



COMITÉ DE EDUCACION CONTINUA Y CONTINUADA

COORDINADORA: DRA CELINA MONTEMAYOR

PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO

COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ

UNA VISIÓN PRÁCTICA DE LAS VARIANTES D

PROFESOR INVITADO: Dr CARLOS MUGUEL COTORRUELO.

Bioquímico egresado de la Universidad Nacional de Rosario, especialista en Inmunohematología y Doctor en Ciencias Biológicas.

Profesor Asociado de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario(Argentina) y Director del Laboratorio de Inmunohematología y Biología Molecular de los Grupos Sanguíneos que presta servicios al Hospital Provincial del Centenario. ccotorru@fbioyf.unr.edu.ar

Una visión práctica de las variantes D

El Sistema Rh: de los genes a las proteínas

El sistema Rh es el grupo sanguíneo más complejo y polimórfico de la membrana del glóbulo rojo. Las proteínas Rh (RhD y RhCE) expresan numerosos antígenos, siendo las determinantes D, C/c, E/e los epitopes de mayor inmunogenicidad. El sistema Rh presenta gran interés clínico en Medicina Transfusional y Obstetricia debido a la participación de sus anticuerpos en los procesos de destrucción inmune de los eritrocitos. Los antígenos Rh desempeñan un papel central en las reacciones hemolíticas transfusionales, en la inmunización de pacientes politransfundidos y en la patogénesis de la Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal. Este grupo sanguíneo eritrocitario está formado por 55 antígenos identificados por métodos serológicos y más de 400 alelos definidos por biología molecular.^{1,2}

Las proteínas RhD y RhCE están codificadas por los genes *RHD* y *RHCE* respectivamente. Estos genes, dispuestos en tándem y enfrentados por sus extremos 3', poseen un 92% de homología y segregan como haplotipos con frecuencias características en los distintos grupos étnicos. Las proteínas Rh están compuesta por una única cadena polipeptídica de 417 residuos de aminoácidos y atraviesan la membrana eritrocitaria 12 veces formando 6 dominios extracelulares. La proteína RhD expresa el antígeno D mientras que la proteína RhCE porta los antígenos C ó c en el segundo dominio extracelular y los antígenos E ó e en el cuarto dominio extracelular. Existen, por lo tanto, cuatro variantes de la proteína RhCE en glóbulos rojos normales: RhCe, RhCE, RhcE y Rhce.^{3,4}

El gen *RHD* posee un alelo responsable del fenotipo D positivo (alelo *RHD* convencional) y numerosas variantes alélicas que dan origen a los fenotipos D parcial, D débil y DEL - denominados en conjunto fenotipos D variante - y a proteínas RhD que no expresan epitopes D o no se ensamblan en la membrana eritrocitaria.^{5,6}

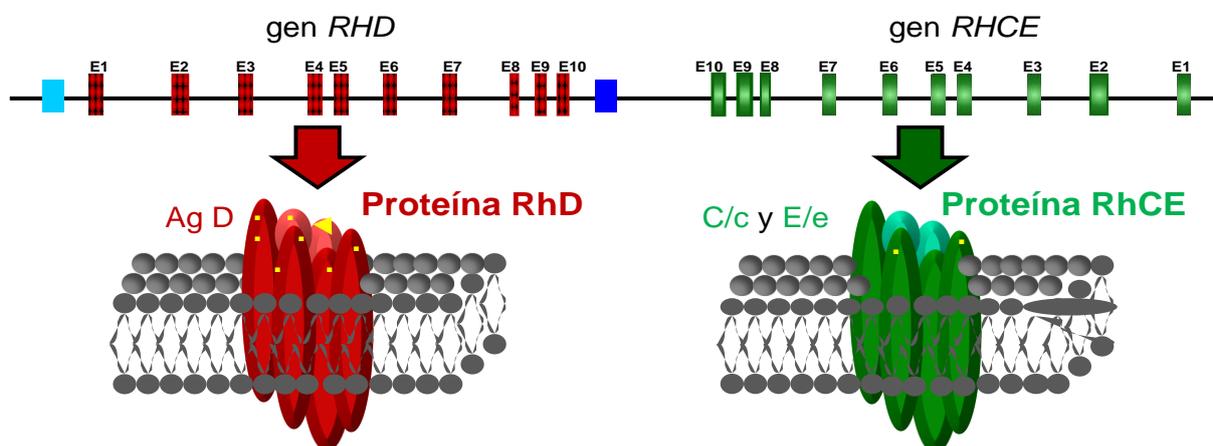


Figura 1: Organización genética del locus *RH* y producto de sus genes.

Los individuos D positivos poseen uno o dos genes *RHD* por célula, mientras que, en las personas de origen caucásico, el fenotipo D negativo resulta, principalmente, de la ausencia de este gen. El gen *RHD* está flanqueado por cajas Rhesus, secuencias de ADN altamente homólogas cuyo análisis es útil para investigar la cigosidad *RHD*.⁷

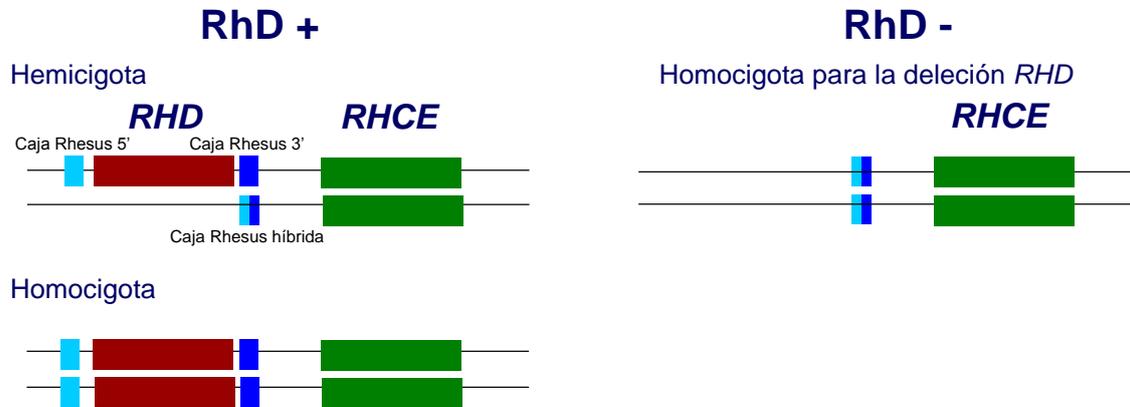


Figura 2: El locus *RH* en individuos D+ y D-.

El antígeno D

El antígeno D es el más inmunogénico de todos los antígenos del Sistema Rh, seguido por c y E. Está compuesto por un mosaico de epitopes (epD) expresados en los dominios extracelulares de la proteína RhD que fueron originalmente definidos con anticuerpos producidos por individuos D positivos que habían desarrollado anti-D. Posteriormente, con el advenimiento de la ingeniería genética y el desarrollo de anticuerpos monoclonales fue posible una mejor caracterización de los epitopes D. Se han descrito modelos que proponen la presencia de 9 epitopes, 30 epitopes y 37 epitopes en el antígeno D. Si bien, el número exacto de epitopes D no está totalmente definido, se ha demostrado que los mismos no son una simple secuencia lineal de aminoácidos, sino que representan estructuras conformacionales, generadas por la interacción de aminoácidos localizados en diferentes regiones de los dominios extracelulares cuando la proteína RhD adquiere la estructura espacial terciaria correcta.⁸⁻¹²

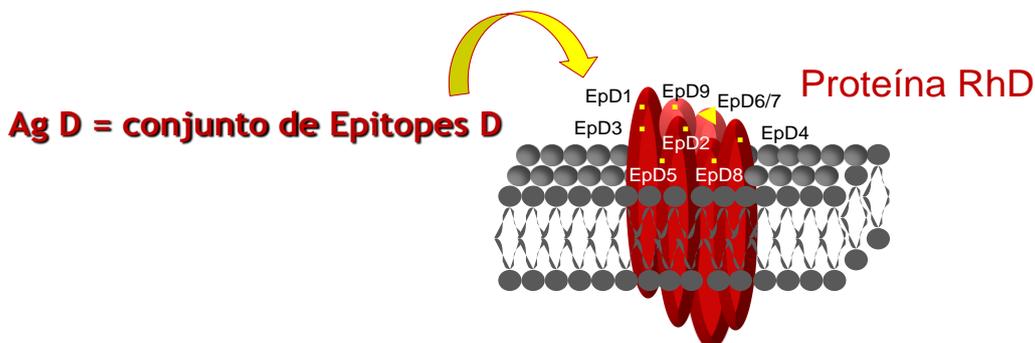


Figura 3: Epitopes D.

Variantes D

La determinación del antígeno D se realiza rutinariamente utilizando anticuerpos monoclonales. Las formulaciones comerciales consisten en reactivos compuestos por anticuerpos dirigidos contra un único epitope D o mezclas de anticuerpos con especificidades hacia diferentes epitopes D. Estos anticuerpos pueden ser IgM o IgG y se deberán utilizar según las especificaciones del fabricante. Cabe destacar que algunos reactivos anti-D están elaborados con anticuerpos policlonales de origen humano^{2,13}.

La tipificación de rutina permite clasificar a los individuos como **D positivos** (aglutinados de 4+ o 3+) y **D negativos** (ausencia de aglutinación). Cuando la reactividad de la muestra no es la esperada, ya sea porque la reacción de intensidad es inferior a lo habitualmente observado para el fenotipo D positivo (aglutinados $\leq 2+$) o bien por una discordancia entre la reactividad de dos anticuerpos diferentes, los glóbulos rojos poseen un fenotipo **D variante** o, lo que es lo mismo, una **variante D**. También son portadores de un fenotipo D variante los individuos en cuyos eritrocitos se detecta el antígeno D en fase antiglobulina, es decir a través de la Prueba de Coombs Indirecta y aquellas personas que siendo D positivas desarrollan un aloanticuerpo anti-D luego de un evento inmunizante.^{1,2,14}



Figura 4: Posibles fenotipos D obtenidos en la tipificación de rutina.

Las variantes D comprenden un conjunto de expresiones heterogéneas y aberrantes del antígeno D que pueden clasificarse como D débil y D parcial. Además, dentro de las variantes D se encuentra el fenotipo DEL.

Los glóbulos rojos portadores de un fenotipo **D débil** poseen un menor número de sitios antigénicos que los eritrocitos D positivos (variación cuantitativa del antígeno D). Históricamente, se clasificaba como D débil a aquellos glóbulos rojos en los que la expresión del antígeno D era detectada por la Prueba de Coombs Indirecta. Actualmente, esta clasificación depende, en cierto modo, de la avidéz de los reactivos que se utilizan para la asignación del fenotipo D. Generalmente, los glóbulos rojos con fenotipo D débil presentan una reacción de aglutinación débil o negativa con anticuerpos anti-D monoclonales en medio salino que se potencia en fase antiglobulina utilizando reactivos anti-D de clase IgG.^{1,2,14}

Los glóbulos rojos con fenotipo **D parcial** se caracterizan por la ausencia de uno o más epitopes del antígeno D (variación cualitativa y, en ocasiones, cuantitativa del antígeno D). Los individuos con este fenotipo son capaces de producir aloanticuerpos anti-D contra los epitopes ausentes tras una inmunización con hematíes D positivos. El fenotipo D parcial fue inicialmente clasificado en categorías en función de la presencia o ausencia de 9 epitopes en la proteína RhD. Así, se caracterizaron los fenotipos D parcial categoría DII hasta DVII con subdivisiones en algunos de ellos basadas en diferencias serológicas muy sutiles. Posteriormente, surgieron nuevos fenotipos D parciales que han sido denominados con diferentes siglas como DBT, DFR, DMH, DHAR, etc.^{1,2,14}

EpD	II	III	IVa	IVb	Va	DBT	VI	VII	DFR	DBT
EpD1	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
EpD2	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
EpD3	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
EpD4	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
EpD5	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
EpD6/7	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
EpD8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
EpD9	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-

Tabla1: Epitopes expresados por diferentes fenotipos D parciales.

El fenotipo D parcial puede reaccionar de forma débil con los anticuerpos anti-D pero también puede mostrar una reactividad equivalente a la de un fenotipo D normal (por ejemplo, el fenotipo DIII o la variante DBT) e, incluso, puede observarse una sobreexpresión del antígeno D o “D de expresión aumentada” (por ejemplo, el fenotipo DIVa). El fenotipo DVI es el más frecuente de todas las variantes D parciales reportadas. Los glóbulos rojos DVI carecen de la mayoría de los epitopes D, entre ellos el epD6/7, el cual se caracteriza por ser altamente inmunogénico. El fenotipo DVI presenta gran importancia clínica, ya que los individuos portadores de esta variante se inmunizan fácilmente tras el contacto con hematíes D positivos. Los aloanticuerpos producidos por individuos DVI están implicados en reacciones hemolíticas transfusionales y pueden provocar una Enfermedad Hemolítica Fetoneonatal grave e, incluso, muerte neonatal. La identificación de este fenotipo en receptores es importante porque deben recibir sangre D negativa para evitar la formación de aloanticuerpos anti-D. Por esta misma razón, las mujeres embarazadas con fenotipo DVI deben recibir la profilaxis con gammaglobulina anti-D. Por tal motivo, las formulaciones de reactivos para la tipificación de rutina incluyen anticuerpos anti-D obtenidos de clones que no detectan la variante DVI (reactivos aptos para la tipificación de pacientes y embarazadas) y anticuerpos anti-D obtenidos de clones que si reaccionan con esta variante (reactivos aptos para el estudio de donantes). De esta manera se pretende que los pacientes y las gestantes portadores de esta variante sean catalogados como D negativos mientras que los donantes sean tipificados como D positivos.²

Los individuos portadores de un **fenotipo DEL** expresan una cantidad mínima de antígeno D en la membrana del glóbulo rojo que no es suficiente para ser detectada mediante los métodos serológicos convencionales utilizados en la tipificación de rutina. Solo una pequeña cantidad de anti-D puede ser recuperada de hematíes DEL utilizando pruebas especializadas de adsorción-elución. Debido a la dificultad para identificar estos fenotipos mediante las técnicas serológicas, la mayoría de los donantes portadores de variantes DEL son tipificados erróneamente como D negativos, con el riesgo potencial de inducir una aloinmunización en receptores D negativos. El fenotipo DEL está fuertemente asociado a la expresión concomitante del antígeno C o E, es decir suele detectarse, generalmente, en individuos tipificados por los métodos de rutina como r'r o r'r.^{1,2}

La dicotomía D débil / D parcial tiene, en realidad, límites confusos y depende principalmente de la sensibilidad y avidéz de los reactivos utilizados para intentar establecer diferencias entre ambas variantes. Debido a la dificultad que presenta la discriminación serológica de estos fenotipos, se los agrupa bajo la denominación “variantes D” o fenotipo “D variante”, permitiendo así una visión unitaria de los mismos.

Por lo expuesto anteriormente, es oportuno recordar que la tipificación de rutina del antígeno D presenta ciertas limitaciones:¹³



Figura 5: Limitaciones de la tipificación D de rutina.

Interpretación del fenotipo D variante

La interpretación clínica del fenotipo D variante es diferente según sea un receptor, una embarazada o un donante de sangre la persona que está siendo estudiada.

Pacientes y embarazadas: cuando la reactividad de las muestras no es la esperada, ya sea porque las reacciones son de una intensidad inferior a lo habitual ($\leq 2+$) o bien por una discordancia entre la reactividad de distintos anticuerpos o porque el antígeno D ha sido detectado en fase antiglobulina, es aconsejable adoptar la solución más favorable para el paciente o la gestante, es decir catalogarlos como D negativos. Esta actitud permitirá que se realice la transfusión con hematíes D negativos y que se administre la dosis profiláctica de gammaglobulina anti-D, respectivamente. De esta manera se protege al paciente de una posible aloinmunización al no poder descartar un fenotipo D parcial.^{15,16,17}

Donantes: en la tipificación de donantes, el fenotipo D variante debe ser catalogado como D positivo ya que existe la posibilidad de que esa expresión disminuida del antígeno D sea suficiente para desencadenar un evento de aloinmunización en pacientes D negativos.^{2,16}

Bases moleculares del fenotipo D variante

Como se mencionó anteriormente, el gen *RHD* es muy polimórfico y posee más de 400 alelos descritos por biología molecular.¹⁸ Estos alelos surgen por diferentes mecanismos moleculares, entre ellos:

- Sustituciones, deleciones o inserciones de uno o varios nucleótidos.
- Duplicaciones de varios nucleótidos o exones.
- Conversión génica: transferencia de segmentos de ADN entre genes homólogos.

Algunos alelos originan proteínas RhD “alteradas”, es decir diferentes a la proteína RhD convencional, que expresan en forma débil el antígeno D. Por otro lado, muchas variantes *RHD* son responsables de un fenotipo D negativo (alelos nulos) porque la proteína originada pierde los epitopes D o es trunca y no se integra en la membrana del glóbulo rojo. También, ciertas variantes alélicas son responsables de un fenotipo DEL mientras que otras, si bien generan un fenotipo D positivo en la tipificación de rutina son, en realidad alelos D parciales.¹⁹⁻²¹

Según la mutación que porta el alelo y el efecto fenotípico al que conduce se han descrito alelos D débiles, alelo D parciales, alelos DEL y alelos nulos.

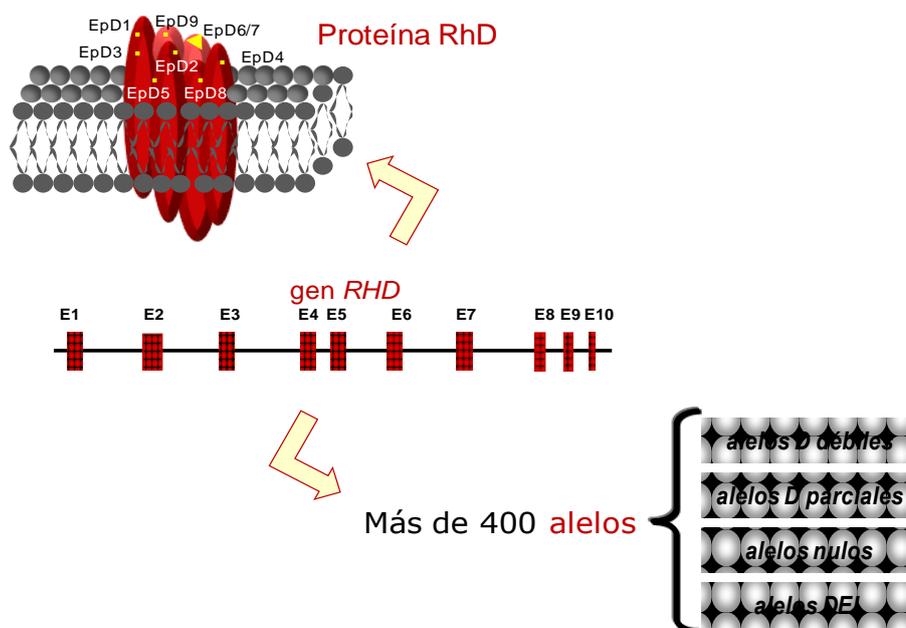


Figura 6: Polimorfismo del gen *RHD*.

En la siguiente tabla se muestran algunos de los más de 400 alelos *RHD*.

<i>DII</i>	<i>DHMi</i>	<i>weak D type 1</i>	<i>weak D type 14</i>	<i>RHD*DEL1</i>
<i>DIII</i>	<i>DHMii</i>	<i>weak D type 2</i>	<i>weak D type 15</i>	<i>RHD*DEL2</i>
<i>DIV</i>	<i>DHO</i>	<i>weak D type 3</i>	<i>weak D type 16</i>	<i>RHD*DEL3</i>
<i>DV</i>	<i>DHQ</i>	<i>weak D type 4.0</i>	<i>weak D type 17</i>	<i>RHD*DEL4</i>
<i>DVI</i>	<i>DHR</i>	<i>weak D type 4.1</i>	<i>weak D type 18</i>	<i>RHD*DEL5</i>
<i>DVII</i>	<i>DUR</i>	<i>weak D type 4.2</i>	<i>weak D type 19</i>	<i>RHD*DEL6</i>
<i>DAR</i>	<i>DMI</i>	<i>weak D type 5</i>	<i>weak D type 20</i>	<i>RHD*DEL7</i>
<i>DAR-E</i>	<i>DNAK</i>	<i>weak D type 6</i>	<i>weak D type 21</i>	<i>RHD*DEL8</i>
<i>DAU</i>	<i>DMH</i>	<i>weak D type 7</i>	<i>weak D type 22</i>	<i>RHD*DEL9</i>
<i>DBS</i>	<i>DNB</i>	<i>weak D type 8</i>	<i>weak D type 23</i>	<i>RHD*DEL10</i>
<i>DCS</i>	<i>DNS</i>	<i>weak D type 9</i>	<i>weak D type 24</i>	<i>RHD*DEL11</i>
<i>DBU</i>	<i>DNT</i>	<i>weak D type 10</i>	<i>weak D type 25</i>	<i>RHD*DEL12</i>
<i>DB</i>	<i>DNU</i>	<i>weak D type 11</i>	<i>weak D type 26</i>	<i>RHD*DEL13</i>
<i>DFR</i>	<i>DOL</i>	<i>weak D type 12</i>	<i>weak D type 27</i>	<i>RHD*DEL14</i>
<i>DHAR</i>	<i>DTO</i>	<i>weak D type 13</i>	<i>weak D type 28</i>	<i>RHD*DEL15</i>

Tabla2: Algunos alelos *RHD*.

Se han descrito numerosos alelos responsables de una expresión débil del antígeno D, sin embargo, las variantes D débil tipo 1, D débil tipo 2, D débil tipo 3 y D débil tipo 4 representan los alelos más frecuentemente encontrados en muestras D variantes de poblaciones caucásicas, superando, en algunos casos, el 90%.

Genotipificación del fenotipo D variante

Una de las aplicaciones más relevantes de la genotipificación *RHD* es la detección del alelo responsable del fenotipo D variante. En este punto cabe preguntarse cuál es el sentido de dicha detección, es decir, qué utilidad tiene determinar si un fenotipo D variante es causado por un alelo *D débil tipo 1*, *D débil tipo 59*, *DIV*, *DFR*, etc. La respuesta a esta pregunta surge de las evidencias clínicas disponibles:

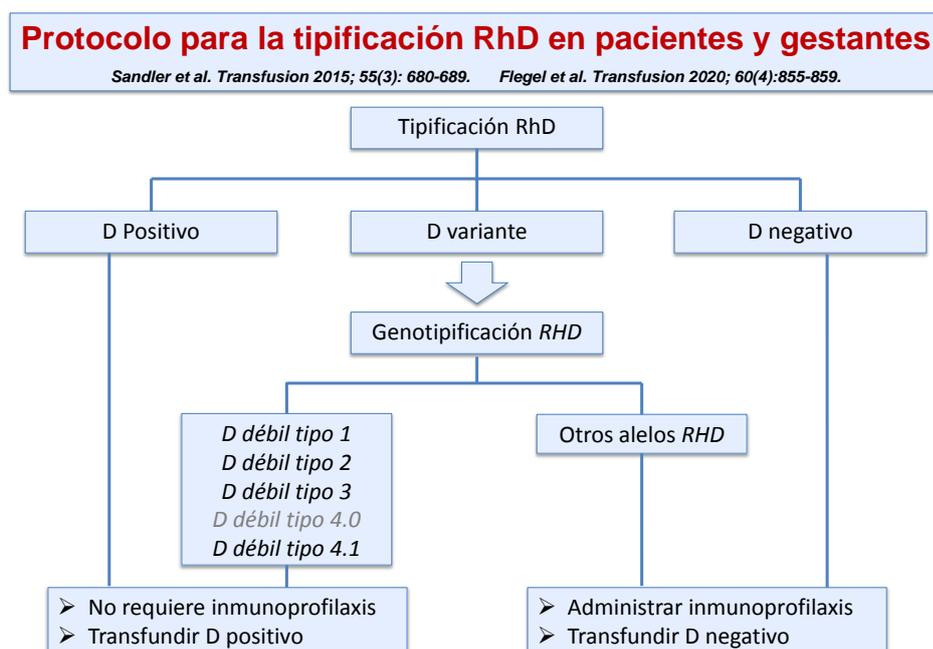
Está documentado en la literatura que los individuos con fenotipo D variante portadores de los alelos D débil tipo 1, D débil tipo 2, D débil tipo 3, D débil tipo 4.0 y D débil tipo 4.1 no son susceptibles de desarrollar una aloinmunización hacia el antígeno D luego del desafío con eritrocitos D positivos.²²⁻²⁷

*Hasta el presente, no hay suficientes evidencias clínicas con respecto a otros alelos *RHD*.*

Ergo, la genotipificación del fenotipo D variante permite definir la conducta transfusional y obstétrica. Los receptores de sangre y las gestantes portadores de un fenotipo D variante originado por un alelo *D débil tipo 1*, *D débil tipo 2*, *D débil tipo 3*, *D débil tipo 4.0* ó *D débil tipo 4.1* pueden ser catalogados como D positivos. Por lo tanto, pueden ser transfundidos con unidades D positivas y no requieren la administración de la profilaxis anti-D. La confirmación del carácter D positivo posibilitará aliviar el stock, habitualmente mermado, de unidades D negativas, y en el caso de las pacientes embarazadas permitirá ahorrar la administración innecesaria de gammaglobulina anti-D. En aquellos pacientes en los cuales el fenotipo D variante es causado por otro alelo *RHD* distinto a los mencionados anteriormente, la conducta recomendada es considerarlos D negativos. Cabe destacar que en el caso de pacientes portadores del alelo *D débil tipo 4.0*, frecuentemente de descendencia africana, algunas consideraciones deben ser tenidas en cuenta y, en ocasiones, se recomienda la transfusión con unidades D negativas y la administración de la inmunoprofilaxis.^{23,26}

Como se mencionó anteriormente, los alelos *RHD* están originados por cambios de nucleótidos conocidos, por lo tanto, es posible identificarlos por métodos de Biología Molecular. La complejidad genética del Sistema Rh y el elevado número de variantes alélicas descritas suponen un verdadero desafío para la genotipificación *RHD*. Con respecto a la caracterización molecular del fenotipo D variante, una estrategia relativamente rápida y no muy costosa consiste en analizar solo la presencia de los alelos *D débil tipo 1*, *D débil tipo 2*, *D débil tipo 3* y *D débil tipo 4*. Este abordaje, además de cubrir aproximadamente el 90% de los alelos responsables de las variantes D, permite identificar aquellas de mayor importancia clínica. En caso de detectar un alelo *D débil tipo 4* cabría la posibilidad de continuar con el estudio para definir si se trata del subtipo *D débil 4.0* o *D débil 4.1*. Es decir que, con una estrategia relativamente sencilla se puede avanzar en la toma de decisiones médicas importantes.^{28,29}

En la siguiente figura se muestra un protocolo de tipificación del antígeno D con su interpretación clínica.



Conclusiones

Desde el punto de vista serológico, la visión unitaria del D débil y D parcial bajo el fenotipo D variante ayuda a decidir la conducta transfusional y obstétrica en los pacientes portadores de dicho fenotipo. Si la aglutinación obtenida no se corresponde con la que habitualmente presentan las muestras D positivas, se recomienda considerarla como D negativa para proteger al paciente de una posible aloinmunización.

La Biología Molecular permite identificar el alelo responsable del fenotipo D variante y obrar en consecuencia según la evidencia clínica disponible para cada alelo. Teniendo en cuenta que aproximadamente el 90% de las variantes D pueden ser consideradas como fenotipo D positivo, el impacto de la genotipificación del fenotipo D variante es contundente.

Bibliografía

1. Daniels GL. Human blood groups. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2013.
2. Muñoz-Díaz E, Cotorruelo C, Nogués N. Capítulo 5: Sistema Rh. Inmunohematología básica y aplicada. Primera edición. GCIAMT; 2014.
3. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000; 95(2):375-387.
4. Huang C, Ye M. The Rh protein family: gene evolution, membrane biology, and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67:1203-1218.
5. Flegel W. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci* 2014; 44:81-91.
6. Westhoff CM. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion* 2004; 44(11):1663-1673.
7. Wagner FF, Flegel WA. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 2000; 95(12):3662-3668.
8. Lomas C, Tippett P, Thompson K, Melamed M, Hughes-Jones N. Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D category. *Vox Sang* 1989; 57:261-264.
9. Tippett P, Lomas C, Wallace M. The Rh antigen D: partial D antigen and associated low incidence antigens. *Vox Sang* 1996; 70:123-131.
10. Jones J, Scott M, Voak D. Monoclonal anti-D specificity and RhD structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. *Transfus Med* 1995; 5:171-184.
11. Scott M. Rh serology. *Transfus Clin Biol* 1996; 3:333-337.
12. Flegel WA, Wagner FF. RHD epitope density profiles of RHD variant red cells analyzed by flow cytometry. *Transfus Clin Biol* 1996; 3(6):429-431.
13. Roback J. Technical Manual, 18th edition. American Association of Blood Banks. United States; 2019.
14. Daniels G. Variants of RhD--current testing and clinical consequences. *Br J Haematol* 2013; 161(4):461-470.
15. Muñoz-Díaz E. Capítulo 22: Control inmunohematológico de la gestante. Inmunohematología básica y aplicada. Primera edición. GCIAMT; 2014.
16. Flegel WA. How I manage donors and patients with a weak D phenotype. *Curr Opin Hematol* 2006; 13(6):476-483.
17. Haspel RL, Westhoff CM. How do I manage Rh typing in obstetric patients? *Transfusion* 2015; 55(3):470-474.
18. International Society of Blood Transfusion (ISBT). Red cell immunogenetics and blood group terminology. 2020. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cellimmunogenetics-and-blood-group-terminology/>.
19. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93(1):385-393.
20. Flegel WA, Wagner FF. Molecular genetics of RH. *Vox Sang* 2000; 78 Suppl 2:109-115.

21. Flegel WA, Wagner FF. Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. *Clin Lab* 2002; 48(1-2):53-59.
22. Sandler SG, Flegel WA, Westhoff CM, et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. College of American Pathologists Transfusion Medicine Resource Committee Work Group. *Transfusion* 2015; 55(3):680-689.
23. Flegel WA, Denomme GA, Queenan JT, et al. It's time to phase out "serologic weak D phenotype" and resolve D types with RHD genotyping including weak D type 4. *Transfusion* 2020; 60(4):855-859.
24. Sandler SG, Chen LN, Flegel WA. Serological weak D phenotypes: a review and guidance for interpreting the RhD blood type using the RHD genotype. *Br J Haematol* 2017; 179(1):10-19.
25. Sandler SG, Queenan JT. A Guide to Terminology for Rh Immunoprophylaxis. *Obstet Gynecol* 2017; 130(3):633-635.
26. Westhoff CM, Nance S, Lomas-Francis C, Keller M, Chou ST. Experience with RHD*weak D type 4.0 in the USA. *Blood Transfus* 2019; 17(2):91-93.
27. Flegel WA, Peyrard T, Chiaroni J, Tournamille C, Jamet D, Pirenne F. A proposal for a rational transfusion strategy in patients of European and North African descent with weak D type 4.0 and 4.1 phenotypes. *Blood Transfus* 2019; 17(2):89-90.
28. Müller TH, Wagner FF, Trockenbacher A, et al. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001; 41(1):45-52.
29. Reid M, Denomme G. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sc* 2011; 44:65-72.