



**COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA  
COORDINADORA: DRA CELINA MONTEMAYOR**

**PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO  
COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ**

**“TIPAGEM MOLECULAR DE GENES DE GRUPOS  
SANGUÍNEOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL”**

**PROFESORA INVITADA: LILIAN CASTILHO, PhD**

Maestría y Doctorado en Inmunohematología con Especialización en el Centro Nacional de Referencia de Grupos Sanguíneos (CNRGS), París, Francia y Post doctorado en biología molecular de grupos sanguíneos en el New York, Blood Center, NY, USA. Con experiencia en Inmunohematología y genética de grupos sanguíneos, trabajó en laboratorios en Brasil y se desempeñó como consultor de la Cruz Roja Americana en Filadelfia, USA.

[castilho@unicamp.br](mailto:castilho@unicamp.br)

## **Introdução**

Os antígenos de grupos sanguíneos são determinantes antigênicos na superfície das hemácias, ou seja, eles podem provocar uma resposta imunológica após uma transfusão ou gestação e, portanto, é o anticorpo que causa problemas clínicos de incompatibilidade transfusional, incompatibilidade materno-fetal e anemia hemolítica autoimune<sup>1</sup>.

A aloimunização é a fonte de uma variedade de problemas durante o manejo clínico e transfusional de longo prazo, sendo os principais problemas a definição correta de muitos antígenos clinicamente significativos e a identificação de hemácias antígeno-negativas adequadas para transfusão<sup>2-4</sup>.

No início da Imunohematologia e nas décadas seguintes, os resultados dos testes de hemaglutinação foram usados para determinar o fenótipo e prever o genótipo de um indivíduo. Apesar de seu custo relativamente baixo, facilidade de desempenho, sensibilidade e especificidade, a determinação do fenótipo eritrocitário baseada na hemaglutinação tem limitações importantes. A tipagem do antígeno eritrocitário de pacientes transfundidos é frequentemente uma tarefa difícil devido à presença de eritrócitos de doadores na circulação dos pacientes. Também é complicado realizar a fenotipagem quando um paciente tem um teste de antiglobulina direto (TAD) positivo ou quando não há reagentes comerciais disponíveis para determinação de antígenos clinicamente significativos.

Em parte, para mitigar essas limitações, a tipagem molecular de genes de grupos sanguíneos foi adicionada ao diagnóstico laboratorial e está cada vez mais sendo usada para determinar o genótipo e prever o fenótipo de um indivíduo<sup>5,6</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1: Comparação dos testes moleculares e sorológicos**

Testes moleculares	Testes sorológicos
Interpretação computadorizada / alta resolução e alto rendimento	Teste subjetivo e trabalho intensivo / baixa resolução e baixo rendimento
Não requer reagentes especiais	Requer o uso de antissoros confiáveis
Pode determinar qualquer antígeno com base molecular conhecida	Muitos antissoros para antígenos clinicamente significativos não estão disponíveis
Hemácias transfundidas e hemácias revestidas por IgG podem ser tipadas com precisão	Hemácias transfundidas e hemácias revestidas por IgG interferem na tipagem
Indica com alto nível de precisão um feto em risco para a DHFRN	Indicação indireta de um feto em risco para a DHFRN
DNA pode ser obtido de diferentes fontes de células	Hemácias são necessárias
Zigozidade pode ser determinada com precisão	Apresenta restrições para determinação da zigozidade
Identifica variantes que levam a fraca expressão dos antígenos	Limitada para identificar variantes com fraca expressão
Caracteriza os tipos de antígenos D fracos e D parciais	Não diferencia D fraco de D parcial

### **Aplicações da tipagem molecular de genes de grupos sanguíneos no diagnóstico laboratorial**

O uso da informação genética fornecida pelo projeto genoma humano acrescentou uma nova fase à Imunohematologia. As bases moleculares dos 345 antígenos de grupos sanguíneos agrupados em 43 sistemas de grupos sanguíneos reconhecidos pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT) foram elucidadas<sup>7,8</sup>. Com os conhecimentos adquiridos com a clonagem gênica e sequenciamento de genes de grupos sanguíneos, foi possível identificar as características moleculares dos antígenos de grupos sanguíneos e saber que a maioria deles são derivados de variações de único nucleotídeo (SNVs), conhecer a organização do locus *RH* e desenvolver uma variedade de métodos para tipagem de grupos sanguíneos usando tecnologia baseada em DNA<sup>9-16</sup>. E então surgiram várias vantagens dos métodos moleculares sobre os métodos sorológicos no diagnóstico laboratorial. Por exemplo, não precisamos de hemácias para a genotipagem eritrocitária, pois o DNA genômico pode ser obtido por diferentes fontes de células e, portanto, podemos tipar pacientes que foram recentemente transfundidos<sup>17</sup>. Testes moleculares podem também ser usados para fenotipar pacientes com autoanticorpos quentes, determinar antígenos de baixa e alta

frequência, auxiliar na identificação de antígenos variantes e na diferenciação entre D fraco e D parcial<sup>18</sup>. A Tabela 2 resume as principais aplicações da tipagem molecular no diagnóstico.

**Tabela 2: Aplicações dos testes moleculares no diagnóstico laboratorial**

<b>Pacientes</b>
Tipagem de pacientes com transfusões recentes
Tipagem de múltiplos antígenos e antígenos de alta prevalência para auxiliar na identificação de anticorpos
Tipagem de pacientes com hemácias revestidas com imunoglobulina (TAD+)
Determina quais pacientes fenotipicamente negativos para o antígeno podem receber hemácias antígeno-positivo
Tipagem de pacientes recebendo terapia com anticorpos monoclonais interferindo nos testes pré-transfusionais
Tipagem de antígenos fracamente expressos nas hemácias
Resolve discrepâncias de fenotipagens
Auxilia na diferenciação entre auto e aloanticorpos
Tipagem de antígenos quando o antissor não estiver disponível ou com potência fraca
Ajuda na identificação de antígenos variantes, especialmente variantes Rh
Tipagem de pacientes que receberam transplante alogênico de células-tronco
<b>Doadores</b>
Fenotipagem de doadores para aumentar o inventário de antígenos negativos
Fenotipagem de doadores para painéis de identificação de anticorpos
Fenotipagem de doadores para identificação de fenótipos raros
Resolve discrepâncias ABO e RhD
Tipagem de antígenos fracamente expressos na membrana eritrocitária
<b>Prenatal</b>
Identifica um feto em risco para DHFRN sem procedimentos invasivos
Determine a Zigozidade <i>RHD</i> paterna
Diferencia D fraco de D parcial para indicação de IgRh

As descobertas moleculares trouxeram muitos outros benefícios para a medicina transfusional, incluindo a descoberta de novos sistemas de grupos sanguíneos e a possibilidade de realizar transfusão personalizada.

### **Tipagem molecular em pacientes**

A tipagem molecular de genes de grupos sanguíneos é recomendada para pacientes dependentes de transfusão, como parte do processo de identificação de anticorpos, uma vez que a identificação do fenótipo deduzido do genótipo do paciente permite ao laboratório determinar a quais antígenos o paciente pode ou não responder para formar aloanticorpos. Além disso, a tipagem molecular fornece maior precisão e mais

informações sobre o perfil antigênico dos pacientes, especialmente aqueles para os quais não dispomos de antíssoros comerciais como, por exemplo, os antígenos do sistema Dombrock e outros antígenos raros.

Vários estudos têm demonstrado a relevância da genotipagem de grupos sanguíneos para o manejo de pacientes cronicamente transfundidos com doenças como anemia falciforme (AF), talassemia e síndrome mielodisplásica (SMD), em que os resultados da hemaglutinação podem não refletir o verdadeiro fenótipo do paciente<sup>19-23</sup>. Além disto, o uso de unidades de sangue mais compatíveis pode reduzir as necessidades de transfusão, diminuindo o risco de outras reações adversas, como lesão pulmonar aguda relacionada à transfusão e potencial exposição a doenças infecciosas.

Os pacientes falciformes estão entre os que mais se beneficiam da tipagem molecular, pois esta permite uma compatibilidade mais exata, identifica os pacientes que não possuem antígenos de alta prevalência e ajuda a diferenciar entre auto e aloanticorpos, especialmente em pacientes que produzem anticorpos Rh. Da Costa et al<sup>24</sup> verificaram que a compatibilidade molecular de glóbulos vermelhos é superior à compatibilidade sorológica em pacientes com doença falciforme (DF), quando os pacientes que estavam recebendo unidades de concentrado de hemácias com compatibilidade sorológica, receberam unidades compatibilizadas pelo genótipo e se beneficiaram das transfusões, conforme demonstrado por uma melhor sobrevivência de hemácias in vivo, avaliada por aumentos nos níveis de hemoglobina e frequência diminuída de transfusões.

A grande diversidade de genes *RH* em indivíduos Africanos também aumenta o risco de pacientes com DF desenvolverem anticorpos Rh clinicamente significativos<sup>25-27</sup>. Chou et al<sup>28</sup> avaliaram genótipos RH em 857 pacientes falciformes e mostraram que 29% dos genes *RHD* e 53% dos genes *RHCE* estavam alterados, mas que nem todos os anticorpos Rh desenvolvidos por esses pacientes estavam associados à herança de alelos *RH* alterados, sugerindo que os anticorpos Rh não são apenas resultado da herança de alelos *RH* alterados, mas que também podem ser resultado de epítomos Rh alterados nas hemácias de doadores. Recentemente, Macedo et al<sup>29</sup> forneceram evidências de que pacientes expostos a unidades de hemácias de doadores com

variantes Rh podem desenvolver anticorpos Rh clinicamente significativos. Portanto, a tipagem molecular pode auxiliar na identificação de alelos *RHD* e *RHCE* que codificam epítomos Rh alterados em pacientes e doadores de sangue, melhorando assim a compatibilidade RH, diminuindo os riscos de aloimunização Rh e reduzindo as reações transfusionais hemolíticas tardias (RTHT) por anticorpos Rh. Além disso, a discriminação entre D fraco e D parcial em pacientes com DF pode ser de importância clínica porque os portadores de antígeno D parcial podem desenvolver anti-D quando transfundidos com unidades de hemácias D-positivas, o que não é comumente observado no fenótipo D fraco, com raras exceções. Em um estudo recente, realizado em 83 pacientes brasileiros com DF fenotipados como D fraco, a genotipagem *RHD* mostrou que 55 (66%) deles tinham genes *RHD* alterados que codificam D parcial e 9 pacientes já haviam desenvolvido anti-D, demonstrando a importância de diferenciar D fraco e D parcial em pacientes cronicamente transfundidos para estabelecer uma política transfusional adequada<sup>30</sup>.

Além de sua contribuição para a determinação correta de antígenos e variantes, a genotipagem eritrocitária de pacientes com DF dependentes de transfusão é importante para determinar quais pacientes fenotipicamente Fy(b-) podem receber concentrado de hemácias (CH) Fy(b+) com segurança, sem o risco de aloimunização<sup>31</sup>. O uso da genotipagem *FY* para identificação de pacientes falciformes portadores do alelo *FY\*B-67C* que impede a expressão dos antígenos FY nos eritrócitos mas não em outros tecidos, demonstrou aumentar consideravelmente a disponibilidade de sangue para eles.

Pacientes com autoanticorpos quentes ou com interferência de drogas (anticorpos contra drogas ou terapias com anticorpos monoclonais, como anti-CD38 e anti-CD47) também se beneficiam da genotipagem eritrocitária estendida com a possibilidade de receber transfusões de CH compatíveis com seus antígenos clinicamente significativos<sup>32-34</sup>. Essa conduta reduz o risco de reações transfusionais hemolíticas, evita aloimunização e melhora o atendimento ao paciente, reduzindo o tempo de trabalho e o número de exames realizados para remover a interferência de autoanticorpos ou drogas.

## Tipagem molecular em doadores de sangue

A tipagem molecular tem sido utilizada em doadores de sangue para selecionar sangue mais compatível para a transfusão, pois vários SNVs podem ser incluídos em um único ensaio, permitindo a identificação de vários antígenos ao mesmo tempo. Atualmente, a genotipagem de alto rendimento com base em arranjos de DNA é um método viável para obter um banco de dados de doadores genotipados, o que pode aumentar os inventários de doadores de sangue negativos para múltiplos antígenos ou negativos para um antígeno de alta prevalência<sup>35,36</sup>.

A tipagem molecular também auxilia identificar doadores negativos com antígenos para os quais não existem antissoros comerciais disponíveis como por exemplo, anti-Do<sup>a</sup>, -Do<sup>b</sup>, -Hy, -Jo<sup>a</sup>, -V, -VS, e para fornecer uma melhor caracterização de painéis de hemácias que são usados para identificação de anticorpos<sup>37</sup>.

Outra importante vantagem da tipagem molecular em doadores de sangue é a identificação de alelos variantes que levam à expressão de antígenos fracos que podem imunizar um receptor negativo para o antígeno se não forem reconhecidos. Um exemplo é um doador com o fenótipo Fy<sup>x</sup>, que pode ser fenotipado incorretamente como Fy(b-). A tipagem molecular pode caracterizar corretamente este doador como Fy(b+<sup>w</sup>) pela identificação do SNV 265C> T responsável pela expressão fraca do antígeno<sup>38</sup>.

A tipagem molecular de um gene variante também pode auxiliar na resolução de uma investigação sorológica em doadores de sangue. Uma proporção de doadores com subgrupos ABO que foram tipados como grupo O no passado agora estão sendo fenotipados como grupo A ou grupo B com o uso de anticorpos monoclonais. Uma vez que as bases de muitos dos subgrupos fracos de A e B estão associadas a genes de transferases alterados, ensaios baseados em DNA podem ser usados para definir corretamente o grupo ABO desses doadores<sup>39</sup>. Da mesma forma, uma proporção de doadores de sangue está apresentando discrepâncias na tipagem RhD devido à variabilidade de antissoros e métodos para detectar antígenos fracos e parciais<sup>40,41</sup>. O teste molecular tem sido usado para confirmar o tipo RhD do doador e identificar doadores com potencial para aloimunizar receptores RhD-negativos. Um estudo

recente realizado nos Estados Unidos em 1174 doadores de sangue fenotipados como RhD-negativo mostrou que 0,94% deles tinham alelos *RHD* variantes que podem causar aloimunização em receptores RhD-negativos<sup>42</sup>.

### **Tipagem molecular no pré-natal**

A descoberta de DNA fetal livre no plasma materno abriu novas e excitantes possibilidades para a determinação pré-natal não invasiva do grupo sanguíneo fetal após sangramento materno-fetal<sup>43</sup>. A genotipagem *RHD* fetal não invasiva por meio da análise de DNA fetal livre no plasma materno já foi incorporada à rotina de muitos países para o manejo de gestantes RhD-negativo previamente sensibilizadas ou em risco de imunização<sup>44,45</sup>. A avaliação do risco de doença hemolítica do feto e do recém-nascido (DHFRN) pela previsão precisa do fenótipo RhD fetal permite administrar corretamente a Imunoglobulina Rh (IgRh) a mulheres RhD-negativo gerando fetos RhD-positivo e evitar a administração desnecessária da IgRh em casos de fetos RhD negativo<sup>46</sup>.

A classificação apropriada dos fenótipos RhD também é crítica para determinar o manejo de pacientes obstétricas<sup>47,48</sup>. No entanto, a distinção sorológica entre D parcial e D fraco é uma tarefa difícil devido às variações nos testes sorológicos<sup>49</sup> e a genotipagem *RHD* tem sido usada para fornecer informações sobre o risco de aloimunização e indicação da IgRh. Atualmente, é preconizado que as mulheres que têm um fenótipo D sorológico fraco devido a alelos *RHD\*fracos tipos 1, 2 e 3* que são as variantes RhD mais comuns em Caucasianos, não apresentam risco de aloimunização e podem ser consideradas RhD-positivo evitando assim o uso desnecessário de IgRh<sup>50,51</sup>. Com base na prevalência de alelos *RHD* variantes em diferentes grupos étnicos, há um consenso na literatura de que a genotipagem *RHD* deve ser realizada em gestantes com fenótipo D fraco para discriminação entre D fraco e D parcial, a fim de identificar mulheres que são ou não candidatas a IgRh<sup>52</sup>.

### **Custo-efetividade da tipagem molecular**



O custo e o reembolso dos testes moleculares têm sido uma barreira para sua implementação de rotina. No entanto, o custo da análise molecular pode ser reduzido significativamente analisando vários polimorfismos ao mesmo tempo e processando muitas amostras por reação usando um modelo de teste centralizado. A introdução de tecnologias como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) também pode levar a uma redução nos custos de sequenciamento. É importante salientar que o teste molecular pode ser realizado apenas uma vez na vida e fazer parte do registro de transfusão do paciente. Atualmente, há um consenso de que a tipagem molecular em pacientes dependentes de transfusão é econômica para selecionar sangue mais compatível, facilitando a transfusão, prevenindo e reduzindo a aloimunização eritrocitária e RTHT<sup>53</sup>. Além disso, pode reduzir o custo da profilaxia Rh, o desconforto da aplicação de IgRh e a exposição a agentes infecciosos. Em doadores, a tipagem molecular pode reduzir o custo da aquisição de soros raros e das repetições, com uma probabilidade de obter uma compatibilidade mais precisa. Por outro lado, tem sido demonstrado que, embora os testes de hemaglutinação sejam considerados mais rápidos e baratos que os testes moleculares, para pacientes com diagnósticos específicos e com história transfusional, eles podem ser limitados, caros e demorados. A análise de custo-benefício costuma ser desafiadora, mas os custos de um paciente aloimunizado e uma reação transfusional devem ser levados em consideração ao analisar o custo da tipagem molecular de genes de grupos sanguíneos no diagnóstico laboratorial. O grupo de pacientes politransfundidos, como aqueles com anemia falciforme ou com anemia hemolítica autoimune e aqueles com resultados sorológicos complexos inexplicáveis, se beneficiarão particularmente de ensaios moleculares com análises mais eficientes, rápidas e menos dispendiosas, melhorando a segurança e eficácia dos produtos sanguíneos com baixos custos adicionais.

## **Conclusão**

A tipagem molecular de genes de grupos sanguíneos traz uma nova era no diagnóstico laboratorial, oferecendo muitas vantagens em relação aos testes sorológicos, com o benefício principal de deduzir o fenótipo de grupo sanguíneo em situações que testes sorológicos não são confiáveis. Tem sido implementada com sucesso em laboratórios

de Imunohematologia e está provando ser uma ferramenta poderosa na prevenção da formação de aloanticorpos, com vantagens potenciais para identificar tipos de sangue raros e encontrar melhores combinações de antígenos para pacientes cronicamente transfundidos.

Com o avanço do sequenciamento de nova geração, será possível obter deduções mais precisas dos fenótipos de grupos sanguíneos em doadores de sangue e pacientes e trazer a medicina personalizada para o campo da Medicina Transfusional<sup>54-57</sup>, permitindo uma compatibilidade eritrocitária mais exata. Isso mudaria a prática atual, aumentando os estoques de unidades de hemácias fenotipadas, possibilitando transfusões de sangue com maior compatibilidade para mulheres em idade fértil e para pacientes que necessitam de transfusões crônicas, evitando a imunização, o risco de DHFRN e reações transfusionais hemolíticas.

A ampla disponibilidade de variantes definidas sorologicamente contribuiu para o conhecimento sobre a diversidade alélica dos grupos sanguíneos humanos. Embora essa diversidade de alelos de grupos sanguíneos nem sempre esteja associada a reações adversas à transfusão, com a coleta de mais informações, ficou claro que muitos eventos moleculares resultam em discrepâncias entre o fenótipo e o genótipo. Em um estudo recente<sup>58</sup> avaliando 325 discrepâncias encontradas entre fenótipos e genótipos na prática diária, verificamos que 97,67% das discrepâncias ocorreram devido a resultados falsos de fenótipos, demonstrando que apesar das limitações dos métodos moleculares atualmente empregados (Tabela 3), a genotipagem é mais eficiente para definir os tipos de sangue, especialmente em pacientes dependentes de transfusão.

### **Tabela 3: Limitações dos métodos moleculares atualmente empregados**

A genotipagem ABO pode não ser precisa devido à complexidade do sistema ABO
Apenas variantes mais comuns estão incluídas nas plataformas atuais de genotipagem de grupos sanguíneos
Muitos alelos nulos não são detectados
Polimorfismos adicionais, dentro das regiões dos "primers", podem levar a "não detecção do alelo" e a resultados falso-negativos
Novos alelos, que podem alterar a expressão sorológica do antígeno e fenótipos nulos podem não ser detectados
Alelos híbridos podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos
Mutações fora da região alvo não são detectadas

E o conhecimento reunido com as descobertas moleculares também tem sido usado para explorar a expressão de novos alelos, expressar antígenos em sistemas heterólogos usando mRNA em estudos de transfecção e produzir formas recombinantes de um antígeno para facilitar a identificação de aloanticorpos contra antígenos de alta prevalência. O avanço dos testes de NGS com a inclusão de variantes genéticas que levam a fenótipos nulos e a redução de custos, irá superar as limitações dos métodos moleculares atuais e permitir em breve a substituição da fenotipagem eritrocitária.

### **Referências**

1. Poole J, Daniels G. Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfusion medicine reviews* 2007; 21: 58-71.
2. Zimring JC, Welniack L, Semple JW, et al. Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. *Transfusion* 2011; 51:435-441.
3. Schonewille H, van de Watering LM, Brand A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic patient cohort: is it time to take precautionary measures? *Transfusion* 2011; 46:630-635.
4. Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. *Br J Haematol* 2012; 159:394-404.

5. Denomme GA, Flegel WA. Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. *Transfusion* 2008; 48:2461-75.
6. Hillyer CD, Shaz BH, Winkler AM, et al. Integrating molecular technologies for red blood cell typing and compatibility testing into blood centers and transfusion services. *Transfusion Medicine Reviews* 2008; 22:117-32.
7. Storry JR, Clausen FB, Castilho L, et al. International Society of Blood Transfusion Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology: Report of the Dubai, Copenhagen and Toronto meetings. *Vox Sang* 2019, 114:95-102.
8. ISBT-Working Party on Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. Available from: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/blood-group-terminology/>
9. Denomme GA. Molecular basis of blood group expression. *Transfus Apher Sci* 2011; 44:53–63.
10. Reid M, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory. *Transfus Apher Sci* 2011, 44:65-72.
11. Boccoz SA, Le Goff G, Blum LJ, Marquette CA. Microarrays in blood group genotyping. *Molecular typing of blood cell antigens. Methods Mol Biol* 2015; 1310:105-13.
12. Meyer S, Vollmert C, Trost N, et al. High-throughput Kell, Kidd, and Duffy matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry-based blood group genotyping of 4000 donors shows close to full concordance with serotyping and detects new alleles. *Transfusion* 2014; 54:3198-207.
13. Latini FR, Gazito D, Arnoni CP, et al. A new strategy to identify rare blood donors: single polymerase chain reaction multiplex SNaPshot reaction for detection of 16 blood group alleles. *Blood Transfus* 2014; 12:256-63.
14. Wagner FF, Bittner R, Döscher A, et al. Extended Donor Typing by Pooled Capillary Electrophoresis: Impact in a Routine Setting. *Transfus Med Hemother*. 2018;45:225-237.
15. Fichou Y, Audrézet MP, Guéguen P, et al. Next-generation sequencing is a credible strategy for blood group genotyping. *Br J Haematol*. 2014, 167:554-62.

16. Boccoz AS, Fouret J, Roche M, et al. Massively parallel and multiplex blood group genotyping using next-generation-sequencing. *Clin Biochem*. 2018, 60:71-76.
17. Reid ME, Rios M, Powell D, et al. DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion* 2000; 40:48-53.
18. Westhoff C. Blood group genotyping. *Blood* 2019, 133:1814-1820.
19. Castilho L, Rios M, Bianco C, et al. DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*. 2002; 42:232–8.
20. Castilho L, Rios M, Pellegrino Jr J, et al. Blood group genotyping facilitates transfusion of beta-thalassemia patients. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:216-20.
21. Ribeiro KR, Guarnieri MH, da Costa DC, et al. DNA array analysis for red blood cell antigens facilitates the transfusion support with antigen-matched blood in patients with sickle cell disease. *Vox Sang*. 2009; 97(2):147–52.
22. Guelsin GAS, Fujita CR, Rodrigues C, et al. Molecular matching for Rh and K reduces red blood cell alloimmunization in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Transfus*. 2015; 13:53-58.
23. Fasano RM, Chou S. Red Blood Cell Antigen Genotyping for Sickle Cell Disease, Thalassemia, and Other Transfusion Complications. *Transfus Med Rev* 2016; 30:197-201.
24. Da Costa DC, Pellegrino J, Guelsin GAS, et al. Molecular matching of red blood cells is superior to serological matching in sickle cell disease patients. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013; 35:35–8.
25. Chou ST, Jackson T, Vege S, et al. High prevalence of red blood cell alloimmunization in sickle cell disease despite transfusion from Rh-matched minority donors. *Blood*. 2013; 122(6):1062–71.
26. Dinardo CL, Kelly S, Dezan MR, et al. Diversity of RH and transfusion support in Brazilian sickle cell disease patients with unexplained Rh antibodies. *Transfusion* 2019; 59:3228-35.

27. Chou ST, Flanagan JM, Vege S, et al. Whole-exome sequencing for RH genotyping and alloimmunization risk in children with sickle cell anemia. *Blood Adv* 2017; 1:1414-22.
28. Chou ST, Evans P, Vege S, et al. RH genotype matching for transfusion support in sickle cell disease. *Blood* 2018; 12: 1198-1207
29. Macedo MD, Miranda MR, Santos TD et al. Rh antibodies as a result of altered Rh epitopes on transfused red cells: a case series of seven Brazilian patients. *BloodTransfus* 2020;\_doi: 10.2450/2020.0073-20. Online ahead of print.
30. Miranda MR, Dos Santos T, Castilho L. Systematic RHD genotyping in Brazilians reveals a high frequency of partial D in transfused patients serologically typed as weak D. *Transfus Apher Sci.* 2021, doi: 10.1016/j.transci.2021.103235.
31. Castilho L. The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion* 2007; 47(S):28S-31S.
32. El Kenz H, Efira A, Quoc Le P, et al. Transfusion support of autoimmune hemolytic anemia: how could the blood group genotyping help? *Transl Res* 2014; 163:36-42.
33. Bub CB, Reis IN, Aravechia MG, et al. Transfusion management for patients taking an anti-CD38 monoclonal antibody. *Hematol Transfus Cell Ther* 2018; 40: 25–29.
34. Velliquette RW, Aeschlimann J, Kirkegaard J, et al. Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing. *Transfusion* 2019; 59:730-737.
35. Flegel WA, Gottschall JL, Denomme GA. Implementing mass-scale red cell genotyping at a blood center. *Transfusion* 2015; 55:2610-15.
36. Shafi H, Abumuhor I, Klapper E. How we incorporate molecular typing of donors and patients into our hospital transfusion service. *Transfusion* 2014; 54:1212-19.
37. Scharberg E, Rink G, Portegys J, et al. The Impact of Using Genotyped Reagent Red Blood Cells in Antibody Identification. *Transfus Med Hemother* 2018;45:218-224.
38. DePalma, Godbey EA, Opalka A, et al. Reliability of labeling red cell units with minor antigen historical results and process considerations. *Transfusion* 2020; 60:822-830.

39. Olsson ML, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001; 98:1585-93.
40. Wagner F, Gassner C, Müller TH, et al. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 1:385-93.
41. Flegel WA, von Zabern I, Wagner FF. Six years' experience performing RGD genotyping to confirm D- red blood cell units in Germany for preventing anti-D immunizations. *Transfusion* 2009; 49:465-71.
42. Perez-Alvarez I, Hayes C, Hailemariam T, et al. RHD genotyping of serologic RhD-negative blood donors in a hospital-based blood donor center. *Transfusion* 2019; 59:2422-2428.
43. Lo YMD. Fetal RhD genotyping from maternal plasma. *Ann Med* 1999; 31:308-312.
44. Clausen FB. Integration of noninvasive prenatal prediction of fetal blood group into clinical prenatal care. *Prenat Diagn* 2014; 34:409-15
45. Clausen FB, Steffensen R, Christiansen M, et al. Routine noninvasive prenatal screening for fetal RHD in plasma of RhD-negative pregnant women-2 years of screening experience from Denmark. *Prenat Diagn*. 2014; 34:1000-5.
46. Clausen FB, Rieneck K, Krog GR, et al. Noninvasive Antenatal Screening for Fetal RHD in RhD Negative Women to Guide Targeted Anti-D Prophylaxis. *Methods Mol Biol*. 2019;1885:347-359.
47. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, et al. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 2005; 45:1554-60.
48. Flegel WA, Denomme GA, Yazer MH. On the complexity of D antigen typing: a handy decision tree in the age of molecular blood group diagnostics (Review). *J Obstet Gynaecol Can* 2007; 29:746-52.
49. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, et al. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008; 48:473-478.

50. Sandler GS, Flegel WA, Westhoff CM, et al. It's time to phase in RHD genotyping for patients with a serologic weak D phenotype. *Transfusion* 2015; 55:680-689. 14.
51. 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; 179:10-19.
52. Kacker S, Vassallo R, Keller M, et al. Financial implications of RHD genotyping of pregnant women with a serologic weak D phenotype. *Transfusion* 2015; 55:2095-103.
53. Carter JH, Flegel WA. Red cell transfusions in genomic era. *Semin Hematol* 2019; 56:236-40.
54. Fichou Y, Ferec C. NGS and blood group systems: State of the art and perspectives. *Transfus Clin Biol* 2017; 24:240-44.
55. Lane WJ, Westhoff CM, Uy JM, et al. Comprehensive blood cell and platelet antigen prediction from whole genome sequencing: proof of principle. *Transfusion* 2016; 56:743-54.
56. Fichou Y, Mariez M, Le Marechal C, et al. The experience of extended blood group genotyping by next generation sequencing (NGS): investigation of patients with sickle cell disease. *Vox sang* 2016; 11:418-24.
57. Guo Y, Busch MP, Seielstad M, et al. Development and evaluation of a transfusion medicine genome wide genotyping array. *Transfusion* 2019; 59:101-11.
58. Menegati SFP, Santos TD, Macedo MD, et al. Discrepancies between red cell phenotyping and genotyping in daily immunohematology laboratory practice. *Transfus Apher Sci* 2020; 59:102585.