/RH). (LEGLER et al., 2005, LEGLER et al., 2005, LIN et al., 2007, KIM et al., 2009, YASUDA et al., 2005) Vale a pena ressaltar, que três destes doadores eram descendentes de Asiáticos.

C.3. ASSOCIAÇÃO DOS TIPOS DE VARIANTES *RHD* ENCONTRADAS COM OS HAPLÓTIPOS *RH*

De acordo com (WAGNER et al., 1999), as variantes *RH* decorrentes de genes *RHD* ativos e inativos podem estar associadas a haplótipos *RHCE* específicos. As variantes *RHD* e os haplótipos associados encontrados em nosso estudo estão de acordo com outros estudos da literatura (REID & LOMAS-FRANCIS, 2006).

D. REAVALIAÇÃO SOROLÓGICA

Nove amostras com o fenótipo D fraco (D fraco tipo 1, D fraco tipo 5 e D fraco tipo 38) foram identificadas na confirmação sorológica pela técnica de antiglobulina humana em gel utilizando um anti-D monoclonal IgG (clone MS26) e não foram detectadas pela técnica em tubo. Este resultado demonstra que a sensibilidade do método e o reagente anti-D utilizado podem influenciar diretamente no resultado da fenotipagem RhD. Nossos resultados mostram ainda que os antígenos RhD fracos tipos 1, 5 e 38 que apresentam baixa densidade antigênica podem não ser detectados na rotina sorológica, pois necessitam de um teste confirmatório que utilize um reagente anti-D IgG potente e um método sensível. Nesta reavaliação sorológica, observou-se também que os antígenos RhD fraco tipo 4.3 e RhDel somente são detectados por técnicas especiais de adsorção e eluição ou por técnicas moleculares, o que está de acordo com a literatura (**KORMOCZI et al., 2005; CREDIDIO et al., 2011**).

E. AVALIAÇÃO DA ALOIMUNIZAÇÃO

Uma das grandes preocupações na prática transfusional é prevenir a aloimunização anti-D, uma vez que este anticorpo pode causar reações hemolíticas tardias e ainda é a principal causa da doença hemolítica do feto e do recém nascido (**WESTHOFF, 2004**).

Fenótipos RhD com baixa densidade antigênica como alguns tipos de D fraco e Del devem ser identificados principalmente em doadores, porque suas hemácias podem aloimunizar pacientes RhD negativo (**WAGNER et al., 2000**).

Em nosso estudo, identificamos doadores fenotipados como RhD negativo que possuíam um gene *RHD* inativo, ou seja, sem risco de aloimunizar mas encontramos também dezenove doadores classificados como RhD negativo que apresentavam genes *RHD* ativos e, portanto com risco de induzir a aloimunização e que diante dos resultados moleculares foram reclassificados como RhD-positivo. Tendo em vista estes achados, procuramos rastrear as

unidades de concentrado de hemácias com os fenótipos D fraco e Del que haviam sido transfundidas em receptores RhD negativo. Infelizmente não foi possível realizar um “*look back*” em todos os pacientes. Em cinco pacientes foi possível realizar uma avaliação pós transfusional e realizar a pesquisa de anticorpo irregular.

Um doador de sangue caracterizado como *RHD*fraco tipo 1* associado ao haplótipo *Ce*, ou seja, com C em posição trans a D, foi fenotipado como RhD-negativo em 2 doações anteriores. A unidade de concentrado de hemácias (CH) da última doação foi transfundida em um paciente RhD negativo com o haplótipo *Ce* ou seja *r`r*. O paciente era do sexo masculino, sem histórico de transfusão de sangue prévia e /ou externa e nesta ocasião recebeu 2 unidades de concentrado de hemácias. O estudo imunohematológico (PAI e IAI) realizado três meses após a transfusão demonstrou a presença de anti-D.

Dois doadores irmãos de primeira doação caracterizados como *RHD*fraco tipo 4.3* associado ao haplótipo *ce*. Uma unidade de concentrado de hemácias foi utilizada em dois pacientes recém-nascidos gemelares e não foi possível investigar o desenvolvimento de anti-D. A outra unidade, foi utilizada em um paciente do sexo feminino, 75 anos, múltipara que desenvolveu um anticorpo anti-D cerca de 2 semanas após a transfusão. O aparecimento deste anti-D pode indicar uma imunização secundária.

Outros dois doadores caracterizados pelos estudos moleculares como *RHD* fraco tipo 5* associado ao haplótipo *cE* foram fenotipados como RhD-negativo em cinco doações anteriores. Dois pacientes cirúrgicos com o fenótipo *ce/ce (rr)* e com grande demanda transfusional (transplante hepático) e que receberam as unidades de concentrados de hemácias destes doadores não desenvolveram anticorpo anti-D e nem anti-E.

Um doador que doou sangue pela primeira vez em nosso serviço e que foi caracterizado como *RHD*DEL* associado ao haplótipo *Ce* teve sua unidade de concentrado de hemácias transfundida em um paciente do sexo masculino, 81 anos, com o fenótipo RhD-negativo *Ce*, ou seja, *r`r*, durante um procedimento de

cirurgia de fratura de fêmur. A avaliação pós-transfusão deste paciente com acompanhamento prospectivo durante três meses não evidenciou uma pesquisa de anticorpo irregular no soro do paciente positiva para o anti-D. Embora o alelo *RHD*DEL.01 (K409K)* já tenha sido previamente associado a aloimunização, outros fatores imunológicos podem ter contribuído para o não desenvolvimento do anti-D nesse paciente. (CHEN et al., 2004).

Diante de nossos resultados e como já demonstrado pela literatura, mesmo com baixa densidade antigênica, o antígeno RhD fraco pode ser imunogênico (WAGNER et al., 2000).

F. AVALIAÇÃO DA IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ANTÍGENO RhD EM DOADORES DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO E SEU IMPACTO NO GERENCIAMENTO DO ESTOQUE

Considerando as implicações clínicas da aloimunização anti-D, a implementação da técnica molecular de triagem em *pool* para a detecção do gene *RHD* e a correta identificação das variantes *RHD* tem por finalidade minimizar o risco de aloimunização eritrocitária pelo antígeno RhD e garantir uma maior segurança transfusional.

De acordo com FLEGEL et al., 2009, a realização da genotipagem *RHD* teria ainda a vantagem de eliminar testes adicionais na caracterização sorológica do antígeno RhD o que também reduziria custos.

Embora a estratégia utilizando *pool* de DNA seja de fácil execução e de menor custo, verificamos que para a implementação na rotina teríamos que considerar o gerenciamento do estoque de sangue RhD negativo e empregar um protocolo que pudesse ser utilizado sem interferir na disponibilidade de sangue para pacientes RhD negativo.

Devido ao fato de que a realização destas técnicas moleculares poderiam teoricamente acarretar uma demora de 2 a 3 dias na liberação das

bolsas, avaliamos o comportamento do estoque de bolsas RhD negativas durante o ano de 2011.

Durante este período, foram coletadas e liberadas 3.891 bolsas, com estoque médio semanal de 74 bolsas e um desvio padrão de 16 bolsas. Foi então considerado como estoque mínimo o estoque médio menos duas vezes o desvio padrão, ou seja, 42 bolsas.

Tendo como base este critério e considerando uma liberação dos resultados moleculares de até três dias, comparamos o estoque médio semanal encontrado e pudemos observar que durante o ano de 2011 somente em uma semana o estoque esteve abaixo do estoque mínimo (39/42 bolsas) (**Figura25**).

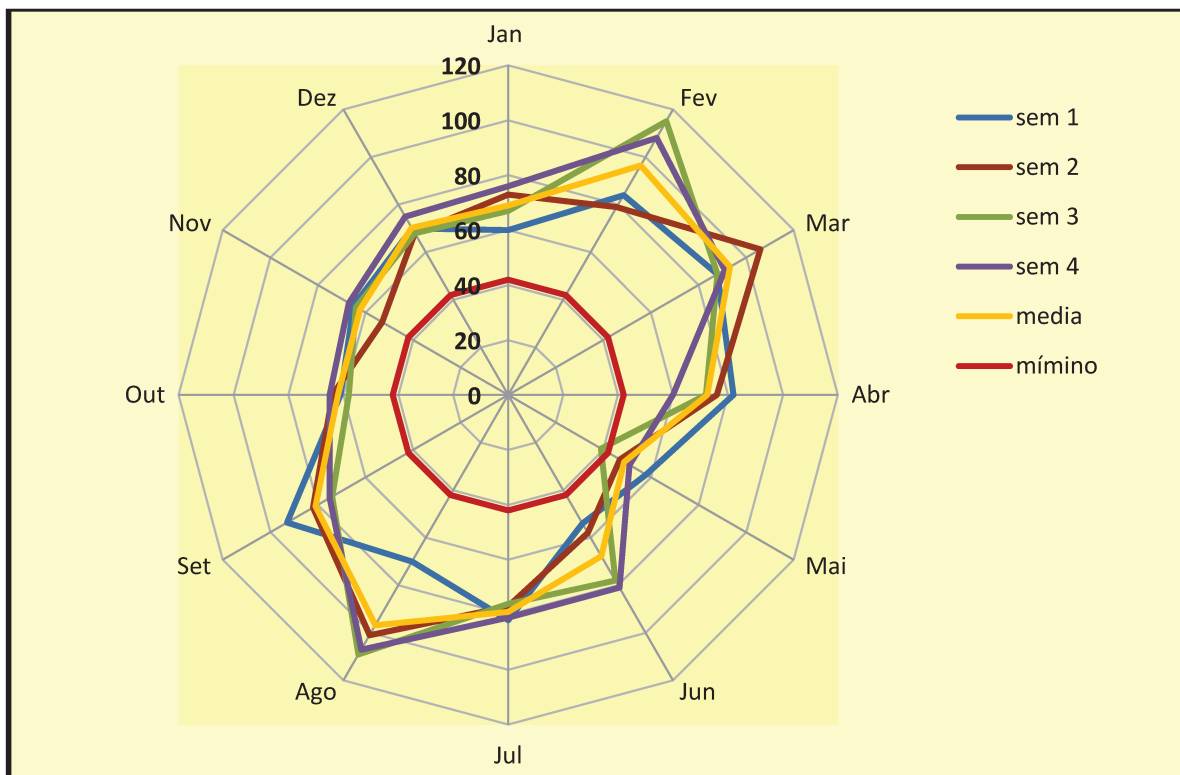


Figura 25: Representação gráfica do estoque médio semanal de bolsas RHD-negativas durante o ano de 2011

Diante destes resultados podemos afirmar que o protocolo sugerido com a utilização de um *pool* de 10 amostras não acarreta uma menor disponibilidade de bolsas RhD negativo no estoque.

De acordo com **FLEGEL et al. 2009**, a realização da genotipagem *RHD* teria ainda a vantagem de eliminar testes adicionais na caracterização sorológica do antígeno RhD, o que reduziria os custos.

Quando analisamos os dados da literatura verificamos que existe uma tendência a realizar genotipagem apenas nas amostras fenotipadas como RhD negativo C e ou E positivas pois a maioria dos casos de D fraco e Del que não são detectados sorologicamente estão associados a presença dos antígenos C e ou E (**WAGNER et al., 2001; CREDIDIO et al., 2011**). Os nossos resultados mostram que apesar da maioria dos alelos *RHD* encontrados em nossas amostras e que poderiam levar a aloimunização estarem associados aos haplótipos *Ce* ou *cE* encontramos também cinco doadores com o alelo *RHD* fraco tipo 4.3 associado ao haplótipo *ce* que induziu a aloimunização em um paciente RhD-negativo. Portanto, o nosso protocolo não pode se basear na realização da genotipagem *RHD* somente em doadores de sangue RhD negativo, C e/ou E+ e sim, em todos os doadores fenotipados como RhD-negativo.

Um dos grandes benefícios da genotipagem *RHD* é que ela é realizada uma única vez e a informação obtida pode ser compartilhada de instituição para instituição nacionalmente ou internacionalmente, o que eliminaria a necessidade de repetir a fenotipagem RhD por sorologia nos doadores de sangue. O método de genotipagem em *pool* aqui descrito e avaliado e que pode ser implementado na rotina, abre também a oportunidade para a extensão da genotipagem em *pool* para outros genes de grupos sanguíneos, em especial, na procura de doadores raros.

G. AVALIAÇÃO DA IMPLEMENTAÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ANTÍGENO RhD EM DOADORES DE SANGUE FENOTIPADOS COMO RhD NEGATIVO E SEU IMPACTO NO CUSTO

As especificações de cada etapa do processo de genotipagem. Em ambas metodologias a mão de obra não foi avaliada, mas os outros itens estão descritos na tabela 10.

Tabela 10: Comparação de custos entre metodologia sorológica e molecular

Especificações	Material	Nº de testes	Custo R\$	Custo unitário R\$	Pool 10
Mão de obra			*****	*****	
Extração DNA	Qiagen	250	2.500,00	10,00	10,00
PCR	Primers (3)	> 1.000 amostras	210,00	0,08	0,00
	Taq polimerase	50 testes (utilizamos 1/2 µl por reação) fará 100 testes	255,00	2,55	0,25
	DNTP	> 1.000 amostras	793,00	3,17	0,31
	Agua		0,00	0,00	0,00
Gel	Agarose (500 g)	250 geis /40 amostras por corrida	1.500,00	6,00	2g/gel 0,15
	TEB 10X (1 litro)	TEB 1X (10 litros)	172,00	1,72	100ml 0,17
	Brometo de Etídium	2mL (usa 2uL por gel)	233,00	0,23	1 gel 0,00
	Ladder	60	399,00	6,65	0,35
Total				30,40	11,23

Houve redução significativa de custos comparando o custo unitário de R\$30,40 (trinta reais e quarenta centavos) versus R\$11,23 (onze reais e vinte três centavos) o custo quando utilizado *pool* de 10 amostras. Para um *pool* constituído de 20 amostras o valor é de aproximadamente R\$7,00 (sete reais).

Se comparamos o valor da determinação sorológica do antígeno RhD utilizando coluna de gel e o teste confirmatório, o valor aproximado é de R8,80 (oito reais e oitenta centavos), portanto a genotipagem se estabelece como uma estratégia vantajosa e de acordo com normas internacionais a genotipagem não é necessário a repetição dos testes.

CONCLUSÃO

Considerando os objetivos do presente trabalho, as condições em que foi realizada a genotipagem *RHD* em *pool* de amostras de DNA de doadores voluntários de sangue classificados como RhD-negativo na rotina sorológica, podemos concluir que:

1. A técnica de genotipagem que amplifica o intron 4 e o éxon 7 do gene *RHD* utilizando amostras de DNA em *pool* é de fácil execução e mostrou ser sensível e específica.
2. É possível amplificar o gene *RHD* em *pools* de 10 e em *pools* de 20 amostras de DNA.
3. A utilização do *pool* de 10 amostras de DNA é mais fácil de ser implantada na rotina, pois permite um melhor gerenciamento do estoque de sangue RhD negativo.
4. Os protocolos utilizados para a caracterização molecular individual das amostras que apresentaram o gene *RHD* e que incluíram primers desenhados de acordo com as sequências genômicas de indivíduos Caucasianos podem ser empregados para a determinação de variantes do gene *RHD* em populações com antecedentes étnicos diversos, como é o caso da população brasileira.
5. No nosso estudo, cento e uma amostras (4,1%) fenotipadas como RhD negativo apresentaram o gene *RHD* na análise molecular.
6. Todas as amostras caracterizadas molecularmente como *RHD* positivo apresentaram o gene *RHD* em heterozigose.
7. Oitenta e duas (82%) das 101 amostras que apresentaram o gene *RHD* possuíam um gene *RHD* inativo.
8. Em 78 (3,81%) amostras foi detectado a presença do gene *RHD* Ψ e em 4 amostras foi detectado a presença de genes híbridos *RHD**D-CE-D que impedem a expressão do antígeno RhD na membrana eritrocitária.
9. Das 4 amostras (0,16%) que apresentaram genes híbridos, 1 foi caracterizada como *RHD**D-CE(2-9)-D e 3 como *RHD**D-CE(3-7)-D.

10. Dezenove amostras (0,74%) foram caracterizadas molecularmente como RhD fraco ou RhDel e, portanto apresentam risco potencial de aloimunizar pacientes fenotipados como RhD negativo.
11. Quatorze amostras (0,57%) fenotipadas como RhD negativo foram genotipadas como *RHD*fraco*. Uma amostra foi caracterizada como *RHD* fraco tipo 1*, cinco como *RHD* fraco tipo 4.3*, três como *RHD* fraco tipo 5* e cinco como *RHD* fraco tipo 38*.
12. Cinco amostras (0,20%) foram identificadas como *RHD*DEL* e todas apresentaram o mesmo mecanismo molecular (1227G>A).
13. Os alelos *RHD*Ψ* e *RHD*fraco tipo 4.3* estão frequentemente associados ao haplótipo *ce*, os alelos *RHD*DEL*, *RHD*fraco tipo 1*, *RHD*fraco tipo 38* e *RHD*D-CE(2-9)-D* ao haplótipo *Ce* e o alelo *RHD*fraco tipo 5* ao haplótipo *cE*.
14. Nossos resultados demonstram claramente que a sensibilidade do método e o reagente anti-D utilizado podem influenciar diretamente no resultado da tipagem RhD.
15. O antígeno RhD nas amostras caracterizadas molecularmente como *RHD*fraco* e *RHD*DEL*, foi detectado somente por adsorção e eluição.
16. Dois pacientes RhD negativo que receberam unidades de sangue RhD fraco (D fraco tipo 1 e D fraco tipo 4.3) desenvolveram anti-D.
17. A técnica do *pool* possibilita a redução do custo em 50% quando comparada com a técnica de PCR individual
18. Nossos resultados demonstram que a realização da genotipagem *RHD* em *pools* de 10 amostras de DNA é viável e pode ser implementada em nossa rotina sem comprometer o estoque mínimo de unidades de sangue RhD negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Daniels G. Rh blood group system. In: Daniels G. Human Blood Groups. Second edition. Oxford and Northampton: Blackwell; 2002: 195-274.
2. Storry JR, Castilho L, Daniels G, Flegel WA, Garratty G, Francis C.L. et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. Vox Sang. 2011;101(1):77-82.
3. Race, RR. Modern concepts of the blood group system. Ann NY Acad. Sci. 1965;127: 884-891.
4. Mollison PL. Immunology of red cells. In: Mollison PL. Blood Transfusion in Clinical Medicine. London, UK, Blackwell; 2005: 48-113.
5. Flegel W. Homing in on D antigen immunogenicity. Transfusion. 2005;45: 467-468.
6. Simsek S, Jong CA, Cuijpers HT. Sequence analysis of cDNA derived from reticulocyte mRNAs coding for Rh polypeptides and demonstration of E/e and C/c polymorphisms. Vox Sang. 1994; 67: 203-209.
7. Le Van Kim C, Mouro I, Chérif-Zahar B. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. 1992; 89: 925-929.
8. Kajii E, Umenishi F, Iwamoto S, Ikemoto S. Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the Rh blood group system. Hum Genet. 1993;91:157-162.
9. Chérif-Zahar B, Bloy C L, Le Van Kim C. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. Proc Natl Acad Sci. 1990; 87: 6243-6247.

10. Chérif-Zahar B, Mattei M G, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron J P. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3-1p36.1 by in situ hybridization. *Human Genetics*. 1991;86:398-400.
11. Carritt B, Kemp T J, Poulter M. Evolution of the human Rh(Rhesus) blood group genes: A 50 year old prediction (partially) fulfilled. *Human Molecular Genetic*. 1997;6:843-850.
12. Wagner F F, Flegel W A. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood*. 2000;95(12):3662-3668.
13. Wagner F F, Flegel W A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. 2004; 20: 23-36.
14. Avent N D, Reid M E. The Rh Blood group system: a review. *Blood*. 2000; 95:375-387.
15. Agre P, Cartron J P. Molecular Biology of the Rh antigen. *Blood*. 1991; 78: 551-563.
16. Avent N D. A new chapter in Rh research: Rh protein are ammonium transporters. *Molecular Medicine*. 2001; 7(3):94-6.
17. Chen-Han H, Ye M. The Rh protein family: gene evolution, membrane biology and disease association. *Cell. Mol. Life Sci*. 2010; 67:1203-1218.
18. Westhoff C M. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion*. 2004; 44: 1663-1673.
19. Avent N D, Butcher S K, Lui W. Localization of the C termini of the Rh (Rhesus) polypeptides to the cytoplasmatic face of the human erythrocyte membrane. *Journal Biological Chemical*. 1992; 267:15-134.
20. Mouro I, Colin Y, Cherif-Zahar B. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nature Genetic*. 1992; 5: 62-65.

21. Mouro I, Le Van Kim C, Rouillac C. Rearrangements of the blood group RhD gene associated with the D^{VI} category phenotype. *Blood*. 1994; 83: 1129-1135.
22. Wolter L C, Hyland C A, Saul A. Refining the DNA polymorphisms that associate with the rhesus c phenotype. *Blood*. 1994;84:985-6.
23. Issitt P D. Recent advances in the Rh blood group system. *Vox Sanguinis*. 1996; 70: 26-30.
24. Lomas C, Tippett P, Thompson K M. Demonstration of seven epitopes on the D antigen using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang*. 1984;57: 261-164.
25. Tippett P, Lomas-Francis C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigen. *Vox Sanguinis*. 1996;70:123-131.
26. Huang C H, Chen Y, Reid M, 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 RHD to the RHCE gene. *Am J Hum Genet*. 1996; 59: 825-833.
27. Rouillac C, Le Van Kim C, Blancher A, Roubinet F, Cartron J P, Colin Y. Lack of G blood group antigen in DIIIb erythrocytes is associated with segmental DNA exchange between RH genes. *Br J Haematol*. 1995; 89: 424-426.
28. Becker E A M, Faas B H W, Simser S, Overbeek M A M, Van Rhernen D J. The genetic basis of a new partial D antigen: D^{DBT}. *British Journal of Haematology*. 1996;93: 720-727.
29. Wagner F F, Gassner C, Smuller T H, Schonitzer D, Schunter F, Flegel W A. Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct Immunohematological features. *Blood*. 1998; 91: 2157-2168.

30. Hemker M B, Ligthart P C, Berger L, Van Rhenen D J, Van Der Schoot C E, Maaskant-van Wijk P A. DAR, a new RhD variant involving exon 4,5 and 7, often in linkage with ceAR, a new Rhce variant frequently found in African Black. *Blood*. 1999; 94: 4337-4342.
31. Huang C H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigen. *Current Opinion in Hematology*. 1997; 4: 94-103.
32. Wagner F F, Ladewig B, Angert K S, Heymann G A, Eicher N I, Flegel W A. The DAU allele cluster of the RHD gene. *Blood*. 2002; 100(1): 306-311.
33. Castilho L, Rios M, Rodrigues A, Pellegrino Jr J, Saad S T O, Costa F F. High frequency of partial DIIIa and DAR alleles found in Sickle Cell disease patients suggest increased risk of alloimmunization to RhD. *Transfusion Medicine*. 2005; 15: 49-55.
34. Huang C H, Ye M. The Rh protein family: gene evolution, membrane biology, and disease association. Review. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67:1203-18.
35. Stratton F. New Rh alleomorph. *Nature*. 1946;158:25-8.
36. Avent ND, Finning KM, Liu W, Scott ML. Molecular biology of partial D phenotypes. *Transfus Clin Biol*. 1996;3(6):511-6.
37. Rouillac C, Gane P, Cartron J P, Le Pennec P Y, Colin Y. Molecular basis of the altered antigenic expression of RhD in weak D and RhC/e in phenotype. *Blood*. 1996; 87: 4853-4861.
38. Wagner F F, Gassner C, Smuller T H, Schonitzer D, Schunter F, Flegel W A. Molecular of weak D phenotypes. *Blood*. 1999; 93: 385-393.
39. Wagner F F, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher N I, Lonicer C B, Muller T H, Siegel M H, Flegel W A. Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood*. 2000;95,8: 2699-2708.

40. Müller T H, Wagner F F, Trockenbacher A, Eicher N I, Flegel W, Schönitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central Europeans populations. *Transfusion*. 2001;41:45-52.
41. Mota M, Fonseca N L, Rodrigues A, Kutner J M, Castilho L. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sang*. 2005; 88: 130-135.
42. Quin X, Grootkerk-Tax M G H M, Maaskant-van Wijk P A, Van der Schoot C E. Systemic analysis and zigosity determination of the RHD gene in a D negative Chinese Han population reveals a novel D- negative RHD gene. *Vox Sang*. 2005;88:35-40.
43. Kormoczi G F, Gassner C, Shao P S, Uchikawa M, Legler T J. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion*. 2005;45:1561-1567.
44. Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Van Huffel R, Cartron JP. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. 1991; 78:2747-52.
45. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eiche RNI, Legler TJ et al. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion*. 2005;45: 527-538.
46. Flegel W A, von Zabern I, Doescher A, Wagner FF, Strathmann KP, Geisen C et al. D variants at the RhD vestibule in the weak D type 4 and Eurasian D clusters. *Transfusion*. 2009; 49:1059-69.
47. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin P G, 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 RhD-negative blood group phenotype. *Blood*.2000; 95:12-18.

48. Faas B H W, Beckers E A M, Wildoer P, Lightart PC, Overbeeke M A M, Zondervan H Á, von dem Borne A E G K R, van der Schoot C E. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion*.1997;37:38-44.
49. Daniels G, Green C, Smart E. Differences between RhD-negative Africans and RhD-negative Europeans. *Lancet*.1997; 380:862-863.
50. Denomme G A, Dake LR, Lilensky D, Ramyar L, Judd W.J. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*.2008;48:473-478.
51. Le Van Kim C, Mouro I, Brossard Y, Chavinié J, Cartron JP, Colin Y. PCR-based determination of Rhc and RhE status of fetuses at risk of Rhc and RhE haemolytic disease. *Br J Haematol*. 1994;88(1):193-5.
52. Faas BH, Simsek S, Bleeker PM, Overbeeke MA, Cuijpers HT, von dem Borne AE, van der Schoot CE. Rh E/e genotyping by allele-specific primer amplification. *Blood*. 1995 Feb 1;85(3):829-32.
53. Poulter M, Kemp T, Carritt B. DNA-based Rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. *Vox Sanguinis*.1996;70:164-168.
54. Blunt T, Steers F, Daniels G, Carritt B. Lack of RH C/E expression in the Rhesus D--phenotype is the result of a gene deletion. *Ann Hum Genet*. 1994;58(1):19-24.
55. Rios M, Cash K, Strupp A, Uehlinger J, Reid M. DNA from urine sediment or buccal cells can be used for blood group molecular genotyping. *Immunohematology*.1999;15: 61-65.

56. Reid M, Rios M, Yazdanbakhsh K. Application of molecular biology techniques to transfusion medicine. *Seminars Hematology*, 37: 166-176, 2000.
57. Maaskant-van Wijk PA, Faas BH, De Ruijter JA, Overbeeke MA, von dem Borne AE, van Rhenen DJ, van der Schoot, C.E. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion*. 1998;38:1015-1021.
58. Chen JC, Lin T M, Chen L Y, Wang Y H, Jin T Y, Yue C T. RHD 1227A is an important genetic marker for RhDel individuals. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:193-198.
59. Martine G.H.M. Tax, C. Ellen Van der Schoot, René Van Doorn, Lotte Douglas-Berger, Dick J. Van Rhenen and Petra A. Maaskant-van Wijk. RHC and RHc genotyping in different ethnic groups. *Transfusion*. 2002;42:634-644.
60. Legler TJ, Maas JH, Köhler M. Sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transf Med*. 2001;11:383-88.
61. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD . Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*. 2003;100:177-182.
62. Rodrigues A, Rios M, Pellegrino Jr J, Costa FF, Castilho L. Presence of *RHD* pseudogene and the hybrid *RHD-CE-Ds* gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35:767-773.
63. Chiaroni M T, Fernandes SC, Granier T, Bokilo A, Bailly P. Molecular analysis of inactive and active *RHD* alleles in native Congolese cohorts. *Transfusion*. 2009;49:1353-1360.

64. Kumpel B. Are weak D RBCs really immunogenic? *Transfusion*. 2006 Jun;46(6):1061-2.
65. Polin H, Danzer M, Gaszner W, Broda D, St-Louis M, Proll J, Hofer K, Gabriel C. Identification of *RHD* alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D- blood donors in Upper Austria. *Transfusion*. 2009;49:676-681.
66. Wagner FF, Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B, Flegel WA. RHD allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet*. 2003 Sep 24;4:14.
67. Cruz B R, Chiba A K, Moritz E, Bordin J O. *RHD* alleles in Brazilian blood donors with weak D or D negative. *Transfus Med*. 2012;22:84-9.
68. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel W A. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics*. 2001; 21:10.
69. Westhoff CM. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*. 2004 Nov;44(11):1663-73.
70. Muller T H, Wagner F F, Trockenbacher A, Eicher N I, Flegel W A, Schonitzer D, Schunter F, Gassner C. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001 Jan;41(1):45–52.
71. Flegel W. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion*. 2007;47:47S-53S.
72. Willy A, Flegel, Inge Von Zabern and Franz F. Wagner Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion*. 2009;47:465–471.

73. Moussa H, Tsochandaridis M, Chakroun T, Jride S, Abddelneji B, Hmida S et al. Molecular background of D negative phenotype in the Tunisian population. *Transfus Med.* 2012;22:192-198.
74. Günther F. Körmöczi, Christoph Gassner, Chao-Peng Shao, Makoto Uchikawa and Tobias J. Legler. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion.* 2005;45:1561–1567
75. Thomas Wagner, Günther F. Körmöczi, Christoph Buchta, Maria Vadon, Gerhard Lanzer, Wolfgang R. Mayr and Tobias J. Legler. Anti-D immunization by DEL red blood cells. *Transfusion.* 2005;45:520–526.
76. Yang Y F, Wang Y H, Chen J C, Eng H L, Lin T M. Prevalence of *RHD* 1227A and hybrid *Rhesus box* in the general Chinese population. *Translational Research.* 2007;149:31-36.
77. Kim K H, Kim K E, Woo K S, Han J Y, Kim J M, Park K U. Primary anti-D immunization by DEL Red Blood Cells. *Korean J Lab Med.* 2009;29:361-65.
78. Yasuda H, Ohto H, Sakuma S, Ishikawa Y. Secondary anti-D immunization by Del red blood cells. *Transfusion.* 2005;45:1581-1584.
79. Reid M, Lomas-Francis C. *The Blood Group Antigens Facts Book.* Second Edition. San Diego: Elsevier Ltda; 2004. 561p.
80. Credidio D C, Pellegrino Jr J, Castilho L. Serologic and molecular characterization of D variants in Brazilians: impact for typing and transfusion strategy. *Immunohematology.* 2011;27:6-11.

APÊNDICE

APÊNDICE HIAE

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1	300109116310	1	4	NEG	rr	A	RHD-
2	300109116312		9	NEG	rr		
3	300109116317		2	NEG	r'r		
4	300109116322		1	NEG	rr		
5	300109116329		1	NEG	rr	B	RHD-
6	300109116330		1	NEG	rr		
7	300109116378		1	NEG	rr		RHD+/RHcc/Ψ+
8	300109116391		1	NEG	rr		RHD-
9	300109116392		5	NEG	rr		
10	300109116395		7	NEG	rr		
11	300109116396	2	3	NEG	rr		RHD-
12	300109116397		1	NEG	rr		
13	300109116400		1	NEG	rr		
14	300109116403		3	NEG	rr		
15	300109116404		11	NEG	rr		
16	300109116407		1	NEG	rr		
17	300109116409		9	NEG	rr		
18	300109116411		1	NEG	rr		
19	300109116413		1	NEG	rr		
20	300109116417		1	NEG	rr		
21	300109116419	3	7	NEG	rr		RHD-
22	300109116410		2	NEG	rr		
23	300109116423		1	NEG	rr		
24	300109116424		23	NEG	rr		
25	300109116430		2	NEG	rr		
26	300109116437		2	NEG	rr		
27	300109116455		1	NEG	rr		
28	300109116461		19	NEG	rr		
29	300109116469		2	NEG	rr		
30	300109116472		10	NEG	rr		
31	300109116499	4	6	NEG	rr		RHD-
32	300109116500		17	NEG	rr		
33	300109116501		4	NEG	rr		
34	300109116532		1	NEG	rr		
35	300109116533		1	NEG	rr		
36	300109116534		1	NEG	rr		
37	300109116535		1	NEG	rr		
38	300109116537		1	NEG	rr		
39	300109116538		1	NEG	rr		
40	300109116544		1	NEG	rr		
41	300109116547	5	15	NEG	rr		RHD-
42	300109116557		4	NEG	rr		
43	300109116574		27	NEG	rr		
44	300109116598		5	NEG	rr		
45	300109116620		9	NEG	rr		
46	300109116626		14	NEG	rr		
47	300109116627		1	NEG	rr		
48	300109116636		10	NEG	rr		
49	300109116651		25	NEG	rr		
50	300109116652		1	NEG	rr		
51	300109116656	6	10	NEG	rr		RHD-
52	300109116657		3	NEG	r''r		
53	300109116692		2	NEG	r'r		
54	300109116693		5	NEG	r'r		
55	300109116694		14	NEG	rr		
56	300109116697		8	NEG	rr		
57	300109116700		7	NEG	rr		
58	300109116709		6	NEG	rr		
59	300109116712		9	NEG	rr		
60	300109116729		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
61	300109116744	7	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
62	300109116750		1	NEG	rr		
63	300109116778		38	NEG	rr		
64	300109116786		2	NEG	rr		
65	300109116894		1	NEG	rr		
66	300109116897		2	NEG	rr		
67	300109116898		1	NEG	rr		
68	300109116924		3	NEG	rr		
69	300109116927		1	NEG	rr		
70	300109116945		11	NEG	r'r		
71	300109116953	8	1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
72	300109116955		5	NEG	rr		
73	300109116956		19	NEG	rr		
74	300109116969		1	NEG	rr		
75	300109116971		1	NEG	rr	B	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
76	300109116972		45	NEG	rr		<i>RHD-</i>
77	300109116974		1	NEG	rr		
78	300109116982		1	NEG	rr		
79	300109116998		4	NEG	rr		
80	300109117017		4	NEG	rr		
81	300109117029	9	1	NEG	r'r	A	<i>híbrido (2-9)</i>
82	300109117030		2	NEG	r'r		<i>RHD-</i>
83	300109117036		1	NEG	rr		
84	300109117046		4	NEG	rr		
85	300109117066		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
86	300109117074		4	NEG	rr		
87	300109117076		21	NEG	rr		
88	300109117085		55	NEG	rr		
89	300109117092		13	NEG	rr		
90	300109117100		3	NEG	r''r		<i>D fraco tipo 5</i>
91	300109117175	10	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
92	300109117183		3	NEG	rr		
93	300109117184		2	NEG	rr		
94	300109117187		4	NEG	rr		
95	300109117201		7	NEG	rr		
96	300109117207		12	NEG	rr		
97	300109117209		31	NEG	rr		
98	300109117215		3	NEG	rr		
99	300109117217		1	NEG	rr		
100	300109117218		1	NEG	rr		
101	300109117249	11	55	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
102	300109117260		1	NEG	rr		<i>D fraco tipo 4.3</i>
103	300109117259		7	NEG	rr		<i>RHD-</i>
104	300109117263		1	NEG	rr		<i>D fraco tipo 4.3</i>
105	300109117271		9	NEG	rr		<i>RHD-</i>
106	300109117288		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
107	300109117291		16	NEG	rr		
108	300109117292		3	NEG	rr		
109	300109117301		7	NEG	rr		
110	300109117306		21	NEG	r''r		
111	300109117321	12	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
112	300109117322		1	NEG	rr		
113	300109117324		5	NEG	rr		
114	300109117339		6	NEG	rr		
115	300109117342		16	NEG	rr		
116	300109117350		7	NEG	rr		
117	300109117354		2	NEG	rr		
118	300109117356		1	NEG	rr		
119	300109117361		1	NEG	rr		
120	300109117365		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
121	300109117375	13	23	NEG	rr		<i>RHD-</i>
122	300109117387		1	NEG	rr		
123	300109117393		7	NEG	rr		
124	300109117397		7	NEG	rr		
125	300109117400		3	NEG	rr		
126	300109117403		45	NEG	rr		
127	300109117410		2	NEG	rr		
128	300109117414		7	NEG	rr		
129	300109117427		6	NEG	rr		
130	300109117430		6	NEG	rr		
131	300109117506	14	12	NEG	rr		<i>RHD-</i>
132	300109117507		3	NEG	rr		
133	300109117518		4	NEG	rr		
134	300109117520		14	NEG	rr		
135	300109117526		1	NEG	rr		
136	300109117532		2	NEG	rr		
137	300109117571		1	NEG	rr		
138	300109117573		1	NEG	rr		
139	300109117576		1	NEG	rr		
140	300109117581		1	NEG	rr		
141	300109117586	15	15	NEG	rr		<i>RHD-</i>
142	300109117604		1	NEG	rr		
143	300109117622		8	NEG	rr		
144	300109117638		8	NEG	rr		
145	300109117666		6	NEG	rr		
146	300109117691		4	NEG	rr		
147	300109117700		3	NEG	rr		
148	300109117708		3	NEG	rr		
149	300109117711		2	NEG	rr		
150	300109117712		2	NEG	rr		
151	300109117726	16	41	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
152	300109117734		2	NEG	rr		
153	300109117749		3	NEG	rr		
154	300109117751		4	NEG	rr		
155	300109117753		1	NEG	rr		
156	300109117762		34	NEG	rr	B	<i>RHD+</i> / <i>RHcc</i> / Ψ +
157	300109117765		1	NEG	rr		
158	300109117769		2	NEG	rr		
159	300109117779		5	NEG	rr		
160	300109117785		7	NEG	rr		
161	300109117790	17	13	NEG	rr		<i>RHD-</i>
162	300109117797		13	NEG	rr		
163	300109117809		1	NEG	rr		
164	300109117812		9	NEG	rr		
165	300109117817		8	NEG	rr		
166	300109117829		3	NEG	rr		
167	300109117831		3	NEG	rr		
168	300109117834		2	NEG	rr		
169	300109117838		2	NEG	rr		
170	300109117841		2	NEG	rr		
171	300109117846	18	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
172	300109117865		19	NEG	rr		
173	300109117866		8	NEG	rr		
174	300109117867		45	NEG	rr		
175	300109117880		1	NEG	rr		
176	300109117881		34	NEG	rr		
177	300109117893		4	NEG	rr		
178	300109117895		11	NEG	rr		
179	300109117898		6	NEG	rr		
180	300109117901		6	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
181	300109117904	19	55	NEG	rr		<i>RHD-</i>
182	300109117908		4	NEG	rr		
183	300109117915		19	NEG	rr		
184	300109117917		7	NEG	rr		
185	300109117919		8	NEG	rr		
186	300109117921		8	NEG	rr		
187	300109117925		2	NEG	rr		
188	300109117927		3	NEG	rr		
189	300109117930		3	NEG	rr		
190	300109117931		1	NEG	r'r		
191	300109117935	20	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
192	300109117938		4	NEG	rr		
193	300109117939		1	NEG	r'r		
194	300109117940		33	NEG	rr		
195	300109117945		2	NEG	rr		
196	300109117948		8	NEG	rr		
197	300109117949		1	NEG	rr		
198	300109117955		1	NEG	rr		
199	300109117959		1	NEG	rr		
200	300109117965		1	NEG	rr		
201	300109117969	21	31	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
202	300109117973		1	NEG	rr		
203	300109117976		2	NEG	rr		<i>Del</i>
204	300109117990		2	NEG	rr		
205	300109117993		1	NEG	r'r	B	<i>RHD-</i>
206	300109118006		4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
207	300109118015		51	NEG	rr		<i>híbrido (3-7)</i>
208	300109118020		2	NEG	rr		<i>RHD-</i>
209	300109118024		1	NEG	r'r		
210	300109118025		15	NEG	rr		
211	300109118026	22	6	NEG	rr		<i>RHD-</i>
212	300109118028		8	NEG	rr		
213	300109118035		13	NEG	rr		
214	300109118040		2	NEG	rr		
215	300109118041		11	NEG	rr		
216	300109118042		4	NEG	rr		
217	300109118046		12	NEG	rr		
218	300109118054		13	NEG	rr		
219	300109118057		1	NEG	rr		
220	300109118060		2	NEG	rr		
221	300109118072	23	63	NEG	rr		<i>RHD-</i>
222	300109118073		8	NEG	rr		
223	300109118075		9	NEG	rr		
224	300109118076		7	NEG	rr		
225	300109118081		1	NEG	rr		
226	300109118090		1	NEG	rr		
227	300109118093		1	NEG	rr		
228	300109118101		1	NEG	rr		
229	300109118109		1	NEG	rr		
230	300109118749		6	NEG	rr		
231	300109118121	24	32	NEG	rr		<i>RHD-</i>
232	300109118127		2	NEG	rr		
233	300109118133		9	NEG	rr		
234	300109118134		1	NEG	rr		
235	300109118155		1	NEG	rr		
236	300109118156		2	NEG	rr		
237	300109118157		2	NEG	rr		
238	300109118161		5	NEG	rr		
239	300109118162		10	NEG	rr		
240	300109118179		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
241	300109118182	25	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
242	300109118200		1	NEG	rr		
243	300109118206		1	NEG	rr		
244	300109118210		1	NEG	rr		
245	300109118211		8	NEG	rr		
246	300109118212		2	NEG	rr		
247	300109118218		16	NEG	rr		
248	300109118223		1	NEG	rr		
249	300109118257		1	NEG	rr		
250	300109118259		1	NEG	rr		
251	300109118261	26	9	NEG	rr		<i>RHD-</i>
252	300109118286		32	NEG	rr		
253	300109118751		1	NEG	rr		
254	300109118304		18	NEG	rr		
255	300109118315		14	NEG	rr		
256	300109118322		2	NEG	r"r"		
257	300109118329		3	NEG	rr		
258	300109118333		9	NEG	rr		
259	300109118334		9	NEG	rr		
260	300109118339		7	NEG	rr		
261	300109118342	27	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
262	300109118346		8	NEG	rr		
263	300109118382		9	NEG	rr		
264	300109118383		25	NEG	rr		
265	300109118407		5	NEG	rr		
266	300109118411		4	NEG	rr		
267	300109118413		3	NEG	r"r		
268	300109118431		1	NEG	rr		
269	300109118454		13	NEG	rr		
270	300109118468		1	NEG	rr		
271	300109118473	28	15	NEG	rr		<i>RHD-</i>
272	300109118479		1	NEG	rr		
273	300109118484		1	NEG	rr		
274	300109118493		1	NEG	rr		
275	300109118495		24	NEG	rr		
276	300109118510		1	NEG	rr		
277	300109118514		16	NEG	rr		
278	300109118530		1	NEG	rr		
279	300109118540		1	NEG	rr		
280	300109118545		7	NEG	rr		
281	300109118554	29	38	NEG	rr		<i>RHD-</i>
282	300109118558		1	NEG	rr		
283	300109118563		28	NEG	rr		
284	300109118564		1	NEG	rr		
285	300109118586		1	NEG	rr		
286	300109118593		1	NEG	rr		
287	300109118621		2	NEG	rr		
288	300109118627		5	NEG	rr		
289	300109118629		4	NEG	rr		
290	300109118631		5	NEG	rr		
291	300109118634	30	4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
292	300109118759		4	NEG	rr		
293	300109118689		1	NEG	rr		
294	300109118690		1	NEG	rr		
295	300109118691		1	NEG	rr		
296	300109118768		3	NEG	rr		
297	300109118703		7	NEG	rr		
298	300109118712		17	NEG	rr		
299	300109118737		16	NEG	rr		
300	300109118770		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
301	300109118779	31	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
302	300109118780		1	NEG	rr		
303	300109118843		1	NEG	rr		
304	300109118844		1	NEG	rr		
305	300109118855		1	NEG	rr		
306	300109118870		1	NEG	rr		
307	300109118881		5	NEG	rr		
308	300109118891		52	NEG	rr		
309	300109118894		1	NEG	rr		
310	300109120410		1	NEG	r'r		<i>hibrido (3-7)</i>
311	300109118908	32	3	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
312	300109118910		1	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
313	300109118912		24	NEG	rr		<i>RHD-</i>
314	300109118914		3	NEG	rr		
315	300109118915		8	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
316	300109118927		18	NEG	rr		
317	300109118935		6	NEG	rr		
318	300109118941		6	NEG	rr		
319	300109118948		4	NEG	rr		
320	300109118955		5	NEG	r'r		<i>Del</i>
321	300109118967	33	11	NEG	rr		<i>RHD-</i>
322	300109118991		19	NEG	rr		
323	300109119010		12	NEG	rr		
324	300109119012		1	NEG	rr		
325	300109119014		11	NEG	rr		
326	300109119015		10	NEG	rr		
327	300109119018		1	NEG	rr		
328	300109119025		1	NEG	rr		
329	300109119032		1	NEG	r'r'		<i>RHD-/RHCC/Y-/hex3-</i>
330	300109119036		1	NEG	rr		
331	300109119048	34	43	NEG	rr		<i>RHD-</i>
332	300109119057		2	NEG	rr		
333	300109119062		6	NEG	rr		
334	300109119065		3	NEG	r''r		
335	300109119128		3	NEG	rr		
336	300109119136		1	NEG	rr		
337	300109119144		1	NEG	rr		
338	300109119146		1	NEG	rr		
339	300109119173		81	NEG	rr		
340	300109119174		3	NEG	rr		
341	300109119178	35	43	NEG	rr		<i>RHD-</i>
342	300109119183		8	NEG	rr		
343	300109119185		1	NEG	rr		
344	300109119190		4	NEG	rr		
345	300109119192		7	NEG	rr		
346	300109119201		8	NEG	rr		
347	300109119213		1	NEG	r'r		
348	300109119215		4	NEG	rr		
349	300109119229		1	NEG	rr		
350	300109119239		14	NEG	rr		
351	300109119257	36	7	NEG	rr		<i>RHD-</i>
352	300109119273		5	NEG	rr		
353	300109119275		7	NEG	rr		
354	300109119285		32	NEG	rr		
355	300109119289		9	NEG	rr		
356	300109119294		12	NEG	rr		
357	300109119296		1	NEG	rr		
358	300109119304		1	NEG	rr		
359	300109119307		1	NEG	rr		
360	300109119314		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
361	300109119318	37	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
362	300109119320		15	NEG	rr		
363	300109119325		2	NEG	rr		
364	300109119330		1	NEG	rr		
365	300109119335		1	NEG	rr		
366	300109119336		45	NEG	rr		
367	300109119347		3	NEG	rr		
368	300109119298		8	NEG	rr		
369	300109119306		2	NEG	rr		
370	300109119352		4	NEG	rr		
371	300109119353	38	32	NEG	rr		<i>RHD-</i>
372	300109119366		2	NEG	rr		
373	300109119373		43	NEG	rr		
374	300109119374		2	NEG	rr		
375	300109119383		19	NEG	rr		
376	300109119392		3	NEG	rr		
377	300109119407		3	NEG	rr		
378	300109119411		8	NEG	rr		
379	300109119413		12	NEG	rr		
380	300109119417		1	NEG	rr		
381	300109119420	39	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
382	300109119424		4	NEG	rr		
383	300109119426		1	NEG	rr		
384	300109119432		1	NEG	rr		
385	300109119439		1	NEG	rr		
386	300109119468		1	NEG	rr		
387	300109119474		3	NEG	rr		
388	300109119480		7	NEG	rr		
389	300109119493		6	NEG	r ^h rr		
390	300109119500		6	NEG	rr		
391	300109119502	40	9	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
392	300109119512		1	NEG	rr		
393	300109119517		1	NEG	rr		
394	300109119518		1	NEG	rr		
395	300109119520		1	NEG	rr		
396	300109119524		14	NEG	rr	B	<i>RHD+</i> / <i>RHcc</i> / Ψ +
397	300109119526		1	NEG	rr		
398	300109119531		1	NEG	rr		
399	300109119533		1	NEG	rr		
400	300109119538		1	NEG	rr		
401	300109119541	41	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
402	300109119544		2	NEG	rr		
403	300109119545		12	NEG	rr		
404	300109119547		1	NEG	rr		
405	300109119549		6	NEG	rr		
406	300109119562		1	NEG	r ^h rr		
407	300109119583		1	NEG	rr		
408	300109119590		1	NEG	rr		
409	300109119592		1	NEG	rr		
410	300109119595		1	NEG	rr		
411	300109119602	42	1	NEG	rr	A	<i>RHD+</i> / <i>RHcc</i> / Ψ +
412	300109119608		26	NEG	rr		<i>RHD-</i>
413	300109119611		8	NEG	rr		
414	300109119613		9	NEG	rr		
415	300109119616		8	NEG	r ^h rr		<i>Del</i>
416	300109119617		8	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
417	300109119675		2	NEG	rr		
418	300109119676		2	NEG	rr		
419	300109119696		1	NEG	rr		
420	300109119719		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
421	300109119720	43	4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
422	300109119729		17	NEG	rr		
423	300109119742		8	NEG	rr		
424	300109119744		1	NEG	r'r		
425	300109119750		6	NEG	rr		
426	300109119759		7	NEG	rr		
427	300109119761		6	NEG	rr		
428	300109119767		1	NEG	rr		
429	300109119776		3	NEG	rr		
430	300109119783		3	NEG	rr		
431	300109119818	44	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
432	300109119823		1	NEG	rr		
433	300109119824		9	NEG	rr		
434	300109119829		16	NEG	rr		
435	300109119835		42	NEG	rr		
436	300109119837		1	NEG	rr		
437	300109119840		66	NEG	r"r		
438	300109119849		4	NEG	rr		
439	300109119850		1	NEG	rr		
440	300109119857		1	NEG	rr		
441	300109119874	45	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
442	300109119890		1	NEG	rr		
443	300109119907		1	NEG	rr		
444	300109119909		24	NEG	rr		
445	300109119918		1	NEG	rr		
446	300109119921		4	NEG	rr		
447	300109119929		17	NEG	rr		
448	300109119948		1	NEG	rr		
449	300109119954		3	NEG	rr		
450	300109119970		1	NEG	rr		
451	300109119973	46	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
452	300109119980		1	NEG	rr		
453	300109119981		1	NEG	rr		
454	300109119994		1	NEG	rr		
455	300109120004		15	NEG	rr		
456	300109120006		1	NEG	rr		
457	300109120007		31	NEG	rr		
458	300109120021		1	NEG	rr		
459	300109120043		5	NEG	rr		
460	300109120065		6	NEG	rr		
461	300109120067	47	7	NEG	rr		<i>RHD-</i>
462	300109120098		1	NEG	rr		
463	300109120100		9	NEG	rr		
464	300109120102		7	NEG	rr		
465	300109120112		1	NEG	rr		
466	300109120117		1	NEG	rr		
467	300109120119		2	NEG	rr		
468	300109120121		5	NEG	r"r		
469	300109120122		4	NEG	rr		
470	300109120128		1	NEG	rr		
471	300109120130	48	33	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
472	300109120131		1	NEG	rr		
473	300109120142		1	NEG	rr		
474	300109120144		1	NEG	rr		
475	300109120158		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
476	300109120164		1	NEG	rr		
477	300109120246		1	NEG	rr		
478	300109120260		1	NEG	rr		
479	300109120264		1	NEG	rr		<i>RHD+ / RHcc / Ψ+</i>
480	300109120278		22	NEG	rr		<i>RHD-</i>

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
481	300109120283	49	7	NEG	rr	A	RHD-
482	300109120286		7	NEG	rr		
483	300109120294		3	NEG	rr		
484	300109120295		6	NEG	rr		
485	300109120299		9	NEG	rr		
486	300109120306		1	NEG	rr	B	RHD+/RHcc/Ψ+
487	300109120329		3	NEG	rr		RHD-
488	300109120338		3	NEG	rr		
489	300109120342		6	NEG	rr		
490	300109120355		5	NEG	rr		
491	300109120374	50	1	NEG	rr	A	RHD-
492	300109120378		1	NEG	rr		
493	300109120398		1	NEG	rr		
494	300109120413		8	NEG	rr		
495	300109120419		2	NEG	rr		
496	300109120450		43	NEG	rr	B	RHD-
497	300109120489		3	NEG	rr		RHD+/RHcc/Ψ+
498	300109120495		1	NEG	rr		RHD-
499	300109120514		1	NEG	rr		
500	300109120694		1	NEG	rr		
501	300109120540	51	44	NEG	rr		RHD-
502	300109120541		1	NEG	rr		
503	300109120552		11	NEG	rr		
504	300109120558		2	NEG	rr		
505	300109120561		5	NEG	rr		
506	300109120599		5	NEG	rr		
507	300109120602		1	NEG	rr		
508	300109120601		1	NEG	rr		
509	300109120611		1	NEG	rr		
510	300109120619		1	NEG	rr		
511	300109120641	52	16	NEG	rr		RHD-
512	300109120647		1	NEG	rr		
513	300109120648		1	NEG	r"r		
514	300109120698		43	NEG	rr		
515	300109120714		2	NEG	rr		
516	300109120741		1	NEG	rr		
517	300109120745		4	NEG	rr		
518	300109120752		9	NEG	rr		
519	300109120760		11	NEG	rr		
520	300109120761		1	NEG	rr		
521	300109120762	53	1	NEG	rr		RHD-
522	300109120768		1	NEG	rr		
523	300109120771		1	NEG	rr		
524	300109120775		1	NEG	rr		
525	300109120782		1	NEG	rr		
526	300109120821		1	NEG	rr		
527	300109120866		1	NEG	rr		
528	300109120878		1	NEG	rr		
529	300109120882		1	NEG	rr		
530	300109120887		1	NEG	rr		
531	300109120900	54	21	NEG	rr		RHD-
532	300109120901		7	NEG	rr		
533	300109120916		8	NEG	rr		
534	300109120947		13	NEG	rr		
535	300109120951		1	NEG	rr		
536	300109120954		12	NEG	rr		
537	300109120965		2	NEG	rr		
538	300109120967		1	NEG	rr		
539	300109120981		2	NEG	rr		
540	300109120988		3	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
541	300109120989	55	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
542	300109121013		5	NEG	rr		
543	300109121014		1	NEG	rr		
544	300109121026		22	NEG	rr		
545	300109121031		4	NEG	rr		
546	300109121043		3	NEG	rr		
547	300109121047		7	NEG	rr		
548	300109121049		7	NEG	rr		
549	300109121054		6	NEG	rr		
550	300109121067		6	NEG	rr		
551	300109121068	56	11	NEG	rr		<i>RHD-</i>
552	300109121073		2	NEG	r"r		
553	300109121080		3	NEG	rr		
554	300109121086		3	NEG	rr		
555	300109121093		44	NEG	rr		
556	300109121107		1	NEG	rr		
557	300109121130		2	NEG	rr		
558	300109121139		6	NEG	rr		
559	300109121140		1	NEG	rr		
560	300109121145		8	NEG	rr		
561	300109121155	57	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
562	300109121183		1	NEG	rr		
563	300109121204		1	NEG	rr		
564	300109121213		1	NEG	rr		
565	300109121240		1	NEG	r"r		
566	300109121244		8	NEG	rr		
567	300109121250		9	NEG	rr		
568	300109121252		1	NEG	rr		
569	300109121265		10	NEG	rr		
570	300109121269		6	NEG	rr		
571	300109121304	58	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
572	300109121377		1	NEG	rr		
573	300109121378		1	NEG	rr		
574	300109121383		14	NEG	rr		
575	300109121389		2	NEG	rr		
576	300109121406		5	NEG	rr		
577	300109121460		1	NEG	rr		
578	300109121466		69	NEG	rr		
579	300109121467		2	NEG	r"r		
580	300109121487		1	NEG	rr		
581	300109121525	59	2	NEG	rr		<i>RHD-</i>
582	300109121536		4	NEG	rr		
583	300109121540		2	NEG	rr		
584	300109121555		1	NEG	rr		
585	300109121567		5	NEG	rr		
586	300109121573		1	NEG	rr		
587	300109121579		1	NEG	rr		
588	300109121582		1	NEG	rr		
589	300109121583		3	NEG	rr		
590	300109121602		5	NEG	rr		
591	300109121618	60	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
592	300109121647		9	NEG	rr		
593	300109121653		1	NEG	rr		
594	300109121670		13	NEG	rr		
595	300109121678		3	NEG	rr		
596	300109121682		1	NEG	rr		
597	300109121688		3	NEG	rr		
598	300109121691		4	NEG	rr		
599	300109121707		1	NEG	rr		
600	300109121741		2	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
601	300109121724	61	1	NEG	r ^h r		<i>RHD-</i>
602	300109121745		49	NEG	rr		
603	300109121751		2	NEG	rr		
604	300109121752		1	NEG	rr		
605	300109121763		3	NEG	rr		
606	300109121764		3	NEG	rr		
607	300109121777		5	NEG	rr		
608	300109121779		1	NEG	rr		
609	300109121782		9	NEG	rr		
610	300109121784		2	NEG	rr		
611	300109121788	62	7	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
612	300109121795		1	NEG	r ^h r		
613	300109121796		2	NEG	rr		
614	300109121803		55	NEG	rr	B	<i>RHD+</i> / <i>RHcc</i> / Ψ ₊
615	300109121819		1	NEG	rr		
616	300109121842		3	NEG	rr		
617	300109121846		5	NEG	rr		
618	300109121850		4	NEG	rr		
619	300109121870		6	NEG	rr		
620	300109121879		5	NEG	rr		
621	300109121882	63	6	NEG	rr		<i>RHD-</i>
622	300109121890		8	NEG	rr		
623	300109121922		21	NEG	rr		
624	300109121929		4	NEG	rr		
625	300109121933		3	NEG	rr		
626	300109121936		7	NEG	rr		
627	300109121941		13	NEG	rr		
628	300109121948		5	NEG	rr		
629	300109121955		12	NEG	rr		
630	300109121959		11	NEG	rr		
631	300109121988	64	7	NEG	rr		<i>RHD-</i>
632	300109121990		4	NEG	rr		
633	300109121992		3	NEG	rr		
634	300109122040		6	NEG	rr		
635	300109122066		6	NEG	rr		
636	300109122087		5	NEG	rr		
637	300109122111		5	NEG	rr		
638	300109122120		8	NEG	rr		
639	300109122124		18	NEG	rr		
640	300109122135		13	NEG	r ^h r		
641	300109122143	65	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
642	300109122150		5	NEG	rr		
643	300109122185		34	NEG	rr		
644	300109122190		3	NEG	rr		
645	300109122240		16	NEG	rr		
646	300109122192		3	NEG	rr		
647	300109122201		7	NEG	rr		
648	300109122215		5	NEG	rr		
649	300109122260		5	NEG	rr		
650	300109122265		13	NEG	rr		
651	300109122277	66	9	NEG	rr		<i>RHD-</i>
652	300109122279		11	NEG	rr		
653	300109122280		1	NEG	rr		
654	300109122288		81	NEG	rr		
655	300109122293		1	NEG	rr		
656	300109122303		1	NEG	rr		
657	300109122304		9	NEG	rr		
658	300109122305		4	NEG	rr		
659	300109122306		1	NEG	rr		
660	300109122391		6	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
661	300109122394	67	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
662	300109122413		1	NEG	rr		
663	300109122429		7	NEG	rr		
664	300109122436		8	NEG	rr		
665	300109122440		8	NEG	rr		
666	300109122444		3	NEG	r'r		
667	300109122445		24	NEG	rr		
668	300109122475		1	NEG	rr		
669	300109122510		6	NEG	rr		
670	300109122528		2	NEG	rr		
671	300109122533	68	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
672	300109122536		7	NEG	rr		
673	300109122548		3	NEG	rr		
674	300109122563		1	NEG	rr		
675	300109122608		1	NEG	rr		
676	300109122625		14	NEG	rr		
677	300109122631		5	NEG	rr		
678	300109122644		2	NEG	rr		
679	300109122668		1	NEG	rr		
680	300109122692		23	NEG	rr		
681	300109122705	69	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
682	300109122712		1	NEG	rr		
683	300109122738		4	NEG	rr		
684	300109122747		4	NEG	rr		
685	300109122752		1	NEG	rr		
686	300109122755		51	NEG	rr		
687	300109122861		3	NEG	rr		
688	300109122866		1	NEG	r'r		<i>híbrido (3-7)</i>
689	300109122867		62	NEG	rr		<i>RHD-</i>
690	300109122870		1	NEG	rr		
691	300109122887	70	4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
692	300109122892		1	NEG	rr		
693	300109122935		1	NEG	rr		
694	300109122936		1	NEG	rr		
695	300109122944		1	NEG	rr		
696	300109122956		5	NEG	rr		
697	300109122964		7	NEG	rr		
698	300109122967		7	NEG	rr		
699	300109122970		9	NEG	rr		
700	300109123003		8	NEG	rr		
701	300109123028	71	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
702	300109123030		13	NEG	rr		
703	300109123039		1	NEG	rr		
704	300109123049		5	NEG	rr		
705	300109123065		1	NEG	rr		
706	300109123066		1	NEG	rr		
707	300109123076		2	NEG	rr		
708	300109123080		1	NEG	rr		
709	300109123083		4	NEG	rr		
710	300190123091		1	NEG	rr		
711	300109123107	72	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
712	300109123122		1	NEG	rr		
713	300109123134		1	NEG	rr		
714	300109123136		6	NEG	rr		
715	300109123138		6	NEG	rr		
716	300109123139		11	NEG	rr		
717	300109123143		5	NEG	rr		
718	300109123144		7	NEG	rr		
719	300109123169		1	NEG	rr		
720	300109123192		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
721	300109123207	73	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
722	300109123210		42	NEG	rr		
723	300109123211		5	NEG	rr		
724	300109123221		1	NEG	rr		
725	300109123228		1	NEG	rr		
726	300109123242		1	NEG	rr		
727	300109123243		1	NEG	rr		
728	300109123254		4	NEG	rr		
729	300109123274		5	NEG	rr		
730	300109123290		1	NEG	rr		
731	300109123294	74	8	NEG	rr		<i>RHD-</i>
732	300109123303		1	NEG	rr		
733	300109123308		8	NEG	rr		
734	300109123316		1	NEG	rr		
735	300109123337		9	NEG	rr		
736	300109123342		1	NEG	rr		
737	300109123343		1	NEG	rr		
738	300109123348		1	NEG	rr		
739	300109123382		9	NEG	rr		
740	300109123402		1	NEG	rr		
741	300109123404	75	15	NEG	rr		<i>RHD-</i>
742	300109123406		1	NEG	rr		
743	300109123409		1	NEG	rr		
744	300109123411		22	NEG	rr		
745	300109123413		4	NEG	rr		
746	300109123442		1	NEG	rr		
747	300109123443		31	NEG	rr		
748	300109123450		6	NEG	rr		
749	300109123471		1	NEG	rr		
750	300109123477		8	NEG	rr		
751	300109123486	76	4	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
752	300109123489		1	NEG	rr		
753	300109123496		46	NEG	rr	B	<i>RHD-</i> <i>RHD+/RHcc/Ψ+</i> <i>RHD-</i>
754	300109123498		1	NEG	rr		
755	300109123505		1	NEG	rr		
756	300109123506		1	NEG	rr		
757	300109123513		1	NEG	rr		
758	300109123517		56	NEG	rr		
759	300109123531		3	NEG	rr		
760	300109123536		5	NEG	rr		
761	300109123564	77	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
762	300109123581		6	NEG	rr		
763	300109123582		8	NEG	rr		
764	300109123586		1	NEG	rr		
765	300109123590		3	NEG	rr		
766	300109123603		1	NEG	rr		
767	300109123604		1	NEG	rr		
768	300109123605		1	NEG	rr		
769	300109123607		4	NEG	rr		
770	300109123609		6	NEG	rr		
771	300109123612	78	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
772	300109123613		1	NEG	rr		
773	300109123637		1	NEG	rr		
774	300109123640		1	NEG	rr		
775	300109123651		1	NEG	rr		
776	300109123654		1	NEG	rr		
777	300109123660		1	NEG	rr		
778	300109123663		1	NEG	rr		
779	300109123669		1	NEG	rr		
780	300109123687		6	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
781	300109123703	79	9	NEG	rr		<i>RHD-</i>
782	300109123726		19	NEG	rr		
783	300109123743		1	NEG	rr		
784	300109123775		13	NEG	rr		
785	300109123777		1	NEG	rr		
786	300109123778		54	NEG	rr		
787	300109123783		1	NEG	rr		
788	300109123784		4	NEG	rr		
789	300109123790		4	NEG	rr		
790	300109123793		6	NEG	rr		
791	300109123800	80	11	NEG	rr		<i>RHD-</i>
792	300109123813		7	NEG	rr		
793	300109123831		1	NEG	rr		
794	300109123858		8	NEG	rr		
795	300109123899		8	NEG	rr		
796	300109123938		9	NEG	rr		
797	300109123942		1	NEG	rr		
798	300109123943		17	NEG	rr		
799	300109123944		1	NEG	rr		
800	300109123993		5	NEG	rr		
801	300109124020	81	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
802	300109124029		1	NEG	rr		
803	300109124034		1	NEG	rr		
804	300109124036		1	NEG	rr		
805	300109124038		18	NEG	rr		
806	300109124039		3	NEG	rr		
807	300109124048		2	NEG	rr		
808	300109124057		1	NEG	rr		
809	300109124062		1	NEG	rr		
810	300109124065		1	NEG	rr		
811	300109124076	82	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
812	300109124089		1	NEG	rr		
813	300109124093		1	NEG	rr		
814	300109124103		1	NEG	rr		
815	300109124116		1	NEG	rr		
816	300109124152		1	NEG	rr		
817	300109124184		1	NEG	rr		
818	300109124185		1	NEG	rr		
819	300109124196		1	NEG	rr		
820	300109124202		1	NEG	rr		
821	300109124221	83	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
822	300109124250		17	NEG	rr		
823	300109124258		5	NEG	rr		
824	300109124261		8	NEG	rr		
825	300109124266		9	NEG	rr		
826	300109124276		8	NEG	rr		
827	300109124277		8	NEG	rr		
828	300109124289		13	NEG	rr		
829	300109124290		1	NEG	rr		
830	300109124346		4	NEG	rr		
831	300109124358	84	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
832	300109124387		4	NEG	rr		
833	300109124395		4	NEG	rr		
834	300109124403		16	NEG	rr		
835	300109124407		3	NEG	rr		
836	300109124408		4	NEG	rr		
837	300109124410		1	NEG	rr		
838	300109124429		1	NEG	rr		
839	300109124465		1	NEG	rr		
840	300109124494		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo	
841	300109124496	85	15	NEG	rr		RHD-	
842	300109124502		3	NEG	rr			
843	300109124507		7	NEG	rr			
844	300109124512		5	NEG	rr			
845	300109124516		4	NEG	rr			
846	300109124521		4	NEG	rr			
847	300109124545		6	NEG	rr			
848	300109124550		1	NEG	rr			
849	300109124558		10	NEG	rr			
850	300109124559		6	NEG	rr			
851	300109124576	86	7	NEG	rr	A	RHD-	
852	300109124578		7	NEG	rr		RHD+/RHcc/Ψ+	
853	300109124584		1	NEG	rr		RHD-	
854	300109124595		2	NEG	rr			
855	300109124604		1	NEG	r"r			
856	300109124611		16	NEG	rr	B	RHD-	
857	300109124655		1	NEG	rr			
858	300109124660		1	NEG	rr			
859	300109124669		1	NEG	rr			
860	300109124719		1	NEG	rr	A	RHD-	
861	300109124767	87	1	NEG	rr			
862	300109124807		1	NEG	rr			
863	300109124809		1	NEG	rr			
864	300109124810		2	NEG	rr			
865	300109124815		17	NEG	rr			
866	300109124816		2	NEG	rr			
867	300109124819		9	NEG	rr		B	RHD-
868	300109124822		7	NEG	rr			
869	300109124843		7	NEG	rr			
870	300109124846		4	NEG	rr			
871	300109124857	88	6	NEG	rr		RHD-	
872	300109124866		4	NEG	rr			
873	300109124893		3	NEG	rr			
874	300109124899		4	NEG	rr			
875	300109124909		6	NEG	rr			
876	300109124954		19	NEG	rr			
877	300109124966		21	NEG	rr			
878	300109124967		4	NEG	rr			
879	300109124994		9	NEG	rr			
880	300109125006		5	NEG	rr			
881	300109125008	89	8	NEG	rr		RHD-	
882	300109125011		5	NEG	rr			
883	300109125012		4	NEG	rr			
884	300109125040		9	NEG	rr			
885	300109125055		13	NEG	rr			
886	300109125060		1	NEG	rr			
887	300109125070		1	NEG	rr			
888	300109125082		6	NEG	rr			
889	300109125083		1	NEG	rr			
890	300109125085		1	NEG	rr			
891	300109125088	90	5	NEG	rr		RHD-	
892	300109125101		1	NEG	rr			
893	300109125118		1	NEG	rr			
894	300109125124		6	NEG	rr			
895	300109125127		3	NEG	rr			
896	300109125247		1	NEG	rr			
897	300109125248		14	NEG	rr			
898	300110126842		6	NEG	rr			
899	300110126315		13	NEG	rr			
900	300110126230		1	NEG	rr			

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
901	300110126899	91	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
902	300110126911		9	NEG	rr		
903	300110126910		1	NEG	rr		
904	300110126289		26	NEG	rr		
905	300110126730		1	NEG	rr		
906	300110126724		1	NEG	rr		
907	300110126749		1	NEG	rr		
908	300110126750		1	NEG	rr		
909	300110126785		16	NEG	rr		
910	300110126758		3	NEG	rr		
911	300110126803	92	7	NEG	rr		<i>RHD-</i>
912	300110126802		3	NEG	rr		
913	300110126393		1	NEG	rr		
914	300110126629		2	NEG	rr		
915	300110126425		1	NEG	rr		
916	300110126617		3	NEG	rr		
917	300110126615		5	NEG	rr		
918	300110126614		6	NEG	rr		
919	300110126578		1	NEG	rr		
920	300110126551		3	NEG	rr		
921	300110126542	93	2	NEG	rr		<i>RHD-</i>
922	300110126534		4	NEG	rr		
923	300110126357		1	NEG	rr		
924	300110126176		1	NEG	rr		
925	300110126427		1	NEG	rr		
926	300110126436		4	NEG	rr		
927	300110126451		6	NEG	rr		
928	300110126472		6	NEG	rr		
929	300110126476		1	NEG	r ^h r		
930	300110126477		19	NEG	rr		
931	300110126449	94	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
932	300110126345		1	NEG	rr		
933	300110126353		1	NEG	rr		
934	300110126352		19	NEG	rr		
935	300110126336		21	NEG	rr		
936	300110126363		1	NEG	rr		
937	300110126365		1	NEG	rr		
938	300110126374		1	NEG	rr		
939	300110126523		1	NEG	rr		
940	300110126522		5	NEG	rr		
941	300110126394	95	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
942	300110126515		14	NEG	rr		
943	300110126509		4	NEG	rr		
944	300110126397		15	NEG	rr		
945	300110126194		2	NEG	rr		
946	300110126254		53	NEG	rr		
947	300110126264		4	NEG	rr		
948	300110126286		7	NEG	rr		
949	300110126293		9	NEG	rr		
950	300110126297		5	NEG	rr		
951	300110126168	96	6	NEG	r ^h r	A	<i>D fraco tipo 38</i>
952	300110126308		1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
953	300110126169		1	NEG	rr		
954	300110126116		1	NEG	rr		
955	300110126121		2	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
956	300110125853		2	NEG	rr		
957	300110126177		3	NEG	rr		
958	300110126179		4	NEG	rr		
959	300110126186		4	NEG	rr		
960	300110126196		4	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
961	300110126199	97	2	NEG	rr		<i>RHD-</i>
962	300110126201		1	NEG	rr		
963	300110126211		34	NEG	rr		
964	300110125858		1	NEG	rr		
965	300110125921		14	NEG	rr		
966	300110126139		1	NEG	rr		
967	300110125830		1	NEG	rr		
968	300110126104		1	NEG	r'r		
969	300110126099		1	NEG	rr		
970	300110126092		2	NEG	rr		
971	300110126219	98	6	NEG	rr		<i>RHD-</i>
972	300110126105		23	NEG	rr		
973	300110126106		3	NEG	rr		
974	300110125824		4	NEG	rr		
975	300110126111		5	NEG	rr		
976	300110126986		1	NEG	rr		
977	300110127152		2	NEG	rr		
978	300110126984		4	NEG	rr		
979	300110126979		4	NEG	rr		
980	300110126975		6	NEG	rr		
981	300110126962	99	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
982	300110126956		11	NEG	rr		
983	300110126945		13	NEG	rr		
984	300110127034		1	NEG	rr		
985	300110127029		1	NEG	r'r		
986	300110127013		1	NEG	r'r		
987	300110126990		3	NEG	rr		
988	300110127084		3	NEG	rr		
989	300110127128		1	NEG	r''r		
990	300110127048		14	NEG	rr		
991	300110127101	100	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
992	300110127148		6	NEG	rr		
993	300110127154		13	NEG	rr		
994	300110127169		3	NEG	rr		
995	300110127179		6	NEG	rr		
996	300110127114		9	NEG	rr		
997	300110127120		1	NEG	rr		
998	300109125391		2	NEG	rr		
999	300109125389		1	NEG	rr		
1000	300109125400		4	NEG	rr		
1001	300109125417	101	13	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1002	300109125420		2	NEG	rr		
1003	300109125422		3	NEG	rr		
1004	300109125581		4	NEG	rr		
1005	300109125538		5	NEG	rr		
1006	300110127200		1	NEG	r'r		
1007	300110127203		2	NEG	rr		
1008	300110127235		4	NEG	rr		
1009	300110127245		1	NEG	rr		
1010	300110127253		4	NEG	rr		
1011	300110127258	101	9	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1012	300110127426		18	NEG	rr		
1013	300110127427		32	NEG	rr		
1014	300110127432		12	NEG	rr		
1015	300110127438		1	NEG	rr		
1016	300110127450		14	NEG	rr		
1017	300110127454		1	NEG	rr		
1018	300110127484		1	NEG	rr		
1019	300110127489		1	NEG	rr		
1020	300110127491		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1021	300110127494	103	21	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1022	300110127495		1	NEG	r'r		
1023	300110127500		4	NEG	rr		
1024	300110127509		1	NEG	rr		
1025	300110127458		1	NEG	rr		
1026	300110127531		12	NEG	rr		
1027	300110127546		1	NEG	rr		
1028	300110127552		14	NEG	rr		
1029	300110127916		15	NEG	r''r		
1030	300110127914		1	NEG	rr		
1031	300110128287	104	18	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1032	300110127955		4	NEG	rr		
1033	300110127961		1	NEG	rr		
1034	300110128300		8	NEG	rr		
1035	300110127901		1	NEG	rr		
1036	300110128253		1	NEG	rr		
1037	300110128289		1	NEG	rr		
1038	300110128291		1	NEG	rr		
1039	300110128293		1	NEG	rr		
1040	300110127902		1	NEG	r'r		
1041	300110127939	105	23	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1042	300110128280		4	NEG	rr		
1043	300110128348		15	NEG	rr		
1044	300110128378		30	NEG	rr		
1045	300110128381		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1046	300110128409		1	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1047	300110128410		1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1048	300110128427		2	NEG	rr		
1049	300110128484		4	NEG	rr		
1050	300110128440		7	NEG	rr		
1051	300110128436	106	45	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1052	300110128431		3	NEG	rr		
1053	300110128327		3	NEG	rr		
1054	300110128295		6	NEG	rr		
1055	300110128494		7	NEG	rr		
1056	300110128508		5	NEG	rr		
1057	300110128518		8	NEG	rr		
1058	300110128521		9	NEG	r'r		
1059	300110128544		11	NEG	r'r		
1060	300110128561		4	NEG	rr		
1061	300110128562	107	77	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1062	300110128565		1	NEG	rr		
1063	300110128568		1	NEG	rr		
1064	300110128576		1	NEG	rr		
1065	300110128329		1	NEG	rr	B	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1066	300110128782		1	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1067	300110128772		1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1068	300110128660		5	NEG	rr		
1069	300110128901		13	NEG	rr		
1070	300110128876		1	NEG	rr		
1071	300110128846	108	3	NEG	r''r	A	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1072	300110128862		63	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1073	300110128886		4	NEG	rr		
1074	300110128596		34	NEG	rr		
1075	300110128587		2	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1076	300110128636		1	NEG	rr		
1077	300110128634		23	NEG	r'r		
1078	300110128858		3	NEG	rr		
1079	300110128895		5	NEG	rr		
1080	300110128274		9	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1081	300110128382	109	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1082	300110128813		2	NEG	rr		
1083	300110128606		33	NEG	rr		
1084	300110128920		31	NEG	rr		
1085	300110128844		1	NEG	rr		
1086	300110128851		1	NEG	rr		
1087	300110129088		13	NEG	rr		
1088	300110128849		7	NEG	rr		
1089	300110129104		1	NEG	rr		
1090	300110129097		12	NEG	rr		
1091	300110129136	110	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1092	300110129150		5	NEG	rr		
1093	300110129151		4	NEG	rr		
1094	300110129046		6	NEG	r ^h r		
1095	300110129047		1	NEG	rr		
1096	300110129305		2	NEG	rr		
1097	300110129310		5	NEG	rr		
1098	300110129141		43	NEG	rr		
1099	300110129373		7	NEG	rr		
1100	300110129118		1	NEG	rr		
1101	300110129060	111	18	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1102	300110129301		17	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1103	300110129319		1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1104	300110129320		2	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1105	300110129448		1	NEG	rr		
1106	300110129414		15	NEG	rr		
1107	300110128990		1	NEG	rr		
1108	300110129275		1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1109	300110129378		1	NEG	rr		
1110	300110129338		1	NEG	rr		
1111	300110129449	112	1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1112	300110129457		2	NEG	rr		
1113	300110129387		1	NEG	rr		
1114	300110129343		14	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1115	300110129382		2	NEG	rr		
1116	300110128971		1	NEG	rr		
1117	300110128980		3	NEG	rr		
1118	300110128982		1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1119	300110129251		1	NEG	rr		
1120	300110129206		11	NEG	rr		
1121	300110129266	113	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1122	300110129262		34	NEG	rr		
1123	300110129138		2	NEG	rr		
1124	300110129942		5	NEG	rr		
1125	300110129910		6	NEG	rr		
1126	300110129903		1	NEG	rr		
1127	300110129951		5	NEG	rr		
1128	300110129945		6	NEG	rr		
1129	300110130034		7	NEG	rr		
1130	300110130041		1	NEG	rr		
1131	300110130038	114	1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1132	300110130035		1	NEG	rr		<i>Dfraco tipo 1</i>
1133	300110130043		2	NEG	r ^h r		<i>RHD-</i>
1134	300110130085		1	NEG	rr	B	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1135	300110130073		1	NEG	rr		
1136	300110113044		6	NEG	rr		
1137	300110130018		1	NEG	rr		
1138	300110129991		1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1139	300110129674		1	NEG	rr		
1140	300110129670		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1141	300110129767	115	2	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1142	300110129580		2	NEG	rr		
1143	300110129677		7	NEG	rr		
1144	300110129988		1	NEG	rr		
1145	300110129777		1	NEG	rr		
1146	300110129855		1	NEG	rr		
1147	300110129851		1	NEG	r ^h r		
1148	300110129814		1	NEG	rr		
1149	300110129566		1	NEG	rr		
1150	300110129615		1	NEG	rr		
1151	300110129617	116	16	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1152	300110129567		5	NEG	rr		
1153	300110129689		11	NEG	rr		
1154	300110129963		1	NEG	rr		
1155	300110129574		1	NEG	rr		
1156	300110129768		1	NEG	rr		
1157	300110130995		3	NEG	rr		
1158	300110130982		3	NEG	rr		
1159	300110130981		2	NEG	rr		
1160	300110130962		4	NEG	rr		
1161	300110129741	117	4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1162	300110129749		2	NEG	rr		
1163	300110129603		1	NEG	rr		
1164	300110129584		1	NEG	rr		
1165	300110129546		1	NEG	rr		
1166	300110129528		1	NEG	rr		
1167	300110129480		1	NEG	rr		
1168	300110129994		8	NEG	rr		
1169	300110129721		53	NEG	rr		
1170	300110129711		1	NEG	rr		
1171	300110129810	118	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1172	300110129619		1	NEG	rr		
1173	300110129535		1	NEG	rr		
1174	300110129530		1	NEG	rr		
1175	300110129469		1	NEG	rr		
1176	300110129598		1	NEG	r ^h r		
1177	300110129541		6	NEG	rr		
1178	300110129564		71	NEG	rr		
1179	300110129595		1	NEG	rr		
1180	300110129699		1	NEG	rr		
1181	300110129628	119	13	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1182	300110129614		21	NEG	rr		
1183	300110130114		3	NEG	rr		
1184	300110130155		1	NEG	rr		
1185	300110130157		1	NEG	rr		
1186	300110130120		1	NEG	rr		
1187	300110130131		1	NEG	rr		
1188	300110130099		26	NEG	rr		
1189	300110130203		2	NEG	r ^h r		
1190	300110130165		6	NEG	rr		
1191	300110130169	120	1	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1192	300110130181		2	NEG	rr		
1193	300110130330		3	NEG	rr		
1194	300110130341		1	NEG	rr		
1195	300110130352		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1196	300110130293		1	NEG	rr		
1197	300110130224		1	NEG	rr		
1198	300110130221		1	NEG	r ^h r		
1199	300110130239		1	NEG	rr		
1200	300110130550		1	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1201	300110130389	121	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1202	300110130384		2	NEG	rr		
1203	300110130601		4	NEG	rr		
1204	300110130542		5	NEG	rr		
1205	300110130625		5	NEG	rr		
1206	300110130535		17	NEG	rr		
1207	300110130557		5	NEG	rr		
1208	300110130574		3	NEG	r"r		
1209	300110130576		4	NEG	rr		
1210	300110130527		5	NEG	rr		
1211	300110130934	122	6	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1212	300110130922		2	NEG	rr		
1213	300110130929		3	NEG	rr		
1214	300110130594		9	NEG	rr		
1215	300110130611		14	NEG	rr		
1216	300110130930		2	NEG	rr		
1217	300110130888		5	NEG	r"r		
1218	300110130607		3	NEG	rr		
1219	300110130896		7	NEG	rr		
1220	300110130901		4	NEG	rr		
1221	300110130867	123	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1222	300110130743		5	NEG	rr		
1223	300110130747		1	NEG	rr		
1224	300110130851		1	NEG	rr		
1225	300110130828		5	NEG	r"r		
1226	300110130702		5	NEG	rr		
1227	300110130818		7	NEG	rr		
1228	300110130667		15	NEG	rr		
1229	300110130663		1	NEG	r"r		
1230	300110130661		2	NEG	rr		
1231	300110130648	124	4	NEG	rr	A	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1232	300110130687		4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1233	300110130824		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1234	300110131540		8	NEG	rr		
1235	300110131144		2	NEG	rr		
1236	300110131291		1	NEG	rr		
1237	300110131399		4	NEG	rr		
1238	300110131436		2	NEG	rr		
1239	300110131375		1	NEG	rr		
1240	300110131443		9	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1241	300110131142	125	5	NEG	rr		
1242	300110131543		1	NEG	rr	B	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1243	300110131376		13	NEG	rr		
1244	300110131367		2	NEG	rr		
1245	300110131390		1	NEG	rr		
1246	300110131311		6	NEG	rr		
1247	300110131160		8	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1248	300110131315		1	NEG	rr		
1249	300110131283		5	NEG	rr		
1250	300110131363		6	NEG	rr		
1251	300110131573	126	11	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1252	300110131561		1	NEG	rr		
1253	300110131484		6	NEG	rr		
1254	300110131272		4	NEG	rr		
1255	300110131497		2	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1256	300110131388		1	NEG	rr		
1257	300110131577		2	NEG	rr		
1258	300110131535		3	NEG	rr		
1259	300110131499		6	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1260	300110131341		1	NEG	rr		<i>RHD-</i>

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1261	300110131172	127	3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1262	300110131423		2	NEG	rr		
1263	300110131393		1	NEG	rr		
1264	300110131366		9	NEG	rr		
1265	300110200896		9	NEG	rr		
1266	300110200888		4	NEG	rr		
1267	300110200885		1	NEG	rr		
1268	300110200870		10	NEG	rr		
1269	300110200697		3	NEG	rr		
1270	300110200573		5	NEG	rr		
1271	300110200701	128	2	NEG	r ^h r		<i>RHD-</i>
1272	300110200561		1	NEG	rr		
1273	300110200576		2	NEG	rr		
1274	300110200006		16	NEG	rr		
1275	300110200592		3	NEG	rr		
1276	300110200170		2	NEG	rr		
1277	300110200684		1	NEG	rr		
1278	300110200677		13	NEG	rr		
1279	300110200030		4	NEG	rr		
1280	300110200601		3	NEG	rr		
1281	300110200153	129	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1282	300110200149		1	NEG	rr		
1283	300110200165		5	NEG	rr		
1284	300110200218		5	NEG	rr		
1285	300110200208		1	NEG	rr		
1286	300110200164		11	NEG	rr		
1287	300110200615		1	NEG	rr		
1288	300110200724		2	NEG	rr		
1289	300110200753		1	NEG	rr		
1290	300110200236		4	NEG	rr		
1291	300110200388	130	6	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1292	300110200276		1	NEG	rr		
1293	300110200367		17	NEG	rr		
1294	300110200727		1	NEG	rr		
1295	300110200760		2	NEG	rr		
1296	300110200763		12	NEG	r ^h r		
1297	300110200752		1	NEG	rr		
1298	300110200365		1	NEG	rr		
1299	300110200366		7	NEG	rr		
1300	300110200305		4	NEG	rr		
1301	300110200275	131	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1302	300110200273		2	NEG	rr		
1303	300110200363		4	NEG	rr		
1304	300110200293		14	NEG	rr		
1305	300110200318		2	NEG	rr		
1306	300110200395		33	NEG	rr		
1307	300110200322		1	NEG	r ^h r		
1308	300110200298		1	NEG	rr		
1309	300110200311		1	NEG	rr		
1310	300110200420		1	NEG	rr		
1311	300110200426	132	2	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1312	300110200472		32	NEG	rr		
1313	300110200428		9	NEG	rr		
1314	300110200483		8	NEG	rr		
1315	300110200485		9	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1316	300110200434		9	NEG	rr		
1317	300110200490		5	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1318	300110200436		5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1319	300110200457		7	NEG	rr		
1320	300110200492		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1321	300110200290	133	13	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1322	300110201389		2	NEG	rr		
1323	300110201393		4	NEG	rr		
1324	300110200782		12	NEG	rr		
1325	300110201128		12	NEG	rr		
1326	300110201182		4	NEG	rr		
1327	300110200953		2	NEG	rr		
1328	300110201060		8	NEG	rr		
1329	300110201102		4	NEG	rr		
1330	300110201085		5	NEG	rr		
1331	300110200948	134	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1332	300110201386		16	NEG	rr		
1333	300110200977		8	NEG	rr		
1334	300110200975		1	NEG	rr		
1335	300110200942		3	NEG	rr		
1336	300110200296		3	NEG	rr		
1337	300110200289		6	NEG	rr		
1338	300110201224		5	NEG	rr		
1339	300110201209		4	NEG	rr		
1340	300110201184		4	NEG	rr		
1341	300110201385	135	4	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1342	300110201199		4	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1343	300110201046		1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1344	300110201055		1	NEG	rr	B	<i>D fraco tipo 5</i>
1345	300110201383		8	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1346	300110200789		9	NEG	rr		
1347	300110200794		1	NEG	r"r		
1348	300110200815		2	NEG	rr		
1349	300110201159		5	NEG	rr		
1350	300110201177		4	NEG	rr		
1351	300110201022	136	13	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1352	300110201235		5	NEG	rr		
1353	300110201236		4	NEG	rr		
1354	300110201248		1	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1355	300110201472		7	NEG	rr		
1356	300110201541		7	NEG	rr		
1357	300110201518		4	NEG	rr		
1358	300110201448		2	NEG	rr		
1359	300110201460		1	NEG	rr		
1360	300110201490		1	NEG	rr		
1361	300110201494	137	3	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1362	300110201850		1	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1363	300110201833		4	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1364	300110201596		6	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1365	300110201829		7	NEG	rr		
1366	300110202181		6	NEG	rr		
1367	300110201406		6	NEG	rr		
1368	300110201505		2	NEG	rr		
1369	300110201507		4	NEG	rr		
1370	300110201527		4	NEG	rr		
1371	300110201566	138	5	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1372	300110201599		5	NEG	rr		
1373	300110201570		1	NEG	rr		
1374	300110201572		4	NEG	rr		
1375	300110201573		8	NEG	rr		
1376	300110201604		9	NEG	rr		
1377	300110201613		9	NEG	rr		
1378	300110201621		2	NEG	rr		
1379	300110201634		2	NEG	rr		
1380	300110201636		1	NEG	rr		

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1381	300110201648	139	11	NEG	rr	A	RHD-
1382	300110201658		3	NEG	rr		
1383	300110201672		4	NEG	rr		
1384	300110201692		1	NEG	rr		RHD+/RHcc/Ψ+
1385	300110201697		7	NEG	rr	B	RHD-
1386	300110201722		4	NEG	rr		RHD-
1387	300110201729		5	NEG	rr		
1388	300110202187		5	NEG	rr		
1389	300110201743		1	NEG	rr		
1390	300110201744		8	NEG	rr		
1391	300110201750	140	1	NEG	rr		RHD-
1392	300110202140		8	NEG	rr		
1393	300110202151		11	NEG	rr		
1394	300110202213		5	NEG	rr		
1395	300110202222		1	NEG	rr		
1396	300110202239		3	NEG	rr		
1397	300110202119		6	NEG	rr		
1398	300110202093		2	NEG	rr		
1399	300110202094		13	NEG	rr		
1400	300110202095		3	NEG	rr		
1401	300110201774	141	1	NEG	rr		RHD-
1402	300110201784		1	NEG	rr		
1403	300110201788		38	NEG	rr		
1404	300110201806		5	NEG	rr		
1405	300110201982		1	NEG	rr		
1406	300110201870		1	NEG	rr		
1407	300110201960		18	NEG	rr		
1408	300110201961		7	NEG	rr		
1409	300110201980		1	NEG	rr		
1410	300110201976		5	NEG	rr		
1411	300110202248	142	21	NEG	rr		RHD-
1412	300110202268		1	NEG	rr		
1413	300110202263		4	NEG	rr		
1414	300110201986		5	NEG	rr		
1415	300110202224		1	NEG	rr		
1416	300110202242		14	NEG	rr		
1417	300110202247		5	NEG	rr		
1418	300110202057		6	NEG	rr		
1419	300110202264		1	NEG	r"r		
1420	300110202294		1	NEG	rr		
1421	300110202029	143	5	NEG	rr		RHD-
1422	300110202037		1	NEG	rr		
1423	300110202045		7	NEG	rr		
1424	300110202051		3	NEG	rr		
1425	300110202350		13	NEG	rr		
1426	300110202356		9	NEG	rr		
1427	300110202364		6	NEG	rr		
1428	300110202302		1	NEG	rr		
1429	300110202306		14	NEG	rr		
1430	300110202318		5	NEG	rr		
1431	300110202331	144	3	NEG	rr	A	RHD-
1432	300110202335		5	NEG	rr		
1433	300110202429		1	NEG	rr		
1434	300110202383		3	NEG	rr		
1435	300110202428		2	NEG	r"r	B	D fraco tipo 5
1436	300110202397		1	NEG	rr		RHD-
1437	300110202406		2	NEG	rr		
1438	300110202432		18	NEG	rr		
1439	300110202458		7	NEG	rr		RHD+/RHcc/Ψ+
1440	300110202461		2	NEG	rr		RHD-

DNA	No Doador	Pool	Nº Doações	RhD	Feno	Pool	Genótipo
1441	300110202463	6	6	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1442	300110202491		3	NEG	rr		
1443	300110202496		5	NEG	rr		
1444	300110202508		5	NEG	rr		
1445	300110202545		9	NEG	rr		
1446	300110203514		4	NEG	rr		
1447	300110203528		3	NEG	rr		
1448	300110203531		2	NEG	rr		
1449	300110203569		2	NEG	rr		
1450	300110203571		2	NEG	rr		
1451	300110204330	146	7	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1452	300110204340		13	NEG	rr		
1453	300110204359		2	NEG	rr		
1454	300110204368		17	NEG	rr		
1455	300110204373		1	NEG	rr		
1456	300110204258		5	NEG	rr		
1457	300110204262		3	NEG	rr		
1458	300110204272		2	NEG	rr		
1459	300110204288		2	NEG	rr		
1460	300110204293		2	NEG	rr		
1461	300110204317	147	1	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1462	300110204314		1	NEG	rr		
1463	300110204234		1	NEG	rr		
1464	300110204227		2	NEG	rr		
1465	300110203585		3	NEG	rr		
1466	300110203590		1	NEG	rr		
1467	300110203627		4	NEG	rr		
1468	300110203628		5	NEG	rr		
1469	300110203690		3	NEG	rr		
1470	300110203683		2	NEG	rr		
1471	300110203674	148	9	NEG	rr	A	<i>RHD-</i>
1472	300110203652		8	NEG	rr		<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1473	300110203650		2	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1474	300110202752		7	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1475	300110203728		11	NEG	rr		
1476	300110202652		1	NEG	r'r		
1477	300110203765		1	NEG	rr		
1478	300110203858		2	NEG	rr		
1479	300110203884		2	NEG	rr		
1480	300110203879		2	NEG	r'r		<i>Del</i>
1481	300110203896	149	17	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1482	300110203788		1	NEG	rr		
1483	300110202890		4	NEG	rr		
1484	300110203960		4	NEG	rr		
1485	300110202570		8	NEG	rr		
1486	300110202578		4	NEG	rr		
1487	300110202588		3	NEG	rr		
1488	300110202589		2	NEG	rr		
1489	300110202591		2	NEG	rr		
1490	300110202608		2	NEG	rr		
1491	300110202616	150	1	NEG	rr	A	<i>RHD+/RHcc/Ψ+</i>
1492	300110202617		3	NEG	rr		<i>RHD-</i>
1493	300110202620		5	NEG	r'r		
1494	300110202561		2	NEG	rr		
1495	300110202479		12	NEG	rr	B	<i>RHD-</i>
1496	300110202645		5	NEG	rr		
1497	300110202672		1	NEG	rr		
1498	300110203246		2	NEG	rr		
1499	300110204192		3	NEG	rr		
1500	300110204225		3	NEG	rr		

APÊNDICE HEMOPE

DNA PE	Nº Doador		Pool	Genótipo		
1	10094	7471	1	RHD-		
2	10094	7325				
3	10094	6474				
4	10094	6923				
5	10094	6160				
6	10094	6458				
7	10094	6501				
8	10094	6417				
9	10094	6481				
10	10094	6558				
11	10094	8312	2	RHD-		
12	10094	6629				
13	10094	6626				
14	10094	7308				
15	10094	7268				
16	10094	7285				
17	10094	7336				
18	10094	6634				
19	10094	6525				
20	10094	7409				
21	10094	7370	3	A	Pseudogene +	
22	10094	7276			RHD-	
23	10094	7404			Pseudogene +	
24	10094	7406			RHD-	
25	10094	6607		B	RHD-	
26	10094	7290				
27	10094	6533				
28	10094	8198				
29	10094	8212				
30	10094	7978				
31	10094	8219	4	RHD-		
32	10094	7984				
33	10094	7990				
34	10094	8244				
35	10094	6537				
36	10094	7265				
37	10094	8270				
38	10094	8127				
39	10094	8213				
40	10094	6343				
41	10094	8012	5	RHD-		
42	50012	4642				
43	50012	6011				
44	50012	4672				
45	50012	4673				
46	10094	8253				
47	10094	6514				
48	10094	8263				
49	10094	8210				
50	10094	8257				
51	10094	8254	6	RHD-		
52	10094	8159				
53	10094	8086				
54	10094	7505				
55	10094	7971				
56	10094	7969				
57	10094	7974				
58	10094	7473				
59	10094	7470				
60	10094	7472				

DNA PE	Nº Doador		Pool	Genótipo		
61	10094	7970	7	RHD-		
62	10094	7337				
63	10094	6811				
64	10094	7800				
65	10094	7228				
66	10094	8240				
67	10094	7203				
68	10094	7532				
69	10094	7190				
70	10094	8167				
71	10094	7503	8	RHD-		
72	50012	4816				
73	50012	4697				
74	50012	5331				
75	10094	7186				
76	10094	7826				
77	10094	7225				
78	10094	7560				
79	50012	6027				
80	10094	7519				
81	10094	8089	9	RHD-		
82	10094	6668				
83	10094	6940				
84	10094	7195				
85	10094	6837				
86	10094	7231				
87	10094	7229				
88	10094	6670				
89	10094	7806				
90	10094	6652				
91	10094	6789	10	A	RHD-	
92	10094	6662			Pseudogene +	
93	10094	7423			RHD-	
94	10094	6678		B	RHD-	
95	10094	8032				
96	10094	7922				
97	10094	8045				
98	10094	7961				
99	10094	7908				
100	10094	8031				
101	10094	8138	11	RHD-		
102	10094	7793				
103	10094	7940				
104	10094	6815				
105	10094	6672				
106	10094	6788				
107	10095	0252				
108	10095	0268				
109	10095	0154				
110	10095	0167				
111	10095	0245	12	RHD-		
112	10095	0155				
113	10095	0161				
114	10094	7888				
115	10094	7953				
116	10095	0162				
117	10094	8129				
118	10094	6620				
119	10094	6771				
120	10094	8315				

DNA PE	N° Doador		Pool	Genótipo	
121	10094	8266	13	RHD-	
122	10094	7915			
123	10094	8298			
124	10094	7911			
125	10094	7728			
126	10095	0424			
127	10095	0449			
128	10095	0133			
129	10095	0311			
130	10095	0414			
131	10094	8322	14	RHD-	
132	10095	0282			
133	10095	0287			
134	10095	0121			
135	10094	07708			
136	10094	7264			
137	10094	7260			
138	10094	7361			
139	10094	6905			
140	10095	0445			
141	10095	0194	15	RHD-	
142	10094	6781			
143	10094	7163			
144	10095	0539			
145	10095	0339			
146	10095	0221			
147	10095	0548			
148	10095	0385			
149	10094	9945			
150	10094	6794			
151	10094	8122	16	A	RHD-
152	10094	6719			RHD-
153	10094	9024		B	Pseudogene +
154	10094	7357			RHD-
155	10095	0421			Pseudogene +
156	10095	0369			RHD-
157	10094	9246			Pseudogene +
158	10001	2683			RHD-
159	10094	9090			Pseudogene +
160	10095	0373			RHD-
161	10094	7604	17	RHD-	
162	10094	7763			
163	10094	7760			
164	10094	7742			
165	10094	7585			
166	10001	2677			
167	10094	7609			
168	10094	7584			
169	10094	7662			
170	10094	7659			
171	10094	7614	18	RHD-	
172	10094	6793			
173	10094	7628			
174	10094	7738			
175	10094	9367			
176	10094	9245			
177	10094	8575			
178	50012	5152			
179	50012	5841			
180	50012	6030			

DNA PE	Nº Doador		Pool	Genótipo	
181	10094	9174	19		RHD-
182	10094	9083			
183	10094	9115			
184	10094	9077			
185	10094	9204			
186	10094	8124			
187	10094	8121			
188	10094	9109			
189	10095	0366			
190	50012	4666			
191	10094	9178	20	A	RHD-
192	50012	5329			Pseudogene +
193	10094	9160			RHD-
194	10095	0004			RHD-
195	10095	0016			Pseudogene +
196	50012	7664		B	RHD-
197	50012	7696			Pseudogene +
198	10095	0052			RHD-
199	10095	0066			RHD-
200	10094	8433			RHD-
201	10094	8492	21	A	RHD-
202	10095	0030			Pseudogene +
203	10095	0235			RHD-
204	10095	0021			RHD-
205	10094	9107			RHD-
206	10094	9053		B	RHD-
207	10094	8432			RHD-
208	10094	8501			RHD-
209	50012	7840			RHD-
210	10094	9551			RHD-
211	10094	8665	22	A	RHD-
212	50012	7726			Pseudogene +
213	10094	8423			RHD-
214	10094	8528			Pseudogene +
215	10094	8533			RHD-
216	50012	7858		B	RHD-
217	50012	7852			RHD-
218	10094	9275			RHD-
219	10094	9548			RHD-
220	10094	8529			RHD-
221	10094	8514	23		RHD-
222	10094	8695			
223	10094	9378			
224	10094	9499			
225	10094	9468			
226	10094	9671			
227	10094	9660			
228	10094	9438			
229	10094	9169			
230	10094	9317			
231	10094	8502	24	A	RHD-
232	10094	9403			Pseudogene +
233	10094	9560			RHD-
234	10094	9319			Pseudogene +
235	10094	8907			RHD-
236	10094	8723		B	RHD-
237	10094	8720			
238	10094	8743			
239	10094	8986			
240	10094	9572			

DNA PE	Nº Doador		Pool	Genótipo	
241	10094	9421	25	RHD-	
242	10094	8978			
243	10094	8994			
244	10094	8643			
245	10094	8647			
246	10094	8701			
247	10094	8913			
248	10094	8881			
249	10094	8870			
250	10094	8823			
251	10094	9570	26	RHD-	
252	10094	8859			
253	10094	8915			
254	10094	8909			
255	10001	2676			
256	10094	9656			
257	10094	8811			
258	10094	8836			
259	10094	9559			
260	10094	9540			
261	10094	8793	27	RHD-	
262	10094	8984			
263	10094	9611			
264	10094	8784			
265	10094	8396			
266	10094	8463			
267	10094	8900			
268	50012	5147			
269	50012	6950			
270	10094	8961			
271	10094	9635	28	A	Pseudogene +
272	10094	9680			RHD-
273	10094	9758			Pseudogene +
274	10094	9757			RHD-
275	10094	9773		B	Pseudogene +
276	10094	9794			RHD-
277	10094	9771			
278	10094	9825			
279	10094	6901			
280	10094	9718			
281	10094	9972	29	RHD-	
282	10094	9852			
283	10094	9853			
284	10095	0072			
285	10095	2188			
286	10094	9887			
287	10094	9985			
288	10094	8955			
289	10094	9838			
290	10094	9954			
291	10094	9970	30	RHD-	
292	10094	9934			
293	10094	9895			
294	10095	0098			
295	10095	2162			
296	10094	8648			
297	10095	1560			
298	10094	9943			
299	10095	1510			
300	10095	1540			

DNA PE	N° Doador		Pool	Genótipo	
301	50012	8038	31	A	<i>RHD-</i>
302	10095	1739			
303	10095	1749			
304	10095	1617		B	<i>Del</i>
305	10095	1029			<i>RHD-</i>
306	10095	0777			
307	10095	1973			
308	10095	1010			<i>RHD-</i>
309	10095	1509			
310	10095	1534			
311	10095	1021	32	<i>RHD-</i>	
312	50012	8051			
313	10095	1511			
314	10095	1527			
315	50012	8053			
316	50012	8031			
317	50012	8134			
318	50012	8060			
319	10095	1619			
320	10095	1475			
321	10095	1992	33	<i>RHD-</i>	
322	10095	8957			
323	10095	1996			
324	10095	1593			
325	10095	0835			
326	10095	0683			
327	10095	0755			
328	10095	0769			
329	10095	0783			
330	10095	0728			
331	10095	0824	34	A	<i>Pseudogene +</i>
332	10095	0810			<i>RHD-</i>
333	10095	0738			
334	10095	0799		B	<i>Pseudogene +</i>
335	10095	1487			
336	10095	0652			
337	10095	0705			<i>RHD-</i>
338	10095	0766			
339	10095	0621			
340	10095	0616			
341	10095	0707	35	<i>RHD-</i>	
342	10095	0741			
343	10095	0785			
344	10095	1717			
345	10095	1999			
346	10095	1919			
347	10095	1036			
348	10095	2015			
349	10095	1113			
350	10095	0699			
351	10095	1731	36	A	<i>RHD-</i>
352	10095	1310			<i>Pseudogene +</i>
353	10095	0713			<i>RHD-</i>
354	10095	1090		B	
355	10095	0666			
356	10095	0693			<i>RHD-</i>
357	10095	1139			
358	10095	1199			
359	10095	1193			
360	10095	1217			

DNA PE	Nº Doador		Pool	Genótipo	
361	10095	1171	37	RHD-	
362	10095	1129			
363	10095	1127			
364	10095	6351			
365	10095	1881			
366	10095	1239			
367	10095	1396			
368	10095	1143			
369	10095	1282			
370	10095	1122			
371	10095	1100	38	RHD-	
372	10095	1240			
373	10095	0602			
374	10095	2165			
375	10095	1305			
376	10095	1867			
377	10095	1265			
378	10095	1343			
379	10095	0043			
380	10095	1297			
381	10095	0045	39	RHD-	
382	10095	0082			
383	10095	8766			
384	10095	8132			
385	10095	1335			
386	10095	6915			
387	10095	1050			
388	10095	1080			
389	10095	1059			
390	10095	0661			
391	10095	5319	40	RHD-	
392	10095	1141			
393	10095	1221			
394	10095	6951			
395	50012	6951			
396	10095	1329			
397	10095	1249			
398	10095	1105			
399	10095	0599			
400	10095	2075			
401	10095	2447	41	RHD-	
402	10095	2270			
403	10095	2567			
404	10095	8771			
405	10095	2518			
406	10095	2424			
407	10095	3264			
408	10095	3270			
409	10095	3459			
410	10095	2255			
411	10095	2269	42	A	Pseudogene +
412	10095	3455			Pseudogene +
413	10095	2517			Pseudogene +
414	10095	3300		B	RHD-
415	10095	2096			RHD-
416	10095	7067			
417	10095	2100			
418	10095	2059			
419	10095	7092			
420	10095	3676			

DNA PE	Nº Doador	Pool	Genótipo	
421	10095	43		<i>RHD-</i>
422	10095			
423	10095			
424	10095			
425	10095			
426	10095			
427	10095			
428	10095			
429	10095			
430	10095			
431	10095	44		<i>D fraco tipo 4.3</i>
432	10095			<i>RHD-</i>
433	10095		A	<i>RHD-</i>
434	10095			<i>RHD-</i>
435	10095			<i>Pseudogene +</i>
436	10095			<i>RHD-</i>
437	10095			<i>RHD-</i>
438	10095			<i>RHD-</i>
439	10095			<i>RHD-</i>
440	10095			<i>RHD-</i>
441	10095			<i>RHD-</i>
442	10095	45		<i>RHD-</i>
443	10095			
444	10095			
445	10095			
446	10095			
447	10095			
448	10095			
449	10095			
450	10095			
451	10095			
452	10095	46		<i>RHD-</i>
453	10095			
454	10095			
455	10095			
456	10095			
457	10095			
458	10095			
459	10095			
460	10095			
461	10095			
462	10095	47		<i>RHD-</i>
463	10095			<i>D fraco tipo 4.3</i>
464	10095		B	<i>RHD-</i>
465	10095			<i>D fraco tipo 38</i>
466	10095			<i>RHD-</i>
467	10095			<i>RHD-</i>
468	10095			<i>RHD-</i>
469	10095			<i>RHD-</i>
470	10095			<i>RHD-</i>
471	10095			<i>RHD-</i>
472	10095			<i>RHD-</i>
473	10095			<i>RHD-</i>
474	10095	48		<i>RHD-</i>
475	10095			
476	10095			
477	10095			
478	10095			
479	10095			
480	10095			

DNA PE	Nº Doador		Pool	Genótipo		
481	10095	2962	49		RHD-	
482	10095	2950				
483	10095	2987				
484	10095	2746				
485	10095	2702				
486	10095	7182				
487	10095	2747				
488	10095	7296				
489	10095	7282				
490	10095	7338				
491	10095	3026	50	A	RHD-	
492	10095	2833			D fraco tipo 38	
493	10095	2990			RHD-	
494	10095	2960			D fraco tipo 38	
495	10095	3025		B		RHD-
496	10095	3013				
497	10095	3779				
498	10095	2992				
499	10095	3018				
500	10095	7347				
501	10095	7297	51	A	Pseudogene +	
502	10095	2525			RHD-	
503	10095	4189				
504	10095	1784			B	RHD-
505	10095	2356				
506	10095	2420				
507	10095	1381				
508	10095	3513				
509	10095	3365				
510	10095	3410		52	A	RHD-
511	10095	3504	Pseudogene +			
512	10095	2646	RHD-			
513	10095	7297	B			RHD-
514	10095	3511				
515	10095	1391				
516	10095	3514				
517	10095	2643				
518	10095	2325				
519	10095	3510	53			RHD-
520	10095	1066				
521	10095	1887				
522	10095	6839				
523	10095	6934				
524	10095	3342				
525	10095	5357				
526	10095	2631				
527	10095	6638				
528	10095	6650				
529	10095	2069	54	A	Pseudogene +	
530	10095	4246			RHD-	
531	10095	4077				
532	10095	4236		B	RHD-	
533	10095	2333				
534	10095	2067				
535	10095	4213				
536	10095	2340				
537	10095	4230				
538	10095	2712				
539	10095	3335				
540	10095	6730				

DNA PE	N° Doador		Pool	Genótipo	
541	10095	7081	55	RHD-	
542	10095	4232			
543	10095	2945			
544	10095	6933			
545	10095	6742			
546	10095	6753			
547	10095	7053			
548	10095	6561			
549	10095	6542			
550	10095	6760			
551	10095	6555	56	RHD-	
552	10095	4535			
553	10095	3231			
554	10095	3166			
555	10095	2810			
556	10095	3315			
557	10095	6648			
558	10095	6679			
559	10095	7235			
560	10095	5920			
561	10095	2941	57	RHD-	
562	10095	1934			
563	10095	3171			
564	10095	2195			
565	10095	2185			
566	10095	3807			
567	10095	9910			
568	10095	3174			
569	10095	2476			
570	10095	2193			
571	10095	4584	58	A	RHD-
572	10095	2068			RHD-
573	10095	4735		B	RHD-
574	10095	4917			Pseudogene +
575	10095	4915			RHD-
576	10095	2441			RHD-
577	10095	4738			RHD-
578	10095	4881			RHD-
579	10095	1383			RHD-
580	10095	4321			RHD-
581	10095	4884	59	RHD-	
582	10095	4875			
583	10095	1855			
584	10095	0983			
585	10095	1861			
586	10095	6930			
587	10095	4939			
588	10095	4790			
589	10095	4797			
590	10095	4410			
591	10095	5643	60	A	RHD-
592	10095	4550			D fraco tipo 4.3
593	10095	2472			RHD-
594	10095	4375		B	RHD-
595	10095	4603			RHD-
596	10095	4622			RHD-
597	10095	0928			RHD-
598	10095	2449			RHD-
599	10095	0939			RHD-
600	10095	0938			D fraco tipo 38

DNA PE	Nº Doador	Pool	Genótipo	
601	10095	61		<i>RHD-</i>
602	10095			
603	10095			
604	10095			
605	10095			
606	10095			
607	10095			
608	10095			
609	10095			
610	10095			
611	10095	62	A	<i>RHD-</i>
612	10095			<i>Pseudogene +</i>
613	10095			<i>RHD-</i>
614	10095		B	<i>RHD-</i>
615	10095			
616	10095			
617	10095			
618	10095			
619	10095			
620	10095			
621	10095	63	A	<i>RHD-</i>
622	10095			<i>Pseudogene +</i>
623	10095			<i>RHD-</i>
624	10095		B	<i>Pseudogene +</i>
625	10095			<i>RHD-</i>
626	10095			<i>Pseudogene +</i>
627	10095			<i>RHD-</i>
628	10095			<i>RHD-</i>
629	10095			<i>RHD-</i>
630	10095			<i>RHD-</i>
631	10095	64	A	<i>RHD-</i>
632	10095			<i>RHD-</i>
633	10095			<i>RHD-</i>
634	10095		B	<i>RHD-</i>
635	10095			<i>RHD-</i>
636	10095			<i>RHD-</i>
637	10095			<i>Pseudogene +</i>
638	10095			<i>RHD-</i>
639	10095			<i>Pseudogene +</i>
640	10095			<i>RHD-</i>
641	10095	65	A	<i>RHD-</i>
642	10095			<i>RHD-</i>
643	10095			<i>RHD-</i>
644	10095		B	<i>RHD-</i>
645	10095			<i>RHD-</i>
646	10095			<i>RHD-</i>
647	10095			<i>RHD-</i>
648	10095			<i>RHD-</i>
649	10095			<i>Pseudogene +</i>
650	10095			<i>Pseudogene +</i>
651	10095	66		<i>RHD-</i>
652	10095			
653	10095			
654	10095			
655	10095			
656	10095			
657	10095			
658	10095			
659	10095			
660	10095			

DNA PE	Nº Doador	Pool	Genótipo	
661	10095	67		<i>RHD-</i>
662	10095			
663	10095			
664	10095			
665	10095			
666	10095			
667	10095			
668	10095			
669	10095			
670	10095			
671	10095	68	A	<i>RHD-</i>
672	10095			
673	10095			
674	10095			
675	10095			
676	10095		B	<i>Pseudogene +</i>
677	10095			<i>RHD-</i>
678	10095			
679	10095			
680	10095			
681	10095	69	A	<i>RHD-</i>
682	10095			
683	10095			
684	10095			
685	10095			
686	10095		B	<i>Pseudogene +</i>
687	10095			<i>RHD-</i>
688	10095			
689	10095			
690	10095			
691	10095	70		<i>RHD-</i>
692	10095			
693	10095			
694	10095			
695	10095			
696	10095			
697	10095			
698	10095			
699	10095			
700	10095			
701	10095	71	A	<i>RHD-</i>
702	10095			
703	10095			
704	10095			
705	10095			
706	10095		B	<i>RHD-</i>
707	10095			<i>Pseudogene +</i>
708	10095			
709	10095			
710	10095			
711	10095	72	A	<i>RHD-</i>
712	10095			<i>Pseudogene +</i>
713	10095			<i>RHD-</i>
714	10095			
715	10095			
716	10095		B	<i>RHD-</i>
717	10095			
718	10095			
719	10095			
720	10095			

DNA PE	Nº Doador	Pool	Genótipo	
721	10095	73		<i>RHD-</i>
722	10095			
723	10095			
724	10095			
725	10095			
726	10095			
727	10095			
728	10095			
729	10095			
730	10095			
731	10095	74	A	<i>RHD-</i>
732	10095			
733	10095			
734	10095			
735	10095			
736	10095		B	<i>RHD-</i>
737	10095			
738	10095			
739	10095			
740	10095			
741	10095	75	A	<i>Pseudogene +</i>
742	10095			
743	10095			
744	10095			
745	10095			
746	10095		B	<i>RHD-</i>
747	10095			
748	10095			
749	10095			
750	10095			
751	10095	76		<i>RHD-</i>
752	10095			
753	10095			
754	10095			
755	10095			
756	10095			
757	10095			
758	10095			
759	10095			
760	10095			
761	10095	77	A	<i>RHD-</i>
762	10095			
763	10095			
764	10095			
765	10095			
766	10095		B	<i>RHD-</i>
767	10095			
768	10095			
769	10095			
770	10095			
771	10095	78	A	<i>RHD-</i>
772	10095			
773	10095			
774	10095			
775	10095			
776	10095		B	<i>RHD-</i>
777	10095			
778	10095			
779	10095			
780	10095			

DNA PE	Nº Doador	Pool	Genótipo	
781	10095	79		<i>RHD-</i>
782	10095			
783	10095			
784	10095			
785	10095			
786	10095			
787	10095			
788	10095			
789	10095			
790	10095			
791	10095	80		<i>RHD-</i>
792	10095			
793	10095			
794	10095			
795	10095			
796	10095			
797	10095			
798	10095			
799	10095			
800	10095			
801	10095	81		<i>RHD-</i>
802	10095			
803	10095			
804	10095			
805	10095			
806	10095			
807	10095			
808	10095			
809	10095			
810	10095			
811	10095	82	A	<i>RHD-</i>
812	10095			<i>Pseudogene +</i>
813	10095			<i>RHD-</i>
814	10095			
815	10095			
816	10095		B	<i>Pseudogene +</i>
817	10095			<i>RHD-</i>
818	10095			<i>Pseudogene +</i>
819	10095			<i>RHD-</i>
820	10095			
821	10095	83	A	<i>RHD-</i>
822	10095			
823	10095			
824	10095			
825	10095			
826	10095		B	<i>Pseudogene +</i>
827	10095			<i>RHD-</i>
828	10095			
829	10095			
830	10095			
831	10095	84		<i>RHD-</i>
832	10095			
833	10095			
834	10095			
835	10095			
836	10095			
837	10095			
838	10095			
839	10095			
840	10095			

DNA PE	N° Doador		Pool	Genótipo	
841	10095	5888	85		<i>RHD-</i>
842	10095	6273			
843	10095	5883			
844	10095	7073			
845	10095	5895			
846	10095	5924			
847	10095	7734			
848	10095	6236			
849	10095	7059			
850	10095	7049			
851	10095	6495	86		<i>RHD-</i>
852	10095	6940			
853	10095	7351			
854	10095	7123			
855	10095	7011			
856	10095	2497			
857	10095	8571			
858	10095	5657			
859	10095	4850			
860	10095	5675			
861	10095	7054	87	A	<i>RHD-</i>
862	10095	4846			
863	10095	5902		B	<i>RHD-</i>
864	50012	4951			
865	50012	5065			<i>Pseudogene +</i>
866	10095	6028			
867	10095	5997			<i>RHD-</i>
868	10095	3629			
869	10095	6027			<i>RHD-</i>
870	10095	5731			
871	50012	8071	88	A	<i>RHD-</i>
872	10095	5732			
873	10095	6313			
874	10095	5900		B	<i>Pseudogene +</i>
875	10095	5899			
876	10095	5128			<i>RHD-</i>
877	10095	5770			
878	10095	8125			
879	10095	5134			
880	10095	8899			
881	10095	6298	89		<i>RHD-</i>
882	10095	6314			
883	10095	5880			
884	10095	5803			
885	10095	6319			
886	10095	6263			
887	10095	5730			
888	10095	5906			
889	10095	6318			
890	10095	6367			
891	10095	6200	90		<i>RHD-</i>
892	10095	6376			
893	10095	5881			
894	10095	5866			
895	10095	6399			
896	10095	9457			
897	10095	9759			
898	10095	8690			
899	10095	6483			
900	10095	8604			

DNA PE	Nº Doador	Pool	Genótipo
901	10095	91	<i>RHD-</i>
902	10095		
903	10095		
904	10095		
905	10095		
906	10095		
907	10095		
908	10095		
909	10095		
910	10095		
911	10095	92	<i>RHD-</i>
912	10095		
913	10095		
914	10095		
915	10095		
916	10095		
917	10095		
918	10095		
919	10095		
920	10095		
921	10095	93	<i>RHD-</i>
922	10095		
923	10095		
924	10095		
925	10095		
926	10095		
927	10095		
928	10095		
929	10095		
930	10095		
931	10095	94	<i>RHD-</i>
932	10095		
933	10095		
934	10095		
935	10095		
936	10095		
937	10095		
938	10095		
939	10095		
940	10095		
941	10095	95	<i>RHD-</i>
942	10095		
943	10095		
944	10095		
945	10095		
946	10095		
947	10095		
948	10095		
949	10095		
950	10095		

***RHD* ALLELIC IDENTIFICATION AMONG D– BRAZILIAN BLOOD DONORS AS A ROUTINE TEST USING POOLS OF DNA**

M.Mota¹M.Dezan¹,M.C.Valgueiro², A.M.Sakashita¹, J.M.Kutner¹, L.Castilho³

¹ Department of Hemotherapy, Albert Einstein Hospital, São Paulo-SP, Brazil

² Blood Bank, HEMOPE, Recife-PE, Brazil

³ INCTs, Hemocentro-UNICAMP, Campinas, Brazil

Corresponding author: Mariza Mota, MD

Department of Hemotherapy

Albert Einstein Hospital, São Paulo-SP, Brazil

Avenida Albert Einstein 627/701

CEP: 05652-000 Morumbi-São Paulo-SP, Brazil

Telephone: (55 11) 2151-3529

Fax: (55 11) 3747-0446

e-mail: marizamota@einstein.br

This study was financially supported by Fapesp grant nº 2009/05924-0, Brazil

Short title: *RHD* among D– Brazilians

ABSTRACT

Background: *RHD* alleles leading to a reduced expression of D antigen of the red blood cell (RBC) surface may be erroneously typed as D– by serology and may cause anti-D immunizations when transfused to recipients. **Methods:** To determine the occurrence of such alleles among apparent D- blood donors, molecular typing was implemented as a routine test using a pool of DNA. A total of 2450 pretyped D– samples was tested in pools of 10 for the *RHD*-specific polymorphism in intron 4 and exon 7. Samples in PCR positive pools were individually reevaluated by exon-specific PCRs, sequencing and serologic methods. **Results:** Among 2450 serologically D– blood donor samples tested, 101 (4.1%) carried the *RHD* gene. Non functional *RHD* (*RHD* ψ , *RHD**CE(2-9)-D and *RHD**CE(3-7)-D), different weak D alleles such as *RHD**weak D type 1, *RHD**weak D type 4.3, *RHD**weak D type 5, *RHD**weak D type 38 and *RHD**DEL were identified. **Conclusion:** We employed a PCR-based assay for *RHD* as a routine test using pools of 10 DNA blood donor samples. The integration of *RHD* genotyping into the routine screening program using pools of DNA samples was straightforward. As a consequence, 19 (0.8%) blood donors carrying a weak D and Del phenotypes with the potential of causing anti-D immunizations in recipients were reclassified as D+. For each population, it would be necessary to adapt the *RHD* genotyping strategy to the spectrum of prevalent alleles.

INTRODUCTION

The Rh blood group system is clinically important, because antibodies against Rh antigens are involved in hemolytic disease of the newborn, hemolytic transfusion reactions, and autoimmune hemolytic anemia (1). The Rh blood group system belongs to one of the most diverse antigen systems presently known in humans and the D antigen is the most important blood group antigen determined by a protein because D-negative individuals can be easily anti-D immunized (1,2).

Rh antigens are carried by two highly homologous proteins, the RhD and RhCE, which are encoded by 2 genes, *RHD* and *RHCE*, located at chromosomal position 1p34–1p36. Both genes encompass 10 exons, and their structures are highly homologous (2). **In previously studies using pools of DNA it has demonstrated that different genetic forms of D negativity occur with high incidences of unexpressed *RHD* alleles among D-negative individuals with the presence of C and/or E antigens (3-6). In general, Caucasians with the RhD-negative phenotype have the absence of the *RHD* gene due to a deletion of *RHD* between the upstream and downstream Rhesus boxes (7). However other D-negative haplotypes exist.** In African populations, some individuals who are D-negative can harbor non-functional *RHD* alleles, the *RHD* ψ gene and *RHD-CE*(3-7)-*D* hybrid (8-10). In Asians, a very weak expression of the D antigen, the **DEL** phenotype, was found in individuals who were apparently D negative and represents 10 – 33% of the Japanese and Chinese serologically

typed as D-negative (11). **Less common D negative alleles are caused by hybrid *RHD-CE-D* alleles or nonsense and frame shift mutations (3-6).**

Among Europeans, 0.6 to 1 percent carries *RHD* alleles producing weak D and partial D (12). Up to 80 weak *RHD* alleles have been described and are due to missense mutations exclusively located in the transmembranous or intracellular parts of the RhD protein (13). A small fraction of weak D samples are explained by qualitatively altered RhD proteins, called partial D and frequently caused by a *RHD/RHCE* hybrid allele (13, 14). A weak D expression is also caused by the suppressive effects of Cde haplotypes placed in trans position (15, 16).

RHD alleles leading to a reduced expression of D antigen on the red blood cell (RBC) surface may be erroneously typed as D- by standard serologic methods, including the indirect antiglobulin test (IAT) and may cause anti-D immunizations when transfused to D- recipients (17). The adsorption/elution technique considered more sensitive is not suitable for routine diagnostic use. D variants detectable by this technique are known as Del and have also caused the generation of anti-D when transfused to D-negative patients (18).

The molecular typing overcomes the limitations of serologic methods in order to solve discrepancies and to identify *RHD* variants. The *RHD* alleles are currently determined by performing PCR assays in individual samples. However, molecular typing of each sample can be time consuming, expensive, and labor intensive, representing a challenge to be performed as a routine in the clinical setting. One of

the major concerns in daily practice transfusions is to prevent anti-D alloimmunization without adding much to the costs of antigen D typing and without incurring in wasting D – units unnecessarily. Therefore, a method for *RHD* genotyping that is less expensive and straightforward is highly desirable.

We developed a method herein for *RHD* typing that applies a pool of 10 DNA samples from apparently D negative blood donors. Our lower-cost method has shown to have great sensibility/sensitivity and to be a great alternative to be used in transfusions centers.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples

A total of 2450 blood donor samples from Southeast (**São Paulo, SP**) and Northeast (**Recife, PE**) Brazil labeled D– were investigated. Blood samples used for screening purposes were the by-product of blood donation and were collected according to the approved protocol of the blood banks. Whole units of blood were taken with informed consent.

Study design and validation of DNA pool

The study design used to analyze the samples is shown in Figure 1.

Validation of DNA pool typing was performed by mixing 9 pretyped negative DNA samples with one reference DNA sample genotyped for

RHD variants. The sensitivity and specificity of the assay were verified by the presence of the specific amplification product, at the DNA concentration of 10ng/μL per sample.

Serologic studies

D antigen reactivity was analyzed by agglutination in duplicate screening on an automated gel system (Wadiana®, Grifols, Derio, Spain) using two different anti-D MoAbs, one IgM (clone P3x61) and **oligoclonal antibodies (clones P3x290 (IgG), P3x35 (IgG), P3x61(IgM), P3x21223B10 (IgM))** (Griffols, Derio, Spain) and on an automated microplate system (PK7200, Olympus Diagnostic Systems) using anti-D **oligoclonal antibodies (clones MS26(IgG)/MS201(IgM))** (Fresenius-Kabi, São Paulo, Brazil). Nonreactive samples were tested with anti-D blend (clones MS26/MS201) using the IAT in tube. C, E, c, e status of all RBCs were determined by hemagglutination in gel neutral cards (Diamed AG, Morat, Switzerland) using routine anti-C, anti-E, anti-c, anti-e MoAbs (Fresenius Kabi, São Paulo, Brazil).

PCR assays

Genomic DNA was individually isolated using the QIAmp DNA Blood Mini- Kit (Qiagen, Valencia, CA), according to the manufacturer's recommendations.

Pools of 10 samples of serologically D negative were tested with a PCR assay used to determine the presence or absence of *RHD*-specific amplified products from sequences in the intron 4 and exon 7 (10). We used 1uL of genomic DNA at the optimal DNA concentration of 10ng/μL per sample in a final

volume of 20 uL of reaction mix. When positive results were found, the pool was first divided in two and the PCR repeated in each pool of five samples.

When a five sample pool generated a PCR-positive result, each sample of the pool was tested individually in a PCR system using sequence specific primers that detect the common weak D types (19), a multiplex PCR that detects the *RHD* gene hybrid alleles (20). *RHD* zygosity was determined by checking for the presence of the hybrid Rhesus box, by an allele-specific PCR (21) and a *Pst* I-RFLP (22).

Sequence analysis

Sequence analysis was performed on PCR products amplified from genomic DNA to determine the specific allele present using *RHD* specific primers as previously reported (23). PCR products were purified by elution from 1% agarose gels using a Qiaex II gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA), and sequenced directly, without subcloning, on an ABI 373XL Perkin Elmer Biosystems (PEB) sequencer, and the PEB Big Dye reagent BD Half-term (GenPak, Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA).

Serological follow-up

Blood samples with positive results in the PCR screening were re-evaluated by an IAT in two gel matrix techniques (Diamed and Grifols) using a MoAb anti-D IgG (clone ESD1). Adsorption/elution test was also performed on all non-reactive samples in IAT but positive in the PCR screening using a MoAb anti-D IgG (clone MS-26) (Fresenius-Kabi, São Paulo, Brazil). For anti-D adsorption to RBCs, 500

μL of RBCs were incubated for 1 hour at 37°C with 500 μL of anti-D diluted 1:2. Elution was performed by using the ELU –KIT II (Immucor Gamma, Houston, TX, USA).

RESULTS

Molecular analyses

We found 101 donors (4.1%) who carried the *RHD* gene. All 101 samples genotyped as D+ were *RHD* heterozygous. Table 1 summarizes the distribution of the *RHD* alleles found in this D– donor population, their molecular alteration detected and the associated haplotypes.

Regional differences in the composition of the group of donors studied were encountered and reflected the diverse Brazilian genetic background. The five DEL carriers identified in this study were from Asian descent, the five weak D type 38 were from Portuguese descent, the weak D types 1 and 5 were from Caucasian descent and the 5 weak D type 4.3 were from African descent. The RhCE phenotypes associated with weak D and *DEL* alleles were consistent with published data (24).

Serological follow-up

Nine different weak D phenotypes such as weak D type 1, weak D type 5 and the weak D type 38 were identified by serologic re-evaluation showing positive IAT results. Weak D type 4.3 and Del phenotypes were only detected by adsorption and

elution. Table 2 shows the *RHD* alleles identified among D-blood donors and their serologic results.

DISCUSSION

Any blood bank must ensure that D negative products are appropriately labeled, such that a recipient of a D-negative product does not form anti-D in response to transfused RBCs (1, 17). In this study, we screened serologically D- donors for the presence of the *RHD* gene and presented a fast and reliable method for *RHD* genotyping using DNA pools. We established this practice in our blood bank because current serologic practice has failed to determine weak D types (16), and to discriminate between the Del and the true D- phenotypes.

This approach revealed that 19 (0.8%) blood donors carrying weak D and Del phenotypes were mistyped as D negative by serology, higher than the incidence of 0.4 percent previously reported in Caucasians (4) and comparable to the relative occurrence of 0.6 and 1 percent described for Germany and Canada (5, 25-27).

The presence of the non-functional *RHD*, *RHD-CE(2-9)-D*, *RHD-CE(3-7)-D* and the high prevalence of *RHD_ψ* (3.2%) found in this donor population reinforce that the ethnic background of the population may govern which *RH* alleles are prevalent. Our population, in fact, has

ethnic characteristics related to the marriage among Caucasians, Amerindians, and Africans.

One of the major concerns in daily transfusion practice is to prevent anti-D alloimmunization, as anti-D may induce hemolytic transfusion reactions and remains the major cause of hemolytic disease of the fetus and newborn (1,7).

A total of nine weak D phenotypes such as weak D type 1, weak D type 5 and the weak D type 38 were identified by serologic re-evaluation showing positive IAT results in gel reinforcing that the sensitivity of the method and the anti-D reagent used may influence on D donor typing result. To avoid further mistyping in our blood bank we started to use molecular techniques, as a way to avoid potential alloimmunization in the patients. However, the use of molecular techniques may represent higher costs. For this reason we investigated an alternative technique in which pools of 10 DNA samples were combined in a single reaction to decrease labor and costs of PCR reactions. By performing this pool, we were able to decrease the costs of PCR typing from approximately US\$21 to US\$13, which represents a reduction of almost 50%. **Previous studies employing pools of DNA to genotype D-negative donors also showed that this strategy can contribute significantly to the total costs what is considered an acceptable strategy in terms of cost saving (5, 6).** Another benefit of using PCR over serological analysis is the fact that PCR genotyping usually does not need to be repeated. Few laboratories, however, are using molecular workup on a daily basis to type D antigen.

In an editorial of Transfusion, Garratty (28) stressed the caveat that not every blood donor in the D- donor pool who is carrying an *RHD* gene necessarily expresses the D antigen. Donors with the *RHD* pseudogene, for instance will not express the D antigen; however D-donor carrying aberrant *RHD* alleles leading to a reduced expression of D antigen on the RBC surface may cause anti-D immunizations when transfused to D- recipients. Detecting all clinically relevant of so called D- donors is impossible at the serologic level. **The overall appearance of 0.8 percent antigen D+ samples among D- blood donors indicates that *RHD* genotyping of D- donors could improve the RBC unit safety by permanently removing D+ donors from the D- pool and transferring their RBC units to the D+ pool as already discussed by Flegel et al (5). According these authors, it also has the advantage that it obviates the need for a sensitive D antigen testing at the serologic level: a very strict quality assurance for sensitivity may not be required anymore, which may return some cost savings (5).**

Another important benefit of using PCR is that the genotyping information can be transferred from institution to institution nationally and internationally, which would eliminate the need for repeat testing of blood donors. The method described herein also opens the opportunity to extend DNA typing to other antigens using pools, especially when we look for rare donors. It is not unreasonable to think that **donor testing in pools of DNA** may also be used for typing other highly polymorphic systems, such as platelets and leukocytes.

REFERENCES

1. Westhoff CM. 2004. The Rh blood group system in review: A new face for the next decade. *Transfusion* 44:1663-1673
2. Wagner FF, Flegel WA. 2004. Review: The molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology* 20:23-36
3. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. 2001. *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* 2-10
4. Polin H, Danzer M, Gaszner W, Broda D, St-Louis M, Proll J, Hofer K, Gabriel C. 2009. Identification of RHD alleles with the potential of anti-D immunization among seemingly D- blood donors in Upper Austria. *Transfusion* 49:676-681
5. Flegel WA, von Zabern I, Wagner FF. 2009. Six years' experience performing RHD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion* 49:465-471
6. Gassner C, Doescher A, Drnovsek TD, Rozman P, Eiche RNI, Legler TJ, Lukin S, Garritsen H, Kleinrath T, Egger B, Ehling R, Kormoczi GF, Kilga-Nogler S, Schoenitzer D, Petershofen EK. 2005. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multicenter study. *Transfusion* 45: 527-538
7. Flegel WA. 2011. Molecular genetics and clinical applications for RH (Review). *Transf Apheres Sci* 44:81-91

8. Wagner FF, Moulds JM, Tounkara A, Kouriba B, Flegel WA. 2003. *RHD* allele distribution in Africans of Mali. *BMC Genet* 4:14
9. Rodrigues A, Rios M, Pellegrino Jr J, Costa FF, Castilho L. Presence of *RHD* pseudogene and the hybrid *RHD-CE-D^s* gene in Brazilians with the D-negative phenotype. 2002. *Braz J Med Biol Res* 35:767-73 (5)
10. Singleton BK, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G. 2000. The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. *Blood* 95:12-18
11. Qun X, Grootkerk-Tax M G H M, Maaskant-van Wijk P A, van der Schoot C E. 2005. Systemic analysis and zygosity determination of the *RHD* gene in a D negative Chinese Han population reveals a novel D- negative *RHD* gene. *Vox Sang* 88:35-40
12. Flegel W A, Wagner F F. 2002. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. *Clin.Lab* 48:53-59.
13. Wagner FF. 1998. The RhesusBase, Department of Transfusion Medicine, University Hospital, Ulm, Germany. <http://www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB>. Accessed March 11, 2011
14. Wagner FF, Gassner C, Muller TH, Schonitzer D, Schunter F, Flegel W. 1999. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 93:385-393
15. Wagner FF. 1994. Influence of Rh phenotype on the antigen density of C, c, and D. Flow cytometric study using a frozen standard red cell. *Transfusion* 34:671-6

16. Mota M, Fonseca NL, Rodrigues A, Kutner JM, Castilho L. 2005. Anti-D alloimmunization by weak D type 1 red blood cells with a very low antigen density. *Vox Sanguinis* 88:130-135
17. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. 2008. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 48:473-478.
18. Körmöczi GF, Gassner C, Shao CP, Uchikawa M, Legler TJ. 2005. A comprehensive analysis of DEL types: partial DEL individuals are prone to anti-D alloimmunization. *Transfusion* 45:1561-7
19. **Mueller** TH, Wagner FF, Trockenbacher A, Eicher NI, Flegel WA, Schonitzer D, Schunter F, Gassner C. 2001. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 41:45-52
20. Maaskant-van Wijk PA, Faas BHW, de Ruijter JAM, Overbeeke MAM, van dem Borne AEGKr, van Rhenen DJ, van der Schoot CE. 1998. Genotyping of RHD by multiplex polymerase chain reaction analysis of six RHD-specific exons. *Transfusion* 38:1015- 1021
21. Chiu RWK, Murphy MF, Fidler C, Zee B C.Y, Wainscoat JS, Lo DYM. 2001. Determination of RhD Zygosity: Comparison of a Double Amplification Refractory Mutation System Approach and a Multiplex Real-Time Quantitative PCR Approach. *Clinical Chemistry* 47:667- 672
22. Wagner FF, Flegel W. 2000. *RHD* gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95:3662- 3668

23. Legler TJ, Maas JH, Köhler M, et al. 2001. Sequencing: a new tool for decision making on transfusion therapy and provision of Rh prophylaxis. *Transf Med* 11:383-88
24. Ansart-Pirenne H, Asso-Bonnet M, Le Pennec P Y, Roussel M, Patereau C, Noizat-Pirenne F. 2004. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion* 44:1282-1286.
25. Flegel WA. 2007. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion* 47:47S-53S
26. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, Flegel WA. 2005. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 45;1554-1560
27. Flegel WA. 2006. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr opin Hematol* 13:476-483
28. Garratty, G. 2005. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion* 45:1547-1551

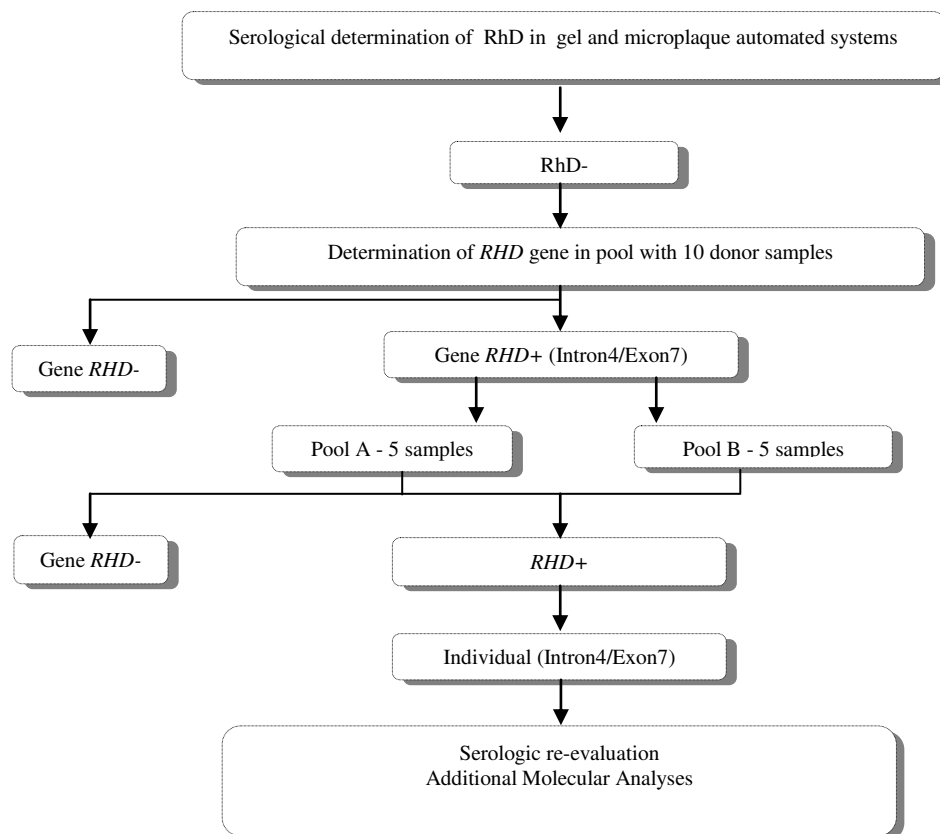
Figure 1. Study design

Table 1: Distribution of the *RHD* alleles identified among D– blood donors, the polymorphisms detected and the associated haplotypes.

<i>RHD</i> allele	N (%)	Polymorphisms detected	Associated haplotype
<i>RHD</i> _ψ	78 (3.2)	37-bp insertion	<i>ce</i>
<i>RHD</i> * <i>CE</i> (2-9)- <i>D</i>	1 (0.04)	CE exons 2-9	<i>Ce trans</i>
<i>RHD</i> * <i>CE</i> (3-7)- <i>D</i>	3 (0.1)	CE exons 3-7	(<i>C</i>) <i>ce</i> ^s
<i>RHD</i> * <i>DEL</i>	5 (0.2)	1227G>A	<i>Ce</i>
<i>RHD</i> * <i>weak D</i> type 1	1 (0.04)	809T>C	<i>Ce</i>
<i>RHD</i> * <i>weak D</i> type 4.3	5 (0.2)	602 C>G, 667 T>G, 819 G>A, 872 C>G	<i>ce</i>
<i>RHD</i> * <i>weak D</i> type 5	3 (0.1)	446C>A	<i>cE</i>
<i>RHD</i> * <i>weak D</i> type 38	5 (0.2)	833 G>A	<i>Ce</i>

Table 2. *RHD* alleles identified among D-blood donors and serologic results.

<i>RHD</i> allele	IAT/Gel¹	Adsorption-elution²
<i>RHD</i> _ψ	-	-
<i>RHD</i> *CE(3-7)-D	-	-
<i>RHD</i> *DEL	-	+
<i>RHD</i> *weak D type 1	+	+
<i>RHD</i> *weak D type 4.3	-	+
<i>RHD</i> *weak D type 5	+	+
<i>RHD</i> *weak D type 38	+	+

¹IAT/Gel (gel cards from Diamed and Grifols) using a MoAb anti-D IgG (clone ESD1).

²Adsorption/elution test was performed using a MoAb anti-D IgG (clone MS-26) and the ELU –KIT II (Immucor Gamma, Houston, TX, USA).