

Badanie obecności fragmentów genu *RHD* u dawców RhD ujemnych z zastosowaniem minipulowania i technologii *real-time PCR*

Mass screening for *RHD* gene fragments in RhD negative donors by minipool testing system using real-time PCR technology

Monika Pelc-Kłopotowska¹, Agnieszka Orzińska¹, Bogumiła Michalewska¹, Anna Walaszczyk², Jolanta Gawęda², Grzegorz Liszewski¹, Barbara Żupańska¹, Ewa Brojer¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej

²Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie

Badania finansowane z grantu nr 2P05E02129

Streszczenie

Wstęp: Podłożem fenotypu RhD ujemny u osób rasy białej jest delecja genu *RHD*. Są jednak osoby, u których gen lub jego fragmenty są obecne, lecz ekspresja białka RhD nie zachodzi, jest obniżona lub białko to nie posiada pewnych epitopów. Występowanie takich zjawisk może się wiązać z ryzykiem immunizacji bądź z ryzykiem fałszywych wyników badań, co jest szczególnie istotne przy nieinwazyjnej diagnostyce RHD płodu. Celem badania była analiza możliwości wykrywania RHD u dawców RhD ujemnych z zastosowaniem strategii minipulowania osocza.

Materiał i metody: Badano próbki osocza 2907 dawców RhD ujemnych. Z przygotowywanych pul osocza od 48 dawców izolowano DNA i badano w nim obecność RHD metodą *real-time PCR* ze starterami do eksonu 7, 10 i intronu 4. Jeśli wynik był dodatni, prowadzono dalsze badania, by zidentyfikować dawcę z RHD. Próbki RHD dodatnie badano dodatkowo w kierunku eksonu 4 RHD i pseudogenu RHDΨ oraz wariantów D słaby i D częściowy metodami molekularnymi i serologicznymi.

Wyniki: Fragmenty genu *RHD* wykryto u 13 z 2907 dawców RhD ujemnych. W żadnym przypadku nie wykryto RHDΨ. U 7 dawców wykryto ekson 7, 10 i intron 4, u 5 tylko ekson 10, a w jednym przypadku tylko ekson 7 i intron 4. W dalszych badaniach 3 przypadki zaklasyfikowano jako D słabe typu 11 (2 dawców) i DFR (1 dawca), a 4 jako hybrydowe warianty RHD-CE-D.

Wnioski: Ustalono, że genotypowanie RHD z DNA wyizolowanego z puli osocza od dawców RhD ujemnych jest użyteczną metodą identyfikacji wariantów genu *RHD* i może być stosowane do badań na szeroką skalę. U 0,45% polskich dawców RhD ujemnych wykryto fragmenty genu *RHD*.

Słowa kluczowe: gen *RHD*, fenotyp RhD, antygen D, D słaby, D częściowy, immunizacja, alloprzeciwciała anty-D

J. Transf. Med. 2008; 1: 40–45

Summary

Background: *RhD* negative phenotype in Caucasians is caused mainly by a complete deletion of *RHD* gene. However, in some individuals the gene or its fragments are present but *D* protein is not expressed, has a low level of expression or lacks some epitopes. *RhD* negative patients transfused with some variants may be at risk of *D* immunization and non-invasive determination of fetal *RHD* may give false results.

Aim: Analysis of the minipool testing strategy and real time PCR typing for detection of *RHD* in *RhD* negative donors.

Material and methods: 2907 *RhD* negative donors typed by direct agglutination in tubes or microplates were studied. Plasma samples of 48 donors were pooled, DNA was extracted and tested by real-time PCR for exon 7, 10 and intron 4 of *RHD*. If the result was positive, further testing was performed to identify donors with *RHD*. *RHD* positive donors were investigated for exon 4 of *RHD* and *RHD*Ψ and available donors were examined for common weak *D* and partial *D* types by SSP-PCR and by serological methods.

Results: *RHD* fragments were detected in 13/2907 *RhD* negative donors: in 7 — exon 7, 10 and intron 4; in 5 — exon 10 and in one — exon 7 and intron 4. In none was *RHD*Ψ detected. In further analysis of available cases three donors were classified as *D* weak type 11 (2 cases) and *DFR* (1 case) and four as hybrid *RHD-CE-D* variants.

Conclusions: The *RHD* genotyping in DNA from donor plasma pools is useful for mass screening for *RHD* variants in *RhD* negative donors. *RHD* fragments were detected in 13/2907 (0.45%) Polish *RhD* negative donors.

Key words: *RHD* gene, *RhD* phenotype, *D* antigen, *D* weak, partial *D*, immunization, alloantibody anti-*D*

J. Transf. Med. 2008; 1: 40–45

Wstęp

W populacji rasy białej około 15% stanowią osoby *RhD* ujemne, a podłożem tego fenotypu wśród zdecydowanej większości jest całkowita delecja genu *RHD*. Są jednak osoby, u których gen ten lub jego fragmenty są obecne, lecz ekspresja białek *RhD* nie zachodzi lub jest bardzo osłabiona. Określa się je jako „osoby z antygenem *D* słaby lub *D* częściowy”. Stanowią one grupę bardzo różnorodną zarówno z punktu widzenia genetycznego, jak i z punktu widzenia klinicznej istotności występującego u nich „szczątkowego” antygeny *D* [1–7]. Wiele obserwacji klinicznych wskazuje, że słabe i częściowe odmiany antygeny *D* mogą być przyczyną immunizacji, dlatego przetoczenie krwi z takim antygenem osobie *Rh* ujemnej może pobudzić ją do produkcji przeciwciał anti-*D*. Jest to szczególnie niebezpieczne dla *RhD* ujemnych dziewczynek i kobiet w wieku rozrodczym, bo wytworzenie przez nie przeciwciał anti-*D* może mieć konsekwencje dla przebiegu ich przyszłych ciąży i grozić chorobą hemolityczną płodów lub noworodków, gdy płód będzie *RhD* dodatni [1, 2].

W literaturze zwraca się także uwagę na znaczenie badania antygeny *D* słaby u biorców krwi [3, 5–7]. Wykazano, że tylko niektórzy z nich są narażeni na immunizację, gdy otrzymają krew od dawcy *RhD* dodatniego. Traktowanie wszystkich biorców ze słabym antygenem *D* jako *RhD* ujemnych nie jest zatem zasadne. Zidentyfikowanie osób z typami *D* słaby, które nie ulegną immunizacji przez antygen *D*, możliwe jest wyłącznie metodami biologii molekularnej.

Dodatkowo istotna jest ocena występowania w populacji polskiej tak zwanego pseudogenu *RHD*Ψ, który jest częstym podłożem fenotypu *RhD* ujemnego w populacjach innych niż rasa biała. Jego obecność u osoby *RhD* ujemnej może być powodem fałszywie dodatniego wyniku nieinwazyjnej diagnostyki *RhD* w konflikcie *Rh*, którą prowadzi się poprzez badania genu *RHD* płodu w osoczu kobiety ciężarnej. Częstość występowania pseudogenu *RHD*Ψ w populacji polskiej nigdy nie była badana.

Autorzy niniejszej pracy prowadzą badania genu *RHD* w osoczu *RhD* ujemnych kobiet ciężarnych [8–11]. Dzięki zastosowaniu do tych badań czulej techniki opartej na reakcji łańcuchowej

polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*, *polymerase chain reaction*) można wykryć śladowe ilości kopii genu płodu. Planowane jest wykorzystanie tej samej techniki do identyfikacji odmian genu *RHD* u osób RhD ujemnych z zastosowaniem strategii badań DNA uzyskiwanego ze zlaných w pulę próbek osocza od wielu dawców. Strategia taka jest w krwiodawstwie wykorzystywana do wykrywania kwasów nukleinowych wirusów u krwiodawców [12].

Celem podjętych badań jest, po pierwsze, analiza możliwości wykrywania *RHD* u dawców oznaczonych jako RhD ujemni z zastosowaniem manipulowania osocza, po drugie wykazanie, jakie odmiany słabego lub częściowego genu *RHD* występują w populacji dawców krwi określonych jako RhD ujemni, i po trzecie, wykazanie, czy wśród dawców RhD ujemnych występują tacy, u których podłożem tego fenotypu jest pseudogen *RHDΨ*.

Materiał i metody

Materiałem do badań były próbki osocza 2907 dawców oznaczonych jako RhD ujemni testami mikrokolumnowymi w żelu (DiaMed, Cressier sur Morat, Szwajcaria). Za pomocą automatycznej stacji pipetującej (Tecan Genesis RSP 150) przygotowano 61 pul osocza (każda składająca się z osocza 48 dawców) [12]. DNA izolowano manualnie przy użyciu zestawu QIAamp Blood Mini Kit Qiagen i badano w nim obecność genu *RHD* metodą *real-time PCR* ze starterami i sondami do eksonu 7, 10 i intronu 4 [9–11]. Jeśli wynik amplifikacji genu *RHD* w DNA izolowanym z puli osocza był dodatni, prowadzono strategię manipulowania aż do zidentyfikowania dawcy z genem *RHD*. Przed przystąpieniem do badań przeprowadzono standaryzację metody. Wykonano 6 powtórzeń, w których pulę osocza od 47 dawców RhD ujemnych/*RHD*(–) „zanieczyszczano” jedną próbką dawcy RhD dodatniego/*RHD*(+) i sprawdzano, jak maksymalnie duże może być rozcieńczenie, w którym gen *RHD* od dodatniego dawcy zostanie wykryty. DNA izolowane z krwi dawców RhD ujemnych z wykrytym genem *RHD* badano następnie metodą SSP-PCR ze starterami do alleli genu w kierunku D słaby i D częściowy (weakD-SSP i CDE-SSP, Inno Train, Kronberg/Taurus, Niemcy). Ponadto osoby z wykrytym genem *RHD* badano za pomocą starterów i sond swoistych dla eksonu 4 pseudogenu *RHDΨ* i eksonu 4 *RHD*. Po zidentyfikowaniu *RHD* dodatnich próbek wśród RhD ujemnych dodatkowo wykonano badania serologiczne:

1) Poszukiwano antygeny D za pomocą szerokiej gamy odczynników monoklonalnych anty-D

różnych klonów: anty-D RUM-1 (IgM), anty-D BS232 (IgM)/BS221/H41 11B7 (IgG), anty-D TH28/MS26, anty-D D175/D415, w testach bezpośredniej aglutynacji techniką próbówkową i mikrokolumnową.

- 2) Stosując odczynnik anty-D IgM+IgG, wykonywano oznaczenia w pośrednim teście antyglobulinowym (PTA).
- 3) Oznaczono pełen fenotyp w zakresie układu Rh.
- 4) Za pomocą zestawu przeciwciał monoklonalnych skierowanych do poszczególnych epitopów poszukiwano kategorii antygeny D.

U dawców RhD ujemnych/*RHD*(+), u których nie wykryto antygeny D odczynnikami diagnostycznymi, zastosowano metodę adsorpcji/elucji. Krwinki badane uczulano surowicą z niekompletnymi przeciwciałami anty-D (najczęściej pochodzącą od zimmunizowanych kobiet ciężarnych). Następnie wykonywano eluat metodą kwaśnej elucji i badano jego swoistość wobec krwinek Dccee, dCcee i dccEe. Dodatkowo reakcje z krwinkami Dccee, a ujemne z pozostałymi krwinkami wskazywały, że wykryto antygen D.

Wyniki

W badaniach standaryzacyjnych wykazano, że dodatkowo wyniki amplifikacji fragmentów eksonu 7, 10 oraz intronu 4 genu *RHD* uzyskuje się przy badaniu DNA wyizolowanego ze zmieszanego w pulę osocza 47 dawców *RHD*(–) i jednego *RHD*(+), czyli po 48-krotnym rozcieńczeniu próbki osocza od dawcy RhD dodatniego osoczem od dawców RhD/*RHD*(–). Opierając się na tych wynikach, w dalszych badaniach poszukiwano genu *RHD* w zlaných w pulę próbkach od 48 dawców RhD ujemnych.

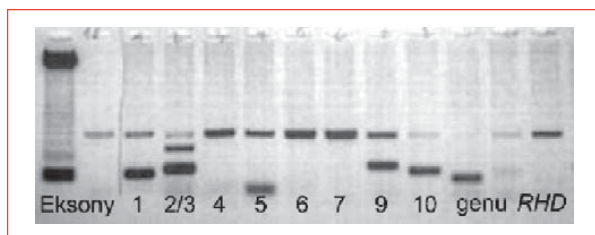
Fragmenty genu *RHD* wykryto u 13 spośród 2907 przebadanych dawców RhD ujemnych, co stanowi 0,45%. Wyniki badań molekularnych przedstawiono w tabeli 1.

W badaniu przeglądowym techniką *real-time PCR* u 7 dawców wykryto ekson 7, 10 i intron 4 genu *RHD* (grupa I), u 5 wykryto tylko ekson 10 (grupa II), u jednego dawcy wykryto intron 4 i ekson 7 (grupa III). Spośród dostępnych do dalszych badań dawców z grupy I u 2 wykryto D słaby typ 11, u jednego dawcy kategorię antygeny D określaną jako DFR. U 3 dawców z grupy II wykryto hybrydowe warianty genu *RHD-CE-D*: [*RHD-CE(2-7)-D*, *RHD-CE(4-7)-D*, *RHD-CE(2-9)-D*]. U dawcy z grupy III wykryto dodatkowo eksony 1, 4, 5, 6, 7 i 9. Przykładowe wyniki amplifikacji eksonów 1–10 genu *RHD* przedstawia rycina 1. W tabeli 2 zestawiono wyniki badań krwinek osób RhD ujemnych/*RHD*(+), wykonanych metodami

Tabela 1. Analiza molekularna DNA u dawców RhD ujemnych z wykrytymi fragmentami genu *RHD***Table 1.** Molecular DNA analysis in RhD negative donors with detected fragments of *RHD* gene

Grupa n	Lp.	Badanie przeglądowe <i>real-time</i> PCR			Badanie wariantów <i>RHD</i>
		Intron 4	Ekson 7	Ekson 10	D słaby/CDE SSP
Grupa I n = 7	1	+	+	+	• D słaby typ 11
	2	+	+	+	• D słaby typ 11
	3	+	+	+	• DFR
	4–7	+	+	+	Nie badano
Grupa II n = 5	8	–	–	+	• <i>RHD</i> -(2-7) <i>CE-D</i>
	9	–	–	+	• <i>RHD</i> -(4-7) <i>CE-D</i>
	10	–	–	+	• <i>RHD</i> -(2-9) <i>CE-D</i>
	11 i 12	–	–	+	Nie badano
Grupa III n = 1	13	+	+	–	Wykryto eksony 1, 4, 5, 6, 7, 9

serologicznymi. Do badań serologicznych dostępny był materiał tylko od 6 dawców. U wszystkich badanych oznaczono fenotyp w zakresie układu Rh i wszystkie próbki okazały się być Ccee. U żadnego

**Rycina 1.** Przykładowy wynik amplifikacji fragmentów *RHD* metodą SSP-PCR**Figure 1.** The example of *RHD* SSP-PCR results

badanego dawcy nie wykryto antygenu D w teście bezpośredniej aglutynacji przy użyciu szerokiego panelu odczynników monoklonalnych, nie wykryto również antygenu D w PTA. W jednym przypadku (nr 9 z grupy II) antygen D został wykryty metodą adsorpcji/elucji. Eluat, wykonany z krwinek uczulonych wcześniej przeciwciałami anti-D, był aktywny tylko z krwinkami Rh dodatnimi. Obserwowano również bardzo słabe reakcje z odczynnikami monoklonalnymi do wykrywania kategorii D.

Dyskusja

W opisywanych badaniach przeanalizowano wykrywanie fragmentów genu *RHD* w grupie blisko 3000 dawców określonych jako RhD ujemni standardowymi metodami serologicznymi zalecanymi do badań dawców krwi. Dawców bada się możliwe

Tabela 2. Wyniki badań metodami serologicznymi krwinek dawców RhD ujemnych/*RHD*(+)**Table 2.** Results of serological testing of red cells in donors RhD negative/*RHD*(+)

Próbka/Fenotyp	Badania serologiczne				
	Anty-D IgM (RUM-1)	Anty-D IgM + IgG (Blend)	Anty-D IgM + IgG (Blend) PTA/LISS	Adsorpcja/elucja	Epitopy antygenu D
1/ Ccee	–	–	–	–	Nie wykryto
2/ Ccee	–	–	–	Nie badano	Nie wykryto
8/ Ccee	–	–	–	–	Nie wykryto
9/ Ccee	–	–	–	Eluat aktywny	Wynik bardzo słabo dodatni
10/ Ccee	–	–	–	–	Nie wykryto
13/ Ccee	–	–	–	–	Nie wykryto

najczulszymi metodami, włączając również test antyglobulinowy, a każda, nawet słabo dodatnia reakcja, interpretowana jest jako świadcząca o wykryciu antygeny D. Podłożem słabych reakcji może być obecność wariantów RhD. Badania częstości ich występowania nie były do tej pory w Polsce przeprowadzone.

Dawcy analizowani w tej pracy byli badani w RCKiK w Warszawie bardzo czułą metodą mikrokolumnową. Wszyscy zostali zaklasyfikowani jako RhD ujemni. Mimo to w 0,45% przypadków wykryto fragmenty genu *RHD*. Przy użyciu poszerzonych badań serologicznych (zastosowanie odczynników monoklonalnych anti-D różnych klonów, zestaw do wykrywania poszczególnych epitopów antygeny D, metoda adsorpcji/elucji) tylko u jednego spośród 6 dostępnych dawców wykryto bardzo słabe reakcje (od 0,5 do 1+) i aktywny eluat.

W innych krajach częstość wykrywania wariantów w populacji osób oznaczonych serologicznie jako RhD ujemni oceniono na około 0,2–1%. Dane otrzymywane w różnych pracach są trudne do porównywania z wynikami autorów niniejszej pracy ze względu na różny dobór populacji badanych [13–19]. Na przykład w pracy Noizat-Pirenne i wsp. częstość wariantów D oceniono na 0,17%, ale autorzy badali gen *RHD* tylko u osób D ujemnych serologicznie, u których występował antygen C lub E [5]. W większości innych prac bada się częstość wariantów RhD w populacjach złożonych zarówno z biorców, jak i dawców krwi, co może wpływać na wyniki ze względu na inny sposób wykonywania badań serologicznych i inne zasady ich interpretacji u biorców i u dawców krwi [17]. U biorców krwi i u kobiet do okresu menopauzy oznaczenie antygeny D wykonuje się za pomocą odczynników monoklonalnych, z których przynajmniej jeden nie może wykrywać kategorii DVI, przestrzegając jednocześnie zasady, że badań tych nie przeprowadza się w PTA. W wypadku jakichkolwiek odstępstw od prawidłowego schematu wyników osoba badana jest zawsze traktowana jako biorca RhD ujemny. Zasada ta została sformułowana na podstawie założenia, że przetoczenie takim osobom krwi RhD dodatniej mogłoby spowodować immunizację prawidłowym antygenem D, a kobieta w ciąży może wytwarzać przeciwciała anti-D, jeśli płód jest RhD dodatni.

Wśród wykrytych w prezentowanych badaniach wariantów dwa należą do D słaby typ 11. W obu przypadkach techniką *real-time* PCR wykryto wszystkie 3 badane fragmenty genu *RHD*, co nie jest zaskoczeniem, ponieważ w tym typie występuje tylko jedna punktowa mutacja w eksonie 6 w pozycji 885 G→T [20]. Według badaczy niemieckich ten

typ słabego antygeny D stanowi tylko 0,22% wszystkich typów D słaby i jest jednym z najrzadziej występujących [20]. Częściej obserwowane typy słabego antygeny D (typ 1 — 71%, typ 2 — 18% i typ 3 — 5%) nie były wykryte w materiale autorów niniejszej pracy prawdopodobnie ze względu na to, że badaniami objęto jedynie grupę dawców RhD ujemnych, badanych bardzo czułą metodą serologiczną.

Wszystkie 3 badane fragmenty *RHD* były też wykryte u dawcy, u którego zdefiniowano kategorię DFR. W obrębie kategorii DFR zidentyfikowano do tej pory trzy typy: 1, 2 i 3 [21]. W dwóch z nich (typ 1 i 3) stwierdza się jedynie pojedyncze mutacje, a podłożem typu 2 jest gen hybrydowy, w którym ekson 4 genu *RHD* jest zastąpiony fragmentem genu *RHCE*.

U pozostałych 4 dawców wykryto tylko niektóre fragmenty genu *RHD*. U 3 w badaniach przeglądowych znaleziono ekson 10, a dalsze badania wykazały, że eksony 2–7, 4–7 i 2–9 genu *RHD* zostały zastąpione genem *RHCE*. Są to geny hybrydowe, z których, jak podaje literatura, najczęściej występującym jest hybryda *RHD-CE(2-9)-D* [15]. W jednym przypadku nie wykryto eksonów 2/3 i 10 genu *RHD*. Wnioskowanie o charakterze tego wariantu wymagałoby dalszych badań, które wykazałyby, czy eksony te są zastąpione genem *RHCE* czy uległy delecji. Możliwe jest też, że w niewykrytych eksonach są mutacje uniemożliwiające amplifikację tych regionów z użytymi starterami lub sondami.

W przeprowadzonych badaniach u żadnego dawcy RhD ujemnego nie wykryto pseudogenu *RHDψ*, będącego częstym podłożem fenotypu RhD ujemnego w innych populacjach niż rasa biała. Obserwacja ta jest ważna z punktu widzenia nieinwazyjnej diagnostyki RhD płodu w konflikcie Rh. Ryzyko fałszywie dodatniego wyniku tej diagnostyki jest więc w Polsce nieznaczne.

Efektom niniejszej pracy jest opracowanie metody wykrywania genu *RHD* u RhD ujemnych osób w celu identyfikacji antygeny D częściowy i D słaby. Do wykrywania genu *RHD* w osoczu RhD ujemnych dawców wykorzystano metodę *real-time* PCR w systemie TaqMan, stosowaną dotychczas do poszukiwania genu *RHD* płodu w osoczu RhD ujemnych kobiet ciężarnych. Wysoka czułość metody pozwoliła na poszukiwanie genu *RHD* w pulach osocza od 48 dawców RhD ujemnych. Zlewianie w pule znacznie obniża koszty badania, dzięki czemu w przyszłości będzie można zastosować taką metodę rutynowo do wykrywania genu *RHD* u osób RhD ujemnych. Przeprowadzenie podobnych badań u biorców i u kobiet ciężarnych określanych jako

RhD ujemni pozwoli na wyłonienie spośród nich osób z typami D słaby uznawanymi za niepodatne na immunizację. Biorcy będą wówczas zakwalifikowani jako RhD dodatni i będą mogli otrzymywać krew od dawców RhD dodatnich. Pozwoli to oszczędzić około 5% RhD ujemnej krwi [22]. Natomiast kobietom ciężarnym z niepodatnymi na alloimmunizację typami D słaby nie trzeba będzie podawać immunoglobuliny anti-D, co zmniejszy o około 5% zużycie tego deficytowego i drogiego preparatu.

Piśmiennictwo

1. Daniels G. Human blood group. Wyd. 2. Blackwell Science, Oxford, 2002.
2. Klein H.G., Anstee D.J. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. Wyd. 11. Blackwell Publishing Oxford, 2005.
3. Garratty G. Do we need to be more concerned about weak D antigens? *Transfusion* 2005; 45 (10): 1547–1551.
4. Denomme G.A., Dake L.R., Vilensky 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.
5. Noizat-Pirenne F., Verdier M., Lejealle A. i wsp. Weak D phenotypes and transfusion safety: where do we stand in daily practice? *Transfusion* 2007; 47: 1616–1620.
6. Ansart-Pirenne H., Asso-Bonnet M., Le Pennec P.Y., Roussel M., Patereau C., Noizat-Pirenne F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion* 2004; 44: 1282–1286.
7. Flegel W.A. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion* 2007; 47 (supl. 1): 47S–53S.
8. Żupańska B., Orzińska A., Nowaczek-Migas M. i wsp. Fetal D gene in maternal plasma should be examined in all immunized Rh(-) pregnant women to avoid invasive procedures. *Ginekol. Pol.* 2006; 77 (5): 359–364.
9. Guz K., Brojer E., Żupańska B., Orzińska A., Kalińska A., Bęc J.R. Non-invasive fetal RhD typing and RhD negative pregnant women-preliminary observations. *Ginekol. Pol.* 2004; 75 (1): 21–5.
10. Brojer E., Żupańska B., Guz K., Orzińska A., Kalińska A. Non-invasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma. *Transfusion* 2005; 45 (9): 1473–1480.
11. Orzińska A., Guz K., Brojer E., Żupańska B. Examination of the RHD gene by non-invasive method in plasma of alloimmunized mother allowed to abandon invasive procedures and to deliver a healthy child. *Ginekol. Pol.* 2004; 75 (12): 963–965.
12. Brojer E., Łętowska M., Gronowska A. HCV RNA testing for early diagnosis of hepatitis C in blood donors — new challenge for transfusion medicine and hepatology. *Pol. Merkur. Lekarski.* 2004; 17: 321–325.
13. Körmöczy G.F., Gassner C., Shao C.P., 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.
14. Körmöczy G.F., Förstemann E., Gabriel C., Mayr W.R., Schönitzer D., Gassner C. Novel weak D types 31 and 32: adsorption-elution-supported D antigen analysis and comparison to prevalent weak D types. *Transfusion* 2005; 45: 1574–1580.
15. Gassner C., Doescher A., Drnovsek T.D. i wsp. Presence of RHD in serologically D-, C/E+ individuals: a European multi-center study. *Transfusion* 2005; 45: 527–538.
16. Müller T.H., Wagner F.F., Trockenbacher A. i wsp. PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 2001; 41: 45–52.
17. Polin H., Danzer M., Hofer K., Gassner W., Gabriel C. Effective molecular RHD typing strategy for blood donations. *Transfusion* 2007; 47: 1350–1355.
18. Denomme G.A., Wagner F.F., Fernandes B.J., Li W., Flegel W.A. Partial D. Weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 2005; 45: 1554–1560.
19. Luettringhaus T.A., Cho D., Ryang D.W., Flegel W.A. An easy RHD genotyping strategy for D — East Asian persons applied to Korean blood donors. *Transfusion* 2006; 46 (12): 2128–2137.
20. Wagner F.F., Gassner C., Müller T.H., Schönitzer D., Schunter F., Flegel W.A. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999; 93: 385–393.
21. von Zabern I., Flegel W.A. IVS5-38del4 deletion in the RHD gene does not cause a DEL phenotype: relevance for RHD alleles including DFR-3. *Transfusion* 2007; 47: 1552–1555.
22. Flegel W.A. The genetics of the rhesus blood group system. *Dtsch. Arztebl.* 2007; 104: 651–657.