

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA MIKEREVIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA MIKEREVIČ

**DOLOČITEV PLODOVEGA GENOTIPA
KRVNOSKUPINSKEGA SISTEMA RhCE IZ PERIFERNE
KRVI NOSEČNIC**

**DETERMINATION OF FETAL *RHCE* GENOTYPE FROM
PERIPHERAL MATERNAL BLOOD**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Zavodu RS za transfuzijsko medicino pod mentorstvom prof. dr. Primoža Rožmana, dr. med., spec. transf. med. in somentorstvom dr. Tadeje Dovč Drnovšek, univ. dipl. biol.

Raziskavo je odobrila komisija RS za medicinsko etiko (sklep št. 123/07/02, nosilec prof. dr. Primož Rožman, dr.med., spec. transf. med., ZTM in sklep št. 35/02/07, nosilka prim. Irena Bricl, dr.med., spec. transf. med., ZTM).

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Primožu Rožmanu, dr. med., spec. transf. med., in somentorici dr. Tadeji Dovč Drnovšek, univ. dipl. biol. za vso pomoč in vodenje pri izdelavi magistrske naloge.

Posebna zahvala gre staršema, ki sta mi omogočila študij ter me pri tem spodbujala in podpirala. Hvala Maticu za potrpežljivost in spodbudo tekom študija in izdelave magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Primoža Rožmana, dr. med., spec. transf. med. in somentorice dr. Tadeje Dovč Drnovšek, univ. dipl. biol.

Tjaša Mikerevič

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO TABEL.....	V
KAZALO ENAČB.....	VI
POVZETEK.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
SEZNAM KRATIC.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka.....	1
1.1.1 Definicija hemolitične bolezni ploda in novorojenčka.....	1
1.1.2 Zgodovina hemolitične bolezni ploda in novorojenčka.....	1
1.1.3 Etiologija in patogeneza hemolitične bolezni ploda in novorojenčka.....	2
1.1.4 Preprečevanje hemolitične bolezni ploda in novorojenčka.....	3
1.1.5 Prenatalna diagnostika hemolitične bolezni ploda in novorojenčka.....	3
1.2 Krvnoskupinski sistem Rhesus – ISBT 004.....	4
1.2.1 Družina proteinov Rh.....	4
1.2.2 Gena <i>RHD</i> in <i>RHCE</i>	5
1.2.3 Polimorfizem krvnoskupinskega sistema RhCE.....	6
1.2.5 Razvoj, porazdelitev in funkcija antigenov krvnoskupinskega sistema RhCE.....	8
1.3 Zunajcelična plodova DNA.....	9
1.4 Določanje plodovega genotipa s kvantitativnim pomnoževanjem s polimerazo v realnem času.....	9
1.4.1 Določanje alelov z metodo alelne diskriminacije in z metodo ekspresije.....	11
1.5 Neinvazivno določanje plodovega genotipa <i>RHCE</i>	13
2 NAMEN DELA.....	14
3 MATERIALI IN METODE.....	15
3.1 Vzorci.....	15
3.1.1 Vzorci za razvoj in optimizacijo reakcij qPCR ter izdelavo strategije za zanesljivo določitev plodove KS RhCE.....	15
3.1.2 Vzorci za ugotavljanje plodovega genotipa <i>RHCE</i> pri imuniziranih nosečnicah v KS RhCE.....	16
3.2 Metode.....	16

3.2.1	Osamitev genomske DNA iz vzorcev periferne venske krvi RhD-negativnih nosečnic in popkovnične krvi novorojenčkov	16
3.2.2	Merjenje koncentracije in čistote izolirane genomske DNA.....	18
3.2.3	Osamitev zunajcelične DNA iz vzorcev periferne venske krvi RhD-negativnih in imuniziranih nosečnic	18
3.2.4	Reakcije PCR v realnem času.....	19
3.2.5	Reakcije PCR v realnem času za določitev genotipa <i>RHCE</i> iz genomske DNA	20
3.2.5.1	<i>Določitev alelov RHCE*C in RHCE*c iz genomske DNA z metodo ekspresije – izbor začetnih oligonukleotidov in sond, optimizacija reakcijske mešanice ter optimizacija reakcij qPCR</i>	20
3.2.5.2	<i>Določitev alelov RHCE*E in RHCE*e iz genomske DNA z metodo alelne diskriminacije – izbor začetnih oligonukleotidov in sond, optimizacija reakcijske mešanice ter optimizacija reakcij qPCR</i>	22
3.2.6	Reakcije PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz periferne krvi nosečnice	24
3.2.6.1	<i>Določitev plodovih alelov RHCE*C, RHCE*c in RHCE*E iz zunajcelične DNA z metodo ekspresije – izbor začetnih oligonukleotidov in sond, optimizacija reakcijske mešanice ter optimizacija reakcij qPCR.....</i>	24
3.2.7	Reakcije PCR v realnem času za gen <i>SRY</i>	26
3.2.8	Reakcije PCR v realnem času za gen <i>ALB</i>	27
3.3	Analiza rezultatov reakcij qPCR.....	28
4	REZULTATI.....	29
4.1	Kvantifikacija izolirane genomske DNA.....	29
4.1.1	Merjenje koncentracije in čistote izolirane genomske DNA.....	29
4.2	Reakcije PCR v realnem času za določitev genotipa <i>RHCE</i> iz genomske DNA..	29
4.2.1	Specifičnost reakcij PCR v realnem času za določitev alelov <i>RHCE*C</i> in <i>RHCE*c</i> iz genomske DNA z metodo ekspresije	29
4.2.2	Specifičnost reakcij PCR v realnem času za določitev alelov <i>RHCE*E</i> in <i>RHCE*e</i> iz genomske DNA z metodo alelne diskriminacije.....	31
4.2.3	Občutljivost reakcij PCR v realnem času za določitev genotipa <i>RHCE</i> iz genomske DNA.....	32
4.2.4	Določitev genotipa <i>RHCE</i> nosečnic in novorojencev iz genomske DNA	35
4.3	Reakcije PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz zunajcelične DNA z metodo ekspresije	37

4.3.1	Specifičnost reakcij PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz zunajcelične DNA	37
4.3.2	Občutljivost reakcij PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz zunajcelične DNA	40
4.3.3	Določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz zunajcelične DNA	43
4.3.3.1	Določitev plodovega alela <i>RHCE*<i>C</i></i> iz zunajcelične DNA	44
4.3.3.2	Določitev plodovega alela <i>RHCE*<i>E</i></i> iz zunajcelične DNA	45
4.3.3.3	Določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> pri imuniziranih nosečnicah	48
5	RAZPRAVA	50
5.1	Krvnoskupinski sistem RhCE	50
5.2	Reakcije PCR v realnem času za določitev genotipa <i>RHCE</i> iz genomske DNA..	51
5.3	Določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz zunajcelične DNA	52
5.4	Reakcije PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> iz zunajcelične DNA	52
5.4.1	Določitev plodovega alela <i>RHCE*<i>C</i></i> iz zunajcelične DNA.....	54
5.4.2	Določitev plodovega alela <i>RHCE*<i>E</i></i> iz zunajcelične DNA.....	55
5.4.3	Določitev plodovega genotipa <i>RHCE</i> pri imuniziranih nosečnicah	56
6	SKLEP.....	58
7	LITERATURA.....	59

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Shematska predstavitev proteinov Rh (prirejeno po 21).</i>	4
<i>Slika 2: Organizacija genskega lokusa RH (prirejeno po 4).</i>	5
<i>Slika 3: Shematski prikaz polimorfizma RhC/c in RhE/e (prirejeno po 21).</i>	7
<i>Slika 4: Shematski prikaz poteka reakcije qPCR (prirejeno po 59).</i>	11
<i>Slika 5: Princip določanje alelov z metodo alelne diskriminacije (zgoraj) in z metodo ekspresije (spodaj) s hidrolizirajočimi sondami (prirejeno po 60).</i>	12
<i>Slika 6: Nosilec za kartuše in nosilec za plastični material ter vzorce.</i>	17
<i>Slika 7: Program qPCR za določanje alelov z metodo ekspresije.</i>	21
<i>Slika 8: Program qPCR za določanje alelov z metodo alelne diskriminacije.</i>	23
<i>Slika 9: Graf pomnoževanja za alela RHCE*C (zgoraj) in RHCE*c (spodaj) iz gDNA (sonda MGB).</i>	30
<i>Slika 10: Graf alelne diskriminacije za genotip RHCE*Ee iz gDNA (sonda MGB).</i>	31
<i>Slika 11: Standardne krivulje in grafi pomnoževanja za alele RHCE*C, RHCE*c, RHCE*E in RHCE*e (sonda MGB).</i>	34
<i>Slika 12: Graf pomnoževanja alelov RHCE*C (zgoraj) in RHCE*c (spodaj) iz gDNA nosečnic in novorojencev (sonda MGB).</i>	36
<i>Slika 13: Graf alelne diskriminacije za alel RHCE*E in alel RHCE*e iz gDNA nosečnic in novorojencev (sonda MGB).</i>	37
<i>Slika 14: Graf pomnoževanja za alel RHCE*C (zgoraj) in alel RHCE*c (spodaj) iz gDNA (sonda TAMRA).</i>	39
<i>Slika 15: Graf pomnoževanja za alel RHCE*E iz gDNA (sonda TAMRA).</i>	40
<i>Slika 16: Standardne krivulje za alele RHCE*C, RHCE*c in RHCE*E (sonda TAMRA) ter gena SRY in ALB.</i>	42
<i>Slika 17: Grafi pomnoževanja za alela RHCE*C in gena SRY v vzorcih zc-DNA.</i>	44
<i>Slika 18: Grafi pomnoževanja alela RHCE*C ter genov SRY in ALB v vzorcih zc-DNA.</i>	46

KAZALO TABEL

<i>Tabela I: KS sistem Rh, klasifikacija po ISBT (1).</i>	4
<i>Tabela II: Nukleotidno zaporedje eksonov 1–5 za gen RHD in alele gena RHCE ter AK razlike med proteinoma RhD in RhCE (prirejeno po 34).</i>	7
<i>Tabela III: Frekvenca alelov krvnoskupinskega sistema RhCE pri belcih (4).</i>	8
<i>Tabela IV: Začetne študije za določitev plodovega genotipa RHCE (prirejeno po 64).</i>	13
<i>Tabela V: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov za določitev alelov RHCE*C in RHCE*c iz gDNA.</i>	22
<i>Tabela VI: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov za določitev alelov RHCE*E on RHCE*e iz gDNA.</i>	23
<i>Tabela VII: Kombinacije konc. začetnih oligonukleotidov in sond za optimizacijo reakcij qPCR za alele RHCE*C, RHCE*c in RHCE*E za določitev plodovega genotipa.</i>	25
<i>Tabela VIII: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov za določitev plodovega genotipa RHCE iz zc-DNA.</i>	26
<i>Tabela IX: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije in dolžine produktov v reakciji qPCR za gen SRY (16).</i>	27
<i>Tabela X: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije in dolžine produktov v reakciji qPCR za gen ALB.</i>	28
<i>Tabela XI: Koncentracija in čistost izolirane gDNA.</i>	29
<i>Tabela XII: Primerjave fenotipov, genotipov in specifičnost reakcij za alela RHCE*C in RHCE*c iz gDNA (sonda MGB).</i>	30
<i>Tabela XIII: Primerjava fenotipov, genotipov in specifičnost reakcij za genotip RHCE*Ee iz gDNA.</i>	32
<i>Tabela XIV: Količine gDNA v reakcijah qPCR za pripravo standardnih krivulj.</i>	33
<i>Tabela XV: Učinkovitost pomnoževanje (E) alelov RHCE*C, RHCE*c RHCE*E in RHCE*e, koeficient determinacije (R^2) in naklon krivulje (k).</i>	35
<i>Tabela XVI: Rezultati genotipizacije RHCE – nosečnica negativna, novorojenec pozitiven za testirani alel.</i>	37
<i>Tabela XVII: Primerjave fenotipov, genotipov in specifičnost reakcij RHCE*C in RHCE*c.</i>	39
<i>Tabela XVIII: Količine gDNA v reakcijah qPCR za pripravo standardnih krivulj za alele RHCE*C, RHCE*c, RHCE*E ter genov SRY in ALB.</i>	41
<i>Tabela XIX: Učinkovitost pomnoževanja (E) alelov RHCE*C, RHCE*c RHCE*E (sonda TAMRA) in genov SRY ter ALB, koeficient determinacije (R^2) in naklon krivulje (k).</i>	43

<i>Tabela XX: Predvidena plodova KS RhC in spol ter zanesljivost genotipizacije ploda za alel RHCE*C in gen SRY z reakcijami qPCR iz plazme nosečnic.</i>	45
<i>Tabela XXI: Predvidena plodova KS RhE in spol ter zanesljivost genotipizacije ploda za alel RHCE*E in gen SRY z reakcijami qPCR iz plazme nosečnic.</i>	47
<i>Tabela XXII: Mediane vrednosti ter razpon vrednosti Cq za alela RHCE*C, RHCE*E in gena SRY ter ALB za določitev plodovega genotipa iz zc-DNA.</i>	47
<i>Tabela XXIII: Predvidena plodova KS RhCE in spol ter zanesljivost genotipizacije za alel RHCE*C in gen SRY z reakcijami qPCR iz vzorcev plazme imuniziranih nosečnic.....</i>	48
<i>Tabela XXIV: Predvidena plodova KS RhCE in spol ter zanesljivost genotipizacije za alel RHCE*E in gen SRY z reakcijami qPCR iz vzorcev plazme imuniziranih nosečnic.....</i>	49

KAZALO ENAČB

<i>Enačba 1: Enačba za izračun učinkovitosti pomnoževanja.</i>	28
---	----

POVZETEK

Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka nastane zaradi protiteles, ki jih mati tvori proti antigenom, ki jih sama nima, plod pa jih podeduje po očetu. V krvnoskupinskem sistemu Rh poleg protiteles anti-RhD hemolitično bolezen ploda in novorojenčka povzročajo še protitelesa anti-RhC, anti-Rhc in anti-RhE. Pri imuniziranih nosečnicah je za pravilno vodenje nosečnosti izredno pomembna določitev plodovega genotipa. Neinvazivna določitev plodovega genotipa je postala mogoča z odkritjem obstoja zunajcelične plodove DNA v periferni krvi nosečnice. V naši študiji smo želeli optimizirati reakcije PCR v realnem času in pripraviti protokol za določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnice. Za določitev genotipa *RHCE* nosečnic in njihovih novorojencev iz genomske DNA smo izbrali ustrezne regije v eksonu 1 (*RHCE**C**), eksonu 2 (*RHCE**c**) in eksonu 5 (*RHCE**Ee**) gena *RHCE*. Po izboru začetnih oligonukleotidov in sond ter optimizaciji reakcij PCR v realnem času, smo lahko zanesljivo določili njihov genotip in napovedali pravilen fenotip. Iz plazme nosečnic, ki so bile negativne za testirani alel, novorojenec pa pozitiven, smo določili plodov genotip. Za optimizacijo reakcij PCR v realnem času za neinvazivno določitev plodovega genotipa *RHCE* iz periferne krvi nosečnic smo uporabili podatke iz literature in izbrali regijo introna 2 (*RHCE**C**), eksona 2 (*RHCE**c**) in eksona 5 (*RHCE**E**) gena *RHCE*. Metodo smo nato preizkusili na zunajcelični DNA, ki smo jo izolirali iz plazme nosečnic. Za dodatno potrditev prisotnosti zunajcelične plodove DNA smo vključili gen *SRY*, ki določa spol. Občutljivost vseh reakcij je bila dovolj visoka, da smo lahko določili plodov genotip tudi v prvem trimesečju nosečnosti. Po končni validaciji postopka smo prisotnost plodovega alela *RHCE**C** pravilno določili pri 91,3 % nosečnicah ter pri obeh imuniziranih nosečnicah s poznanim fenotipom RhCc in spolom otroka. Prisotnost plodovega alela *RHCE**E** smo pravilno določili pri 87,5 % nosečnicah ter pri vseh šestih imuniziranih nosečnicah s poznanim fenotipom RhEe in spolom otroka. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega gena *SRY* je bila 100 % pri vseh vzorcih. Zaključimo lahko, da bi bila naša metoda za določitev plodovega alela *RHCE**C** in alela *RHCE**E** ob testiranju dodatnih svežih vzorcev lahko uporabna v rutinski diagnostiki.

Ključne besede: RhCE, hemolitična bolezen ploda in novorojenčka, zunajcelična plodova DNA, neinvazivna prenatalna diagnostika, genotipizacija

ABSTRACT

Hemolytic disease of the fetus and newborn is caused by maternal antibodies against the fetal antigens, which was inherited from his father. In Rh blood group system besides anti-RhD antibodies, frequent antibodies responsible for hemolytic disease of the fetus and newborn are also anti-RhC, anti-Rhc and anti-RhE. In order for the appropriate management of pregnancy in immunized pregnant women it is very important to determine the fetal genotype. The discovery of cell-free fetal DNA in the peripheral blood of pregnant women opened the possibilities for non-invasive determination of fetal genotype. In our study, we wanted to develop real-time PCR reactions and prepare the protocol for determination of fetal *RHCE* genotype from the maternal blood. The corresponding regions in exon 1 (*RHCE**C**), exon 2 (*RHCE**c**) and exon 5 (*RHCE**Ee**) of *RHCE* gene were selected in order to determine their genotype. After the selection of primers, probes and optimization of real-time PCR reactions their genotypes were determined reliably and phenotypes were predicted correctly. Fetal genotype was determined from the maternal plasma of pregnant women, who were negative for the tested allele, but the newborn was positive. In order to optimize real-time PCR reactions for non-invasive determination of fetal *RHCE* genotype the data from the literature were used. The corresponding regions in intron 2 (*RHCE**C**), exon 2 (*RHCE**c**) and exon 5 (*RHCE**E**) of *RHCE* gene were selected. The method was verified on the cell-free DNA from the plasma of pregnant women. The presence of fetal DNA was additionally confirmed using the gender determining gene *SRY*. The sensitivity of all reactions was high enough that low amount of fetal DNA in the first trimester of pregnancy could be detected. After the final validation of the procedure the presence of fetal *RHCE**C** was correctly determined in 91,3 % pregnant women and for both immunized pregnant women with known child's RhCc phenotype and gender. The presence of fetal *RHCE**E** was correctly determined in 87,5 % pregnant women and in all 6 immunized pregnant women with known child's RhEe phenotype and gender. The reliability of determining the presence of fetal *SRY* gene was 100 %. We can conclude that our methods for the determination of fetal *RHCE**C** and *RHCE**E** could be reliable enough for routine diagnostics when some additional fresh samples will be tested.

Keywords: RhCE, hemolytic disease of the fetus and newborn, cell-free fetal DNA, non-invasive prenatal diagnostics, genotyping

SEZNAM KRATIC

A	adenin
Ag	antigen
AK	aminokislina
bp	bazni par
C	citozin
Cq	cikel pri katerem zaznamo porast fluorescence v eksponentni fazi reakcije PCR v realnem času (ang. quantification cycle)
Da	Dalton
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
DNaza	deoksiribonukleaza
E	učinkovitost pomnoževanja (ang. efficiency)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
G	gvanin
gDNA	genomska DNA
HBPN	hemolitična bolezen ploda in novorojenčka
ICT	indirektni Coombsov test
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin G
k	naklon linearne regresijske krivulje (ang. slope)
kbp	kilobazni par
kDa	kilodalton
KS	krvna skupina
MGB	(ang. minor groove binder)
Mr	relativna molekulska masa
NFQ	(ang. non-fluorescence quencher)
NIPD	neinvazivna prenatalna diagnostika
NK	nukleinska kislina
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
Rh	Rhesus
R²	koeficient determinacije

SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (ang. single nucleotide polymorphism)
SRY	regija na kromosomu Y, ki določa spol (ang. sex-determining region Y)
T	timin
Th	intenziteta fluorescence, ki je značilno višja od bazne linije (ang. Threshold)
zc-DNA	zunajcelična DNA
zcp-DNA	zunajcelična plodova DNA
ZTM	Zavod RS za transfuzijsko medicino
qPCR	kvantitativni PCR, PCR v realnem času (ang. quantitative PCR)

1 UVOD

Mednarodno združenje za transfuzijo krvi (ISBT, ang. International Society of Blood Transfusion) krvnoskupinski (KS) sistem definira kot sistem, v katerem je en ali več KS antigenov (Ag) pod nadzorom posameznega genskega lokusa oziroma dveh ali več tesno povezanih homolognih genov, med katerimi lahko pride do rekombinacij. ISBT KS Ag razvršča v 36 KS sistemov (1). Nekateri KS sistemi imajo le en Ag, drugi (npr. KS Rhesus (Rh)) jih imajo več.

KS Ag so proteini, glikoproteini in glikolipidi, ki se nahajajo na membrani eritrocitov. Eritrociti imajo na svoji površini več kot 400 različnih KS Ag (2). KS Ag so bialelni in se dedujejo kodominantno, kar pomeni, da se oba alela izražata hkrati. V procesu imunskega odziva po transfuziji krvi in v nosečnosti KS Ag lahko povzročijo nastanek specifičnih aloprotiteles (3, 4). Aloprotitelesa lahko povzročajo klinične težave pri transfuziji neskladnih eritrocitov ter hemolitični boleznii ploda in novorojenčka (HBPN, ang. hemolytic disease of the fetus and newborn) (2).

1.1 Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka

1.1.1 Definicija hemolitične boleznii ploda in novorojenčka

HBPN je bolezen, do katere pride pri plodu ali novorojenčku zaradi prisotnosti materinih aloprotiteles proti eritrocitnim Ag, ki jih mati nima, plod pa jih podeduje po očetu. Če je oče heterozigot za določen KS Ag, obstaja 50 % verjetnost, da plod nosi ta Ag. Poleg protiteles anti-RhD so v sistemu Rh povzročitelji HBPN najpogosteje še protitelesa anti-RhC (6 %), anti-Rhc (16 %), anti-RhE (48 %) in anti-Rhe (3 %) (5, 6).

1.1.2 Zgodovina hemolitične boleznii ploda in novorojenčka

Prvi primer HBPN je ob rojstvu dvojčkov leta 1609 opisala francoska babica. Prvi otrok je bil mrtvorojen, drugi je takoj po rojstvu umrl zaradi zlatenice (7). Leta 1932 je Diamond opisal povezavo med hidropsom ploda (čezmerno nabiranje serozne tekočine v intersticiju

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

ali v telesnih votlinah), zlatenico, anemijo in eritroblasti v krvnem obtoku (8). Leta 1939 sta Levine in Stetson pri ženski, ki je rodila mrtvorojenega otroka, odkrila protitelesa. Sklepala sta, da se je ženska med nosečnostjo senzibilizirala s plodovimi eritrocitnimi Ag, ki jih je plod podedoval po očetu (9). Leta 1940 sta Landsteiner in Wiener odkrila KS sistem Rh. Eritrocite opic *Rhesus* sta injicirala v morske prašičke, ki so pričeli tvoriti protitelesa proti opičjim eritrocitom. Protitelesa morskih prašičkov sta izolirala in jih pomešala z vzorci krvi belcev (10). Aglutinacija je bila prisotna pri 85 % vzorcev, torej RhD-pozitivnih ljudi. Leta 1941 je Levine s sod. opisal povezavo med protitelesi anti-RhD pri že omenjeni ženski in HBPN. Ženska je bila RhD-negativna, zato je njen serum aglutiniral moževe RhD-pozitivne eritrocite in eritrocite drugih RhD-pozitivnih oseb, ne pa eritrocitov RhD-negativnih ljudi (11).

1.1.3 Etiologija in patogeneza hemolitične boleznii ploda in novorojenčka

Do fetomaternalne krvavitve (prisotnost plodovih eritrocitov v materinem krvnem obtoku) lahko pride pri abdominalnih poškodbah nosečnice, pri patoloških spremembah posteljice, povsem spontano ali kot posledica invazivnih diagnostičnih postopkov v nosečnosti (12). Če mati nima Ag, ki ga je plod podedoval po očetu, lahko tvori aloprotitelesa proti le-temu (5). Materina aloprotitelesa razreda IgG prehajajo preko posteljice v plodov krvni obtok in povzročijo hemolizo plodovih eritrocitov. Stopnja hemolize je odvisna od podrazreda protiteles IgG, količine protiteles in števila Ag mest na eritrocitu (2). Plod in novorojenček sta pri prvi nosečnosti redko prizadeta, saj do fetomaternalne krvavitve in s tem do primarne imunizacije prihaja predvsem pozno v nosečnosti in med porodom. Materine spominske celice B se v drugi nosečnosti, v sekundarnem protitelesnem imunskem odzivu, zelo hitro diferencirajo v plazmatke, ki proizvajajo protitelesa IgG (2). Transport protiteles IgG preko posteljice se začne v drugem trimesečju nosečnosti.

HBPN glede na stopnjo prizadetosti ploda oziroma novorojenčka razdelimo na blago, zmerno in hudo obliko. Pri blagi obliki je prisotna minimalna anemija, zdravljenje pa ni potrebno. Pri zmerni obliki je prisotna zmerna anemija, kjer se po rojstvu lahko razvije trajna možganska okvara zaradi odlaganja bilirubina v možganskih jedrih. Pri hudi obliki se že v maternici razvije hidrops ploda, katerega posledice so edemi, odpoved srca in smrt (2). V KS sistemu Rh hudo obliko HBPN povzročajo protitelesa anti-RhD ter anti-Rhc, in

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic sicer pogosteje kot protitelesa anti-RhC in anti-RhE. Pri 14 % nosečnic je prisotnih več vrst protiteles; najpogostejša je kombinacija anti-Rhc in anti-RhE (24,5 %) (13).

1.1.4 Preprečevanje hemolitične bolezni ploda in novorojenčka

V 60. letih prejšnjega stoletja je Stern s sodelavci eksperimentalno dokazal, da lahko s preventivno aplikacijo imunoglobulinov IgG anti-RhD RhD-negativnim nosečnicam preprečimo senzibilizacijo na Ag RhD in s tem nastanek HBPN (14). Uspešna preventiva z IgG anti-RhD je pozornost usmerila tudi na druge KS Ag. Pri drugih Ag preventiva z IgG ni mogoča (ni preparatov), vendar lahko pri sensibiliziranih nosečnicah iz periferne krvi določimo plodov genotip in tako pravilno vodimo nosečnost (npr. intrauterine transfuzije, zgodnejši porod).

1.1.5 Prenatalna diagnostika hemolitične bolezni ploda in novorojenčka

Skladno s Pravilnikom o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji vsem nosečnicam z osnovnimi imunohematološkimi preiskavami do 12. tedna nosečnosti določimo KS ABO, RhD in Kell. Hkrati z indirektnim Coombsovim testom (ICT) določimo prisotnost morebitnih eritrocitnih protiteles v serumu nosečnice. Pri RhD-negativnih nosečnicah preiskavo ICT ponovimo v 28. tednu nosečnosti. Novorojencem RhD-negativnih porodnic po rojstvu iz popkovnične krvi rutinsko določimo KS ABO, RhD in Kell (2, 15).

Če pri nosečnici dokažemo prisotnost eritrocitnih protiteles (pozitiven ICT), opravimo dodatne preiskave. Nosečnicam določimo specifičnost in titer protiteles ter ovrednotimo njihov klinični pomen. S testom ADCC (ang. antibody dependent cell cytotoxicity) določimo agresivnost protiteles, saj visok titer protiteles še ne pomeni nujno prizadetosti ploda. Za oceno ogroženosti ploda določimo tudi eritrocitne Ag partnerja. Določiti moramo prisotnost tistega Ag, proti kateremu nosečnica tvori protitelesa. Za natančno določitev ogroženosti ploda lahko določimo plodov genotip z invazivnimi postopki (analiza amnijske tekočine ali horionskih resic) ali z novejšimi neinvazivnimi postopki (genotipizacija zunajcelične plodove DNA (zcp-DNA) iz materine krvi) (2, 15, 16).

1.2 Krvnoskupinski sistem Rhesus – ISBT 004

KS sistem Rh ima ISBT številko 004 (*Tabela I*). Poleg KS sistema ABO je KS sistem Rh v transfuzijski medicini klinično najpomembnejši, saj je najbolj polimorfen in imunogen (17). Sestavlja ga 54 Ag (1, 4). Klinično najpomembnejši Ag v tem sistemu so RhD, RhC, Rhc, RhE in Rhe.

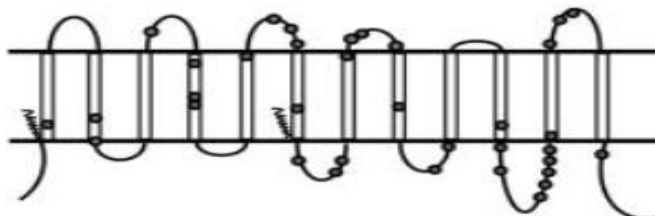
Tabela I: KS sistem Rh, klasifikacija po ISBT (1).

ISBT št.	Krvnoskupinski sistem	ISBT simbol	ISBT ime gena	Kromosomska lokacija
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11

1.2.1 Družina proteinov Rh

Družino proteinov Rh tvori pet membranskih proteinov, ki 12-krat prečkajo celično membrano in tvorijo 6 zunajceličnih zank (18). Njihovi amino- in karboksilni terminalni deli (N- in C-terminalni deli) so usmerjeni v citoplazmo celice (19, 20). Glede na mesto izražanja proteine Rh delimo na eritroidno in neeritroidno specifične. Družino eritroidno specifičnih proteinov sestavljata proteina RhD in RhCE ter glikoprotein RhAG (ang. Rh-associated glycoprotein) (4).

Ag KS sistema Rh se nahajajo na dveh zelo podobnih transmembranskih proteinih RhD (CD240D) in RhCE (CD240CE). Proteina imata približno molekulska maso (*Mr*) 30 kilodaltonov. Zaradi njune *Mr* ju imenujemo tudi podenota Rh30. Sestavljena sta iz 417 aminokislin (AK) in se med seboj razlikujeta v 31–35 AK (4, 17) (*Slika 1*). Proteina kodirata tesno povezana gena *RHD* in *RHCE* (17).



Slika 1: Shematska predstavitev proteinov Rh (prirejeno po 21).

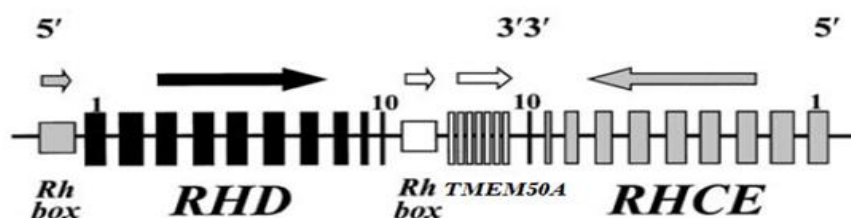
Na sliki je prikazan protein Rh z *Mr* 30 kDa. S temnimi krogi so označene AK, ki se razlikujejo med proteinoma RhD in RhCE.

Proteina RhD in RhCE se izrazita le, če je na membrani eritrocita prisoten tudi glikoprotein RhAG (17), ki je del družine proteinov Rh in je odgovoren za stabilnost kompleksa Rh. RhAG spada v samostojen KS sistem z ISBT številko 030. Sestavljen je iz 409 AK in ima *Mr* 50 kDa, zaradi česar ga poimenujemo tudi podenota Rh50. Kodira ga gen *RHAG*, ki leži na kromosomu št. 6 (3, 4). Protein RhAG je v 38 % identičen s proteinoma RhD in RhCE (17).

Leta 1961 je Vos s sodelavci opisal fenotip Rh_{null} . Osebe s tem redkim fenotipom na eritrocitih nimajo izraženih Ag Rh bodisi zaradi mutacij v genih *RHD*, *RHCE* in *RHAG* (22).

1.2.2 Gena *RHD* in *RHCE*

Gen *RHCE* so odkrili leta 1990 (19, 20), kmalu zatem pa tudi gen *RHD* (23–25). Gena *RHD* in *RHCE* ležita drug poleg drugega na krajšem kraku kromosoma št. 1. Vsak gen sestavlja 10 eksonov in intronov. Gen *RHD* sestavlja 52.295 kilobaznih parov (kbp), *RHCE* pa 57.831 kbp (26). Eksoni 1–7 kodirajo zapis za 50–60 AK, eksoni 8–10 pa kodirajo zadnjih 58 AK (27, 28). Gena *RHD* in *RHCE* sta nasprotno orientirana. S svojima 3'-terminalnima koncema sta obrnjena drug proti drugemu (4). Med genoma *RHD* in *RHCE* leži 30 kbp dolg gen *TMEM50A* (ang. *Transmembrane protein 50A*) (3, 18). Pred in za genom *RHD* sta dve 9 kbp dolgi regiji, imenovani *Rhesus box* (18). Gena *RHD* in *RHCE* sta identična v 93,8 % (4, 29). Gen *RHD* kodira protein RhD, torej Ag RhD. Gen *RHCE* kodira protein RhCE, torej Ag RhC, Rhc, RhE in Rhe. Strukturne in nukleotidne razlike med genoma *RHD* in *RHCE* upoštevamo pri načrtovanju reakcij PCR. Organizacijo genskega lokusa *RH* prikazuje *Slika 2*.



Slika 2: Organizacija genskega lokusa *RH* (prirejeno po 4).

Na sliki je prikazana organizacija genskega lokusa *RH*. *RH* gen sestavljajo: v smeri 5'–3' orientiran gen *RHD*, omejen z dvema regijama (*Rhesus box*), v smeri 5'–3' orientiran gen *TMEM50A* ter v smeri 3'–5' orientiran *RHCE*.

1.2.3 Polimorfizem krvnoskupinskega sistema RhCE

Za raznolikost genov KS je odgovornih več molekularnih mehanizmov: insercije in delecije, polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP, ang. single nucleotide polymorphism) in genske konverzije (izmenjava genetskega materiala med zelo podobnima genoma) (18, 30, 31). Antitetična (nasprotna) alela *RHCE**C** in *RHCE**c** ter alela *RHCE**E** in *RHCE**e** sta nastala zaradi SNP.

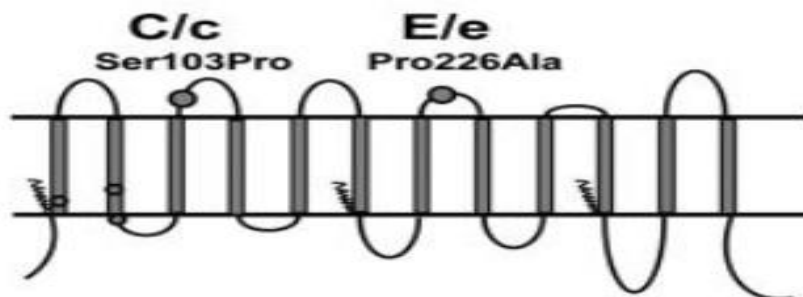
Molekularni mehanizem za polimorfizem RhC/c je kompleksen. Polimorfizem RhC/c je posledica zamenjave šestih nukleotidov v genu *RHCE*, vendar le štiri zamenjave vodijo v spremembo AK (RhC/c): v eksonu 1 zamenjava 48C>G vodi v spremembo Cys16Trp, v eksonu 2 pa 178A>C v Ile60Leu, 203G>A v Ser68Asn in 307T>C v Ser103Pro (31, 32). Zamenjavi nukleotidov 150T>A in 201G>A v eksonu 2 ne vodita v spremembo AK. Le sprememba nukleotida 307T>C vodi v spremembo AK (Ser103Pro), ki se nahaja na drugi zunajcelični zanki proteina RhCE, je torej razlog za imunizacijo in vezavo protiteles (*Slika 3*). Čeprav je Ser na mestu 103 nujen, pa vendarle ne zadostuje za specifičnost Ag RhC, saj sta eksona 2 gena *RHD* in alela *RHCE**C** identična ter oba kodirata AK Ser na mestu 103. Za popolno izražanje mora imeti Ag RhC Ser na mestu 103, Cys na mestu 16 in še nekaj AK, značilnih le za RhC. Alel *RHCE**C** za razliko od alela *RHCE**c** in gena *RHD* v intronu 2 vsebuje še 109 bp dolgo nukleotidno zaporedje, ki se uporablja za detekcijo prisotnosti alela *RHCE**C** (33). Protein Rhc ima na mestu 103 Pro. Za določitev prisotnosti alela *RHCE**c** po navadi detektiramo prisotnost C na mestu 307 (4, 33).

Ag RhE in Rhe se razlikujeta le v eni AK na četrti zunajcelični zanki proteina RhCE. Polimorfizem RhE/e je posledica substitucije 676C>G v eksonu 5 gena *RHCE* (*Slika 3*). Pri tem se Ala (Rhe) na mestu 226 zamenja s Pro (RhE) (31). *Tabela II* prikazuje nukleotidne in AK razlike med genoma ter proteinoma KS sistema RhD in RhCE.

Tabela II: Nukleotidno zaporedje eksonov 1–5 za gen RHD in alele gena RHCE ter AK razlike med proteinoma RhD in RhCE (prirejeno po 34).

Ekson	1	2					3				4						5								
Nukleotidno zaporedje	1–148	149–335					336–486				478–635						636–801								
Mesto zamenjave nukleotida	48	150	178	201	203	307	361	380	383	455	505	509	514	544	577	594	602	667	676	697	712	733	744	787	800
RHD	G	T	A	G	G	T	T	T	A	A	A	T	A	T	G	A	C	T	G	G	G	G	C	G	A
RHCE*C	C	T	A	G	G	T	A	C	G	C	C	G	T	A	A	T	G	G	C	A	C	T	A	T	
RHCE*c	G	C	C	A	A	C	A	C	G	C	C	G	T	A	A	T	G	G	C	A	C	T	A	T	
RHCE*E		C	A				A	C	G	C	C	G	T	A	A	T	G	G	C	A	C	T	A	T	
RHCE*e		C	A				A	C	G	C	C	G	T	A	A	T	G	G	G	C	A	C	T	A	T
RhCE	Cys	-	Leu	-	Asn	Pro	Met	Ala	Gly	Thr	Leu	Arg	Phe	Thr	Lys	Asn	Arg	Val	Pro	Gln	Met	Leu	-	Arg	Met
RhD	Trp	-	Ile	-	Ser	Ser	Leu	Val	Asp	Asn	Met	Met	Ile	Ser	Glu	Lys	Thr	Phe	Ala	Glu	Val	Val	-	Gly	Lys

V tabeli so podana nukleotidna zaporedja ter mesta nukleotidnih zamenjav v eksonih 1–5, ki določajo gen RHD in alele gena RHCE. Zeleno so označene nukleotidne razlike med aleloma RHCE*C in RHCE*c, modro pa nukleotidna razlika alelov RHCE*E in RHCE*e. S sivo barvo so označene spremembe AK med proteinoma RhD in RhCE. Prazna mesta so nespecifična mesta za posamezne alele gena RHCE.



Slika 3: Shematski prikaz polimorfizma RhC/c in RhE/e (prirejeno po 21).

Na sliki je z z večjima krogoma prikazan položaj AK, odgovoren za polimorfizem RhC/c in RhE/e. Na Ag RhC se na mestu 103 nahaja Ser, na Ag Rhc pa Pro. Na Ag RhE se na mestu 226 nahaja Pro, na Ag Rhe pa Ala.

1.2.4 Frekvenca antigenov RhC, Rhc, RhE, Rhe

Ag RhC, Rhc, RhE in Rhe predstavljajo po dva para antitetičnih Ag (18). Ag RhC nosi 68 %, Ag Rhc pa 80 % belih angleških krvodajalcev. Pri črnih je frekvenca Rhc višja (98 %),

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

frekvenca RhC pa nižja (27 %) kot pri belih angleških krvodajalcih, medtem ko se v azijski populaciji frekvenca RhC približuje 100 %, frekvenca Rhc pa je zelo nizka (4).

Ag Rhe je pri vseh populacijah pogostejši kot Ag RhE. Ag Rhe ima 98 % belcev in 98 % črncev, medtem ko ima Ag RhE le 29 % belcev in 22 % črncev (35). V **Tabeli III** so prikazane frekvence alelov sistema RhCE.

Tabela III: Frekvenca alelov krvnoskupinskega sistema RhCE pri belcih (4).

	Belci
Alel	Frekvenca
<i>RHCE*C</i>	0,4327
<i>RHCE*c</i>	0,5673
<i>RHCE*E</i>	0,1554
<i>RHCE*e</i>	0,8446

1.2.5 Razvoj, porazdelitev in funkcija antigenov krvnoskupinskega sistema RhCE

Ag KS sistema Rh na eritrocitih zaznamo že zelo zgodaj, kar potrди dejstvo, da imajo pomembno vlogo pri HBPN. Ag RhC, Rhc, RhE in Rhe so prisotni na plodovih eritrocitih od 8. gestacijskega tedna dalje (36). So eritroidno specifični, saj jih z radioimunskimi testi ali s pretočno citometrijo niso odkrili na preostalih krvnih celicah (37, 38).

Fiziološka vloga proteina RhCE še ni popolnoma pojasnjena. Po vsej verjetnosti je pomemben pri vzdrževanju integritete eritrocitne membrane. Njegovo strukturno vlogo potrди tudi dejstvo, da imajo posamezniki s fenotipom Rh_{null} nepravilno oblikovane eritrocite (stomatocite) s krajšo življenjsko dobo (37, 39). Protein RhCE ne sodeluje pri transportu plinov, saj nima AK, ki so ohranjene v drugih proteinih družine Rh, npr. v RhAG, ki so nujno potrebne za transport plinov.

1.3 Zunajcelična plodova DNA

Leta 1997 je Lo s sod. v plazmi in serumu nosečnice dokazal prisotnost zunajcelične plodove DNA (zcp-DNA) (40). Celotno zunajcelično DNA (zc-DNA) nosečnice predstavljata zcp-DNA in zc-DNA matere (16). Odkritje zcp-DNA je omogočilo varno neinvazivno prenatalno diagnostiko (NIPD) (41).

Zcp-DNA izvira iz apoptotičnih celic sinciciotrofoblasta (42, 43). V krvnem obtoku nosečnice jo zaznamo od 5. tedna nosečnosti dalje (41, 44). Delež zcp-DNA v prvem trimesečju nosečnosti predstavlja približno 3 % celotne zc-DNA in v zadnjem trimesečju naraste na 6 do 20 % (45, 46). Povprečna količina zcp-DNA v prvem trimesečju nosečnosti predstavlja 25,4 genomskih ekvivalentov (GE) na mL materine krvi (GE/mL) oziroma 167,64 pg/mL materine plazme. V zadnjem trimesečju količina zcp-DNA naraste na 292,2 GE/mL, kar je enako 1928 pg/mL (47). GE uporabljamo kot pretvorbeni faktor za prikaz količine DNA v obliki števila kopij in predstavlja 6,6 pg genomske DNA (48, 49). Zcp-DNA (143 bp) je krajša od materine zc-DNA (166 bp) (50). Po porodu iz materinega obtoka izgine že v 16,3 minute (razpon 4–30 minut), zato je ne moremo zaznati v naslednjih nosečnostih (51).

Zcp-DNA v NIPD lahko uporabljamo tudi za določanje plodovega spola in KS Rh. S tem pristopom lahko določimo le alele, ki jih je plod podedoval po očetu, materin genski zapis pa jih ne vsebuje (52). S tem se izognemo invazivni metodi, kot sta amniocenteza in biopsija horionskih resic, ki predstavljata tveganje za plod (53, 54).

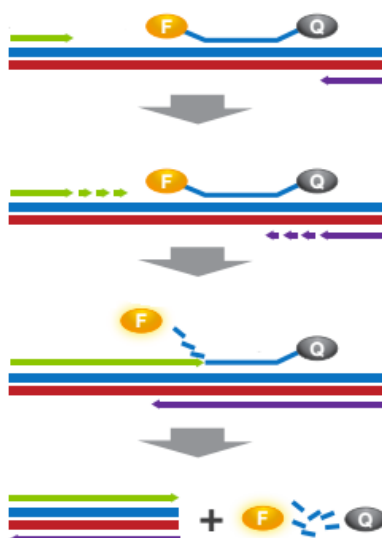
1.4 Določanje plodovega genotipa s kvantitativnim pomnoževanjem s polimerazo v realnem času

V zadnjih letih je verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR, ang. quantitative polymerase chain reaction) postala vodilno orodje za detekcijo in kvantifikacijo DNA ter RNA. S qPCR lahko zaznamo nizke količine DNA, zato predstavlja optimalno metodo za zanesljivo NIPD (41). qPCR je nadgradnja klasične reakcije PCR, ki poteče v treh korakih: denaturacija DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov, podaljševanje novonastale verige

DNA. qPCR omogoča merjenje količine produkta po vsakem ciklu med samo reakcijo qPCR. Iz količine produkta PCR lahko samo v eksponentni fazi zanesljivo sklepamo o začetnem številu kopij matrice v vzorcu. Kontinuirano spremljanje reakcije in merjenje količine produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi, je najpomembnejša prednost qPCR pred klasično reakcijo PCR (55).

Metoda qPCR temelji na 5'–3' eksonukleazni aktivnosti polimeraze *Thermus aquaticus* (*Taq*) in uporabi hidrolizirajočih sond, ki se vežejo na tarčno zaporedje na DNA. Sonda je oligonukleotid, ki ima na 5'-terminalnem koncu vezan fluorofor, ki ga imenujemo reportersko barvilo. Na 3'-terminalnem koncu je vezan dušilec, ki je lahko nefluorescenten (NFQ, ang. non-fluorescence quencher) ali fluorescenten. Novejše oblike sond imajo na 3'-terminalnem koncu NFQ, na katerega je vezana molekula MGB (ang. minor groove binder). MGB močno stabilizira vezavo sonde na DNA, sama dolžina produkta pa je krajša. Zato lahko uporabimo krajše sonde kot običajno, ki so se izkazale tudi za bolj sekvenčno specifične (16).

Kadar sta reporter in dušilec vezana na sondo, sta dovolj blizu, da dušilec absorbira sproščeno svetlobo reporterske molekule. V času sintetiziranja nove verige polimeraza *Taq* s svojo eksonukleazno aktivnostjo prilegajočo sondo razgradi, tako da se razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem poveča (*Slika 4*). Dušilec ne absorbira več sproščene svetlobe reporterskega barvila, kar zaznamo kot porast fluorescence, ki je sorazmerna s količino nastajajočega produkta PCR (56–58).



Slika 4: Shematski prikaz poteka reakcije qPCR (prirejeno po 59).

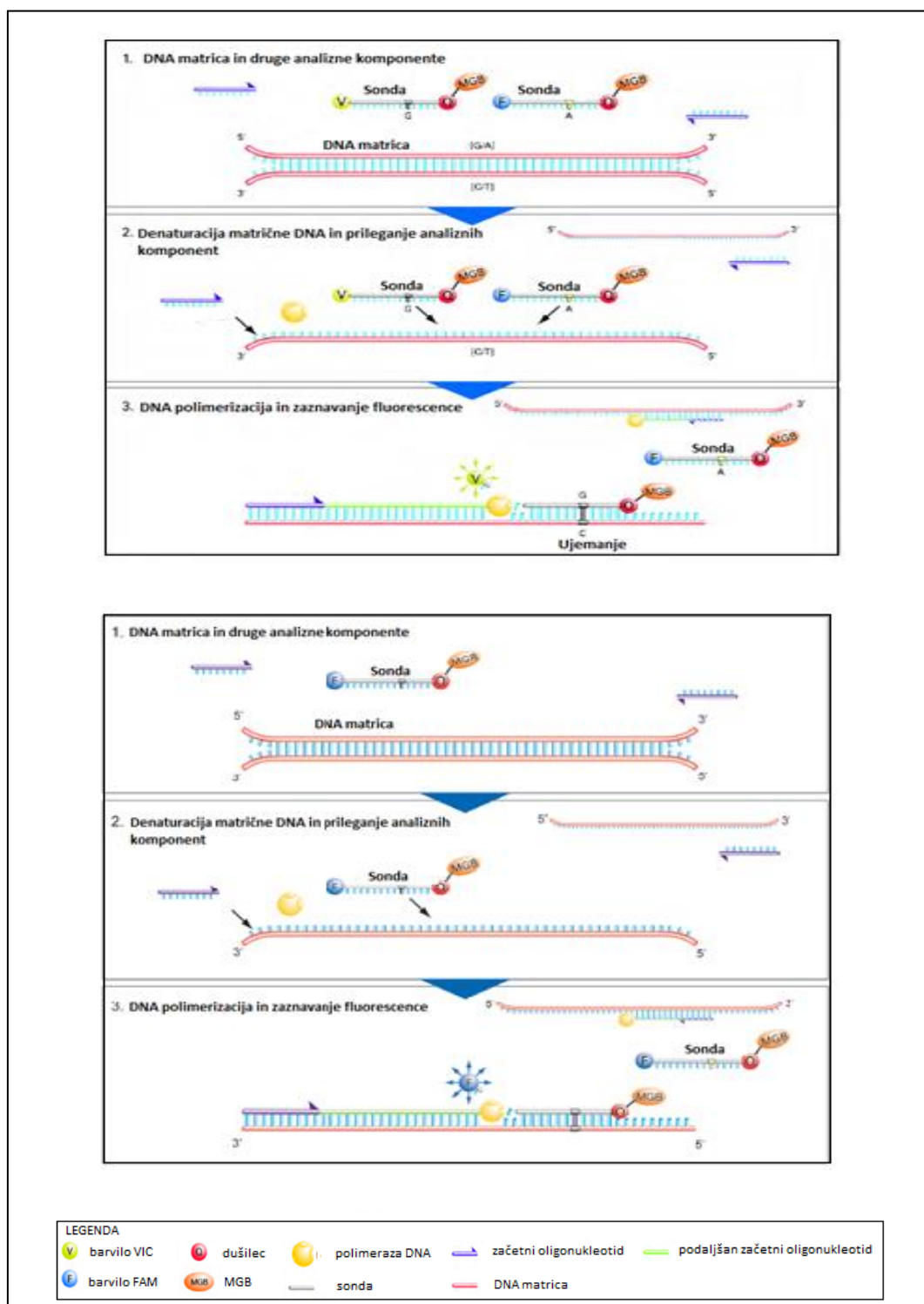
Slika prikazuje nastanek novonastajajoče verige v smeri 5'–3'. Na verigo DNA (modra in rdeča črta) se vežejo začetni oligonukleotidi (zeleno in vijolična puščica), sledi podaljševanje novonastajajoče verige. Sonda (modro) se popolnoma prilega tarčnemu zaporedju. Ob sintetiziranju novonastajajoča veriga doseže sondo in DNA-polimeraza jo začne razgrajevati oz. hidrolizirati. Ob tem zaznamo fluorescenco, sorazmerno količini nastajajočega produkta. S črko *F* je označeno reportersko barvilo, s črko *Q* pa dušilec.

Metodo qPCR lahko uporabljamo tako za merjenje ekspresije genov kot za določitev prisotnosti alelov (z metodo alelne diskriminacije ali z metodo ekspresije).

1.4.1 Določanje alelov z metodo alelne diskriminacija in z metodo ekspresije

Alelna diskriminacija temelji na pomnoževanju izbranih sekvenčno zelo podobnih odsekov DNA. Pri tem uporabimo dve alelno specifični hidrolizirajoči sondi in dva začetna oligonukleotida. Ena sonda je označena npr. z barvilom VIC, druga s FAM. Princip alelne diskriminacije prikazuje **Slika 5**, zgoraj. Med reakcijo PCR se z vsakim ciklom sprosti več fluorescence barvila tiste sonde, ki se je vezala na komplementarno verigo DNA oz. na ustrezen alel. Po končani reakciji PCR dobimo informacijo o homozigotnem ali heterozigotnem statusu preiskovanca. Sonda, ki se zaporedju DNA matrice ne prilega popolnoma, ostane nevezana, porasta fluorescence tega barvila pa ne zaznamo. Fluorescenco reporterskih barvil lahko odčitamo tudi po končani reakciji PCR (60).

Pri določitvi alela z metodo ekspresije uporabimo eno alelno specifično hidrolizirajočo sondo in dva začetna oligonukleotida. Sonda je npr. označena z barvilom FAM. Princip detekcije ekspresije je prikazan na *Sliki 5*, spodaj.



Slika 5: Princip določanje alelov z metodo alelne diskriminacije (zgoraj) in z metodo ekspresije (spodaj) s hidrolizirajočimi sondami (prirejeno po 60).

1.5 Neinvazivno določanje plodovega genotipa *RHCE*

Po odkritju Lo in sod. o obstoju zcp-DNA v plazmi in serumu nosečnic leta 1997 (40) se je NIPD močno razširila na vsa področja. Po uspešni uvedbi določitve plodovega genotipa *RHD* iz plazme RhD-negativnih nosečnic so raziskovalne skupine začele določati tudi genotip ploda za ostale KS, predvsem alel *KEL1* in alele gena *RHCE* (61). Za določitev plodovega genotipa *RHCE* je bilo objavljenih le nekaj študij, ki so zbrane v **Tabeli IV**. V študijah so plodov genotip določili na manjšem številu vzorcev; zajete so bile tako imunizirane kot neimunizirane nosečnice. V vseh objavljenih študijah so za določitev plodovega genotipa z metodo qPCR uporabili začetne nukleotide in sonde, ki sta jih objavila Legler s sod. in Finning s sod. (61–63).

Tabela IV: Začetne študije za določitev plodovega genotipa *RHCE* (prirejeno po 64).

Študija	Leto	<i>RHCE</i> *C		<i>RHCE</i> *c		<i>RHCE</i> *E	
		Število vzorcev	Točnost (%)	Število vzorcev	Točnost (%)	Število vzorcev	Točnost (%)
Legler s sod. (62)	2002	23	100	1	100	35	100
Hromadnikova s sod. (65)	2005	n.t.	n.t.	41	100	45	100
Finning s sod. (63)	2007	13	100	44	100	46	100
Orzinska s sod. (66)	2008	n.t.	n.t.	11	100	n.t.	n.t.
Gutensohn s sod. (67)	2010	46	100	87	100	100	100
Scheffer s sod. (5)	2011	n.t.	n.t.	19	100	21	100
Skupaj		82	100	203	100	247	100

n. t. – niso testirali

2 NAMEN DELA

Neskladje v Ag KS sistema RhCE med nosečnico in plodom (mati negativna, plod pozitiven) je lahko razlog za nastanek protiteles pri materi in HBPN. Klinično najpomembnejša protitelesa KS RhCE, ki povzročajo HBPN, so protitelesa anti-c. Kljub temu lahko HBPN povzročajo tudi protitelesa anti-C in najpogosteje prisotna protitelesa anti-E, vendar se bolezen pojavi redkeje in v blažji obliki. Odkritje zcp-DNA, ki se nahaja prosto v materini plazmi, in razvoj qPCR sta omogočila neinvazivno določitev plodove KS RhCE. Pravilna napoved plodovega genotipa je pomembna za nadaljnje vodenje nosečnosti.

Namen magistrske naloge je optimizirati reakcije qPCR in izdelati strategijo za neinvazivno določitev plodove KS RhCE iz periferne venske krvi nosečnic.

Za doseg končnega cilja je potrebno optimizirati tudi ustrezne reakcije qPCR za določitev genotipa KS sistema RhCE iz genomske DNA (gDNA) RhD-negativnih nosečnic in njihovih novorojencev, saj kot določa Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji (15), z rednimi rutinskimi testi v času nosečnosti in po porodu ne določamo njihovega fenotipa RhCE. Le pri ustreznih parih, ko bo mati negativna, novorojenec pa pozitiven za testirani alel, bomo nadaljevali z določitvijo plodovega genotipa iz periferne krvi nosečnice.

Namen dela zajema naslednje specifične cilje:

- iz periferne krvi nosečnice in novorojencev osamiti gDNA,
- iz plazme nosečnice osamiti zcp-DNA,
- optimizirati ustrezne reakcije qPCR za pravilno napoved fenotipa RhCE iz gDNA,
- preveriti ustreznost reakcije qPCR za pravilno napoved plodovega fenotipa RhCE iz periferne krvi nosečnic,
- potrditi prisotnost plodove DNA v primeru negativnega rezultata za iskani alel.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

3.1.1 Vzorci za razvoj in optimizacijo reakcij qPCR ter izdelavo strategije za zanesljivo določitev plodove KS RhCE

Za razvoj in optimizacijo reakcij qPCR za določitev prisotnosti alelov gena *RHCE* smo uporabili naslednje skupine vzorcev:

- a) Vzorce gDNA 155 tipiziranih krvodajalcev in podatke o njihovem fenotipu RhCE, ki so zbrani v Registru tipiziranih krvodajalcev na Zavodu RS za transfuzijsko medicino (ZTM).
- b) Komercialno dostopno humano gDNA moškega (Promega, ZDA), ki smo jo redčili v redčitveni vrsti 1:10, tako da smo v reakcijah qPCR prišli v območje količine zcp-DNA, ki se nahaja v plazmi nosečnice (16). Začetna koncentracija je bila 227 µg/mL. Genotip vzorca *RHCE*Cc* in *RHCE*Ee* so z metodo PCR s sekvenčno specifičnim prileganjem (PCR-SSP, ang. PCR-sequence specific priming) in uporabo komercialnega seta Ready-gene CDE (Inno-Train Diagnostik, Kronberg/Taunus, Nemčija) predhodno določili v Laboratoriju za molekularno biologijo na ZTM.
- c) Ostanke vzorcev periferne venske krvi in po posebnem protokolu že izolirane plazme (16) 71 RhD-negativnih nosečnic. Vzorce krvi so nosečnicam odvzeli v 7.–29. tednu nosečnosti v standardne epruvete z EDTA (etilendiamintetraocetna kislina).
- d) Ostanke vzorcev popkovnične krvi 72 novorojencev RhD-negativnih porodnic (ena mama je rodila dvojčke), ki se odvzamejo po rojstvu za rutinsko določitev KS ABO, RhD, Kell in katerih spol smo poznali.

Vsi vzorci so bili do uporabe shranjeni pri -20 °C.

3.1.2 Vzorci za ugotavljanje plodovega genotipa *RHCE* pri imuniziranih nosečnicah v KS RhCE

- a) Ostanke vzorcev periferne venske krvi in po posebnem protokolu že izolirane plazme (16) 21 imuniziranih nosečnic, in sicer 15 nosečnic s protitelesi anti-RhE, 2 nosečnici z anti-Rhc in 4 nosečnice s protitelesi anti-RhC. Vzorce krvi so nosečnicam odvzeli v standardne epruvete z EDTA. Vsi vzorci so bili do uporabe shranjeni pri -20 °C.

3.2 Metode

Pri vseh postopkih osamitve nukleinskih kislin in optimizaciji reakcij qPCR smo uporabili sledeči material in reagente:

- stojalo za 1,5 mL mikroeprovete,
- 1,5 mL mikroeprovete brez DNaz in RNaz (Eppendorf, Nemčija),
- stresalnik LabDancer (IKA, Nemčija),
- nastavljive pipete za volumne: 0,1–2,5 µL, 2–20 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete s filtrom ep.T.I.P.S Dualfilter, brez DNaz in RNaz: 0,1–10 µL, 0,5–20 µL, 10–100 µL in 50–1000 µL (Eppendorf, Nemčija).

3.2.1 Osamitev genomske DNA iz vzorcev periferne venske krvi RhD-negativnih nosečnic in popkovnične krvi novorojenčkov

Material in reagenti:

- aparat za izolacijo nukleinskih kislin BioRobot EZ1 (Qiagen, Nemčija),
- kartica za aparat za izolacijo nukleinskih kislin BioRobot EZ1 – EZ1 DNA Blood v.1.3 (Qiagen, Nemčija),
- komercialni set za izolacijo nukleinskih kislin z aparatom BioRobot EZ1 – EZ1 DNA Blood 350 µL Kit.

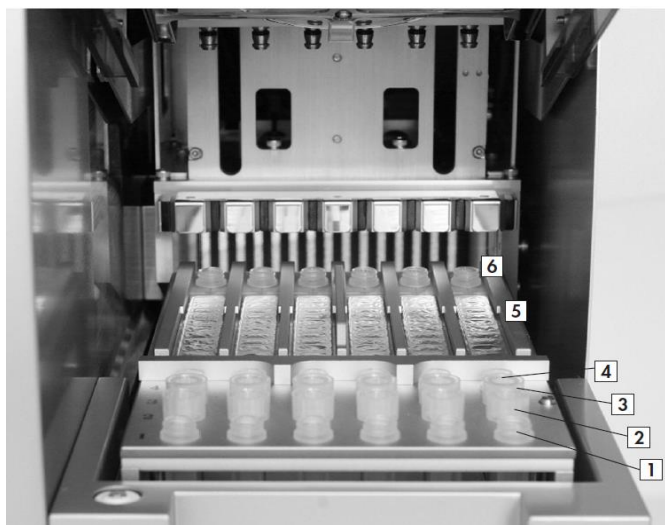
Metoda:

gDNA smo osamili iz periferne venske krvi nosečnice in iz popkovnične krvi novorojenca. Za avtomatizirano osamitev gDNA s pomočjo magnetnih delcev smo uporabili aparat BioRobot EZ1 in komercialni set EZ1 DNA Blood 350 μ L Kit. Za osamitev gDNA smo v aparat vstavili kartico EZ1 DNA Blood Card in sledili navodilu proizvajalca:

1. Z drsom navzgor smo odprli vrata aparata BioRobot EZ1.
2. V nosilca aparata smo vstavili potreben material po predpisanem vrstnem redu

(*Slika 6*):

- vrstica 1 – 1,5 mL mikropruvete za elucijo izolirane DNA,
- vrstica 2 – nosilci za nastavke in nastavki s filtri,
- vrstica 3 – prazna,
- vrstica 4 – 2 mL mikropruvete z vzorci,
- vrstica 5 – kartuše z reagenti,
- vrstica 6 – prazna.



Slika 6: Nosilec za kartuše in nosilec za plastični material ter vzorce.

3. V 2 mL mikropruvete v vrstici 4 smo odpipetirali 350 μ L krvi.
4. Pripravljena nosilca smo vstavili nazaj v aparat BioRobot EZ1 in zaprli vrata aparata z drsom navdrol.
5. Sledili smo navodilom na LCD ekranu aparata BioRobotEZ1.
6. Izbrali smo elucijski volumen 200 μ L.

Izolirano gDNA smo do uporabe shranili pri -20°C .

3.2.2 Merjenje koncentracije in čistote izolirane genomske DNA

Material in reagenti:

- UV spektrofotometer BioPhotometer (Eppendorf, Nemčija),
- UV kivete UVette (Eppendorf, Nemčija),
- magnetno stojalo (Qiagen, Nemčija),
- destilirana voda.

Metoda:

Po osamitvi smo koncentracijo in čistost gDNA izmerili s spektrofotometrom BioPhotometer z merjenjem absorpcije svetlobe pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. Koncentracijo gDNA smo določili z merjenjem absorbanc pri valovni dolžini 260 nm. Pri tej valovni dolžini ima raztopina gDNA, ki vsebuje 50 µg/mL dvojnovijačne DNA, absorbanco 1,0. Čistost DNA določimo z razmerjem absorbanc pri 260 (A260) in 280 (A280) nm. Čista gDNA ima razmerje A260/A280 med 1,7 in 1,9.

Za umeritev spektrofotometra smo v UVetto odpipetirali 70 µL vode in na spektrofotometru nastavili vse potrebne parametre (meritev koncentracije dvojnovijačne DNA in nastavitve ustreznega redčenja vzorca). V 1,5 mL mikroepreveto smo za končni volumen 70 µL odpipetirali DNA in vodo v razmerju 1:10, dobro premešali in prenesli v UVetto. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco raztopine DNA pri 260 in 280 nm.

3.2.3 Osamitev zunajcelične DNA iz vzorcev periferne venske krvi RhD-negativnih in imuniziranih nosečnic

Material in reagenti:

- aparat za izolacijo nukleinskih kislin BioRobot EZ1 (Qiagen, Nemčija),
- kartica za aparat za izolacijo nukleinskih kislin BioRobot EZ1 – EZ1 Virus v.2.0 (Qiagen, Nemčija),
- komercialni set za izolacijo nukleinskih kislin z aparatom BioRobot EZ1 – EZ1 Virus Mini Kit v.2.0 (Qiagen, Nemčija).

Metoda:

Zc-DNA smo osamili iz plazme RhD-negativnih in imuniziranih nosečnic. Za avtomatizirano osamitev zc-DNA smo uporabili aparat BioRobot EZ1 in komercialni set EZ1 Virus Mini Kit v2.0. Pri osamitvi zc-DNA smo v aparat vstavili kartico EZ1 Virus Card v2.0 in sledili navodilom proizvajalca. Postopek je podoben postopku osamitve gDNA, le da smo v nosilca aparata vstavili potreben material po naslednjem vrstnem redu (*Slika 6*):

- vrstica 1 – 1,5 mL mikroepruvete za elucijo izoliranih NK,
- vrstica 2 – nosilci za nastavke in nastavki s filtri,
- vrstica 3 – 1,5 mL mikroepruvete s 60 µL raztopine nosilca RNA,
- vrstica 4 – 2 mL mikroepruvete z vzorci,
- vrstica 5 – kartuše z reagenti,
- vrstica 6 – 2 mL mikroepruvete za lizo vzorcev.

V 2 mL mikroepruvete v vrstici 4 smo odpipetirali 400 µL plazme in izbrali elucijski volumen 60 µL. Izolirano gDNA smo do uporabe shranili pri -20°C.

3.2.4 Reakcije PCR v realnem času

Material in reagenti:

- aparat za pomnoževanje nukleinskih kislin s qPCR Viiia 7 Real-Time PCR System (Applied biosystems, ZDA),
- namizna centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Nemčija),
- stresalnik LabDancer (IKA, Nemčija),
- DNA/RNA UV komora (Biosan, Latvija),
- reakcijske plošče za PCR s 384 vdolbinicami (Applied Biosystem, ZDA),
- nosilci za reakcijske plošče (Applied Biosystems, ZDA),
- optična folija za pokrivanje reakcijske plošče (Applied Biosystems, ZDA),
- elektronske enokanalne pipete za volumne: 0,5–10 µL, 5–100 µL (Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete s filtrom ep.T.I.P.S Dualfilter, brez DNaz in RNaz: 0,1–10 µL, 0,5–20 µL, 10–100 µL in 50–1000 µL (Eppendorf, Nemčija),
- centrifuga za mikrotitrne ploščice (Tehtnica, Slovenija),

- voda brez Dnaz in RNaz (Ambion, ZDA).

Metoda:

Vse reakcije qPCR smo izvedli na aparatu Viia 7 Real-Time PCR System. Reakcijske mešanice smo pripravili v brezprašni komori.

3.2.5 Reakcije PCR v realnem času za določitev genotipa *RHCE* iz genomske DNA

Pri vseh reakcijah qPCR smo uporabili t. i. sonde MGB, ki imajo na 3'-terminalnem koncu na NFQ vezano molekulo MGB. Reakcije qPCR za določitev genotipa KS sistema RhCE smo izvedli v dvojnikih. Za slepi poskus smo kot vzorec uporabili vodo.

Material in reagenti:

- TaqMan Expression Master Mix (2x) (Applied Biosystems, ZDA),
- TaqMan Genotyping Master Mix (2x) (Applied Biosystems, ZDA),
- komercialno pripravljena mešanica začetnih oligonukleotidov in sond za določanje alelov *RHCE**C** in *RHCE**c** z metodo ekspresije, assay by design, 20x (Applied Biosystems, ZDA) – po naročilu,
- komercialno pripravljena mešanica začetnih oligonukleotidov in sond za določanje alelaov *RHCE**Ee** z metodo alelne diskriminacije, assay by design, 40x (Applied Biosystems, ZDA) – po naročilu.

*3.2.5.1 Določitev alelov *RHCE**C** in *RHCE**c** iz genomske DNA z metodo ekspresije – izbor začetnih oligonukleotidov in sond, optimizacija reakcijske mešanice ter optimizacija reakcij qPCR*

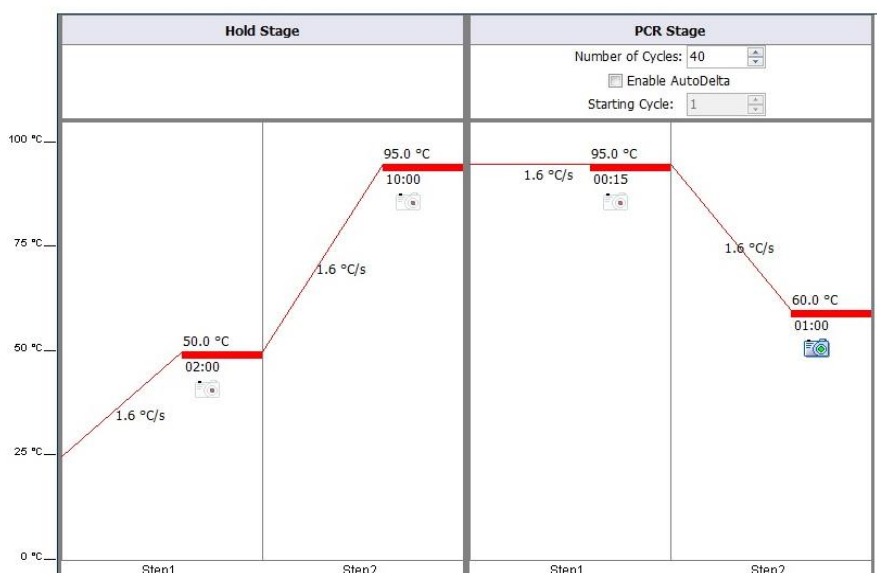
Za določitev genotipa *RHCE**Cc** so v Laboratoriju za molekularno biologijo na ZTM na podlagi nukleotidnih zaporedij iz baze podatkov genske banke GeneBank št. DQ266400.1 (*RHCE**C**), št. DQ322275.1 (*RHCE**c**) in št. L08429.1 (*RHD*), podatkov o polimorfizmih za alela *RHCE**C** in *RHCE**c** in polimorfizmih med genoma *RHD* in *RHCE* izbrali ustrezni regiji eksona 1 (48C) za določitev alela *RHCE**C** in eksona 2 (178C, 201A in 203A) za določitev alela *RHCE**c** na genu *RHCE*. Podatke so poslali v podjetje Applied Biosystems, kjer so s posebnim programom izbrali in pripravili mešanico začetnih

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

nukleotidov ter sond za detekcijo izbranih alelov z metodo ekspresije. Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov so podane v ***Tabeli V***.

Reakcijsko mešanico za določitev prisotnosti alelov z metodo ekspresije smo po navodilih proizvajalca pripravili iz: 5 μL TaqMan Expression Master Mixa (2x), 0,5 μL komercialno pripravljene mešanice začetnih oligonukleotidov in sond (assay by design, 20x), 2,75 μL vode in 2 μL gDNA s konc 10 ng/ μL . Končni volumen reakcij qPCR je bil 10 μL .

Izbrane odseke smo pomnoževali s standardnim programom z oznako Standardna krivulja, ki ga prikazuje ***Slika 7***.



Slika 7: Program qPCR za določanje alelov z metodo ekspresije.

Specifičnost reakcij qPCR smo preverili s testiranjem 12 vzorcev gDNA krvodajalcev iz Registra tipiziranih krvodajalcev, katerih fenotip KS sistema RhCE smo poznali. Občutljivost reakcij qPCR smo preverili s pomočjo standardne krivulje z uporabo komercialno dostopne humane genomske DNA moškega.

Tabela V: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov za določitev alelov RHCE*C in RHCE*c iz gDNA.

Začetni oligonukleotidi in sonde				
Specifičnost	Ime	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Konc. (nM)	Dolžina prod. (bp)
RHCE*C	RHC_48C_F	TCTAAGTACCCGCGGTCTGT	900	73
	RHC_48C_R	GGAGAATGAGAGCTGCTTCCA	900	
	RHC_48C_M	FAM-CCCCTCTGCGCCCTAA-NFQ	250	
RHCE*c	RHc 178_203_F	GCGGCCCTTGGCTTG	900	58
	RHc 178_203_R	CACTGCTCCAGCTGTGTCT	900	
	RHc 178_203_M	FAM-TCACCTCAAATTTCC-NFQ	250	

Z rdečo barvo so označeni alelno specifični nukleotidi.

3.2.5.2 Določitev alelov RHCE*E in RHCE*e iz genomske DNA z metodo alelne diskriminacije – izbor začetnih oligonukleotidov in sond, optimizacija reakcijske mešanice ter optimizacija reakcij qPCR

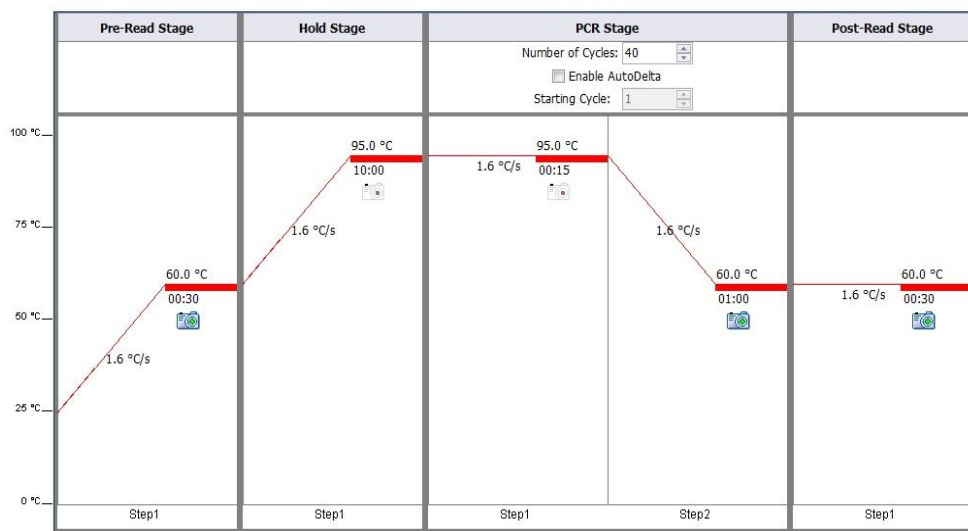
Za določitev genotipa RHCE*Ee so v Laboratoriju za molekularno biologijo na ZTM na podlagi nukleotidnih zaporedij iz baze podatkov genske banke GeneBank št. M34015.1 (RHCE*E), št. DQ322275.1 (RHCE*e) in št. L08429.1 (RHD), podatkov o polimorfizmu za alela RHCE*E in RHCE*e in polimorfizmih med genoma RHD in RHCE izbrali ustrezno regijo eksona 5 za določitev alelov RHCE*Ee (C676G) in specifične nukleotide gena RHCE (667G in 697C). Podatke so poslali v podjetje Applied Biosystems, kjer so s posebnim programom izbrali in pripravili mešanico začetnih nukleotidov ter sond za detekcijo izbranih alelov z metodo alelne diskriminacije. Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov so podane v **Tabeli VI**.

Reakcijsko mešanico za določitev genotipa iz gDNA z metodo alelne diskriminacije smo po navodilih proizvajalca pripravili iz: 5 µL TaqMan Genotyping Master Mixa (2x), 0,25 µL komercialno pripravljene mešanice začetnih oligonukleotidov in sond (assay by design,

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

40x), 2,75 μ L vode in 2 μ L gDNA s konc. 10 ng/ μ L. Končni volumen reakcij qPCR je bil 10 μ L.

Izbrane odseke smo pomnoževali s standardnim programom z oznako Genotipizacija, ki ga prikazuje *Slika 8*.



Slika 8: Program qPCR za določanje alelov z metodo alelne diskriminacije.

Specifičnost reakcij qPCR smo preverili s testiranjem 155 vzorcev gDNA krvodajalcev iz Registra tipiziranih krvodajalcev, katerih fenotip KS sistema RhCE smo poznali. Občutljivost reakcij qPCR smo preverili s pomočjo standardne krivulje z uporabo komercialno dostopne humane genomske DNA moškega.

Tabela VI: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov za določitev alelov RHCE*E on RHCE*e iz gDNA.

Začetni oligonukleotidi in sonde				
Specifičnost	Ime	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Konc. (nM)	Dolžina prod. (bp)
RHCE* eE	RHeE_676_F	GCCCTCTTCTTGTGGATGTTCTG	900	74
	RHeE_676_R	GCATTCTTCCTTTGGATTGGACTTC	900	
	RHeE_676_V (e)	VIC-TGTCAACTCTGCTCTGCT-NFQ	250	
	RHeE_676_M (E)	FAM-TGTCAACTCTCCTCTGCT-NFQ	250	

Z rdečo barvo so označeni alelno specifični nukleotidi. Z modro barvo so označeni nukleotidi, specifični za gen RHCE.

3.2.6 Reakcije PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz periferne krvi nosečnice

Najpomembnejša protitelesa, ki poleg protiteles anti-RhD (KS sistem Rh) povzročajo HBPN, so protitelesa anti-RhC, anti-Rhc in anti-RhE. Določitev plodovih alelov *RHCE**C**, *RHCE**c** in *RHCE**E** iz zc-DNA smo izvedli z metodo ekspresije. V vseh reakcijah qPCR smo uporabili t. i. klasične sonde, ki smo jih izbrali iz literature (62,63), ki imajo na 3'-terminalnem koncu kot dušilec vezano barvilo TAMRA. Reakcije qPCR za določitev genotipa ploda KS sistema RhCE smo izvedli v šestih ponovitvah reakcije qPCR. Za slepi poskus smo kot vzorec uporabili vodo.

Material in reagenti:

- TaqMan Expression Master Mix (2x) (Applied Biosystems, ZDA),
- začetni oligonukleotidi za določanje alelov *RHCE**C**, *RHCE**c** in *RHCE**E** (20x) z metodo ekspresije (Metabion, Nemčija),
- sonde za določanje alelov *RHCE**C**, *RHCE**c** in *RHCE**E** (20x) z metodo ekspresije (Metabion, Nemčija).

3.2.6.1 Določitev plodovih alelov *RHCE**C**, *RHCE**c** in *RHCE**E** iz zunajcelične DNA z metodo ekspresije – izbor začetnih oligonukleotidov in sond, optimizacija reakcijske mešanice ter optimizacija reakcij qPCR

Pri izbiri začetnih oligonukleotidov in sond za določitev plodovega genotipa *RHCE* smo uporabili podatke iz literature (5, 62, 63, 65–67). Za določitev plodovih alelov *RHCE**C**, *RHCE**c** in *RHCE**E** iz periferne krvi nosečnic smo izbrali nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond iz študij, ki so dosegala 100 % zanesljivost (62, 63). Za določitev alela *RHCE**C** so detektirali daljše nukleotidno zaporedje introna 2 (33, 62), za določitev alela *RHCE**c** pa polimorfizme v eksonu 2 (201A, 203A in 307C). Za določitev alela *RHCE**E** so izbrali regijo eksona 5 (676C) in specifične nukleotide gena *RHCE* (667G, 697C in 712 A) (62, 63).

Izbrali smo enak program za pomnoževanje nukleinskih kislin kot ga je uporabila Finning s sod. (63), s 100 % zanesljivostjo določitve plodovega genotipa. Enak program priporoča tudi proizvajalec aparata.

Pri optimizaciji reakcij qPCR smo primerjali fluorescenčne signale posameznih reakcij pri različnih kombinacijah končnih koncentracij začetnih oligonukleotidov in sond (**Tabela VII**).

Tabela VII: Kombinacije konc. začetnih oligonukleotidov in sond za optimizacijo reakcij qPCR za alele RHCE*C, RHCE*c in RHCE*E za določitev plodovega genotipa.

	Alel (ime)		
	<i>RHCE*C</i> (<i>RH_big_C_KF</i>)	<i>RHCE*c</i> (<i>RH_small_C_KF</i>)	<i>RHCE*E</i> (<i>RH_big_E_KF</i>)
Kombinacije konc. začetnih oligonukleotidov/sonda (nM)	300/100	600/100	900/100
	300/250	600/250	900/250

Reakcijsko mešanico za določitev prisotnosti plodovih alelov z metodo ekspresije v sklopu optimizacije smo pripravili iz: 10 µL TaqMan Expression Master Mixa (2x), 5 µL vzorca zc-DNA ali gDNA (redčenje 1:10.000, da dosežemo območje količine zcp-DNA), različnega volumna začetnih oligonukleotidov in sonde (glede na izbrano končno konc.) ter vode. Končni volumen reakcij qPCR je bil 20 µL. Kot kontrolne vzorce za uporabo reakcij qPCR v namene neinvazivne prenatalne diagnostike smo uporabili del vzorcev zc-DNA nosečnic, katerih fenotip RhCE novorojencev smo poznali, in redčene vzorce gDNA krvodajalcev iz Registra tipiziranih krvodajalcev (redčenje 1:10.000, da smo dosegli območje količine zcp-DNA). Izbrane odseke smo pomnoževali s standardnim programom z oznako Standardna krivulja, ki ga prikazuje **Slika 7**, le da smo število ciklov s 40 zvišali na 50.

Specifičnost reakcij qPCR smo preverili tudi s testiranjem 155 vzorcev gDNA krvodajalcev iz Registra tipiziranih krvodajalcev, katerih fenotip KS sistema RhCE smo poznali. Končni volumen reakcij smo v ta namen znižali na 10 µL. Občutljivost reakcij qPCR smo preverili s pomočjo standardne krivulje z uporabo komercialno dostopne humane genomske DNA moškega.

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

Po končani optimizaciji smo za določitev prisotnosti plodovih alelov z metodo ekspresije pripravili 20 μ L reakcijo qPCR, ki je vsebovala: 10 μ L TaqMan Expression Master Mixa (2x), 1,2 μ L začetnih oligonukleotidov (končna konc. 600 nM), 0,5 μ L sonde (končna konc. 250 nM), 2,1 μ L vode in 5 μ L zc-DNA.

Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov so podane v **Tabeli VIII**.

Tabela VIII: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije v reakciji qPCR in dolžine produktov za določitev plodovega genotipa RHCE iz zc-DNA.

Začetni oligonukleotidi in sonde				
Specifičnost	Ime	Nukleotidno zaporedje (5'–3')	Konc. (nM)	Dolžina prod. (bp)
RHCE* C (62)	RH_big_C_KF_F	CATTGCTATAGCTTAAGGACTCA	600	105
	RH_big_C_KF_R	ATGATTGTACCACTGGGAAG	600	
	RH_big_C_KF_P	FAM-CAACACCAAACCAGGGCCACC-TAMRA	250	
RHCE* c (63)	RH_small_C_KF_F	TGGGCTTCCTCACCTCAA	600	141
	RH_small_C_KF_R	TGATGACCACCTTCCCAGG	600	
	RH_small_C_KF_P	FAM-CAATCCTGCTGGACGGCTTCCTGA-TAMRA	250	
RHCE* E (63)	RH_big_E_KF_F	TGGCCACGTGTCAACTCTC	600	97
	RH_big_E_KF_R	CTGTCACCACACTGACTGCTAG	600	
	RH_big_E_KF_P	FAM-CAAAGGAAGAATGCCATGTTCAACACCTAC-TAMRA	250	

Z rdečo barvo so označeni alelni specifični nukleotidi oziroma zaporedja. Z modro barvo so označeni nukleotidi, specifični za gen RHCE.

3.2.7 Reakcije PCR v realnem času za gen SRY

Za potrditev prisotnosti zcp-DNA smo uporabili gen SRY, ki se nahaja na kromosomu Y v eni kopiji. Reakcijsko mešanico za določitev plodovega spola iz periferne krvi nosečnice smo pripravili tako, kot jo v Laboratoriju za molekularno biologijo na ZTM pripravljajo za

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

rutinske teste (16, 68). Pripravili smo 20 μ L reakcijo qPCR, ki je vsebovala: 10 μ L TaqMan Expression Master Mixa (2x), 1,2 μ L začetnih oligonukleotidov, 0,4 μ L sonde, 2,2 μ L vode in 5 μ L zc-DNA. Izbrane odseke smo pomnoževali s standardnim programom z oznako Standardna krivulja, kot smo ga uporabili za določitev plodovega genotipa *RHCE* (*Slika 7*, število ciklov smo s 40 zvišali na 50). Reakcije qPCR za določitev plodovega spola smo izvedli v treh ponovitvah. Za slepi poskus smo kot vzorec uporabili vodo.

V *Tabeli IX* so podana zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, njihove končne koncentracije v reakciji qPCR za gen *SRY* in dolžine produktov.

Tabela IX: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije in dolžine produktov v reakciji qPCR za gen *SRY* (16).

Začetni oligonukleotidi in sonde				
Specifičnost	Ime	Nukleotidno zaporedje (5'-3')	Konc. (nM)	Dolžina prod. (bp)
<i>SRY</i>	SRY_F	CGTGCATCCACCAGCAGTAA	600	59
	SRY_R	TGGTTGCTAAGGACTGGATGAA	600	
	SRY_FAM	FAM-TCCCCACAACCTC-MGB	200	

3.2.8 Reakcije PCR v realnem času za gen *ALB*

Uspešnost osamitve zc-DNA smo določili s prisotnostjo gena *ALB*. Reakcijsko mešanico smo pripravili tako, kot jo v Laboratoriju za molekularno biologijo na ZTM pripravljajo za rutinske teste (16, 68). Pripravili smo 20 μ L reakcijo qPCR, ki je vsebovala: 10 μ L TaqMan Expression Master Mixa (2x), 0,8 μ L začetnih oligonukleotidov, 0,3 μ L sonde, 3,1 μ L vode in 5 μ L zc-DNA. Izbrane odseke smo pomnoževali s standardnim programom z oznako Standardna krivulja, kot smo ga uporabili za določitev plodovega genotipa *RHCE* (*Slika 7*, število ciklov smo s 40 zvišali na 50). Reakcije qPCR smo izvedli v dvojnikih. Za slepi poskus smo kot vzorec uporabili vodo.

V *Tabeli X* so podana zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, njihove končne koncentracije v reakciji qPCR za gen *ALB* in dolžine produktov.

Tabela X: Zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond, končne koncentracije in dolžine produktov v reakciji qPCR za gen ALB.

Začetni oligonukleotidi in sonde				
Specifičnost	Ime	Nukleotidno zaporedje (5'–3')	Konc. (nM)	Dolžina prod. (bp)
ALB	Albumin_F	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	600	59
	Albumin_R	ACAACAATGCCAGGGAGAGATTT	600	
	Albumin_FAM	FAM-ACTCTTAAGCCTAGACGAT-MGB	200	

3.3 Analiza rezultatov reakcij qPCR

Po končanih reakcijah qPCR smo rezultate obdelali s programom Viia 7 Software v1.2.4. Na grafu pomnoževanja v reakciji qPCR je na x-osi število kvantifikacijskih ciklov (C_q, ang. threshold cycle), na y-osi pa vrednost normalizirane fluorescencence (ΔR_n). C_q je cikel, pri katerem zaznamo porast fluorescence v eksponentni fazi reakcije PCR v realnem času. Vrednost C_q je obratnosorazmerna začetni količini DNA. V reakciji PCR na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga (Th, ang. threshold). To je intenziteta fluorescence, ki je signifikantno višja od bazne linije. Potrebno je določiti tudi bazno linijo, s katero zmanjšamo šum, ki nastane v začetnih ciklih reakcije qPCR.

Iz standardnih krivulj smo za vsako reakcijo izračunali učinkovitost pomnoževanja (E, ang. efficiency), koeficient determinacije (R²) in naklon standardne krivulje (k; ang. slope). Učinkovitost pomnoževanja se izračuna iz naklona linearne regresijske krivulje po enačbi:

$$E = \left(10^{\frac{1}{\text{naklon}}} - 1 \right) \times 100$$

Enačba 1: Enačba za izračun učinkovitosti pomnoževanja.

Vrednost k blizu -3,3 je optimalna in odraža 100 % učinkovitost pomnoževanja. Vrednost R² je merilo ujemanja linearne regresijske krivulje in C_q standardnih reakcij. Vrednost 1 predstavlja popolno ujemanje med linearno regresijsko krivuljo in podatki. Zaželeno je, da je R² višji kot 0,99.

4 REZULTATI

4.1 Kvantifikacija izolirane genomske DNA

4.1.1 Merjenje koncentracije in čistote izolirane genomske DNA

Izolirani gDNA, ki smo jo osamili iz periferne krvi nosečnic (71) in njihovih novorojencev (72, ena mama je rodila dvojčke), smo izmerili koncentracijo in čistost (*Tabela XI*).

Tabela XI: Koncentracija in čistost izolirane gDNA.

Koncentracija DNA (ng/ μ L) (A260)	Čistost DNA (A 260/280)
Povprečna vrednost in razpon	Povprečna vrednost in razpon
116,0 (16,41–250,27)	1,77 (1,29–1,88)

4.2 Reakcije PCR v realnem času za določitev genotipa *RHCE* iz genomske DNA

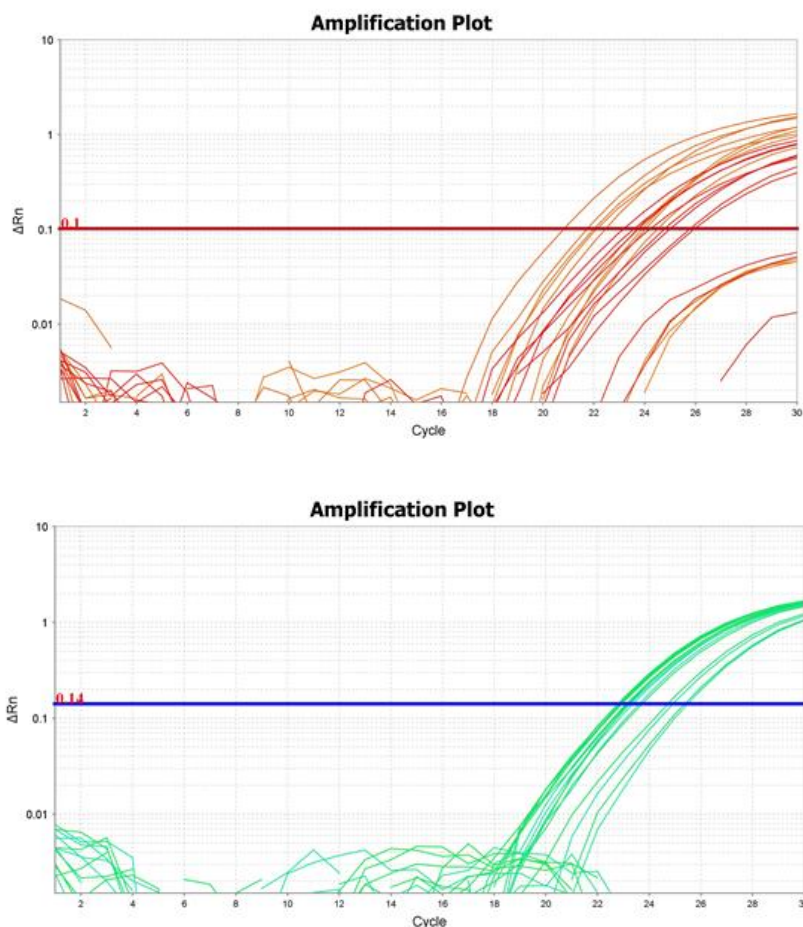
4.2.1 Specifičnost reakcij PCR v realnem času za določitev alelov *RHCE**C** in *RHCE*c* iz genomske DNA z metodo ekspresije

Pri optimizaciji reakcij qPCR za določitev alelov *RHCE**C** in *RHCE*c* smo za kontrolne vzorce uporabili gDNA 12 tipiziranih krvodajalcev, katerih podatki o njihovem fenotipu so zbrani v Registru tipiziranih krvodajalcev na ZTM. Med 12 vzorci je bilo 10 (83,3 %) RhD-pozitivnih in 2 (16,7 %) RhD-negativna. Od tega je bilo 8 (66,7 %) RhC-pozitivnih in 8 (66,7 %) Rhc-pozitivnih krvodajalcev.

Za potrditev prisotnosti alela *RHCE**C** smo določili vrednosti $C_q \leq 30$ in $T_h = 0,10$, za potrditev prisotnosti alela *RHCE*c* pa $C_q \leq 30$ in $T_h = 0,14$. Bazna linija za oba alela je bila od 3 do 15 ciklov. Rezultati genotipizacije so se popolnoma ujemali z rezultati

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

serološko določenih Ag RhC in Rhc. Graf pomnoževanja je prikazan na **Sliki 9**. Rezultati primerjave fenotipov, genotipov in odstotkov specifičnosti so prikazani v **Tabeli XII**.



Slika 9: Graf pomnoževanja za alela *RHCE**C** (zgoraj) in *RHCE**c** (spodaj) iz gDNA (sonda MGB).

Zgornja slika prikazuje krivulje pomnoževanja za alel *RHCE**C**, spodnja slika pa krivulje pomnoževanja za alel *RHCE**c**.

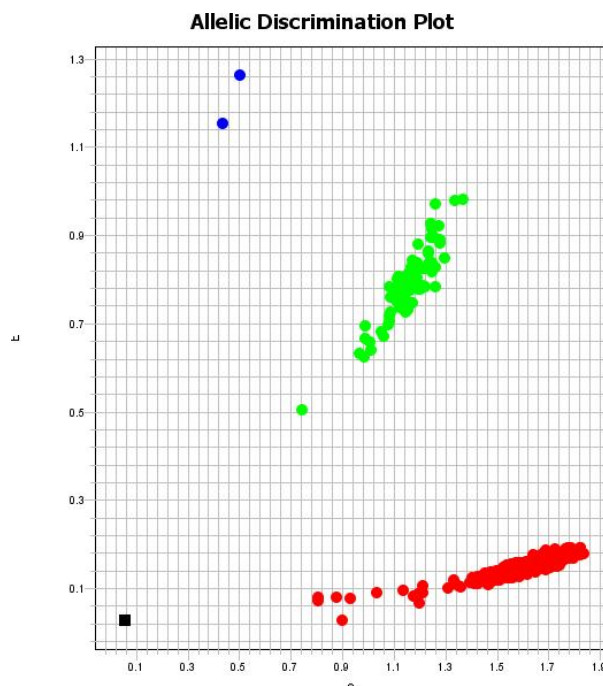
Tabela XII: Primerjave fenotipov, genotipov in specifičnost reakcij za alela *RHCE**C** in *RHCE**c** iz gDNA (sonda MGB).

serologija RhC in Rhc		genotipizacija <i>RHCE*<i>Cc</i></i> (<i>RHC_48C</i> in <i>RHc_178_203</i>)	
fenotip	št. vzorcev	genotip	specifičnost (%)
RhC+c-	4	<i>RHCE*<i>CC</i></i>	100
RhC+c+	4	<i>RHCE*<i>Cc</i></i>	100
RhC-c+	4	<i>RHCE*<i>cc</i></i>	100
skupaj 12		skupaj 100	

4.2.2 Specifičnost reakcij PCR v realnem času za določitev alelov *RHCE*E* in *RHCE*e* iz genomske DNA z metodo alelne diskriminacije

Pri optimizaciji reakcij qPCR za določitev alelov *RHCE*E* in *RHCE*e* smo za kontrolne vzorce uporabili gDNA 155 tipiziranih krvodajalcev, katerih podatki o njihovem fenotipu so zbrani v Registru tipiziranih krvodajalcev na ZTM. Med 155 vzorci je bilo 114 (73,5 %) RhD-pozitivnih in 41 (26,5 %) RhD-negativnih. Od tega je bilo 39 (25,16 %) RhE-pozitivnih in 114 (99,35 %) Rhe-pozitivnih krvodajalcev.

Za potrditev prisotnosti alela *RHCE*E* smo določili vrednosti $Cq \leq 30$ in $Th = 0,044$, za potrditev prisotnosti alela *RHCE*e* pa $Cq \leq 33$ in $Th = 0,04$. Bazna linija za oba alela je bila od 3 do 15 ciklov. Rezultati genotipizacije so se popolnoma ujemali z rezultati serološko določenih Ag RhE in Rhe. Graf alelne diskriminacije je prikazan na *Sliki 10*. Rezultati primerjave fenotipov, genotipov in odstotkov specifičnosti so prikazani v *Tabeli XIII*.



Slika 10: Graf alelne diskriminacije za genotip *RHCE*Ee* iz gDNA (sonda MGB). Modri krogi predstavljajo homozigote za alel *RHCE*E*, zeleni krogi predstavljajo heterozigote za alela *RHCE*E* in *RHCE*e*, rdeči krogi predstavljajo homozigote za alel *RHCE*e*. Črn kvadrat predstavlja vzorec brez DNA (voda).

Tabela XIII: Primerjava fenotipov, genotipov in specifičnost reakcij za genotip *RHCE*Ee* iz gDNA.

serologija RhE in Rhe		genotipizacija <i>RHCE*Ee</i> (<i>RHeE_676</i>)	
fenotip	št. vzorcev	genotip	specifičnost (%)
RhE+e-	1	<i>RH*EE</i>	100
RhE+e+	38	<i>RH*Ee</i>	100
RhE-e+	116	<i>RH*ee</i>	100
	skupaj 155		skupaj 100

4.2.3 Občutljivost reakcij PCR v realnem času za določitev genotipa *RHCE* iz genomske DNA

S pripravo standardnih krivulj za alele KS sistema *RHCE* smo določili občutljivost reakcij qPCR. Pri tem smo uporabili komercialno humano gDNA moškega z genotipom *RHCE*Cc* in *RHCE*Ee*. DNA smo redčili v redčitveni vrsti 1:10 in pripravili 7 redčenj. Začetna koncentracija DNA je bila 227 µg/mL. Za reakcijo qPCR smo uporabili 5 µL gDNA (16).

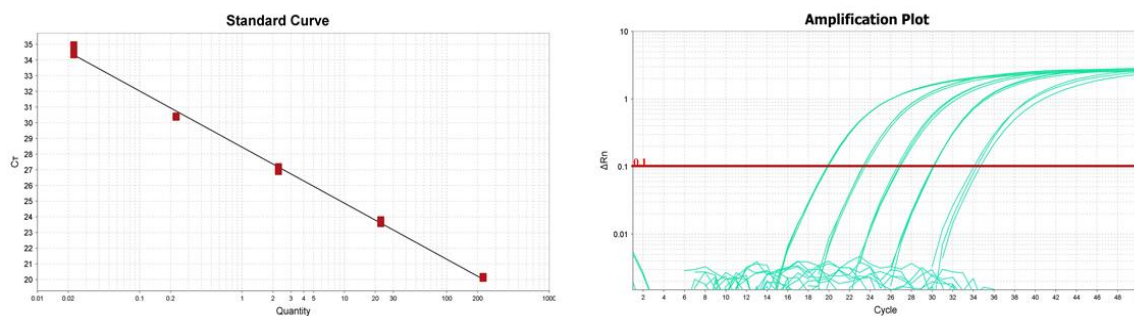
Zanesljiv signal smo pri vseh reakcijah zasledili pri redčenju 1:10.000 (S5), torej je za tega zadostovalo 113,5 pg (0,0227 ng/µl) DNA. Količine gDNA v reakcijah qPCR so prikazane v **Tabeli XIV**.

Tabela XIV: Količine gDNA v reakcijah qPCR za pripravo standardnih krivulj.

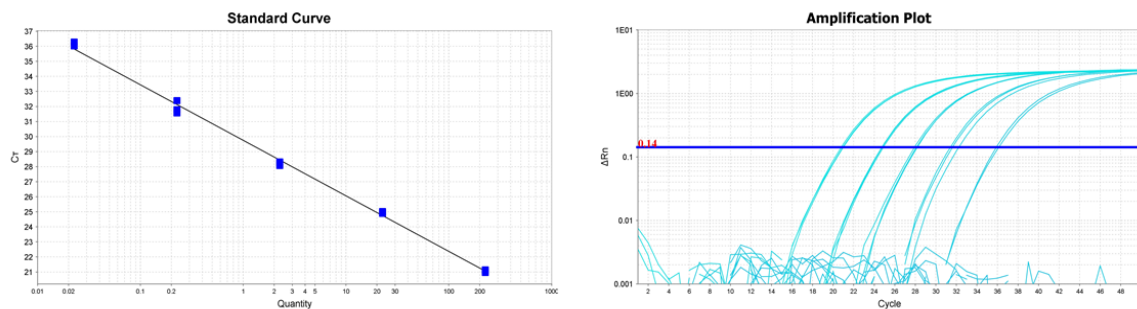
Vzorec	Začetna konc. DNA (ng/ μ l)	Količina DNA v reakciji qPCR (pg)
S1	227	1135.000
S2	22,7	113.500
S3	2,27	11.350
S4	0,227	1.135
S5	0,0227	113,5
S6	0,00227	(negativen rezultat)
S7	0,000227	(negativen rezultat)
S8	0,0000227	(negativen rezultat)

Standardne krivulje in grafe pomnoževanja za alele *RHCE**C, *RHCE**c, *RHCE**E in *RHCE**e prikazuje *Slika 11*.

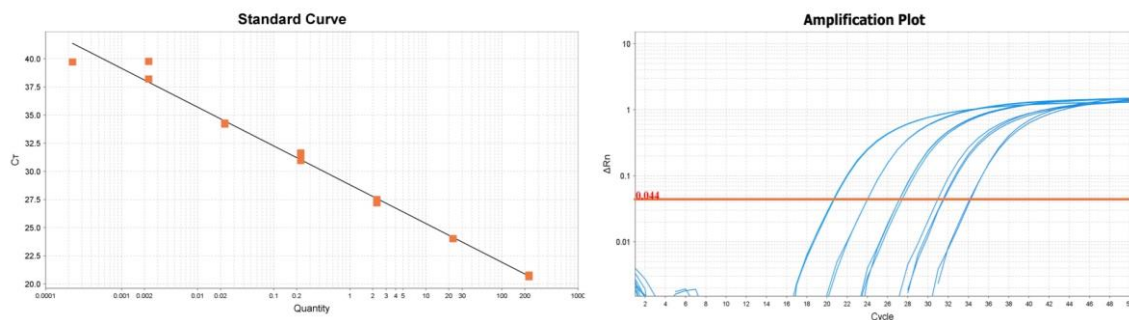
RHCE*C (RHC_48C)



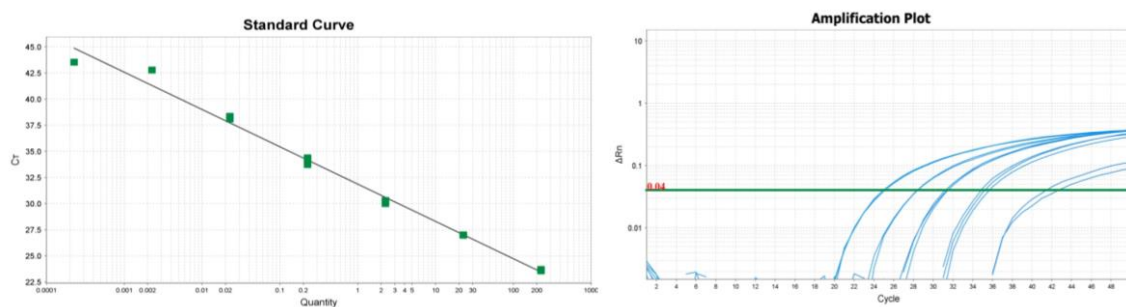
RHCE*c (RHc_178_203)



RHCE*E (RHeE_676_M (E))



RHCE*e (RHeE_676_V (e))



Slika 11: Standardne krivulje in grafi pomnoževanja za alele RHCE*C, RHCE*c, RHCE*E in RHCE*e (sonda MGB).

*Na levi strani slike so prikazane standardne krivulje, na desni strani so prikazani grafi pomnoževanja za alele RHCE*C (1. vrsta), RHCE*c (2. vrsta), RHCE*E (3. vrsta) in RHCE*e (4. vrsta).*

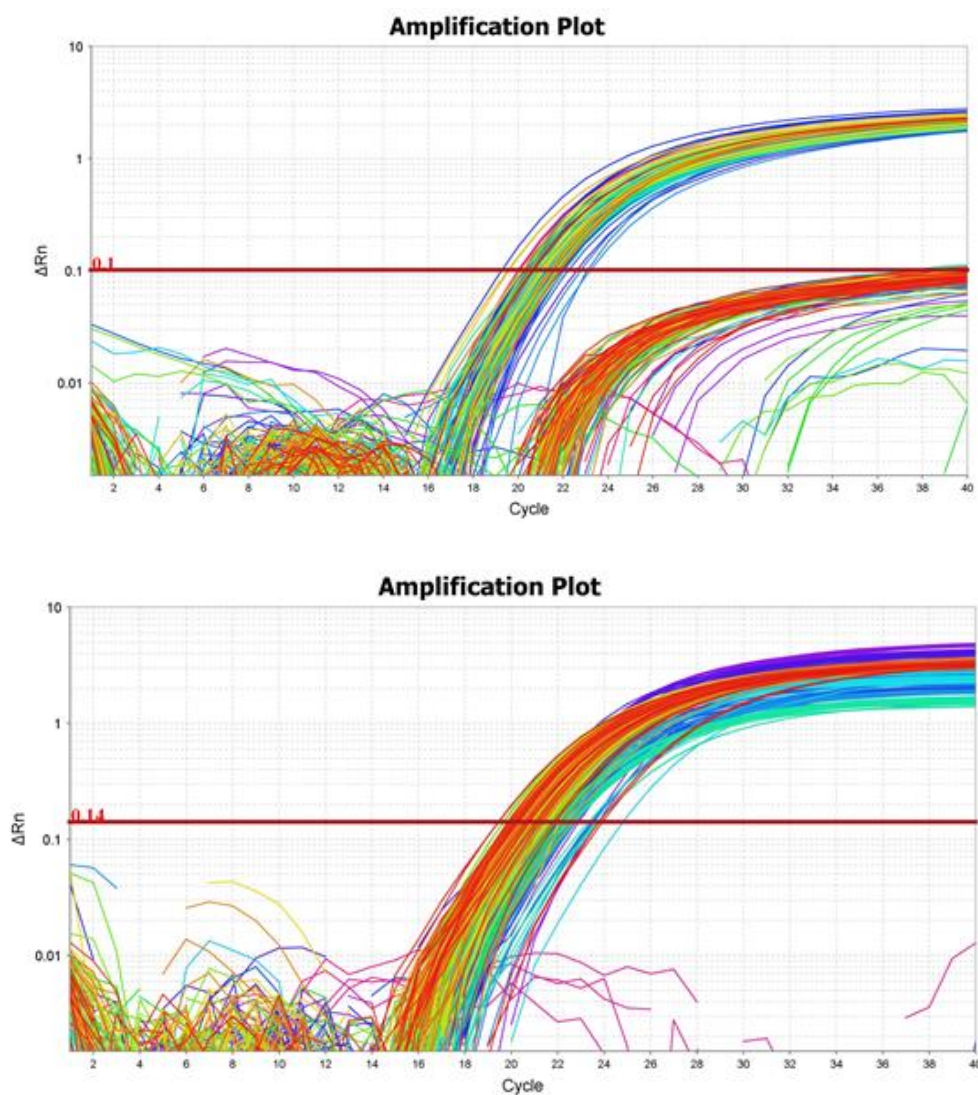
V **Tabeli XV** so podane vrednosti učinkovitosti pomnoževanja (E), koeficient determinacije (R^2) in naklon krivulje (k). Najvišjo učinkovitost smo dobili pri testiranju alela $RHCE^*E$ (95,04 %), najnižjo pa pri alelu $RHCE^*c$ (86,65 %).

Tabela XV: Učinkovitost pomnoževanje (E) alelov $RHCE^*C$, $RHCE^*c$, $RHCE^*E$ in $RHCE^*e$, koeficient determinacije (R^2) in naklon krivulje (k).

	Alel (ime)			
	$RHCE^*C$ (<i>RHC_48_C</i>)	$RHCE^*c$ (<i>RHc_178_203</i>)	$RHCE^*E$ (<i>RHeE_676_M (E)</i>)	$RHCE^*e$ (<i>RheE_676_V (e)</i>)
E (%)	90,49	86,65	95,04	90,72
R^2	0,99	0,99	0,99	0,99
k	-3,57	-3,69	-3,45	-3,57

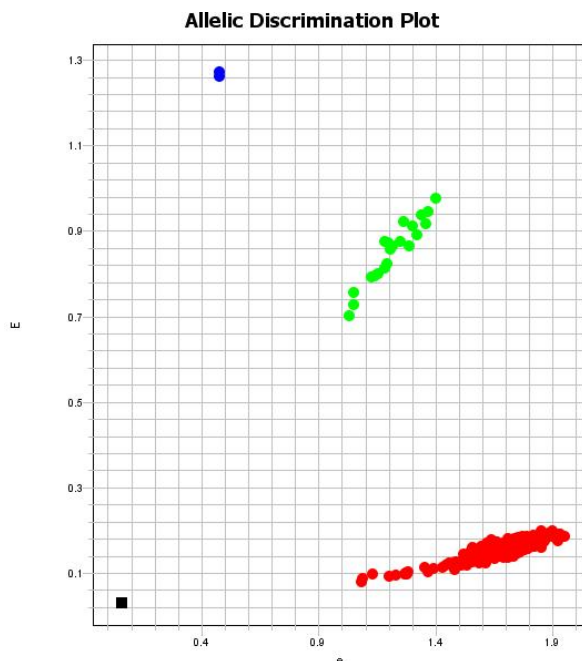
4.2.4 Določitev genotipa $RHCE$ nosečnic in novorojencev iz genomske DNA

Iz vzorcev periferne in popkovnične krvi smo izolirali gDNA in s postavljeno metodo qPCR določili genotip $RHCE$ 71 RhD-negativnim nosečnicam in 72 novorojencem, katerih vzorce smo lahko dobili glede na Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji. Poiskali smo pare (nosečnica negativna, plod pozitiven), ki smo jih testirali v nadaljevanju naše študije. Pri tem smo upoštevali prej določene parametre Cq, Th in bazno linijo. **Slika 12** prikazuje grafa pomnoževanja alelov $RhCE^*C$, $RHCE^*c$, **Slika 13** pa določitev genotipa $RHCE^*Ee$ iz gDNA nosečnic in novorojencev.



Slika 12: Graf pomnoževanja alelov $RHCE^*C$ (zgoraj) in $RHCE^*c$ (spodaj) iz gDNA nosečnic in novorojencev (sonda MGB).

Zgornja slika prikazuje značilne krivulje pomnoževanja za alel $RHCE^*C$, spodnja pa značilne krivulje pomnoževanja za alel $RHCE^*c$.



Slika 13: Graf alelne diskriminacije za alel *RHCE*E* in alel *RHCE*e* iz gDNA nosečnic in novorojencev (sonda MGB).

Z modrimi pikami so prikazani homozigoti za alel *RHCE*E*, z zeleno heterozigoti, z rdečo homozigoti za alel *RHCE*e* in s črno vzorec brez DNA (voda).

Število parov, ko je bila nosečnica negativna, novorojenec pa pozitiven za testiran alel, je prikazano v **Tabeli XVI**. Te pare smo testirali v nadaljevanju naše študije.

Tabela XVI: Rezultati genotipizacije *RHCE* – nosečnica negativna, novorojenec pozitiven za testirani alel.

		nosečnica negativna, novorojenec pozitiven za alel		
		<i>RHCE*C</i>	<i>RHCE*c</i>	<i>RHCE*E</i>
št. parov		28	0	9

4.3 Reakcije PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz zunajcelične DNA z metodo ekspresije

4.3.1 Specifičnost reakcij PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz zunajcelične DNA

Za določitev prisotnosti plodovih alelov *RHCE*C*, *RHCE*c* in *RHCE*E* iz zcp-DNA smo uporabili v literaturi objavljene začetne oligonukleotide in sonde (62, 63). Kot kontrolne

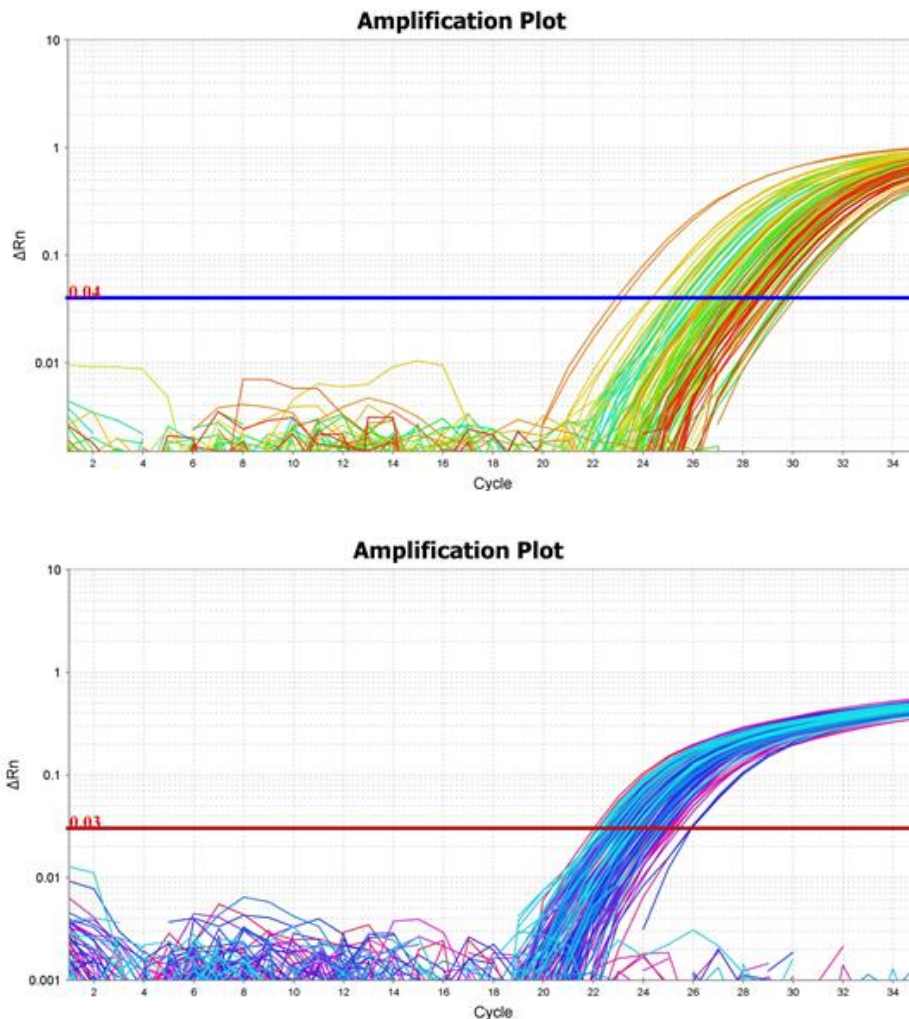
Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

vzorke za optimizacijo reakcij qPCR v namene neinvazivne prenatalne diagnostike smo uporabili del vzorcev zc-DNA nosečnic, katerih fenotip RhCE novorojencev smo poznali, in redčene vzorce gDNA krvodajalcev iz Registra tipiziranih krvodajalcev (redčenje 1:10.000). Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sond smo optimizirali ter izbrali optimalno koncentracijo sond 250 nM in koncentracijo začetnih oligonukleotidov 600 nM.

Za kontrolo specifičnosti smo za kontrolne vzorce uporabili tudi gDNA 155 tipiziranih krvodajalcev, katerih podatki o njihovem fenotipu so zbrani v Registru tipiziranih krvodajalcev na ZTM. Med 155 vzorci je bilo 114 (73,5 %) RhD-pozitivnih in 41 (26,5 %) RhD-negativnih. Od tega so bili 103 (66,5 %) RhC-pozitivnih, 118 (76,1 %) Rhc-pozitivnih, 39 (25,16 %) RhE-pozitivnih in 154 (99,35 %) Rhe-pozitivnih krvodajalcev.

Za potrditev prisotnosti alela *RHCE**C iz gDNA smo določili $Cq \leq 30$ in $Th = 0,04$. Za alel *RHCE**c smo določili vrednosti $Cq \leq 30$ in $Th = 0,03$. Za potrditev prisotnosti alela *RHCE**E iz gDNA smo določili vrednost $Cq \leq 29$ in $Th = 0,04$. Bazna linija za vse alele je bila od 3 do 15 ciklov. Grafa pomnoževanja za alel *RHCE**C in *RHCE**c sta prikazana na **Sliki 14**, rezultati primerjave fenotipov, genotipov in odstotkov specifičnosti pa v **Tabeli XVII**.

Rezultati genotipizacije kontrolnih vzorcev so se povsem ujemali z rezultati serološko določenih fenotipov RhCE.



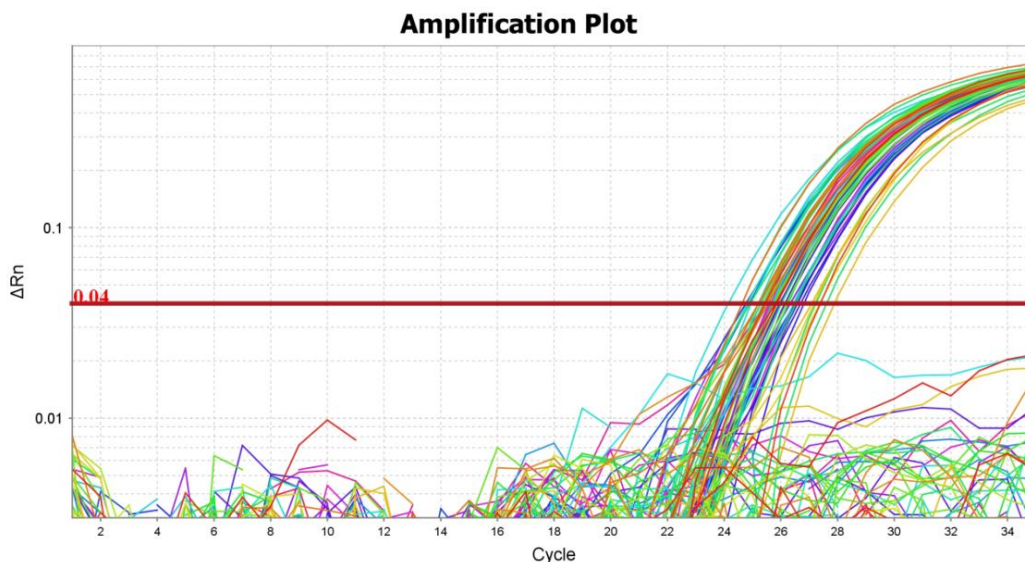
Slika 14: Graf pomnoževanja za alel $RHCE^*C$ (zgoraj) in alel $RHCE^*c$ (spodaj) iz gDNA (sonda TAMRA).

Zgornja slika prikazuje krivulje pomnoževanja alela $RHCE^*C$, spodnja slika pa krivulje pomnoževanja alela $RHCE^*c$ iz gDNA.

Tabela XVII: Primerjave fenotipov, genotipov in specifičnost reakcij $RHCE^*C$ in $RHCE^*c$.

serologija RhC in Rhc		genotipizacija $RHCE^*Cc$ ($RH_big_C_KF$ in $RH_small_c_KF$)	
fenotip	št. vzorcev	genotip	specifičnost (%)
RhC+c-	37	$RHCE^*CC$	100
RhC+c+	66	$RHCE^*Cc$	100
RhCE-c+	52	$RHCE^*cc$	100
skupaj 155			skupaj 100

Graf pomnoževanja za alel *RHCE*E* je prikazan na **Sliki 15**. Reakcijo qPCR za alel *RHCE*E* (*RH_big_E_KF*) smo testirali na istih vzorcih gDNA (glej **Tabelo XIII**) in dosegli 100 % specifičnost.



Slika 15: Graf pomnoževanja za alel *RHCE*E* iz gDNA (sonda TAMRA).

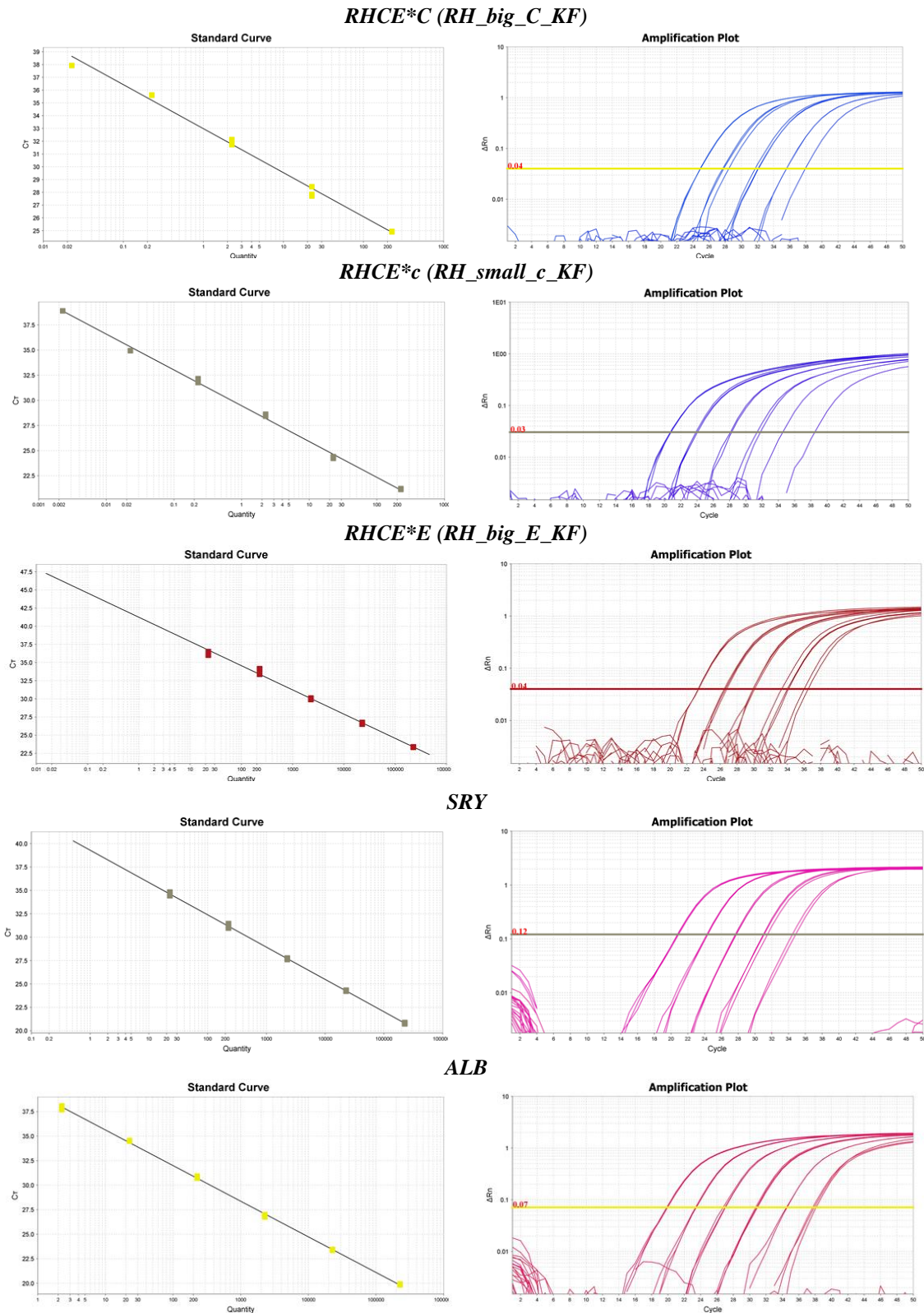
4.3.2 Občutljivost reakcij PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz zunajcelične DNA

S pripravo standardnih krivulj za vse testirane gene smo določili občutljivost posameznih reakcij qPCR. Pri tem smo uporabili komercialno humano gDNA moškega in DNA redčili v redčitveni vrsti 1:10. Količine gDNA v reakcijah qPCR so prikazane v **Tabeli XVIII**. Za reakcijo qPCR smo uporabili 5 μ L gDNA (16). Zanesljiv signal smo pri vseh reakcijah (razen *ALB*) zasledili pri redčenju 1:10.000 (S5), torej je za le-tega tako zadostovalo 113,5 pg (0,0227 ng/ μ L) DNA. Pri reakciji za gen *ALB* smo zanesljiv signal zasledili še pri redčenju 1:10.0000 (S6), torej je za le-tega zadostovalo 11,35 pg (0,00227 ng/ μ L) DNA.

Tabela XVIII: Količine gDNA v reakcijah qPCR za pripravo standardnih krivulj za alele RHCE*C, RHCE*c, RHCE*E ter genov SRY in ALB.

Vzorec	Začetna konc. DNA (ng/ μ l)	Količina DNA v reakciji qPCR (pg)
S1	227	1.135.000
S2	22,7	113.500
S3	2,27	11.350
S4	0,227	1.135
S5	0,0227	113,5
S6	0,00227	11,35
S7	0,000227	(negativen rezultat)
S8	0,0000227	(negativen rezultat)

Standardne krivulje in grafe pomnoževanja za alele *RHCE*C*, *RHCE*c*, *RHCE*E* ter genov *SRY* in *ALB* prikazuje **Slika 16**.



Slika 16: Standardne krivulje za alele $RHCE^*C$, $RHCE^*c$ in $RHCE^*E$ (sonda TAMRA) ter gena SRY in ALB.

Na levi strani slike so prikazane standardne krivulje, na desni strani pa grafi pomnoževanja za alele $RHCE^*C$ (1. vrsta), $RHCE^*c$ (2. vrsta), $RHCE^*E$ (3. vrsta) in gena SRY (4. vrsta) ter ALB (5. vrsta).

V **Tabeli XIX** so podane vrednosti učinkovitosti pomnoževanja (E), koeficient determinacije (R^2) in naklon krivulje (s). Najvišjo učinkovitost pri testiranju alelov KS sistema RhCE smo dobili pri alelu *RHCE*E* (99,54 %), najnižjo pa pri alelu *RHCE*c* (90,89 %).

Tabela XIX: Učinkovitost pomnoževanja (E) alelov *RHCE*C*, *RHCE*c* *RHCE*E* (sonda TAMRA) in genov *SRY* ter *ALB*, koeficient determinacije (R^2) in naklon krivulje (k).

	Alel oz. gen (ime)				
	<i>RHCE*C</i> (<i>RH_big_C_KF</i>)	<i>RHCE*c</i> (<i>RH_small_c_KF</i>)	<i>RHCE*E</i> (<i>RH_big_E_KF</i>)	<i>SRY</i>	<i>ALB</i>
E (%)	95,2	90,89	99,54	94,87	88,64
R²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
k	-3,44	-3,56	-3,33	-3,45	-3,63

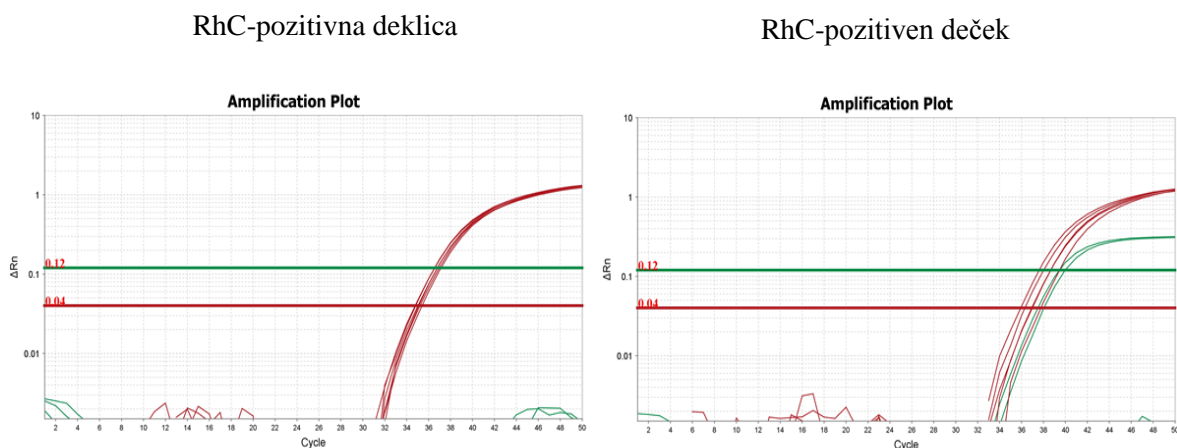
4.3.3 Določitev plodovega genotipa *RHCE* iz zunajcelične DNA

Za preverjanje ustreznosti optimiziranih reakcij qPCR v prenatalne namene in za izdelavo strategije za zanesljivo določitev plodovega alela KS sistema RhCE smo testirali vse pare nosečnica-novorojenec, kjer je bila nosečnica negativna, novorojenec pa pozitiven za testirani alel. Za alel *RHCE*C* je bilo takih parov 28, za alel *RHCE*E* 9, za alel *RHCE*c* pa nismo našli ustreznega para (**Tabela XIV**). Pri vseh testih smo kot negativne kontrole uporabili zc-DNA nosečnic, ki so bile tako kot njihovi novorojenci negativne za testirani alel. Vse vzorce smo tudi testirali na prisotnost gena *SRY*, ki določa spol, saj smo tako lahko dodatno potrdili prisotnost zcp-DNA. Za potrditev uspešne osamitve zc-DNA smo določili še prisotnost gena *ALB*.

Za potrditev prisotnosti gena *SRY* iz zc-DNA smo določili $Cq \leq 42$ in $Th = 0,12$; pozitivni sta morala biti vsaj dve reakciji od treh. Če je pozitivna ena reakcija, je potrebno testiranje ponoviti. Za določitev prisotnosti gena *ALB* smo določili $Cq \leq 42$ in $Th = 0,07$. Bazna linija za oba gena je bila od 3 do 15 ciklov.

4.3.3.1 Določitev plodovega alela *RHCE**C iz zunajcelične DNA

Za potrditev prisotnosti plodovega alela *RHCE**C iz zc-DNA smo določili $Cq \leq 42$ in $Th = 0,04$. Bazna linija je bila od 3 do 15 ciklov. Za potrditev prisotnosti plodovega alela *RHCE**C mora biti $Cq \leq 42$ v vsaj štirih od šestih reakcij. V primeru ene do treh pozitivnih reakcij je potrebno testiranje v celoti ponoviti. Grafa pomnoževanja za alel *RHCE**C in gen *SRY* iz vzorcev zc-DNA prikazuje **Slika 17**.



Slika 17: Grafi pomnoževanja za alela *RHCEC in gena *SRY* v vzorcih zc-DNA.**

Na grafih so prikazani primeri krivulj pomnoževanja za alel *RHCE**C (vijolično) in gen *SRY* (zeleno) v primeru RhC-pozitivne deklice (levo) ter RhC-pozitivnega dečka (desno).

Iz vzorcev zamrznjene plazme 28 RhD-negativnih nosečnic, ki so bile negativne, njihov novorojenec pa pozitiven za alel *RHCE**C, in so jih na ZTM shranili od 48 do 72 ur po odvzemu krvi, smo osamili zc-DNA in jo do uporabe shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Šestindvajset nosečnic (92,9 %) je bilo v prvem (11; 39,3 %) in drugem trimesečju (15; 53,6 %) nosečnosti. V tretjem trimesečju sta bili dve nosečnici (7,1 %). Med novorojenci je bilo 16 (57,1 %) dečkov in 12 (42,9 %) deklic.

Rezultati genotipizacij z reakcijami qPCR iz zc-DNA nosečnic se niso popolnoma ujemali z rezultati genotipizacij z reakcijami qPCR iz gDNA novorojencev. Pri petih vzorcih (17,6 %; dva vzorca 8. teden nosečnosti, po en vzorec 9., 15. in 29. teden nosečnosti) število pozitivnih reakcij za alel *RHCE**C in/ali gen *SRY* ni ustrezalo našim kriterijem oz. strategiji, ki smo jo postavili glede na večino dobljenih rezultatov. Ponovnega testiranja nismo mogli izvesti zaradi pomanjkanja vzorca plazme nosečnice. Vzorce smo izključili iz nadaljnje obravnave. Pri dveh od 23 končno obravnavanih vzorcev (8,7 %; 8. in 16. teden

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic (nosečnosti), kjer smo napačno predvideli, da plod nima prisotnega alela *RHCE*C* (vseh šest reakcij negativnih), sta bili novorojenki deklici; tako nismo mogli potrditi prisotnosti zcp-DNA v vzorcih (reakcije qPCR za določitev gena *SRY*, ki določa spol, so bile negativne).

Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE*C* je bila v prvem trimesečju nosečnosti 87,5, v drugem trimesečju pa 92,6 %. Za določitev prisotnosti plodovega alela *RHCE*C* v zadnjem trimesečju nosečnosti smo testirali le en vzorec. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE*C* v zadnjem trimesečju je bila 100 %. Zanesljivost genotipizacije glede na vse testirane vzorce je bila 91,3 %. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega gena *SRY* je bila 100 % v vseh trimesečjih nosečnosti.

V **Tabeli XX** so zbrani podatki o predvideni plodovi KS RhC in spolu ter zanesljivost genotipizacije ploda z reakcijami qPCR.

Tabela XX: Predvidena plodova KS RhC in spol ter zanesljivost genotipizacije ploda za alel *RHCE*C* in gen *SRY* z reakcijami qPCR iz plazme nosečnic.

Teden nosečnosti	Novorojenec			Predviden plodov Ag RhC in spol				Zanesljivost genotipizacije (%)	
	RhC- pozitiven	spol		<i>RHCE*C</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*C</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*C</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*C</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*C</i>	<i>SRY</i>
		Moški	Ženska						
≤14	8	4	4	7	0	1	0	87,5	100
15-28	14	7	7	13	0	1	0	92,6	100
29-42	1	1	0	1	0	0	0	100	100
Skupaj	23	12	11	21	0	2	0	91,3	100

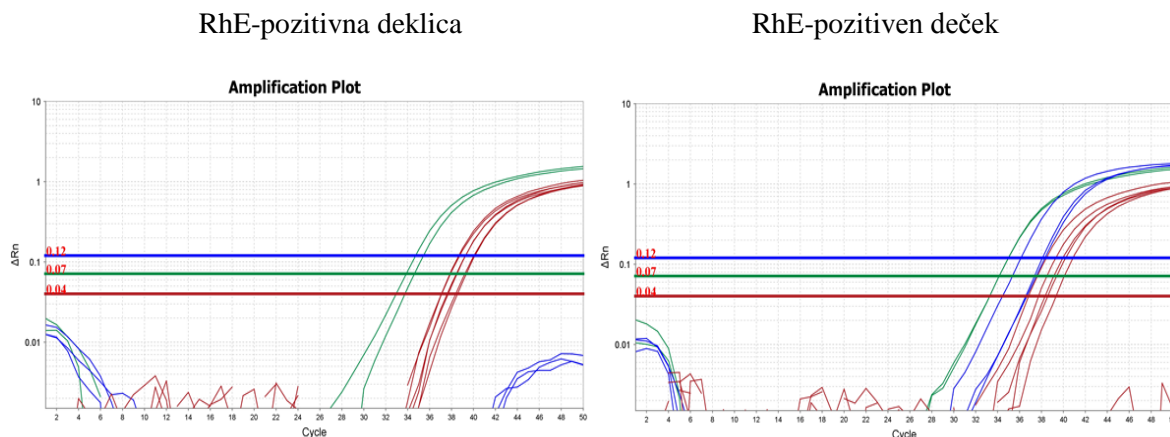
Zelena barva v tabeli prikazuje pravilno, rdeča pa nepravilno določitev iskanega alela oz. gena.

4.3.3.2 Določitev plodovega alela *RHCE*E* iz zunajcelične DNA

Za potrditev prisotnosti plodovega alela *RHCE*E* iz zc-DNA smo določili $Cq \leq 42$ in $Th = 0,04$. Bazna linija je bila od 3 do 15 ciklov. Za potrditev prisotnosti plodovega alela *RHCE*E* mora biti $Cq \leq 42$ v vsaj štirih od šestih reakcij. V primeru ene do treh pozitivnih

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

reakcij je potrebno testiranje v celoti ponoviti. Grafi pomnoževanja za alel *RHCE*E*, gena *SRY* in *ALB* iz vzorcev zc-DNA prikazuje **Slika 18**.



Slika 18: Grafi pomnoževanja alela *RHCE*E* ter genov *SRY* in *ALB* v vzorcih zc-DNA. Na grafih so prikazani primeri krivulj pomnoževanja za alel *RHCE*E* (vijolično), gen *SRY* (modro) in gen *ALB* (zeleno) v primeru RhE-pozitivne deklice (levo) ter RhE-pozitivnega dečka (desno).

Iz vzorcev zamrznjene plazme 9 RhD-negativnih nosečnic, ki so bile negativne, njihov novorojenec pa pozitiven za alel *RHCE*E*, in so jih na ZTM shranili od 48 do 72 ur po odvzemu krvi, smo osamili zc-DNA in jo do uporabe shranili pri -20°C . Vse nosečnice so bile v prvem (8; 88,9 %) in drugem trimesečju (1; 11,1 %) nosečnosti. Med novorojenci so bili 4 (44,4 %) dečki in 5 (55,6 %) deklic.

Rezultati genotipizacij z reakcijami qPCR iz zc-DNA nosečnic se niso popolnoma ujemali z rezultati genotipizacij z reakcijami qPCR iz gDNA novorojencev. V enem vzorcu (11,1 %; 13. teden nosečnosti) število pozitivnih reakcij za alel *RHCE*E* ni ustrezalo našim kriterijem oz. strategiji, ki smo jo postavili glede na večino dobljenih rezultatov. Ponovnega testiranja nismo mogli izvesti zaradi pomanjkanja vzorca plazme nosečnice. Vzorec smo izključili iz nadaljnje obravnave.

Pri enem od osmih končno obravnavanih vzorcev (12,5 %; 26. teden nosečnosti), kjer smo napačno predvideli, da plod nima prisotnega alela *RHCE*E* (vseh šest reakcij negativnih), je bila novorojenka deklica; tako v vzorcu nismo mogli potrditi prisotnosti zcp-DNA (reakcije qPCR za določitev gena *SRY*, ki določa spol, so bile negativne).

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE*E* je bila v prvem trimesečju nosečnosti 100 %. Za določitev prisotnosti plodovega alela *RHCE*E* v drugem trimesečju nosečnosti smo testirali le en vzorec. Zaradi lažno negativnih rezultatov je bila zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE*E* 0 %. Zanesljivost genotipizacije glede na vse testirane vzorce je bila 87,5 %. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega gena *SRY* je bila 100 % v obeh prvih dveh trimesečjih nosečnosti.

V **Tabeli XXI** so zbrani podatki o predvideni plodovi KS RhE in spolu ter zanesljivost genotipizacije ploda z reakcijami qPCR.

Tabela XXI: Predvidena plodova KS RhE in spol ter zanesljivost genotipizacije ploda za alel *RHCE*E* in gen *SRY* z reakcijami qPCR iz plazme nosečnic.

Teden nosečnosti	Novorojenec		Predviden plodov Ag RhE in spol				Zanesljivost genotipizacije (%)		
	RhE-pozitiven	spol		<i>RHCE*E</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*E</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*E</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*E</i> <i>SRY</i>	<i>RHCE*E</i>	<i>SRY</i>
		Moški	Ženska						
≤14	7	4	3	7	0	0	0	100	100
15-28	1	0	1	0	0	1	0	0	100
29-42	0	/	/	/	/	/	/	/	/
Skupaj	8	4	4	7	0	1	0	87,5	100

Zelena barva v tabeli prikazuje pravilno, rdeča pa nepravilno iskanega alel oz. gena.

Mediane vrednosti in razpon vrednosti Cq za reakcije qPCR iz zc-DNA nosečnic so prikazane v **Tabeli XXII**.

Tabela XXII: Mediane vrednosti ter razpon vrednosti Cq za alela *RHCE*C*, *RHCE*E* in gena *SRY* ter *ALB* za določitev plodovega genotipa iz zc-DNA.

Alel/gen	Mediana in razpon vrednosti Cq
<i>RHCE*C</i>	37,18 (34,78–41,21)
<i>RHCE*E</i>	37,84 (36,21–41,29)
<i>SRY</i>	39,44 (36,41–41,89)
<i>ALB</i>	32,84 (25,83–35,21)

4.3.3.3 Določitev plodovega genotipa RHCE pri imuniziranih nosečnicah

V zadnji fazi smo izdelano strategijo za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz periferne krvi nosečnic testirali na 21 imuniziranih nosečnicah, ki so imele protitelesa anti-RhC (4), anti-Rhc (2) in anti-RhE (15). Iz vzorcev zamrznjene plazme vseh imuniziranih nosečnic, ki so jih na ZTM shranili od 48 do 96 ur po odvzemu krvi, smo osamili zc-DNA in jo do uporabe shranili pri -20 °C. Vse nosečnice so bile v drugem (19; 90,5 %) in tretjem trimesečju (2; 9,5 %) nosečnosti. Od 6 (28,6 %) nosečnic smo pridobili več vzorcev periferne krvi v različnih tednih nosečnosti. Po rojstvu otrok smo pridobili podatke o serološko določenem fenotipu in spolu otroka le za 8 novorojencev, in sicer za RhC pri dveh in za RhE pri šestih otrocih. V vseh osmih primerih smo pravilno napovedali spol ploda in prisotnost alela *RHCE**C (*Tabela XXIII*) in alela *RHCE**E (*Tabela XXIV*).

Tabela XXIII: Predvidena plodova KS RhCE in spol ter zanesljivost genotipizacije za alel RHCE*C in gen SRY z reakcijami qPCR iz vzorcev plazme imuniziranih nosečnic.

		Predvidena plodova KS RhC in spol				Zanesljivost genotipizacije <i>RHCE</i> *C in <i>SRY</i> (%)
		RhC-pozitivna		RhC-negativna		
		Spol		Spol		
Teden nosečnosti	Število vzorcev	Moški	Ženski	Moški	Ženski	
15–28	2	0	1	0	1	100
Skupaj	2	0 (0 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	1 (100 %)	100
		1 (50 %)		1 (50 %)		

Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE**C in gena *SRY* je bila 100 %. V primeru ene nosečnice s protitelesi anti-RhC, za katero nismo imeli podatkov o fenotipu RhCE in spolu otroka, smo glede na sprejeto strategijo pri določitvi plodovega genotipa iz periferne krvi z reakcijami qPCR predvideli, da je plod RhC-negativen, deklica. Pri drugem primeru pa kljub testiranju iz več vzorcev, odvzetih v drugem trimesečju nosečnosti, nismo mogli dokončno predvideti plodove KS RhC. Število pozitivnih reakcij

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic

za alel *RHCE**C ni ustrezalo naši strategiji. Ponovnega testiranja nismo mogli izvesti, saj nismo imeli dodatnih vzorcev plazme nosečnice.

V primeru dveh nosečnic s protitelesi anti-Rhc, za kateri nismo imeli podatkov o fenotipu RhCE in spolu otroka, nismo mogli dokončno predvideti plodove KS Rhc, saj število pozitivnih reakcij za alel *RHCE**c ni ustrezalo naši strategiji. V enem primeru končne odločitve nismo mogli sprejeti, kljub temu da smo testirali dva različna vzorca, odvzeta v drugem trimesečju nosečnosti. Ponovnega testiranja nismo mogli izvesti, saj nismo imeli dodatnih vzorcev plazme nosečnic.

Tabela XXIV: Predvidena plodova KS RhCE in spol ter zanesljivost genotipizacije za alel *RHCEE in gen *SRY* z reakcijami qPCR iz vzorcev plazme imuniziranih nosečnic**

		Predvidena plodova KS RhE in spol				Zanesljivost genotipizacije <i>RHCE</i> *E in <i>SRY</i> (%)
		RhE-pozitivna		RhE-negativna		
		Spol		Spol		
Teden nosečnosti	Število vzorcev	Moški	Ženski	Moški	Ženski	
15–28	1	0	1	0	0	100
29–42	5	0	1	2	2	100
Skupaj	6	0 (0 %)	2 (100 %)	2 (50 %)	2 (50 %)	100
		2 (33,3 %)		4 (66,7 %)		

Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE**E in gena *SRY* je bila 100 %. V primeru štirih nosečnic s protitelesi anti-RhE, za katere nismo imeli podatkov o fenotipu RhCE in spolu otroka, smo glede na sprejeto strategijo pri določitvi plodovega genotipa iz periferne krvi z reakcijami qPCR predvideli, da je plod RhE-pozitiven, deklica. V primeru ene nosečnice smo predvideli, da je plod RhE-pozitiven, deček, pri eni pa, da je plod RhE-negativen, deklica. Pri treh nosečnicah nismo mogli dokončno predvideti plodove KS RhE, saj število pozitivnih reakcij za alel *RHCE**E ni ustrezalo naši strategiji.

5 RAZPRAVA

Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka nastane zaradi protiteles, ki jih mati tvori proti Ag, ki jih sama nima, plod pa jih je podedoval po očetu. Pogost razlog za nastanek HBPN je tvorba protiteles proti Ag KS sistema RhCE kot posledica prejšnjih nosečnosti ali transfuzij neskladne krvi. Materina aloprotitelesa se vežejo na plodove eritrocite in jih hemolizirajo (2, 5, 6). V KS sistemu Rh poleg protiteles anti-RhD HBPN najpogosteje povzročajo protitelesa anti-Rhc (16 %), anti-RhC (6 %) in anti-RhE (48 %) (5, 6), mogoča pa je tudi kombinacija prisotnosti več protiteles, npr. najpogostejša je kombinacija anti-Rhc in anti-RhE (24,5 %) (13). V sklopu prenatalne diagnostike danes vsem nosečnicam do 12. tedna nosečnosti določimo KS ABO, RhD in Kell. Hkrati z ICT določimo prisotnost morebitnih eritrocitnih protiteles v serumu nosečnice (15).

Preventivna zaščita z ustreznimi protitelesi IgG, kot jo poznamo za KS RhD (IgG anti-RhD), za preostale KS sisteme RhCE zaenkrat ni mogoča. Vendar je kljub temu smiselno določiti plodov genotip, saj lahko ob poznavanju neskladja med nosečnico in plodom pravilno vodimo nosečnost. Do nedavnega so za določitev plodovega genotipa bili na razpolago le invazivni postopki, novejši pristopi pa nam omogočajo določitev plodovega genotipa iz periferne krvi nosečnice (2, 15, 16). Leta 1997 je Lo s sod. v plazmi in serumu nosečnic dokazal prisotnost zcp-DNA (40), kar je omogočilo razvoj neinvazivne prenatalne diagnostike (41). Zaenkrat pa obstaja le malo študij za neinvazivno določitev plodovega genotipa *RHCE* (69).

5.1 Krvnoskupinski sistem RhCE

Med klinično najpomembnejšimi Ag KS Rh so Ag RhD, RhC, Rhc, RhE in Rhe (1, 4, 17), ki se nahajajo na dveh zelo podobnih transmembranskih proteinih RhD in RhCE, ki se med seboj razlikujeta v 31–35 AK (4, 17). Proteina kodirata tesno povezana gena *RHD* in *RHCE* (17), sestavljena iz po 10 eksonov in intronov, med njima pa obstaja kar 93,8 % identičnost (4, 29). Antitetična alela *RHCE**C in *RHCE**c ter alela *RHCE**E in *RHCE**e sta nastala zaradi SNP. Za načrtovanje reakcij PCR je potrebno upoštevati strukturne in

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic
nukleotidne razlike med genoma *RHD* in *RHCE* ter mesta nastankov SNP za posamezne
alele.

5.2 Reakcije PCR v realnem času za določitev genotipa *RHCE* iz genomske DNA

Ker v Sloveniji nosečnicam in njihovim novorojencem v sklopu rutinskih testov v času
nosečnosti ne določamo fenotipa RhCE, smo za namen določitve genotipa *RHCE* iz
zamrznjenih vzorcev polne krvi optimizirali reakcije qPCR.

Določitev alelov *RHCE**C** in *RHCE**c** iz gDNA smo izvedli z metodo ekspresije. Uporabili
smo sonde MGB, testirali pa smo polimorfizem v eksonu 1 (48C) za alel *RHCE**C** in
polimorfizme v eksonu 2 (178C, 201A in 203A) za alel *RHCE**c**. Pri optimizaciji reakcij
smo za kontrolne vzorce uporabili gDNA 12 tipiziranih krvodajalcev iz Registra tipiziranih
krvodajalcev na ZTM. Učinkovitost pomnoževanja (E) za alel *RHCE**C** je bila 90,49 %, za
alel *RHCE**C** pa 86,65 %. Rezultati vseh genotipizacij kontrolnih vzorcev so se povsem
ujemali z rezultati serološko določenih fenotipov RhCE. Zanesljivost napovedi fenotipa
KS RhCc je bila 100 %.

Določitev alelov *RHCE**E** in *RHCE**e** iz gDNA smo izvedli z metodo alelne
diskriminacije. Uporabili smo sonde MGB, testirali pa smo polimorfizem v eksonu 5
(C676G) gena *RHCE*. Pri izboru začetnih nukleotidov in sonde smo upoštevali tudi
specifične nukleotide gena *RHCE* (667G in 697C). Pri optimizaciji reakcij smo za
kontrolne vzorce uporabili gDNA 155 tipiziranih krvodajalcev iz Registra tipiziranih
krvodajalcev na ZTM. Učinkovitost pomnoževanja (E) za alel *RHCE**E** je bila 95,04 %, za
alel *RHCE**e** pa 90,72 %. Med 155 vzorci je bilo 39 (25,16 %) RhE-pozitivnih in 154
(99,35 %) Rhe-pozitivnih. Rezultati vseh genotipizacij kontrolnih vzorcev so se povsem
ujemali z rezultati serološko določenih fenotipov RhCE. Zanesljivost napovedi fenotipa
KS RhEe je bila 100 %.

S pripravo standardnih krivulj za alele KS sistema *RHCE* smo določili občutljivost reakcij
qPCR. Zanesljiv signal smo pri vseh reakcijah zasledili pri redčenju 1:10.000 (S5), torej je
za le-tega zadostovalo 113,5 pg (0,0227 ng/μL) DNA.

V naši nalogi smo optimizirali ustrezne reakcije qPCR za določitev genotipa *RHCE* iz gDNA. Te reakcije bodo na ZTM v bodoče uporabili za genotipizacijo krvodajalcev in pacientov, katerim bo v transfuzijske namene potrebno določiti njihov genotip. Z že komercialno pripravljenimi mešanici začetnih oligonukleotidov in sond želijo opraviti testiranje s kar najmanjšim rokovanjem z reagenti (zmanjšana možnost napak in kontaminacije) ter čim lažjo in hitro interpretacijo rezultatov.

5.3 Določitev plodovega genotipa *RHCE* iz zunajcelične DNA

Z namenom izdelati zanesljivo strategijo za neinvazivno določitev plodovega genotipa *RHCE* iz periferne krvi nosečnic z metodo qPCR, smo v raziskavo vključili 71 RhD-negativnih nosečnic in 72 novorojencev (41 dečkov in 31 dekl�ic). Iz ostankov vzorcev periferne krvi, ki smo jih nosečnicam odvzeli v 19. tednu nosečnosti (razpon 7.–29. teden), in ostankov popkovnične krvi novorojencev smo nosečnicam in novorojencem določili genotip *RHCE*. Vzorci so bili shranjeni šele od 48 do 72 ur po odvzemu krvi.

5.4 Reakcije PCR v realnem času za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz zunajcelične DNA

Glede na dejstvo, da smo imeli na razpolago malo vzorca plazme RhD-negativnih nosečnic, ki smo jih vključili v študijo, smo se odločili, da bomo za neinvazivno določitev plodovega genotipa *RHCE* uporabili objavljene protokole, z možnimi modifikacijami reakcij qPCR (npr. manjši volumen reakcije qPCR). Test smo želeli s čim majšo izgubo vzorcev zaradi optimizacije kar najhitreje uporabiti v prenatalni diagnostiki.

Zanesljivost protokolov za detekcijo posameznih alelov KS sistema RhCE se razlikuje v posameznih študijah in sega od 67 do 100 % (67). Za neinvazivno določitev plodovega genotipa *RHCE**C**, *RHCE*c* in *RHCE**E** iz periferne krvi nosečnic z metodo qPCR smo uporabili nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov in sond iz študij, ki so dosegala 100 % zanesljivost (62, 63). Sonde imajo na mestu dušilca vezano fluorescentno barvilo TAMRA. Program za pomnoževanje nukleinskih kislin je bil enak, kot ga je uporabila Finning s sod. (63), s 100 % zanesljivostjo določitve plodovega genotipa, in kot ga

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic priporoča proizvajalec aparata oz. programa za reakcije qPCR z metodo ekspresije. Po optimizaciji reakcij qPCR smo izbrali končno koncentracijo začetnih oligonukleotidov (600 nM) in sond (250 nM), ki so bile višje od objavljenih (62, 63, 67).

Za določitev alela *RHCE***C* smo detektirali daljše nukleotidno zaporedje introna 2 v genu *RHCE* (33, 62), za določitev alela *RHCE***c* pa polimorfizme v eksonu 2 (201A, 203A in 307C). Za določitev alela *RHCE***E* smo izbrali regijo eksona 5 (676C) in specifične nukleotide gena *RHCE* (667G, 697C in 712 A) (62, 63).

Specifičnost reakcij qPCR smo preverili s testiranjem 155 vzorcev gDNA krvodajalcev iz Registra tipiziranih krvodajalcev. Učinkovitost pomnoževanja za alel *RHCE***C* je bila 95,2, za alel *RHCE***c* 90,89, za alel *RHCE***E* pa 99,54 %. Med 155 vzorci so bili 103 (66,5 %) RhC-pozitivni, 118 (76,1 %) Rhc-pozitivnih, 39 (25,16 %) RhE-pozitivnih in 154 (99,35 %) Rhe-pozitivnih krvodajalcev. Rezultati vseh genotipizacij kontrolnih vzorcev so se povsem ujemale z rezultati serološko določenih fenotipov RhCE. Zanesljivost napovedi fenotipa KS RhCE je bila 100 %. Frekvenca alelov *RHCE***C*, *RHCE***c*, *RHCE***E* in *RHCE***e* v slovenski populaciji belih krvodajalcev je podobna v literaturi objavljenim frekvencam pri belcih (35).

Za potrditev prisotnosti zcp-DNA v primerih, ko bi bil plod negativen za testirani alel KS RhCE, smo uporabili gen *SRY*, ki določa spol. Uspešnost osamitve zc-DNA pa smo potrdili s prisotnostjo gena *ALB*. Reakcijski mešanici smo, razen manjšega volumna reakcije qPCR, pripravili tako, kot jo v Laboratoriju za molekularno biologijo na ZTM pripravljajo za rutinske teste (16, 68).

S pripravo standardnih krivulj za vse testirane alele in gene smo določili občutljivost posameznih reakcij qPCR. Zanesljiv signal smo pri vseh reakcijah (razen *ALB*) zasledili pri redčenju 1:10.000 (S5), torej je za le-tega tako zadostovalo 113,5 pg (0,0227 ng/ μ L) DNA, kar je dovolj, da lahko zaznamo zcp-DNA že v zgodnji nosečnosti (16, 68). V prvem trimesečju nosečnosti je povprečna količina plodove DNA 167,64 pg/mL, v zadnjem trimesečju pa 1928 pg/mL (47). Pri reakciji za gen *ALB* smo zanesljiv signal zasledili še pri redčenju 1:10.0000 (S6), torej je za le-tega zadostovalo 11,35 pg (0,00227 ng/ μ L) DNA. Gen za *ALB* se pri človeku nahaja v dveh kopijah, zato je test bolj občutljiv v

Mikerevič T. Določitev plodovega genotipa krvnoskupinskega sistema RhCE iz periferne krvi nosečnic primerjavi z občutljivostjo testov za alele gena *RHCE* in gena *SRY*, kjer smo uporabili redčeno gDNA moškega z genotipom *RHCE*Cc*, *RHCE*Ee*, torej heterozigota, kjer se vsak alel nahaja le v eni kopiji.

Za preverjanje ustreznosti optimiziranih reakcij qPCR v prenatalne namene in za izdelavo strategije za zanesljivo določitev plodovega alela KS sistema RhCE smo testirali vse pare nosečnica-novorojenec, kjer je bila nosečnica negativna, novorojenec pa pozitiven za testirani alel. Za alel *RHCE*C* je bilo takih parov 28, za alel *RHCE*E* 9, za alel *RHCE*c* pa nismo našli ustreznega para.

Volumen reakcije qPCR je bil 20 μ L, kar je manj kot uporabljeni volumni v objavljenih študijah, volumen zc-DNA v reakcijah qPCR je bil 5 μ L, torej enako kot v prej omenjenih študijah (16, 62, 63, 67), v katerih so zaznali količino zcp-DNA iz plazme, odvzete v zgodnji nosečnosti. V literaturi je navedeno različno število ponovitev reakcij qPCR za določitev prisotnosti posameznega alela, in sicer od 2 do 8 (62, 63, 65, 67). Legler s sod. je predlagal vsaj štiri ponovitve, da dosežemo višjo zanesljivost določitve plodovega genotipa. V naši študiji smo izbrali 6 ponovitev za določitev alela KS sistema RhCE tudi zato, ker smo iz 60 μ L izolirane zc-DNA lahko izvedli skupno 12 reakcij qPCR, v katere smo dali po 5 μ L zc-DNA (6 reakcij za detekcijo alela sistema RhCE, 3 reakcije za detekcijo gena *SRY* in 2 reakciji za detekcijo gena *ALB*).

Po testiranju vseh vzorcev nosečnic smo določili kriterije za potrditev prisotnosti plodovega alela *RHCE*C* in alela *RHCE*E* iz zc-DNA, in sicer, mora biti $Cq \leq 42$ v vsaj štirih od šestih reakcij. V primeru ene do treh pozitivnih reakcij, je potrebno testiranje v celoti ponoviti.

5.4.1 Določitev plodovega alela *RHCE*C* iz zunajcelične DNA

Od 28 nosečnic, katerim smo iz zc-DNA želeli določiti plodov genotip *RHCE*C*, je bilo 26 nosečnic (92,9 %) v prvem (11; 39,3 %) in drugem trimesečju (15; 53,6 %) nosečnosti. V tretjem trimesečju sta bili dve nosečnici (7,1 %). Med novorojenci je bilo 16 (57,1 %) dečkov in 12 (42,9 %) deklic.

Pri petih vzorcih (17,6 %) število pozitivnih reakcij za alel *RHCE***C* in/ali gen *SRY* ni ustrezalo postavljenim kriterijem oz. strategiji. Zaradi pomanjkanja vzorcev plazme ponovnega testiranja nismo mogli izvesti, zato smo vzorce izključili iz nadaljnje obravnave. Prisotnost plodovega alela *RHCE***C* smo pravilno določili pri 21 (91,3 %) od 23 končno obravnavanih vzorcih. Pri dveh od 23 obravnavanih vzorcev (8,7 %; 8. in 16. teden nosečnosti), kjer smo napačno predvideli, da plod nima prisotnega alela *RHCE***C*, sta bili novorojenki deklici, tako da nismo mogli potrditi prisotnosti zcp-DNA v vzorcih. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE***C* z gestacijsko starostjo ploda je bila 87,5 % v prvem trimesečju nosečnosti, 92,6 % v drugem trimesečju in 100 % v zadnjem trimesečju nosečnosti. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega gena *SRY* je bila 100 % v vseh trimesečjih nosečnosti.

5.4.2 Določitev plodovega alela *RHCE*E* iz zunajcelične DNA**

Od 9 nosečnic, katerim smo iz zc-DNA želeli določiti plodov genotip *RHCE***E*, so bile vse nosečnice v prvem (8; 88,9 %) in drugem trimesečju (1; 11,1 %) nosečnosti. Med novorojenci so bili 4 (44,4 %) dečki in 5 (55,6 %) deklic.

Pri enem vzorcu (11,1 %) število pozitivnih reakcij za alel *RHCE***E* in/ali gen *SRY* ni ustrezalo postavljenim kriterijem oz. strategiji. Zaradi pomanjkanja vzorca plazme ponovnega testiranja nismo mogli izvesti, zato smo vzorec izključili iz nadaljnje obravnave. Prisotnost plodovega alela *RHCE***C* smo pravilno določili pri 7 (87,5 %) od 8 končno obravnavanih vzorcev. Pri enem od osmih obravnavanih vzorcev (12,5 %; 26. teden nosečnosti), kjer smo napačno predvideli, da plod nima prisotnega alela *RHCE***E*, je bila novorojenka deklica, tako, da nismo mogli potrditi prisotnosti zcp-DNA v vzorcih. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE***E* je bila v prvem trimesečju nosečnosti 100 %. Zaradi lažno negativnega rezultata pri določitvi plodovega genotipa iz edinega vzorca plazme, odvzete v zadnjem trimesečju nosečnosti, je bila zanesljivost določitve v tem obdobju 0 %. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega gena *SRY* je bila 100 % v obeh prvih dveh trimesečjih nosečnosti.

5.4.3 Določitev plodovega genotipa *RHCE* pri imuniziranih nosečnicah

Izdelano strategijo za določitev plodovega genotipa *RHCE* iz periferne krvi nosečnic smo testirali na 21 imuniziranih nosečnicah, ki so imele protitelesa anti-RhC (4), anti-Rhc (2) in anti-RhE (15). Vzorci zamrznjene plazme so bili shranjeni šele od 48 do 96 ur po odvzemu krvi. Vse nosečnice so bile v drugem (19; 90,5 %) in tretjem trimesečju (2; 9,5 %) nosečnosti. Po rojstvu otrok smo pridobili podatke o serološko določenem fenotipu RhCE in spolu otroka le za 8 novorojencev, in sicer za RhC pri dveh in za RhE pri šestih otrocih. V vseh osmih primerih (100 %) smo pravilno napovedali spol ploda in prisotnost alela *RHCE**C in alela *RHCE**E. Zanesljivost določitve prisotnosti plodovega alela *RHCE**C in *RHCE**E ter gena *SRY* je bila 100 %.

V objavljenih študijah je bilo tako kot v naši število testiranih vzorcev za določitev posameznega plodovega alela relativno majhno. Posamezne študije navajajo rezultate od enega samega testiranega vzorca (62) pa do 100 vzorcev (67).

Z našimi testi nismo uspeli doseči 100 % zanesljivosti določitve plodovega genotipa *RHCE*, tako kot je to uspelo nekaterim avtorjem (67). Zaradi majhnega števila vzorcev vsaka nepravilno določena KS RhCE vodi v veliko odstopanje zanesljivosti genotipizacije. Kljub temu, da je bila večina vzorcev v naši raziskavi odvzeta v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti, pa količina plodove DNA v vseh vzorcih ni bila dovolj visoka za zanesljivo določitev plodovega genotipa. Najverjetnejši razlog je, da je koncentracija zcp-DNA v materini plazmi precej stabilna, vendar se s starostjo vzorca krvi povečuje količina materine zc-DNA, kar lahko vodi do nejasnih ali lažnih rezultatov (70, 71). Plazma iz vzorcev periferne krvi nosečnic, ki so jih uporabili za študije, je bila izolirana največ 48 ur po odvzemu (63, 65). Za našo študijo pa so ostanki vzorcev krvi nosečnic prispeli v Laboratorij za molekularno biologijo šele po vseh opravljenih rutinskih testih, kar je ponavadi bilo šele od 48 do celo 96 ur po odvzemu krvi nosečnici. V tem času kri tudi ni bila ves čas shranjena pri 4 °C. Materine celice so razpadle in sprostila se je materina DNA, ki je predstavljala vedno večji delež zc-DNA. Prav tako je za slabo pomnoževanje zcp-DNA krivo njeno razpadanje v času transporta in hranjenja vzorca krvi nosečnice (62, 70, 71). V takih pogojih je še posebno zahtevna določitev prisotnosti plodovega alela, ki se od matrinega razlikuje le v SNP (62).

Na podlagi naših rezultatov in dejstva, da se transport protiteles IgG preko posteljice začne v drugem trimesečju nosečnosti, pri čemer lahko pride do HBPN (2) in dejstva, da smo v naši študiji testirali vzorce nosečnic, odvzete večinoma v drugem in tretjem trimesečju nosečnosti (imunizirane in neimunizirane), pri čemer smo dosegli visoko zanesljivost določitve plodovega genotipa, lahko sklepamo, da bi bila naša metoda za določitev plodovega alela *RHCE***C* in alela *RHCE***E* ob testiranju dodatnih svežih vzorcev lahko uporabna v rutinski diagnostiki. V prihodnosti bo potrebno plazmo iz vzorcev periferne krvi nosečnic, pri katerih bomo želeli določiti plodov genotip KS sistema RhCE, shraniti v 48 urah po odvzemu krvi. S tem se bo povečala zanesljivost določitve plodovega genotipa. Določitev v drugem trimesečju nosečnosti pa je dovolj zgodnja za pravilno vodenje nosečnosti pri imuniziranih nosečnicah.

V zadnjem času so se v NIPD pojavile nove molekularne metode kot so masna spektrometrija, digitalni PCR in sekvenciranje naslednje generacije (65, 66, 72). Novejše metode imajo sicer večjo občutljivost vendar so dražje in zapletene, zato so v klinični praksi manj uporabljane (41).

6 SKLEP

Ob začetku dela smo si zadali cilj optimizirati reakcije qPCR in izdelati strategijo za neinvazivno določitev plodove KS RhCE iz periferne venske krvi nosečnic. V ta namen smo:

- Optimizirali reakcije qPCR za določitev genotipa *RHCE* iz gDNA, saj v Sloveniji nosečnicam in njihovim novorojencem v sklopu rutinskih testov v času nosečnosti ne določamo fenotipa RhCE. Brez ustreznih parov (mami negativna, otrok pozitiven za testirani alel) ne bi mogli nadaljevati naloge. Optimizirane reakcije so se izkazale primerne za pravilno napoved fenotipa RhCE.
- Optimizirali reakcije qPCR in izdelali strategijo, s katero lahko pravilno določimo plodov fenotip KS sistema RhCE.
- Pravilno določili prisotnost plodovega alela *RHCE***C* in pravilno napovedali plodov fenotip RhC pri 91,3 % obravnavanih nosečnic.
- Pravilno določili prisotnost plodovega alela *RHCE***E* in pravilno napovedali plodov fenotip RhE pri 87,5 % obravnavanih nosečnic.
- Določili, da je najnižja potrebna količina DNA za zanesljiv signal v vseh reakcijah qPCR za alele gena *RHCE* in *SRY* 113,5 pg (0,0227 ng/μL) DNA, kar je dovolj za detekcijo plodove DNA, izolirane iz plazme nosečnice, tudi v zgodnejši nosečnosti.
- Pri vseh imuniziranih nosečnicah pravilno določili prisotnost plodovega alela *RHCE***C* in *RHCE***E* ter pravilno napovedali plodov fenotip.
- 100 % zanesljivo določili prisotnost plodovega gena *SRY* pri vseh nosečnicah.

Zaključimo lahko, da bi bila naša metoda za določitev plodovega alela *RHCE***C* in alela *RHCE***E*, ob testiranju dodatnih svežih vzorcev uporabna v rutinski diagnostiki.

7 LITERATURA

1. <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/> (Dostopano: december 2015).
2. Železnik K, Dovč-Drnovšek T, Rožman P et al. Preventiva in diagnostika hemolitične bolezni ploda in novorojenčka. *Zdravniški vestnik* 2012; 81: 312–21.
3. Reid EM, Lomas-Francis Christine, Olsson LM. *The blood group antigen*, Elsevier, London, 2011: 147–150.
4. Daniels G: *Human blood groups*, Wiley-Blackwell, Bristol, 2013: 180–198.
5. Scheffer PG, van der Schoot CE, Page-Christiaens GC et al. Noninvasive fetal blood group genotyping of rhesus D, c, E and of K in alloimmunised pregnant women: evaluation of a 7-year clinical experience. *BJOG* 2011; 118(11): 1340–8.
6. Zwingerman R, Jain V, Hannon J et al. Alloimmune Red Blood Cell Antibodies: Prevalence and Pathogenicity in a Canadian Prenatal Population. *J Obstet Gynaecol Can.* 2015; 37(9): 784–90.
7. Bowman JM: RhD hemolytic disease of the newborn. *N Engl J Med* 1998; 339(24): 1775–7.
8. Diamond LK, Blackfan KD, Baty JM. Erythroblastosis fetalis and its association with universal edema of the fetus, icterus gravis neonatorum and anemia of the new-born. *J pediatr* 1932; 1: 269–309.
9. Levine P, Stetson RE. An unusual case of intra-group agglutination. *JAMA* 1939; 113: 126–27.
10. Landsteiner K, Wiener AS. An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proc Soc Exp Biol Med* 1940; 43: 223.
11. Levine P, Katzin EM, Burnham L. Isoimmunization in pregnancy: It's possible bearing od the etiology of erythroblastosis foetalis. *JAMA* 1941; 116: 825–27.
12. Domazet-Fink J, Pestevšek M, Novak-Antolič Ž. Fetomaternalna krvavitev – diferencialna diagnostika ob prikazu primera, *Zdrav vestn* 2002; 71: 425–8.
13. Koelewijn JM, Vrijkotte TGM, van der Schoot CE et al. Effect of screening for red cell antibodies, other than anti-D, to detect hemolytic disease of the fetus and newborn: a population study in the Netherlands. *Transfusion* 2008; 48(5): 941–52.
14. Liunbruno GM, D'Alessandro A, Rea F et al. The role of antenatal immunoprophylaxis in the prevention of maternal-foetal anti-Rh(D) alloimmunisation. *Blood Transfus* 2010; 81(1): 8–16.

15. Pravilnik o transfuzijskih preiskavah in postopkih ob transfuziji, 2007, Uradni list RS, št. 9/07.
16. Dovč-Drnovšek T. (2013). Določanje plodovega genotipa RHD iz plazme RhD-negativnih nosečnic z metodo PCR v realnem času. Doktorska disertacija, Ljubljana: Univerza v Ljubljani: Medicinska fakulteta.
17. Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000; 97 (2): 375–87.
18. Willy A, Flegel. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci* 2011; 44(1): 81–91.
19. Avent ND, Ridgwell K, Tanner MJ et al. cDNA cloning of a 30 kDa erythrocyte membrane protein associated with Rh (Rhesus)-blood-group-antigen expression. *Biochem J* 1990; 271(3): 821–25.
20. Cherif-Zahar B, Bloy C, Le Van Kim C et al. Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 (16): 6243-47.
21. Westhoff CM. The Structure and Function of the Rh antigen Complex. *Semin Hematol* 2007; 44(1): 42–50.
22. Vos GH, Vos D, Kirk RL et al. A sample of blood with no detectable Rh antigens. *Lancet* 1961; 1: 14–5.
23. Le van Kim C, Mouro I, Cherif-Zahar B et al. Molecular cloning and primary structure of the human blood group RhD polypeptide. *Current Issue* 1992; 89(33): 10925–9.
24. Kajii E, Umenishi F, Iwamoto S et al. Isolation of a new cDNA clone encoding an Rh polypeptide associated with the Rh blood group system. *Hum Genet* 1993; 91(2): 157–62.
25. Arce MA, Thompson ES, Wagner S et al. Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD- positive, but not RhD-negative individuals. *Blood* 1993; 82(2): 651–5.
26. Denomme G, Rios M, Reid EM. *Molecular protocols in transfusion medicine*, Elsevier, London, 2000: 85–93.
27. Cherif-Zahar B, Le van Kim C, Rouillac C, Raynal V et al. Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. *Genomics* 1994; 19(1): 68–74.
28. Cherif-Zahar B, Raynal V, Cartron JP. RH Gene Structure: Reassignment of Two Exon-Exon Junctions. *Bood* 1997; 89(12): 4661.
29. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP et al. Noninvasive fetal RhCE genotyping from maternal blood. *BJOG* 2009; 116(2): 144–51.

30. Colin Y, Cherif-Zahar B, Le van Kim C et al. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood* 1991; 78(10): 2747–52.
31. Mouro I, Colin Y, Cherif-Zahar B et al. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet* 1993; 5(1): 62–5
32. Simsek S, de Jong CA, Cuijpers HT et al. 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 (2): 203–9.
33. Poulter M, Kemp TJ, Carritt B. DNA-based rhesus typing: simultaneous determination of RHC and RHD status using the polymerase chain reaction. *Vox Sang* 1996; 70(3): 164–8.
34. Gassner C, Schmarada A, Kilga-Nogler S et al. RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Transfusion* 1997; 37(10): 1020–6.
35. Tills D, Kopec AC, Tills RE. *The Distribution of the Human Blood Groups and Other Polymorphisms*: Oxford University, Oxford.
36. Gemke RJ, Kanhai HH, Overbeeke MA et al. ABO and Rhesus phenotyping of fetal erythrocytes in the first trimester of pregnancy. *Br J Haematol* 1985; 64(4): 689–97.
37. Dunstan RA, Simpson MB, Rosse WF. Erythrocyte antigens on human platelets. Absence of Rh, Duffy, Kell, Kidd, and Lutheran antigens. *Transfusion* 1984; 24(3): 243–6.
38. Dunstan RA. Status of major red cell blood group antigens on neutrophils, lymphocytes and monocytes. *Br J Haematol* 1986; 62(2): 301–9.
39. Coupland L, Yabas M, Cromer D et al. Anemia, Shortened Erythrocyte Lifespan and Stomatocytosis In a Flippase Mutant Mouse Strain. *Blood* 2013; 122(21): 2183.
40. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–7.
41. Tounta G, Kolialexi A, Papantoniou N et al. Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma: Progress overview beyond predictive and personalized diagnosis. *EPMA J* 2011; 2(2): 163–71.
42. Masazuki H, Miura K, Yoshiura K et al.: Detection of cell free placental DNA in maternal plasma: direct evidence from three cases of confined placental mosaicism. *J Med Genet* 2004; 41(4): 289–92.
43. Alberry M, Maddocks D, Jones M et al. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenatal Diagn* 2007; 27(5): 415–8.

44. Honda H, Miharu N, Ohashi Y et al. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002; 110(1): 75–9.
45. Lo YM. Fetal RhD genotyping from maternal plasma. *Ann Med* 1999; 31(5): 308–12.
46. Chandrananda D, Thorne NP, Bahlo M. High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA. *BMC Med Genomics* 2015; 8: 29.
47. Lo YM, Teins MS, Lau TK et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*; 62(4): 768–75.
48. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988, 239: 487–491.
49. Lo YM, Lau TK, Chan LY. Quantitative analysis of the bidirectional fetomaternal transfer of nucleated cells and plasma DNA. *Clin Chem* 2000, 46: 1301–1309.
50. Lo YMD, Chan KCA, Sun H et al: Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* 2010; 2(61): 61–91.
51. Lo YM, Leung TN, Lau TK et al. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999; 64(1): 218–24.
52. Faas BH, Beuling EA, Christiaens GC. Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *Lancet* 1998; 352: 119
53. Simpson JL, Elias S. Isolating fetal cells from maternal blood. *Advances in prenatal diagnosis through molecular technology. JAMA* 1993; 270(19): 2357–61.
54. Cheung MC, Goldberg JD, Kan YW. Prenatal diagnosis of sickle cell anaemia and thalassaemia by analysis of fetal cells in maternal blood. *Nat Genet* 1996; 14(3): 264–8.
55. Černe D, Ostanek B. *Biomedicinska analitika I. Ljubljana*, 2012: 137–145.
56. Heid CA, Stevens J, Livak KJ et al. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10): 986–94.
57. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; 29(3): 151–9.
58. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4(6): 357–62.
59. <http://www.medicinalgenomics.com/microbial-test/> (Dostopano: marec 2016).

60. <http://www.thermofisher.com/search/results?persona=DocSupport&refinementSearch=true&navId=4294959596&query=expression+viia> (Dostopano: februar 2016).
61. Kolialexi A, Tounta G, Mavrou A. Noninvasive fetal RhD genotyping from maternal blood. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010; 10(3): 285–96.
62. Legler TJ, Lynen R, Maas J-H et al. Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. *Transfus Apher Sci.* 2002; 27(3): 217–23.
63. Finning K, Martin P, Summers J et al. Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C, c, and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma: *Transfusion.* 2007; 47(11): 2126–33.
64. Clausen FB. Integration of noninvasive prenatal prediction of fetal blood group into clinical prenatal care. *Prenat Diagn.* 2014; 34(5): 409–15.
65. Hromadnikova I, Vechetova L, Vesela K et al. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. *J Histochem Cytochem.* 2005; 53(3): 301–5.
66. Orzińska A, Guz K, Brojer E, Zupańska B. Preliminary results of fetal Rhc examination in plasma of pregnant women with anti-c. *Prenat Diagn.* 2008; 28(4): 335–7.
67. Gutensohn K, Müller SP, Thomann K et al. Diagnostic accuracy of noninvasive polymerase chain reaction testing for the determination of fetal rhesus C, c and E status in early pregnancy. *BJOG.* 2010; 117(6): 722–9.
68. Dovč-Drnovšek T, Klemenc P, Toplak N et al: Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal Plasma. *Transfus Med Hemother.* 2013; 40(1): 37–43.
69. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP et al. Noninvasive fetal RhCE genotyping from maternal blood. *BJOG.* 2009;116(2): 144–51.
70. Finning K, Martin P, Summers J et al. Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study. *BMJ.* 2008; 336(7648): 816–8.
71. Angert RM, LeShane ES, Lo YMD et al. Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem.* 2003; 49(1): 195–8.
72. Rieneck K, Clausen FB, Dziegiel MH. Noninvasive Antenatal Determination of Fetal Blood Group Using Next-Generation Sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 6(1): 023093.