

MATERNAL KANDAN  
NONİNVAZİF YÖNTEMLERLE FETAL RH  
TAYİNİ

DR. GÖKÇENUR GÖNENÇ  
UZMANLIK TEZİ

T.C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

2013

TEZ DANIŞMANI : PROF.DR. ALİN BAŞGÜL YİĞİTER

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimi aldığım İstanbul Bilim Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda yetişmemi sağlayıp ufkumu genişleten Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. İlkkan Dünder'e, bilgi ve deneyimleriyle eğitimimde sonsuz katkıları olan ve tez danışmanlığımı üstlenip yardımlarını benden esirgemeyen Perinatoloji Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Alin Başgül Yiğiter'e, çalışmamda ve yetişmemde sabır, destek ve gülüyüzleri için Yard.Doç.Dr. Herman İşçi'ye, Yard.Doç.Dr. Nilgün Güdücü'ye, Yard.Doç.Dr. Banu Bingöl Günenç'e, tez çalışmamı yapmamda fikir ve desteğini aldığım Prof.Dr. Kılıç Aydınli'ya, çalışmanın yapılma aşamasında bana olan desteklerinden dolayı İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yard.Doç.Dr. Tuba Günel'e, İstanbul Bilim Üniversitesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç.Dr. Veysel Sabri Hançer'e ve Dr. Murat Büyükdoğan'a, eğitimim süresince omuz omuza çalıştığım asistan arkadaşlarıma, poliklinik, servis ve doğumhanede beraber çalıştığım hemşire ve ebe arkadaşlarıma, sekreterimize, laborant arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana güvenen ve her zaman yanımda olduklarını bildiğim anne ve babama, hayat yoldaşım, ebedi arkadaşım Murat Gönenc'e ve yaşam enerjim minik İnci'ne sonsuz teşekkürler..

Dr. Gökçenur Gönenc

## Kısaltmalar

CVS	: Koryonik vilüs örneklemesi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
HLA	: İnsan lökosit antijeni (Human leucocyte antigen)
IAT	: İndirekt antiglobulin test
IDC	: İndirekt Coombs testi
Ig	: İmünoglobulin
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
MCA	: Orta serebral arter
NPV	: Negatif prediktif değer
NST	: Non-stress test
PAPP-A	: Gebelikle ilişkili plazma proteini
PPV	: Pozitif prediktif değer
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RES	: Retiküloendotelyal sistem
Rh	: Resus faktör
RhD	: Resus faktör geni
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyon
USG	: Ultrasonografi

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı Rh uygunsuzluğu olan gebelerde fetal Rh durumunun invaziv olmayan bir teknikle, maternal kandan serbest fetal DNA izolasyonu ile tespit edilmesidir. Özellikle daha önceki gebeliklerinde fetal anemi gelişen gebelerde fetusun RhD pozitif olduğunun bilinmesi fetusun yakın takibine olanak verecektir.

**Yöntem:** Rh uygunsuzluğu olan 50 gebeden serbest fetal DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA, TaqMan probu ve RhD geninin exon 7 bölgesine ait primerlerle Real Time PCR kullanılarak analiz edildi.

**Bulgular:** Rh uygunsuzluğu olan 50 hastanın 3 tanesinin bebeği RhD negatif olarak saptandı, geri kalan 47 hastanın bebeği RhD pozitif olarak bulundu. RhD pozitif bulunan fetuslardan bir tanesinin, doğumdan sonra RhD negatif olduğu saptandı.

**Sonuç:** Fetal Rh durumunun non invazif olarak maternal kandan izolasyonu mümkündür. Non invazif olarak fetal RhD durumunun saptanması, gereksiz indirekt coombs testleri ve gereksiz Anti D immunglobulin uygulamasının önüne geçerek maliyet düşürülmesine ve gereksiz kan ürünü uygulamasının engellenmesine olanak sağlayacaktır. Bu çalışma prenatal tanı alanında yeni gelişmelere ön ayak olacaktır.

## **ABSTRACT**

**Objective:** Anti D Immunoglobulin is applied to all pregnant women having RhD incompatibility to prevent hemolytic disease of the newborn. The aim of this study is to determine fetal RhD status in the Rh incompatible pregnancies with a non-invasive technique; free fetal DNA isolation from maternal circulation. In the case of Rh incompatibility especially with a history of previous fetal anemia, it can be beneficial to know Rh status antenatally in terms of monitoring fetuses with Rh positive status consciously.

**Methods:** Total free DNA was isolated in 50 Rh (-) pregnant women, who had RhD alloimmunisation with their husbands. The gene in isolated DNA is investigated with TaqMan probe and real time PCR by using primers belonging to exon 7 of the RhD gene.

**Results:** We analyzed 50 RhD negative women by using quantitative real time PCR technique. Three of them were RhD (-) and the rest of them were found to be RhD (+). After birth one of the infants who were analyzed as RhD (+) were found to be RhD(-).

**Conclusion:** The detection of fetal RhD status by using a noninvasive method from maternal circulation is found to be possible. Assessing fetal RhD status non-invasively by using free fetal DNA in maternal blood will be money saving for unnecessary indirect coombs test and unnecessary Anti D immunoglobulin applications that is used in Rh incompatible pregnancies. This study will throw a fresh light on prenatal diagnosis

## GİRİŞ

Normal şartlar altında, fetal eritrositler doğum veya düşük sırasında plasental bariyeri aşarak annenin dolaşımına karışır. Bu karşılaşma, annenin RhD (-) ve bebeğin RhD (+) olduğu durumlarda annede RhD (+) antijenlere karşı izoimmünizasyon oluşması ile sonuçlanır. Eğer bu izoimmünizasyonun oluşması engellenemezse, sonraki gebeliklerde RhD (+) fetuslarda plasentadan fetusa geçen anti-RhD antikorlarının fetal eritrositlerde yıkıma yol açması sonucu oluşan “yenidoğanın hemolitik hastalığı” ortaya çıkar. Hastalığın şiddeti değişkendir ve yenidoğan ölümü ile sonuçlanabilir (1).

Yenidoğanın hemolitik hastalığını önlemek amacıyla RhD (-) olan tüm gebelere rutin olarak anti-D immünooglobini uygulanmaktadır. RhD (-) annelerin bebeğinin RhD (+) olma olasılığı yaklaşık %60 olduğu kabul edilirse, bu annelerin %40'ında bu uygulamanın gereksiz olduğu görülür (2). Ne yazık ki, bu uygulama tamamen masum değildir; tüm kan ürünlerinde olduğu gibi, anti-D immünoglobinin de stokları sınırlıdır ve uygulamasıyla kan ürünleri ile bulaşan hastalıkların bulaş riski artmaktadır (3).

Prenatal dönemde fetal RhD durumunun belirlenmesi sayesinde, yenidoğanın hemolitik hastalığı riski göze alınmaksızın, RhD (-) annelerin gereksiz immünizasyonu engellenebilir. Prenatal tanı yöntemlerinde kullanılan fetal genetik materyal geleneksel olarak amniyosentez veya koryon vilus örnekleme ile elde edilir. Ancak, bu invaziv örnekleme yollarının yaklaşık %1 oranında düşük ile sonuçlanabilir (4). Ayrıca, işlem, fetomaternal kanama ile komplike olduğunda,

annede RhD izoimmünizasyonun gelişmesine de yol açabilmektedir. Bu nedenle, invaziv prenatal tanı yöntemlerinin kullanımı kromozomal anöploidiler ve monogenik hastalıklar gibi belli genetik fetal hastalıklar için risk grubunda olan gebeliklerle sınırlandırılır (5,6). Dolayısıyla, RhD uygunsuzluğu söz konusu olduğunda risk-yarar dengesi kurulursa, rutin anti-D immünoglobini uygulanması invaziv tanı yöntemlerinden daha ağır basmaktadır. Bu dengeyi değiştirmenin tek yolu invaziv olmayan tanı yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Mevcut riskleri nedeniyle invaziv prenatal tanı yöntemlerine alternatif oluşturabilecek invaziv olmayan yöntemlerin bulunması araştırmacıların hedefi haline gelmiştir. Plasenta fizyolojisinin daha iyi anlaşılması bu sorunun çözülmesine ilham kaynağı olmuştur. Yapılan çalışmalarda, plasentanın anneden fetusa doğru tek yönlü geçişi sağlayan bir bariyer olduğu kabul edilen popüler görüşün aksine, plasentanın çift yönlü trafiğe izin veren bir bariyer olduğunu desteklemektedir. Bu çalışmalarda, sağlam fetal hücrelerin ve hücre dışı serbest fetal nükleik asitlerin plasentayı geçebildiği ve anne kanında tespit edilebildiği gösterilmiştir (7,8). Sonuç olarak, bu bulgular invaziv olmayan bir tanı yönteminin kapısını aralamıştır: Annenin periferik kanından fetal genetik materyalin izolasyonu ve analizi.

Annenin kan dolaşımından hücre dışı serbest fetal DNA izolasyonu ile fetusun RhD durumu belirlenebilir. Bu sayede, invaziv bir prenatal tanı yöntemi kullanılmaksızın RhD uygunsuzluğu adayı anneleri tespit etmek ve özgül tedavi yapmak mümkün hale gelmektedir.

İleriye dönük olarak yapılan bu tez çalışmasında, anne kanından fetal genetik materyalin izolasyonu ve analizinin fetusun RhD durumunun belirlenmesindeki etkinliği araştırıldı.

## GENEL BİLGİLER

### Resus Kan Grubu Sistemi

Landsteiner ve Wiener, 1940 yılında, rhesus maymunlarına karşı oluşturulan tavşan serumunun, insan serum örneklerinin %85'ini aglütine ettiğini bulmuşlar ve bu seruma "Rh faktör" veya "Coombs serumu" adını vermişlerdir. Aglütine olan eritrositler Rh (+) olarak tanımlanmıştır. Takiben Rh kan grupları tanımlanmış ve değişik adlarla sınıflandırılmıştır (1).

Bugüne kadar yaklaşık 400 adet kırmızı kan hücre antikoru tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları genetik ve immunolojik açıdan önemli olmalarına rağmen oldukça nadir görüldüklerinden dolayı ciddi klinik öneme sahip değillerdir. Kan bankalarında dahi ABO ve RH dışındaki antijenler rutin taramada yer almamaktadır (1).

Rhesus (Rh) kan grubu sistemi (Rh faktörünü de içerir) günümüzde bilinen 400 farklı insan kan grubu sisteminden biridir. Sistem dahilinde, içlerinde en önemlileri D, C, c, E ve e antijeni olmak üzere, tanımlanmış toplam 50 kan grubu antijeni mevcuttur. Pratikte sıkça kullanılan bir terim olan Rh faktörünü belirleyen ve tüm antijenler içinde en güçlü immünojenik özelliğe sahip olan D antijenidir ve her gebe mutlaka D antijeni mevcudiyeti yönünden taranmalıdır (9).

Fisher ve Race , bu antijenlerin 3 farklı antijenik yapı, her iki gen allelinde olduğunu belirtmişlerdir (DE/cde, CDe/Cde, Cde/cDe..). (10,11) Rh sistemine ait antijenler 1. kromozomun kısa kolunda RHD ve RHCE olmak üzere iki gen





**Şekil-1:** RhD geninin yapısı [*D(+): RhD geni taşıyanlar; D(-):RhD geni taşımayanlar*].

grubu tarafından kodlanmaktadır. D (+) bireyler RHD geninin bir veya iki kopyasına sahipken, D (-) bireyler bu gene sahip değildir. (12)

Bu genler her biri 10'ar exon içermekte olup %94 sekans benzerliğine sahiptirler. D antijeninin varlığı bireyin Rh (+) olmasını belirler. Rh (+) olan bireylerin yaklaşık %45'i D için homozigottur (DD), %55'i heterozigottur (Dd). Birçok D (-) kadında 1. kromozomda delesyon gösterilmiştir (13).

Rh antijenleri, membran üzerinde iç kısımda yer alan lipoproteinlerdir. Görevleri hücre membranında proton veya katyon pompası gibi geçen solüt miktarını düzenlemektir. Membran içi ATP'az ile etkileşimde bulunurlar. Hücre membran stabilitesini sağlarlar. Bu özellik, immün cevap açısından önemli bir noktadır (14). Fertilizasyondan itibaren 30.günde fetal Rh antijenleri saptanmaktadır. Bu nedenle, fetal eritrositler 6. gestasyonel haftadan itibaren maternal izoimmünizasyona neden olabilir. Embriyonik dönemde, fetal eritrositlerdeki Rh antijenleri en erken 38. günde görülmektedir.

Eritrositlerdeki D antijeni, miktar ve nitelik açısından 5 farklı tipe ayrılır (15):

1. Common D antijeni: Tüm epitoplari mevcut D antijenidir,
2. Zayıf D veya DU antijeni: D antijen miktarı azalmıştır,
3. Parsiyel D antijeni: D antijeninin bazı epitoplari bulunmaktadır,
4. Parsiyel zayıf D antijeni: Parsiyel D sayı olarak az oranda görülür,
5. Yüksek D antijeni: Normal D antijeni yüksek oranda kromozomal yapı içinde bulunur.

### **Rh Sistemine Ait Tiplendirme Testleri**

Kan merkezlerinde rutin eritrosit antijenlerinin saptanmasına ait testlerden Rh tiplendirmesinde sadece D antijeni çalışılır. D<sub>u</sub> antijeni saptanmasına ait testler genellikle donörlerde yapılır. Diğer Rh antijenleri aşağıdaki özel durumlarda çalışılır:

1. Bilinmeyen Rh antikorlarının tanımlanması
2. Rh antikorları taşıdığı bilinen alıcılara transfüzyon yapılması
3. Babalık tayini ve diğer aile çalışmaları
4. Çeşitli test panelleri için eritrosit hazırlanması

Daha kolay ve anlaşılır olduğu için yaygın olarak Fisher-Race isimlendirilmesi kullanılmaktadır. Bu nomenklatürde üç allel gen veya izoantijenler Cc, Dd, Ee olarak yer alır. C, c, E, e, D antijenlerine karşı gelişmiş antikorlar serumda gösterilmiştir. Sadece “d” antijeninin varlığı teorik olarak kabul edilir.

## **D antijeninin saptanmasında kullanılan antiserumlar**

### ***Yüksek proteinli antiserumlar***

Yüksek konsantrasyonda proteinler ve diğer makromolekülleri içerir. Lam, hızlı tüp veya mikroplak tekniklerinde kullanılmak için hazırlanmıştır.

Rutinde yüksek protein içerikli anti-D antiserumu kullanılmaktadır. Test için eritrosit süspansiyonu hazırlarken serum fizyolojik, serum veya plazma kullanılabilir.

### ***Düşük Proteinli Antiserumlar***

Bu gruptaki antiserumlar yüksek protein içerikli antiserumlarla yapılan testlerde yıkanmış eritrosit kullanılmasına rağmen kontrol tüpleri pozitif bulunan ve Direkt Coombs Testi pozitif örneklerde kullanılır. Test iyi yıkanmış eritrositlerin serum fizyolojikte hazırlanmış süspansiyonu ile çalışılmalıdır. Antiserumların aralarında önemli farklılıklar olan üç ayrı türü vardır :

1. Geleneksel SF reaktif tüp testi antiserumu: Hakim antikor IgM'dir. En önemli problem uygun kaynak bulmadaki güçlüktür.
2. Monoklonal IgM antiserumları: Sıklıkla IgM ve poliklonal IgG karışımından oluşur. IgM tipi antikorlar D antijeni pozitif eritrositleri aglütine eder. Poliklonal IgG antikorları ise D<sub>u</sub> saptanmasında kullanılır. Bu antiserum, yüksek protein içerikli antiserumlar gibi tüm rutin çalışmalarda veya kontrol testleri pozitif bulunmuş örneklerde kullanılabilir.
3. Kimyasal olarak modifiye edilmiş poliklonal IgG: Bu antiserumun hazırlanmasında DDT (dithiothreitol) kullanılır. DDT etkisi ile IgG orta

şidette redükte olur. Bunun sonucunda molekülün esnekliği artar. Bu şekilde hazırlanmış IgG lamda çalışmaya uygundur. Tüm rutin çalışmalarda veya kontrol testleri pozitif bulunmuş örneklerde kullanılabilir.

## **Rh Tayininde Serolojik Tiplendirme Yöntemleri**

Rh tayininde serolojik tiplendirme yapmak amacıyla beş farklı yöntem kullanılır (17):

1. Lam testi: En iyi sonuç yüksek konsantrasyonda eritrosit süspansiyonu kullanarak alınır. % 40-50 konsantrasyonunda serum fizyolojik, serum veya plazma ile eritrosit süspansiyonu hazırlanabilir.
2. Tüp testi: Hemaglütinasyon ile uygulanır.
3. Mikroplak testi: Rh testi için pıhtılaşmış veya antikoagüle örnekler kullanılabilir
4. Zayıf D testi: D antijeni her zaman güçlü reaksiyon vermeyebilir. Bazı eritrositler, birçok anti-D ajanı tarafından direkt aglütine edilemeyecek zayıflıkta bir D antijeni taşır. D antijeninin bu zayıf durumu, en belirgin olarak, test eritrositinin anti-D ile bekletilmesinden sonra İndirekt Antiglobulin Test (İAT) ile tanımlanabilir.
5. Kapiler test: D'nin lam ve tüp testleri kadar yaygın kullanılmamasına rağmen, kapiller Rh test metodu, kullanılacak kan merkezleri için konvansiyonel bir yöntemdir.

1957 yılında Kleihauer ve arkadaşları tarafından geliştirilen çok hızlı ve duyarlılığı yüksek bir test ile fetusa ait eritrositleri, anne eritrositlerinden ayırmayı keşfetmişlerdir. Bu test fetal eritrositlerin aside daha dirençli

olmalarına dayalı bir test olup feto-maternal kanama miktarını öngörmeye faydalıdır.

## **Rh İmmünizasyonu**

### **Etyoloji**

Her ne kadar yenidoğan hemolitik hastalığına en sık neden olan neden ABO kan grubu uyumsuzluğu olsa da bunun neticesinde gelişen anemi şiddetli bir anemi değildir. Fetüslerin yaklaşık %20'sinde ABO uyumsuzluğu görülür ancak bu fetüslerin %5'i klinik olarak etkilenmiştir (1).

ABO uyumsuzluğu, CDE uyumsuzluğundan farklıdır. ABO uyumsuzluğu sıklıkla ilk gebeliği etkiler çünkü, O kan grubu olan annede gebe kalmadan önce anti - A ve anti - B antikoru bulunabilir. Anti - A ve Anti - B antikoru IgM yapısında olduklarından plasentayı geçemezler ve fetal eritrositler üzerinde etki gösteremezler. Ayrıca fetal eritrositlerdeki antijenik bölgeler erişkindeki kadar yoğun değildir. Bu nedenle hemolizi göstermek için amniyosentez gerekliliği genelde olmaz. ABO uyumsuzluğunun RH uyumsuzluğundan bir diğer farkı çok ciddi anemiye yol açmamasıdır. ABO uyumsuzluğunda eritroblastozis fetalis gelişmesi nadirdir, genelde hafif anemi ve fototerapi ile düzelen bir sarılık tablosu oluşur. Bu nedenle de kadın doğum hekiminden çok çocuk doktorunu ilgilendiren bir durumdur (18).

Rh izoimmünizasyonun gerçekleşmesi için öncelikli şart annenin Rh (-) ve fetüsün Rh (+) kan grubuna sahip olmasıdır. Ek olarak, annenin bağışıklık sistemini tetikleyecek miktarda fetal eritrositin annenin kan dolaşımına

karışması şarttır. D antijeni taşıyan fetal eritrositlere karşı anne kanında anti-D antikorları oluşması halinde ise Rh izoimmünizasyonundan söz edilir (19).

Çok nadir de olsa ilk gebeliklerde de Rh uygunsuzluğu gözlenebilmektedir. Bunun açıklaması büyükanne teorisi ile açıklanabilir. Büyükanne teorisi Rh (-) kadının, Rh (+) olan kendi annesinin kanında iken Rh (+) eritrositlerle karşılaşarak sensitize olmasıdır. Bu Rh sensitizasyonu olan olguların %2'sinde görülmekte ve bu sensitizasyon için 0.005 ml kanın bebeğe geçmesi yeterli olmaktadır. Neyse ki RhD pozitif olan annelerin RhD negatif fetus taşıma olasılığı %0.1 kadar düşüktür (20).

İzoimmünizasyon seyrek görülen bir durumdur. Bunun nedenleri arasında eritrosit antijenlerinin toplumda seyrek görülmesi, fetal antijenlerin veya maternal antikorların plasentadan eser miktarda pasajı, antijen çeşitliliği ve annenin immun yanıtının bazı antijenlere karşı kuvvetli olmaması sayılabilir.

Fetal kan hücreleri, fizyolojik veya patolojik bir çok durum sonucunda annenin kan dolaşımına karışabilirler. Rh izoimmünizasyonu için yeterli olan minimum kan miktarının 0,1 ml olduğu tahmin edilmektedir. İkinci uyarılma için 0,03 ml fetal kan yeterli olabilmektedir. Pratikte en sık karşılaşılan neden, fetomaternal kanamadır Choavaratana ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 2000 gebe kadına Kleihauer – Betke testi uygulamışlardır ve her trimesterde olan fetomaternal kanama oranının yüksek olmasına rağmen fetustan anneye transfüzyon oranını çok düşük bulmuşlardır (21).

Çok miktarda transfüzyon olması nadir bir durumdur ve 1985 yılında yapılan bir derlemede 9000 kadından sadece 21 tanesinde 30 ml'yi geçen miktarda transfüzyon saptamışlardır (22). Fetomaternal kanamanın etyolojisinde birçok faktör mevcuttur (Tablo-2). Ek olarak, Rh izoimmünizasyonu olgularının

hatırı sayılır bir kısmında da altta yatan neden önceden yapılmış uygunsuz kan ürünleri transfüzyonudur.

Gebelik evresi	Kanama (%)	Hacim(ml)
Birinci trimester	54	0
İkinci trimester	63	0.08
Üçüncü trimester	71	0.13
Doğum	76	0.19

**Tablo-1:** Fetomaternal kanama.

Etyoloji	Sıklık (%)
Erken gebelik kaybı	3-5
Tıbbi tahliye	6-20
Ektopik gebelik	5-8
Amniyosentez	4-11
Koryon villüs örneklemesi	8-15
Kordosentez	30-50
Antepartun travma	Değişken
Plasenta dekolmanı	Düşük
Fetal ölüm	Değişken
Plasentanın elle çıkarılması	Değişken
Eksternal versiyon	Değişken

**Tablo -2 :** Fetomaternal kanamaya neden olaylar ve insidansları (1)

## Fizyopatoloji

Rh izoimmünizasyonunda, fetal eritrositlerle ilk karşılaşmada annede oluşan primer immün yanıt zayıftır. IgM yapısında antikorlar oluşur ve plasentayı geçmez. Takiben ortaya çıkan sekonder immün yanıt ise daha az miktarda eritrosit ile ve daha hızlı şekilde gelişir. Sekonder immün yanıtta B hücreleri rol oynar ve araçlar IgG (özellikle IgG<sub>3</sub>) yapısında antikorlardır. IgG<sub>3</sub> antikorları plasentadan geçebilirler ve fetusun D (+) antijenlere sahip eritrositlere yapışıp, aglütine ve hemoliz olmalarına neden olabilirler. Bu durum, değişken derecelerde ortaya çıkan yenidoğanın hemolitik hastalığı ile sonuçlanır (13).

Rh uygunsuzluğu olan gebelerin çoğuna anti D immunoglobulin uygulaması yapıldığı için anti D izoimmunizasyonu seyrek görülmektedir ve yenidoğan hemolitik hastalığına sebep olarak daha nadir görülen eritrosit antijenlerinin etyolojide rol oynadığı düşünülmektedir. Bunların başında da Anti – E, Anti – C, Anti – c antijenleri bulunmaktadır. Bu antijenlerin de yaklaşık dörtte biri Lewis antijenleridir ve eritrositlerdeki Lewis antijenleri doğumdan sonraki birkaç hafta içinde tam olarak geliştiğinden dolayı hemolize yol açmamaktadır (23, 24).

Kell antijenleri de Kafkas ırkında %90 negatiftir ve duyarlılaşmanın en sık nedeni genelde tarama yapılmaksızın uygulanan Kell antijen pozitif kan ürünü transfüzyonudur. Bir diğer neden de gebelikte oluşan fetomaternal kanamadır (25). Kell antikorları kemik iliğindeki eritrosit prekursorlerine bağlanır ve anemiye cevap olarak hematopoetik aktivasyonu baskılar. Anti D

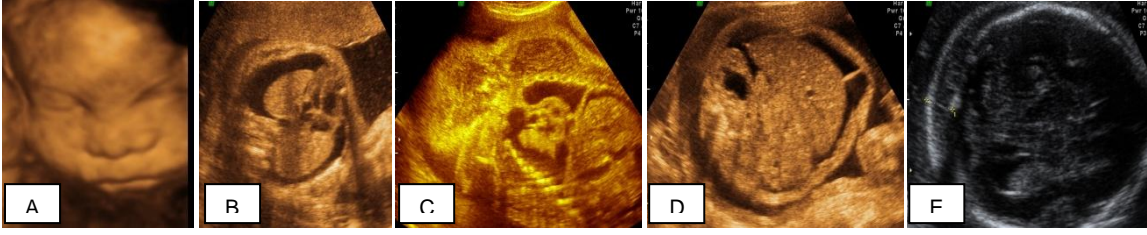


immunizasyonundan farklı olarak Kell immunizasyonunda daha hızlı ve daha derin anemi olması beklenir. Caine ve Mueller tarafından yapılan çalışmada 13 tane Kell antijenine duyarlılaşmış gebelikten 5 tanesinde hidrops geliştiğini bildirmiştir (26). Bowman ve arkadaşları 20 Kell antijeni duyarlı gebelikten 4 tanesinde transfüzyon gerekliliği olduğunu, 4 tane gebelik intrauterin ölüm ile sonuçlandığını bildirmiştir. Kell isoimmunizasyonunun bu denli ağır seyretmesinden dolayı bazı araştırmacılar 1/8 den büyük aviditeler için ileri tetkik gerekebileceğini öne sürmüşlerdir (27).

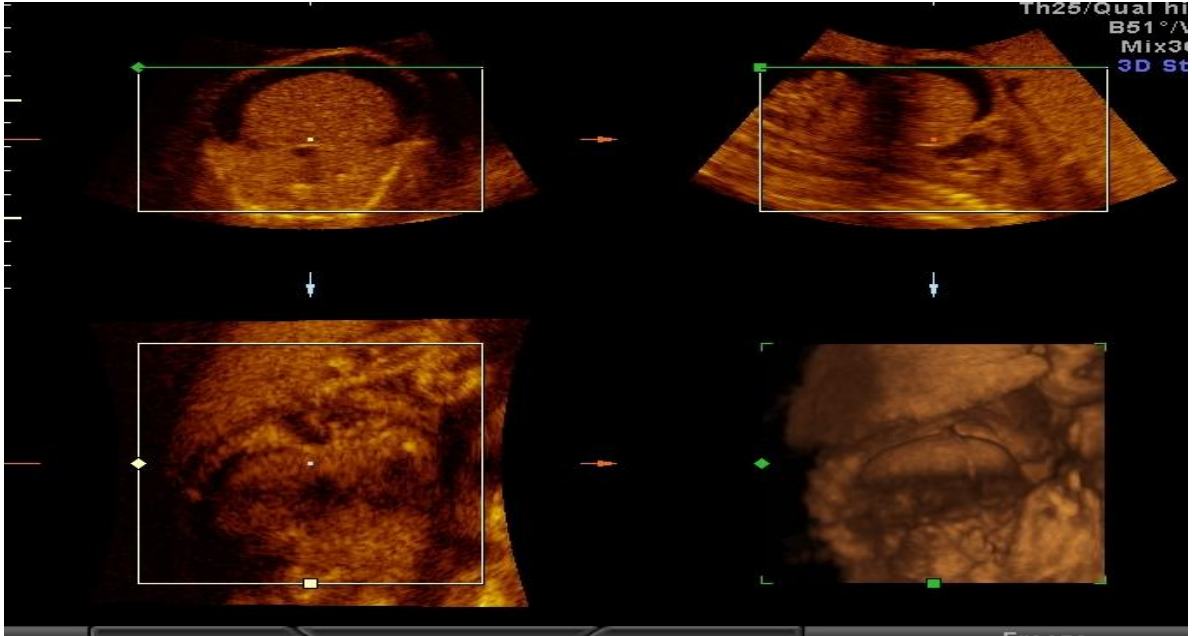
D antijeninin yanında Kidd (Jka), Duffy (Fya) antijenleri de Anti D izoimmunizasyonu kadar ağır derecede eritroblastozise neden olabilir. İki adet Duffy antijeni tanımlanmıştır (Fya ve Fyb) Bunlardan Fya daha immunojeniktir. Kidd antijeni de iki adettir, %50 hastada her iki varyantta pozitifdir (28).

### **Hidrops fetalis**

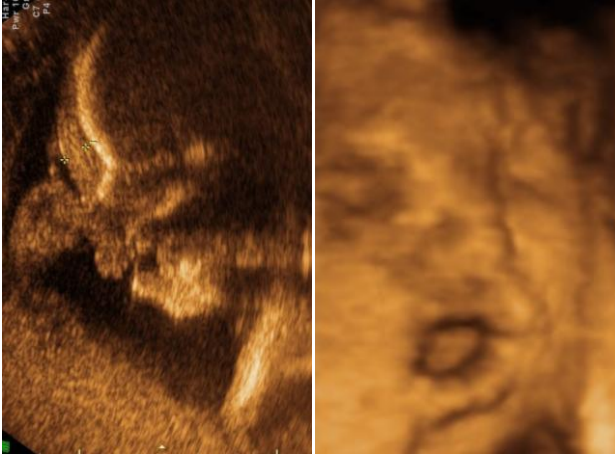
Fetus vücudunda asit veya plevral effuzyon tarzında sıvı birikimi görülmesine hidrops denir. Hidrops, isoimmun veya non immun olarak sınıflandırılabilir. İmmun hidropsta; ciddi miktarda ve uzamış hemoliz neticesinde gelişen anemi nedeniyle ekstramedüller hematopoez artar. Dalak ve karaciğerde olan hematopoez sonucunda hepatik disfonksiyon olur (29). Kalp normalden büyük izlenebilir, fetal göğüs boşluğunda, karın boşluğunda ve cilt altında sıvı birikimi görülebilir. Hatta hepatomegali , splenomegali ve asit nedeniyle doğumda distosi görülebilir. Plasenta, ödem oluşması sonucunda normalden büyük, kalın izlenebilir. Bu hidropik değişimler ultrasonografik muayenede kolaylıkla görülebilir (1).



**Şekil 2:** Hidropik fetus USG görüntüsü. A: Fasyal ödemin üç boyutlu USG görüntüsü; B: Toraks boşluğundaki plevral efüzyonun yatay kesitteki USG görüntüsü; C: Toraks ve abdomendeki efüzyonun koronal plan görüntüsü; D: Abdominal asitin yatay plandaki görüntüsü; E: Fetal baş çevresindeki ödemin iki boyutlu USG ile yatay plandaki görüntüsü (Prof.Dr. Alin Başgül Yiğiter'in arşivinden, 2012).



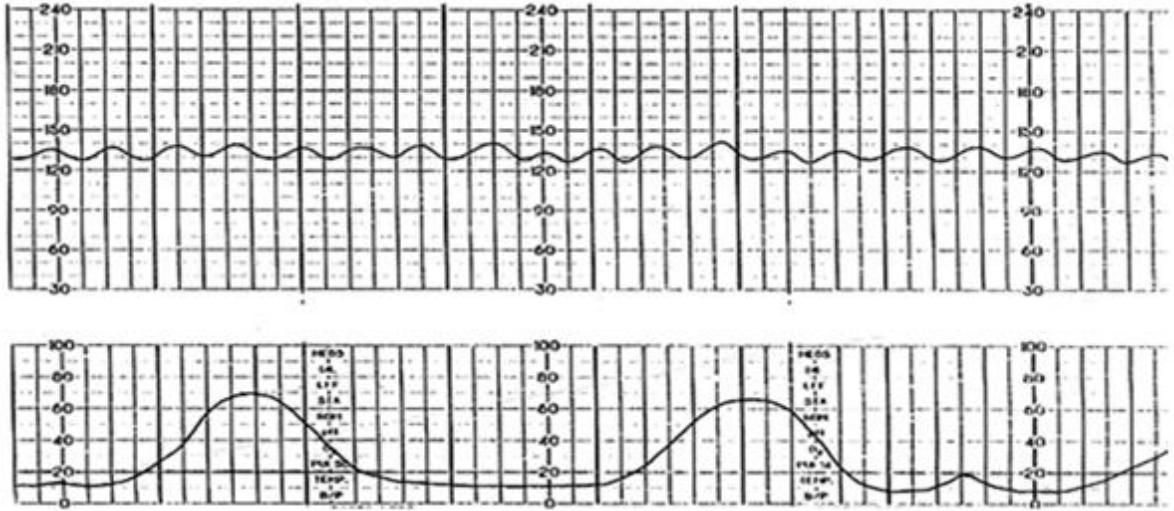
**Şekil-3:** Üçüncü trimesterdeki hidropik fetusun üç boyutlu USG ile multiplanar görüntülenmesi (Prof.Dr. Alin Başgül Yiğiter'in arşivinden, 2012).



**Şekil-4:** Hidropik fetustaki fasyal ödemin iki ve üç boyutlu USG görüntüleri (Prof.Dr. Alin Başgöl Yiğiter'in arşivinden, 2012).

Gelişen hidropsun patofizyolojisi net olarak ortaya konmamakla birlikte ciddi anemiye bağlı kalp yetmezliği, karaciğer parankim hasarına bağlı gelişen portal hipertansiyon, karaciğer disfonksiyonuna bağlı gelişen hipoproteinemi ve onkotik basınçta düşme, neden olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda aneminin şiddetinin asit miktarı ile doğru orantılı olduğu bildirilmiştir (30).

Ciddi fetal asit görülen bebekler derin anemi ve dolaşım problemlerine bağlı olarak anne karnındayken kaybedilebilirler. Genellikle anemisi ağır olan bebeklerde non stres teste 'sinuzoidal patern' izlenir (31). Yine plasental ödeme bağlı plasentamegali neticesinde annede preeklampsi gelişebilir. Preeklampsiye bağlı, annede de fetusta olduğu gibi ciddi ödem görülebilir ve bu tablo "ayna sendromu" olarak nitelendirilir (32).



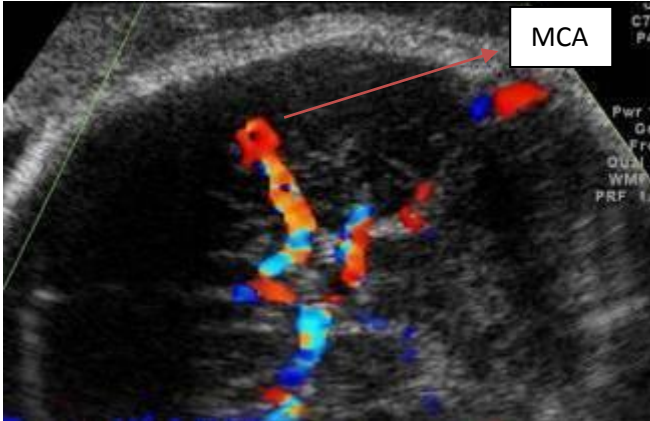
**Şekil 5:** Sinüzoidal patern NST.

Hemoglobin seviyesi çok düşük olmayan bebekler doğumda normal görünümde olabilirler. Hiperbilirubinemi, tedavi edilmediğinde kernikterus denilen, özellikle bazal ganglionlarda hasarla seyreden ve serebral palsiye kadar ilerleyen bir tablo oluşturabilir (33, 34).

Maternal antikor taraması esnasında eritrosit antikorlarının mevcudiyeti durumunda bu antikorların subtipi incelenmelidir. Immunoglobulin G ler plasentayı geçebilmekte ancak Immunoglobulin M ler geçememektedir. Eğer immunoglobulin G pozitifliği saptanırsa fetal hemolizle ilişkili olabileceğinden dolayı antikor titresi mutlaka araştırılmalıdır. Kritik seviyelerde antikor titresi ileri tetkiki gerektirir. Bu kritik seviyeler her laboratuvar için farklı olabilmekte beraber genel kabul gören değer 1/16'dır (1).

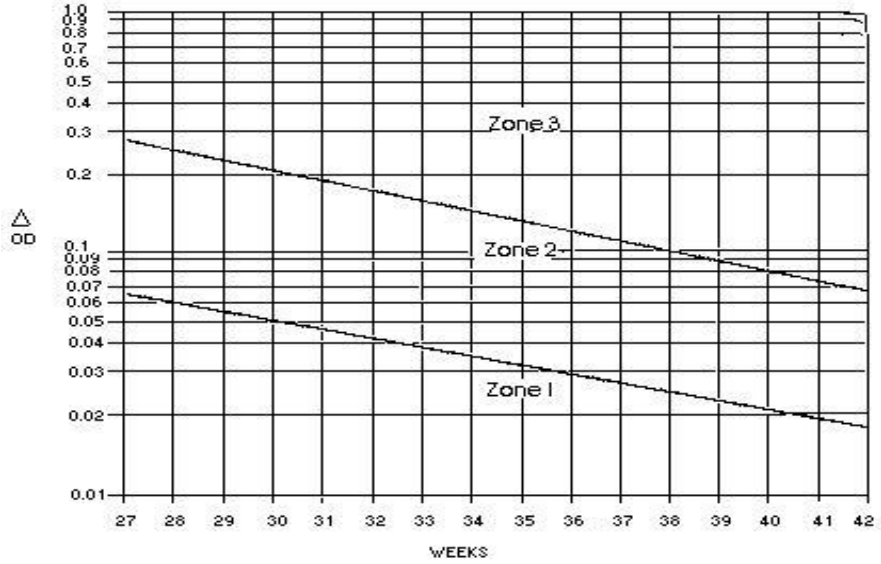
Maternal antikor pozitifliği fetusun bundan kesin olarak etkileneceği anlamına gelmez. Daha önceden duyarlılık gelişmiş kadınlarda RhD negatif fetus taşımalarına rağmen antikor cevabı oluşabileceği gösterilmiş ve bu durum "amnestik cevap" olarak adlandırılmıştır (1).

Rh uygunsuzluğu olan gebelerde, özellikle daha önceki gebeliklerinde fetal anemi veya hidrops geliştirenlerde gebelik yaşının tam hesaplanması önem taşımaktadır, çünkü her gebelikte anemi biraz daha erken başlamakta ve daha derin olmaktadır. Etkilenen gebeliklerde antikor pozitifliği saptandığında belli aralıklarda titre takibi yapılmalıdır. Bu takip genellikle ayda bir kez olmak üzere yapılmaktadır. Etkilenen gebelik ilk gebelik değilse antikor titresinin faydası amnestik cevap nedeniyle sınırlıdır. Bu durumda devreye orta serebral arter (MCA) Doppleri gibi ek parametreler girmektedir (11). Mari ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 111 anemi riski altındaki fetusa ve 265 normal fetusa MCA Doppleri incelemesi yapılmış fetal hidrops gelişecek fetusları önceden saptamada %100 duyarlılık bildirilmiştir (35).



**şekil-6:** MCA'nın ultrasonografik görüntüsü.

Fetal eritrositlerde hemoliz olduğunda amniyotik sıvıda bilirubin konsantrasyonu hemoliz derecesiyle doğru orantılı olarak artmaktadır. Amniyotik sıvıdaki bilirubin konsantrasyonları Liley eğrilerine göre 3 zona ayrılmakta, zon 3 'e giren bilirubin seviyesindeki fetuslarda mortalite ve morbidite yüksek oranlarda olmaktadır (36).



**Şekil-7:** Liley eğrileri.

Kordosentez yani umbilikal kordan kan örnekleme yapılması, %1.4 fetal kayıp oranı olan invazif bir yöntem olup fetusun hemoglobin seviyesini ve kan grubunu belirlenemede fayda sağlamaktadır ancak yüksek fetal kayıp oranları noninvazif metodların bu yöntemlere ne derece üstün olduğunu kanıtlamaktadır (36).

## Önlem

Yenidoğanın hemolitik hastalığının fizyopatolojisi 1960'lı yıllarda tanımlanmış ve Rh izoimmünizasyonunu önlemek amacıyla anti-D profilaksisinin uygulamasına başlanmıştır. Bunun sonucunda, uygulama öncesinde 1/2200 oranında görülen yenidoğanın hemolitik hastalığı ile ilişkili bebek ölümü oranı günümüzde 1/21000 oranına kadar düşmüştür (38,39).

Anti -D Ig insan plazma derivesidir. Hazırlanma aşamasında bakteriyel ve viral kontaminasyona karşı önleyici işlemlerden geçirilmektedir. Bunun için en sık kullanılan yöntem 1950'lerde geliştirilen Cohn soğuk etanol fraksiyonasyondur. Cohn yöntemi Ig agregatlarını tam temizleyemediği için anti-D serumu intravenöz kullanıma uygun değildir ve intramuskuler uygulama için ruhsatlandırılmıştır.

Anti-D Ig hazırlanırken filtrasyon aşamasında 12-18 nanometrelik Viresolve 180 ultrafiltrasyon membranları kullanılarak virus kontaminasyonu engellenmektedir. Ultrafiltrasyon aşamasında kullanılan teğetsel filtrasyon mekanizması kullanılarak Ig'ler zarflı ve zarfsız virüslerden ayırt edilebilmektedir çünkü zarfsız virüsler kimyasal ve fiziksel ajanlara karşı dirençlidir.

Son ürün yaklaşık %5.1 gamma globulin, 2.9 mg/ml sodyum klorid, % 0.01 polisorbata 80 ve 15 mg/ml glisin. Doz başına yaklaşık 15 µg kadar düşük dozda Ig A bulunur. Rhogam içindeki anti-D içeriği µg olarak ifade edilir ve 1µg, 5 IU'dur (40).

Rh negatif annelere Rh pozitif eritrositlerle karşılaşmadan önce veya hemen sonra anti-D immünoglobulin verilmesi Rh izoimmünizasyonunu önleyebilmektedir. Anti-D immünoglobulinleri hiperimmünize Rh D (-) donörlerden elde edilirler. Birçok ülkede rutin antenatal program içerisinde 3. trimester başında ve yenidoğan kan grubuna göre doğumu takiben anti-D uygulaması yer almaktadır (38).

Anti-D kullanımı ile fetal eritrositlerin üzerindeki D antijenleri bloke edilir ve D antijeni ile anne retikuloendotelial sisteminin karşılaşması önlenir. Daha sonra bu eritrositler dalak ve lenf bezlerinde temizlenir. Ayrıca antikor antijen kompleksleri anne plazma hücrelerinin antikor üretimini azaltmaktadır. Bu komplekslerin sitokinler aracılığı ile antijen spesifik B hücrelerinin çoğalmasını azalttıkları düşünülmektedir. Anne zayıf Rh pozitif ise (Du pozitif) Rh immünizasyonu geliştirmez ve anti D uygulanması gerekmez. Rh pozitif bebek doğuran Rh negatif annelerin yaklaşık %16'sında Rh izoimmünizasyonu gelişirken anti D uygulanırsa bu oran %1'in altına düşer. Rh uyumsuzluğu ile birlikte ABO uyumsuzluğu olması fetal eritrositlerin hızlıca dolaşımdan temizlenmesini sağlayarak %16 olan bu oranı %2'ye düşürür. Anti-D profilaksisinin yaygınlaşması diğer minör kan grubu uyumsuzluklarının önemini rölatif olarak artırmıştır. Anti-D profilaksisi % 0,1 - 0,2 oranında başarısız olabilir (1, 11).

İlk prenatal muayenede kan grubu mutlaka bakılmalıdır. RhD(-) annelere, başlangıçta indirekt Coombs testi uygulanmalıdır. Bu test ile, maternal kanda, fetal eritrositlere karşı oluşan antikor miktarı titraj cinsinden belirlenmektedir. Sıvı bazlı aglütinasyon tekniği veya enzimatik yolla anti-D titrajı



ölçülebilmektedir. Testin negatif olduğu olgular 28. gebelik haftasına kadar izlenir ve 28. gebelik haftasında testin halen (-) olması durumunda anti-D immünoglobini ile antenatal profilaksi yapılmalıdır. Bu uygulama %2 olan antenatal izoimmünizasyon oranını %0,1'e düşürür (4) Doğumların % 15 - 50' sinde Rh izoimmünizasyonuna neden olabilecek fetomaternal kanama olabilir. Doğum sonrasında, Rh (+) bebek doğuran immünize olmamış annelere, ilk 72 saat içinde Anti-D immünglobulin uygulanır. İlk 72 saat önemli olmakla birlikte, 14-28. güne kadar yapılabildiği belirtilmektedir . Fakat koruyuculuk ilk 72 saatten sonra azalmaktadır (22).

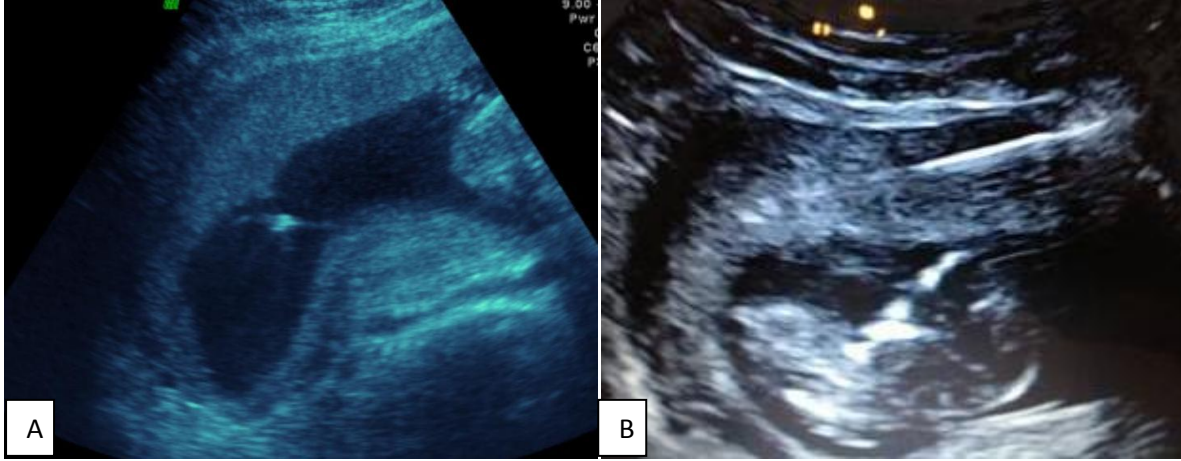
Günümüzde 10µg Anti-D'nin 1ml kanın D antijenlerini bloke edebildiği kabul edilmektedir. Genellikle 300µgr Anti D immünglobulini, 30 cc fetal kan veya 15 cc fetal eritrosit kaybını dengelemektedir. Vajinal ve sezaryen doğumlarda %1 gibi az bir oranda 30 ml'nin üzerinde fetomaternal kanama oluşabilir. Bu nedenle doğumdan sonra fetomaternal kanama miktarının belirlenmesine (Kleihauer-Betke testi) gerek duyulmamaktadır (42). Bununla birlikte Rh D (-) kadınlarda, bazı durumlarda olası fetomaternal kanama nedenlerinden dolayı uygulanacak Anti-D immünglobulin dozları da belirtilmektedir (Tablo 3). Birinci veya ikinci trimestrda belirtilen nedenlerden biri dolayısıyla Anti-D immünglobulin yapılmış olan hastalara 28. haftada tekrar dozu önerilmektedir fakat geç ikinci trimestrda yapılmış olan dozun tekrarının 12 hafta sonra yapılması önerilmektedir (37).

Endikasyon	Doz ( $\mu$ gr)
İlk trimesterde düşük	50
Ektopik gebelik ( ilk 12 hafta)	50
Ektopik gebelik (12. Haftadan sonra)	300
İlk trimester düşük tehdidi	50
Molar gebelik	50
İlk trimesterde indüklenmiş düşük	50
İkinci trimesterde indüklenmiş düşük	300
İntrauterin fetal ölüm (10. hafta sonrası)	300
Amniyosentez	300
Koryon villüs örneklemesi	50
Tüp ligasyonu sonrası	?
Eksternal sefalik versiyon	300
Plasenta anomalileri (ablasyo, previa)	300
Abdominal travma	300
İkinci ve üçüncü trimesterde nedeni bilinmeyen vaginal kanama	300

**Tablo-3.** Çeşitli klinik durumlarda Rh imünizasyonunu önleme amacıyla uygulanacak anti-D Ig dozları.

Rhogam profilaksisi ile, ekzojen olarak verilen Anti-D, D antijeni taşıyan fetal hücrelere bağlanarak, dalak ve karaciğerden eliminasyonunu hızlandırmaktadır. Bu sayede, hafıza B hücrelerinin uyarılmasını ve ilk immün yanıtın engellenmesini önlemektedir. Bu olay sırasında, Anti-D immunglobuline bağlı fetal hücre kompleksinden kaynaklanan sitokin cevap ile, bu inhibisyonun gerçekleştiği düşünülmektedir. İndirekt coombs testi (ICT) testi (+) olduktan sonra Anti-D vermenin hiçbir anlamı yoktur. Yenidoğan kan grubu Rh (-) ise Anti-D yapılmaz. Yenidoğana Anti-D yapılması hiçbir zaman endike değildir.

Bununla beraber bir kısım (İngiltere'de ortalama %40) Rh D (-) gebeye fetüs Rh D (-) olduğundan gereksiz yere anti D profilaksisi uygulanmaktadır. Bu uygulamayla Rh D (-) fetüs taşıyan Rh D (-) gebeler gereksiz yere verilen kan ürünlerine ait risklere maruz kalmakta aynı zamanda ekonomik anlamda ülke ekonomisi için ekstra bir yük ortaya çıkmaktadır. Son yıllara kadar fetal Rh durumu için koryon villüs örnekleme, amniyosentez gibi invaziv yöntemler kullanılmakta idi (43). Bu prosedürler ortalama %0,5-1'lerde düşük riski taşımakla beraber aynı zamanda işlemlerin kendileri immünizasyona sebep olabilmektedirler. Maternal kanda hücre dışı serbest fetal DNA'nın prenatal fetal Rh genotiplendirmesinde kullanılmasıyla Rh (-) gebelerin yönetimi daha doğru olarak yapılabilecektir (44).



**Şekil-8:** A: Amniyosentez , B: Koryon villüs biyopsisi

### **Maternal Serumda Hücre Dışı Serbest Fetal DNA İzolasyonu ve Analizi**

İnsan gebeliği sırasında, düşük miktarlarda da olsa, çekirdekli fetal hücrelerin ve hücre dışı serbest fetal genetik materyalin annenin kan dolaşımına geçtiği bilinen bir gerçektir. (8, 45, 46) Bu gerçeği, anneden elde edilen periferik kanda fetal genetik materyalin izolasyonu ve analizi takip etmiştir. Bu sayede, invaziv olmayan bir yöntemle, fetusun RhD durumunun belirlenmesinin de dahil olduğu, fetal genetik incelemeler mümkün hale gelmiştir.

Fetal RhD durumunun değerlendirmesi için anne kanının kullanımı 1990'lı yıllarda bildirilmeye başlanmıştır (44, 47, 48). Fakat bu yaklaşımdaki ana sorun maternal kandaki nükleuslu fetal hücrelerin düşük konsantrasyonda bulunması olarak görülmüştür (46). Bu nedenle maternal dolaşımdaki bu hücreleri değerlendirebilmek için çok daha sensitiv metotlara (49) veya floresan aktive

hücre ayrıştırma (44) ve mikromanüplasyon (50) gibi fetal hücre izolasyon prosedürlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Fetal hücre izolasyonu için birçok metod tarif edilmiş olmasına rağmen geniş bir skalada tam olarak doğru ve ekonomik bir metod ortaya konamamıştır.

Fetal çekirdekli hücreler doğumu takiben tespit edilemeyecek düzeye kadar azalır. Doğum sonrası 2 ay içinde PCR ile fetal hücreler görülemez olur (51). Son yıllarda bazı çalışmalar fetal hücrelerin çok düşük seviyelerde olsa da doğumdan yıllar sonra dahi kadınlarda tespit edilebileceğini göstermiştir. Yapılan bir çalışmada erkek CD34 progenitor hücrelerinin maternal kanda doğumdan sonra neredeyse 27 yıl bulunabileceği gösterilmiştir (52). Aynı zamanda bu çalışmalarda bu geç fenomenin bazı ciddi otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına da neden olabileceği düşünülmektedir (53, 54). Birçok araştırmacı maternal kandan fetal selüler DNA'nın izole edilmesinin teorik olarak mümkün olduğunu gösterse de uygulanan hiçbir metodun sonucu klinik kullanım için gerekli güvenilirliği sağlayamamıştır. Aynı zamanda geçmiş gebelikten kalan hücrelerin yeni gebelik sürecinde yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği de kanıtlanmıştır.

Birçok araştırmacı maternal kanda fetal DNA'nın selüler fraksiyonu üzerine araştırma yaparken Lo ve ark. çalışmalarını dolaşımdaki serbest DNA üzerine yoğunlaştırmışlardır (55). Fetal DNA'nın maternal serumda ilk olarak gösterilmesi fetal DNA belirteci olarak erkek fetus gebeliğinde Y kromozomu kullanılarak maternal kan örneklerinden elde edilen DNA'ya yapılan spesifik PCR ile 1997 yılında Lo ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (55). Hücre dışı serbest fetal DNA'nın tam olarak nereden köken aldığı, maternal seruma hangi kaynaktan karıştığı bugün için net olarak ortaya konabilmiş değildir.

Hücre dışı fetal DNA'nın maternal plazmadan elde edildiği ilk zamanlarda, maternal dolaşıma karışan hücrelerin maternal immün sistemle veya başka yollarla otolizi sonucu fetal DNA'nın çıktığı düşünülmekteydi. Son yıllarda ise plasental trofoblastların apoptozis veya aponekrozis gibi süreçler sonrasında maternal dolaşıma karışan hücre dışı serbest fetal DNA kaynağı olabileceği daha fazla düşünölmeye başlanmıştır. Maternal ve fetal dolaşimler birbirlerinden trofoblastların predominant olduğu bir plasental bariyer ile ayrılmaktadır. Trofoblastlarla malign karakterli hücreler arasındaki benzerlik; invaziv karakterleri, onkogen ekspresyonları göz önünde tutulduğunda bu hücrelere psödo-malign hücreler de denmesine neden olmaktadır (56, 57). Birçok kanser hastasının plazma ve serumlarında tümör ile ilişkili tümöral DNA yapılarının gösterilebilmiş olması (58) bir anlamda malign hücrelere olan benzerlikleri ile anılan trofoblastların bu olayda kilit görev üstlendiğini düşündürmektedir.

Fetal çekirdekli hücrelerin aksine hücre dışı serbest fetal DNA'nın maternal plazmadan uzaklaştırılması dakikalarla ölçülecek kadar hızlıdır. Sirkülasyonda serbest DNA'nın yarılanma ömrü 15 dakikadır (59). Hücre dışı serbest fetal DNA'nın maternal dolaşımdan atılımından sorumlu ana organın hangisi olduğuna dair kesin kanıtlar olmamakla beraber bu süreçte plazma nükleazlarının önemli görev üstlendikleri düşünülmektedir (60). Bu çalışmalar maternal plazmadaki fetal DNA'nın fetal hücreler gibi önceki gebeliklerden persiste olarak sonuçları olumsuz etkileyemeyeceğini göstermektedir.

Fetal DNA gebeliğin 5. haftasından itibaren maternal plazmada tespit edilebilir (61) ve gestasyonel yaşla beraber fetal DNA konsantrasyonunun da arttığı gösterilmiştir. Gebeliğin son 8 haftasında keskin bir artış saptanmıştır.

Lo ve arkadaşları ilk trimesterde 1ml plazmada ortalama 25 fetal genom eşdeğerinin üçüncü trimesterde ortalama 100 genoma yükseldiğini göstermişlerdir (59). Bu çalışmada fetal DNA'nın maternal plazmadaki total DNA'ya oranı birinci trimesterde yaklaşık %3,4 (0,4-12) ve üçüncü trimesterde %6,2 (%2,3-11,5) olarak bulunmuştur. Total maternal plazma DNA'sındaki fetal DNA'nın relatif konsantrasyonunu belirlemek zordur çünkü maternal kan çalışma protokolleri total maternal DNA konsantrasyonunu etkilemektedir.

Real-time PCR teknolojisini kullanarak Lo ve ark. fetal Rh D sekansının 2. trimester maternal plazmasından yüksek sensitivite ve spesifiteyle güvenilir bir şekilde amplifiye edilebileceğini tespit etmişlerdir (62). Bu bilgi daha sonra diğer bağımsız gruplar tarafından da desteklenmiştir (63, 64). Hücre dışı serbest fetal DNA'nın tam olarak nereden köken aldığı, maternal seruma hangi kaynaktan karıştığı bugün için net olarak bilinmemektedir. Hücre dışı fetal DNA'nın maternal plazmada elde edildiği ilk zamanlarda maternal dolaşıma karışan hücrelerin maternal immün sistemle veya başka yollarla otolizi sonucu fetal DNA'nın açığa çıktığı düşünülmekteydi. Son yıllarda ise plasental trofoblastların apoptozis veya aponekrozis gibi süreçler sonrasında maternal dolaşıma karışan hücre dışı serbest fetal DNA kaynağı olabileceği görüşü daha fazla hakim olmaya başlamıştır (65).

Nükleik asitlerin maternal kanda veziküller içinde veya hücre dışında bulunuyor olması DNA ve RNA'nın değişik yollardan ölen hücrelerden serbestlendiğini işaret etmektedir (66). Sinsityotrofoblastlardan trofoblastik materyalin klasik olarak salınımı sinsityal kümelerden membran ile kaplı bu DNA ve RNA paketlerinin apoptotik salınımı ile gerçekleşmektedir (67). Buna ek olarak son yıllarda bazı diğer teoriler de gündeme gelmeye

başlamıştır. Tesadüfen meydana gelen kırıklar veya nekrozis, fetal nükleik asidin serbest şekilde salınımına neden oluyor olabilir. Aponekrozis olarak adlandırılan ve trofoblastik materyalin serbest olarak salınımını açıklayan bir başka görüş de mevcuttur. Bu mekanizma hücrenin nekrotik disintegrasyonunu takip eden apopitotik sürecin inkomplet kalmasıyla açıklanmaktadır (68).

Sinsityotrofoblastlardaki normal yaşlanma süreci ve bu apopitoz sürecinin son evresi uygun şekilde fonksiyon göremez ise geç apopitotik nükleusun paketlenmesi değişebilecek ve bu durumda normal apopitotik salınım tamamlanamayacak, daha çok nekroza benzer bir mekanizma ile sonuçlanacaktır. Bu nedenle bu mekanizma aponekrotik mekanizma olarak adlandırılmaktadır. Bu durum hipoksik koşullardaki villöz hücre kültürlerinde sinsityotofoblast sitoplazması içindeki apopitotik DNA yığınlarında gösterilmiştir (67). Apopitozis ve aponekrozis yolu ile sinsityotrofoblastlardan salınan hücre dışı serbest veya membranlar ile çevrelenmiş mikro-partiküller şeklindeki DNA materyali maternal dolaşıma kaçmaktadır. Bununla birlikte bu partiküllerin kaynaklandığı yerleri araştıran invitro çalışmalara ek olarak invivo çalışmalar da gerekmektedir.

## **RT-PCR**

RT-PCR floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir ve DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesinin çoğaltmak için kullanılır (69). Polimeraz zincir reaksiyonu, moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir. Son yıllarda PCR reaksiyonunda sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, "Real- Time PCR" olarak



adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real – time PCR, geleneksel PCR'ın uygulama alanını artırırken PCR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (70).

RT-PCR'de ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Geleneksel PCR'dan farklı olarak, genin başlangıçtaki miktarının tayini de yapılabilmektedir. “Real – time PCR” ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan (SYBR Green) ya da diziye özgün boya işaretli problemlerden (Taqman) yararlanılmaktadır (71). Oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır. Sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (72). Klinik uygulamaları giderek artan “Real – time PCR” sistemleri enfeksiyon hastalıklarının tanısında, gen anlatımı ve kromozom bozukluklarının analizinde, nokta mutasyonlarının belirlenmesinde, patojenlerin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (73).

## **Fetal RhD tayininin klinik kullanımı**

1990 ların ortalarından itibaren rutin antenatal anti D immunoglobulin uygulaması devreye girmiş ve kan uyuşmazlığına bağlı fetal kayıplar yaklaşık %1.2 den % 0.28' e kadar düşürülebilmektedir. 2008 yılında yayınlanan NICE kılavuzunda 28. Haftada tek doz yapılan anti D immunoglobulinin yapılmasının maliyet – etkinlik açısından uygun olduğu bildirilmiştir ancak yapılan çalışmalar Rh negatif gebelerin %40 'ının bebeklerinin Rh negatif olduğunu ve bu gebelere gereksiz anti D immunoglobulin uygulandığını ortaya koymuştur. Anne kanında serbest fetal DNA ve fetal RhD geninin saptanması invaziv olmayan bir yöntemle bebeğin Rh durumunun saptanmasını sağlamaktadır. İlk trimesterden itibaren, fetal Rh durumunu bilinmesi halinde Rh negatif olduğu bilinen fetuslarda, gereksiz kan ürünü uygulaması yapılmayabilecek ve Rh pozitif olduğu bilinen fetuslar hidrops riski açısından daha yakından takip edilebilecektir (38, 74).

## YÖNTEM

Çalışma İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü bünyesinde gerçekleştirildi. Prospektif, randomize olmayan, tek merkezli olarak tasarlanan bu çalışmaya Rh uygunsuzluğu olan ve 5. gestasyonel haftanın üstünde olan gebeler dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm gebelerin gebelikleri ve gebelik haftaları klinik, biyokimyasal ve sonografik incelemelerle teyit edildi. Çalışmaya dahil olan tüm gebelere çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildi ve hepsine aydınlatılmış gönüllü olur formu imzalatıldı.

Şu kriterlere sahip olan bireyler çalışmanın dışında bırakıldı: 1. Çalışmaya katılmak için gönüllü olmayan veya aydınlatılmış gönüllü olur formunu imzalamak istemeyenler, 2. Gebelikleri düşük ile sonuçlanan veya tıbbi tahliye yapılanlar, 3. Çoğul gebeliği olanlar.

Çalışmaya dahil olan gebelerden vakuteynir sistemi ile önkol venlerinden yaklaşık 10 ml periferik kan örneği alındı. Numuneler EDTA'lı tüp içinde muhafaza edildi. Tüpe alınan numuneler 5000 devir/dakika 15 dakika santrifüje edildikten sonra, elde edilen plazma 15 ml'lik tüpe aktarıldı. Numuneler, bu tüp içinde DNA izolasyonu işlemine dek korunmak üzere -80°C'de saklandı.

DNA analizi için gerekli işlemler İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Laboratuvarı ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Genetik Laboratuvarı'nda yürütüldü.

## **Ön Hazırlık**

İleri ve geri primerler ile Taqman prob liyofilize halde temin edildi. Kullanıma en uygun olan 50 µM'lık ana stoğu elde etmek için katı haldeki primerler 105 µl, prob ise 57 µl su ile sulandırıldı. Ana stoklar da x10'luk sulandırmalar ile deneyde kullanılacak hale getirildi. "Elution Buffer" kullanımdan önce 70°C'lık su banyosunda bekletildi.

## **DNA izolasyonu**

Maternal plazmadan total serbest DNA izolasyonu "High Pure PCR Template Preparation Kit" kullanım kılavuzunun serbest DNA izolasyonu işlemine uygun olarak yapıldı. Öncelikle -80°C'de saklanan numuneler eritilerek 13000 devir/dakika devirle 10 dakika boyunca santrifüje edildi ve üst sıvılar alındı. Her örneğe 200 µl "Binding Buffer" ve 40 µl proteinaz K eklenerek 70°C'lık su banyosunda 10 dakika bekletildi. Üzerine 100 µl izopropanol de eklenerek, toplam karışımlar süzgeçli ependorfa alındı. Tüm sıvılar alt tüplere geçene kadar santrifüje edildi. Ependorflara 500 µl "Inhibitory Buffer" eklendi ve santrifüje edildi. Ardından her defasında 500 µl "Wash Buffer" eklenerek iki santrifüj daha yapıldı. Süzgeçli ependorflara 50 µl "Elution Buffer" eklendi ve santrifüjden sonra içinde serbest DNA'yı bulunduran alt tüp alınarak "Real Time PCR"ın yapılacağı güne kadar -20°C'de muhafaza edildi.

## RT-PCR analizi

Tablo-1'deki içerik ve Tablo-2'de belirtilen şartlar altında RhD'ye ait ekson 7 bölgesine özgün primerler (5'-CTC CAT CAT GGG CTA CAA-3', 5'- CCG GCT CCG ACG GTA TC-3') , Taqman prob (5' FAM AGC AGC ACA ATG TAG ATG TAG ATG ATC TCT CCA TAMRA-3') , FAM (karboksifloresan) ve TAMRA (6-karboksitetrametilrodamin) işaretli probalar kullanılarak, gen tayini için Real Time PCR gerçekleştirildi. Pozitif kontrol için RhD geni, kontaminasyon tayini için NTC kullanıldı. PCR için DNA varlığını doğrulamak amacıyla tüm örnekler PCR öncesinde spektrofotometrede analiz edildi.

Bileşenler	Hacim (µl)	Derişim (nM)
TaqMan prob		
Prob 1	1	25
Prob 2	1	
İleri primer	0.6	300
Geri primer	0.6	300
dH <sub>2</sub> O	3.7	-
Kalıp DNA	50(ng)	-
Master Mix	25	-

**Tablo 4:** RT-PCR'de kullanılan içerik.

	Segment 1	Segment 2	
Sıcaklık (°C)	95	95	60
Süre (saniye)	600	15	60
Döngü	1	50	50

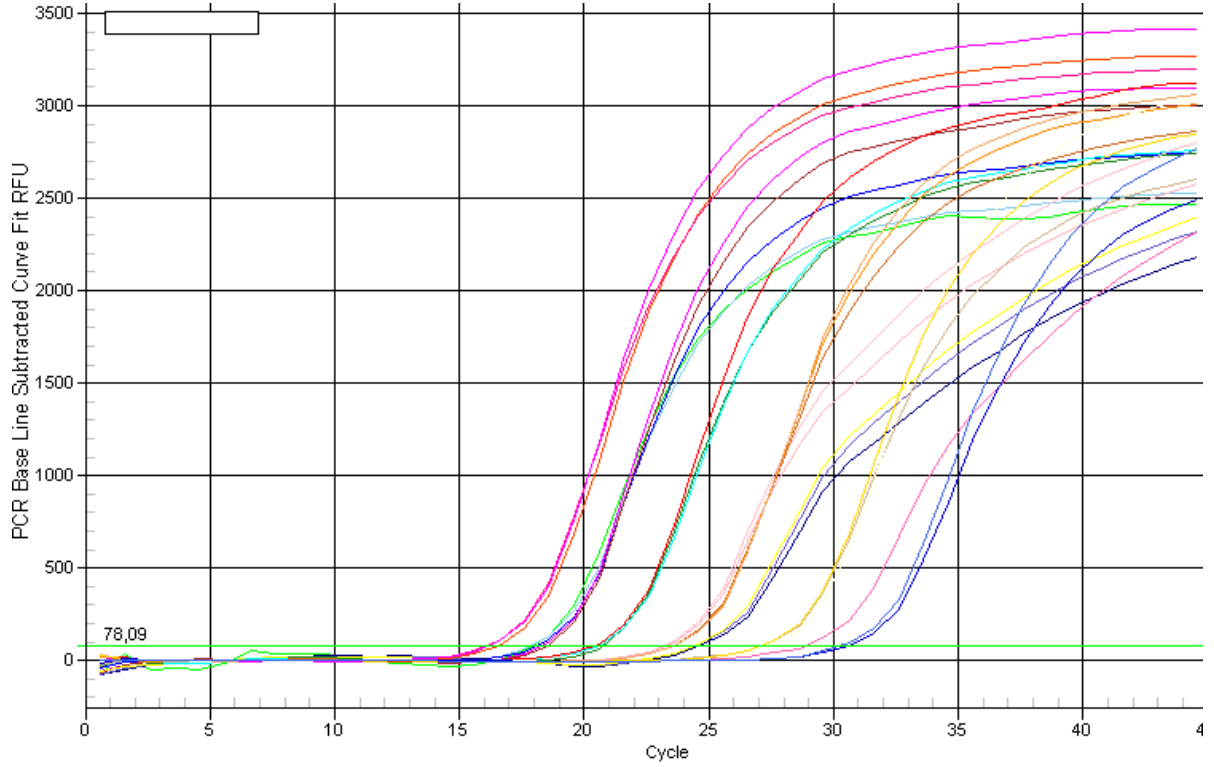
**Tablo-5:** RT-PCR döngü şartları.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların gebelikleri, son adet tarihine göre 6 ve 24. haftalar arasında değişmekte olup ilk trimester ultrasonografisi ile doğrulanmıştır. Ortalama gestasyonel yaş 13.9 hafta bulunmuştur. Sonuçlar, bebeklerin kan gruplarıyla karşılaştırıldığında Real - time PCR ile negatif sonuç saptananların hepsi RhD(-), ancak pozitif saptanan 47 olgudan bir tanesinin RhD (-) olduğu tespit edildi. Yanlış pozitif sonuç elde ettiğimiz gebeden örnek aldığımızda gebeliğinin 24. haftasındaydı. Rh uygunsuzluğu bulunan bu gebelerdeki maternal hücre dışı serbest fetal DNA'da Rh genotiplendirmesini takiben 1. trimester örneklerinde, 2.trimester örneklerinde ve toplamda çalışmanın spesifite, sensitivite, negatif ve pozitif prediktif değerleri hesaplandı. Şekil 9'da real-time PCR ile yapılan değerlendirmelerin grafikleri izlenmektedir.

Rh (-) olduğu bilinen 51 gebe kadına ait total DNA, pozitif ve negatif kontroller ile NTC "Taqman prob" yöntemi ile analiz edildi. Gebeliğinin 10. haftasında spontan abortus ile sonuçlanan bir olgu çalışmadan çıkartıldı. Çalışma sonucunda negatif kontrol, NTC ve 4 örnek RhD (-), pozitif kontrol ve 46 örnek ise RhD (+) olarak bulundu. Gebelerden 28 tanesi ilk trimesterde iken, 22 tanesi ikinci trimesterdeydi. Birinci trimester örneklerinin ortalama haftası 8.78, ikinci trimester örneklerinin ortalama haftası 20.4 idi. Birinci ve ikinci trimester maternal serum örnekleri sınıflandırılarak değerlendirildiğinde;

birinci trimester örnekleri içerisinde 3 yenidoğanın serolojisi Rh (-) ve 25 tanesinin seroloji ise Rh (+) olarak belirlendi. PCR sonuçlarına bakıldığında yalancı negatif ve yalancı pozitif sonuç bulunmamaktadır. Buradan birinci trimester örnekleri alınan gebelerin sonuçlarına göre sensitivite %100, spesifite %100, PPV % 100, ve NPV % 0 ve



**Şekil 9:** RT-PCR grafiği.

toplamda doğruluk %100 olarak hesaplanmıştır. İkinci trimester örnekleri içerisinde; 1 yenidoğanın serolojisi Rh (-) ve 21 bebeğinki de Rh (+) olarak belirlendi. PCR sonuçlarına bakıldığında; 1 yalancı pozitif sonuç görülmüş ve yalancı negatif sonuç saptanmamıştır. Buradan ikinci trimester serumları alınan gebelerin sonuçlarına bakıldığında sensitivite %100, spesifite % 66.6, PPV % 95, ve NPV % 0 olarak bulunmuştur. İkinci trimester örneklerinde toplamda doğruluk oranı ise % 95.23 olarak hesaplandı .



no	yaş	gravid	parite	hafta	çalışma sonucu	gerçek sonuç
1	32	1	0	6	pozitif	pozitif
2	28	1	0	12	pozitif	pozitif
3	30	1	0	12	pozitif	pozitif
4	19	1	0	12	pozitif	pozitif
5	30	2	1	16	pozitif	pozitif
6	29	2	0	16	pozitif	pozitif
7	25	1	0	6	pozitif	pozitif
8	27	1	0	12	pozitif	pozitif
9	31	2	0	6	pozitif	pozitif
10	25	1	0	5	pozitif	pozitif
11	20	1	0	12	pozitif	pozitif
12	36	3	2	16	pozitif	pozitif
13	34	1	0	20	pozitif	pozitif
14	32	1	0	12	pozitif	pozitif
15	33	2	1	6	pozitif	pozitif
16	29	1	0	12	pozitif	pozitif
17	38	2	0	20	pozitif	pozitif
18	24	1	0	24	pozitif	pozitif
19	29	1	0	12	pozitif	pozitif
20	23	1	0	6	pozitif	pozitif
21	30	2	0	24	pozitif	pozitif
22	27	1	0	5	pozitif	pozitif
23	32	3	1	16	pozitif	pozitif
24	29	2	1	5	pozitif	pozitif
25	31	1	0	16	pozitif	pozitif
26	33	1	0	24	pozitif	pozitif
27	30	3	1	24	pozitif	negatif
28	29	2	0	12	pozitif	pozitif
29	39	4	0	12	pozitif	pozitif
30	24	1	0	16	pozitif	pozitif
31	22	1	0	20	pozitif	pozitif
32	26	2	0	5	negatif	negatif
33	28	1	0	8	pozitif	pozitif
34	30	3	1	12	negatif	negatif
35	30	1	0	8	pozitif	pozitif
36	35	2	0	7	pozitif	pozitif
37	32	1	0	24	pozitif	pozitif
38	30	1	0	5	pozitif	pozitif
39	28	1	0	10	pozitif	pozitif
40	24	1	0	16	negatif	negatif
41	31	3	0	20	pozitif	pozitif
42	30	1	0	25	pozitif	pozitif
43	35	2	1	24	pozitif	pozitif
44	34	1	0	8	pozitif	pozitif
45	25	1	0	16	pozitif	pozitif
46	27	1	0	24	negatif	negatif
47	29	2	0	24	pozitif	pozitif
48	31	1	0	24	pozitif	pozitif
49	34	3	2	12	pozitif	pozitif
50	21	1	0	6	pozitif	pozitif

Tablo 7: çalışma sonuçları.

## TARTIŞMA

Serbest fetal DNA'nın keşfinden sonra doğum öncesi prenatal tanıda çok büyük bir ilerleme kaydedildi. Bu süre içinde gerçekleştirilen araştırmalar doğum öncesi fetal cinsiyet tayinini, paternal kalıtımla iletilen tek gen hastalıklarını, hemolitik hastalık taşıyanların tespitini bir gerçeklik haline getirdi.

Yapılan çalışmalardaki %98'ı bulan doğruluk oranları yakın bir zamanda kadınlarda fetal RhD tayininin rutin olarak uygulanabileceği ve insan kaynaklı Anti D kullanımının anlamlı şekilde azalacağını göstermektedir (72). Fetal DNA gebeliğin 5. haftasından itibaren anne kanında tespit edilmekte, doğumun hemen sonrasında hızla yıkılmaktadır. Anne kanındaki total serbest DNA'nın yalnızca %3–6' sı fetal kaynaklıdır (3,75). Bizim çalışmamızda da gebelerin 5. haftasından itibaren Rh uygunsuzluğu olan tüm gebelerden kan alındı. Son zamanlarda gelişen PCR teknikleriyle hassaslık artsa da karşılaşılan en büyük zorluk saf ve yüksek ölçekte fetal DNA izolasyonudur. Bu izolasyona ulaşılmasıyla birlikte invazif girişimlere olan ihtiyaç azalacaktır.

Bizim çalışmamızda 46 hastanın bebeği Rh (+) , 4 hastanın bebeği Rh (-) olarak saptanmış ancak bebekler doğduktan sonra yapılan testlerde Rh (+) olduğu düşünülen bebeklerden bir tanesi Rh (-) çıkmıştır. Bu doğrultuda çalışmamızın doğruluk oranı %98'dir. %2 yanlış pozitif sonucumuzun daha önce bazı çalışmalarda da ortaya konmuş olan RhD pseudogen (RHD $\Psi$ ) veya RHD-CE-Ds hibrit gen ile ilişkili olabileceğini düşünüyoruz (76, 77, 78).

Daha önce 40 hastalık bir çalışmada bir fetusun exon 10 ile negatif, exon 7 ile pozitif olduğu, iki fetusun da exon 7 ile negatif exon 10 ile pozitif olduğu saptanmış bu farklı sonuçlar RHDΨ alelinin maternal RhD ekspresyonuna atfedilmiştir (79). Biz, çalışmamızda sadece RhD exon 7 bölgesini çalıştık. RhD negatif olduğu halde çalışmamızda RhD pozitif saptanan olguda da RHDΨ aleli olabileceğini ve exon 10 bölgesini çalışmadığımız için bu yanlış pozitif sonucu alabilmiş olabileceğimizi düşünmekteyiz.

Yapılan bir çalışmada yanlış pozitif sonuçların etnik köken ile ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Kafkas bölgesinde yaşayanlarda genetik yapının harmanlanmasına rağmen RhD negatif bireylerde delesyonlar yoğun olarak saptanabilmektedir. Afrika'da Rh negatif bireylerde RhD sekansı bulunmakta ancak D antijeni üretmemektedir. Bu sekanslar da RhD pseudogenleridir (80). Yapılan çalışmada Afrika'da pseudogen dağılımları Afrika zencilerinde, Amerikalı- Afrikalılar'da ve zenci güney Afrikalılar'da farklılık göstermektedir (81). Bu nedenle çalışılan grubun etnik kökenini bilmek çok önemlidir. Bizim toplumumuz için net bir veri bulunmamaktadır ancak Günel ve arkadaşlarının yaptığı 40 hastalık bir çalışmada 2 hastada RHDΨ pseudogen saptanmıştır. Hasta sayısının az olması nedeniyle bu oranı toplumuza uyarlamak zordur, RHDΨ pseudogenin çok sık görülmediği çıkarımı yapılabilir. Ancak yine de çalışma sonucunda yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların en aza indirgenebilmesi için RHD geninin birden çok bölgesinin PCR ile amplifikasyonu gereklidir (79).

Toplumda yaklaşık % 0.2 - % 1 civarında "zayıf D" fenotipi mevcuttur (82). Tip 1 ve tip 2 ye ayrılan zayıf D varyantlarından tip 2 de diğer Rh grubu

antijenleri kadar immunizasyona yol açabilir (83). Tip 1 zayıf variant D'lerde ise immunizasyon bildirilmemiştir (84). Denomme tarafından yapılan çalışmada 1022 örnek test edilmiş 2 hastada zayıf D varyantı olduğu görülmüştür. Bu iki hastada serolojik test sonucu RhD pozitif saptanmış bukkal mukozadan alınan doku örneğindeki DNA'sının real time PCR sonucu RhD negatif olarak tespit edilmiştir, (85) benzer şekilde Minon ve arkadaşları 563 hastalık serilerinde 3 hastada serolojik testlerin negatif sonuç verdiğini ancak real time PCR tetkiklerinin pozitif sonuçlandığını bildirmiş, Roulliac ve arkadaşlarının çalışmasında 2 hastada uyumsuzluk, Van der Shoot ve arkadaşlarının çalışmasında da 5 hastada uyumsuzluk bildirilmiştir (76,86,87). Bizim çalışmamızda da bir hasta serolojik olarak negatifken Real time PCR da pozitif saptanmıştır. Bebeğin kanının serolojik kontrolü tekrarlanmış ve sonuç değişmemiştir. Hasta ileri tetikiki kabul etmediğinden dolayı zayıf D varyantı taraması yapılamamıştır. Serolojik testler fetusta olduğu gibi annede de kan grubu belirlenmesinde sıkıntılara yol açabilir. Flegel ve arkadaşları RhD negatif oldukları bilinen hastaların zayıf varyantlarını taramış, sonuç olarak serolojik testlerin annedeki zayıf D varyantını tanıyamadığını ortaya koymuştur. Zayıf variant tip 1 gebelere profilaktik antiD immunoglobulin uygulaması yapılmasının gerekli olmayabileceğini, bu gerekliliğin fetal RhD durumunun belirlenmesiyle ortaya konabileceğini bildirmişlerdir (83).

RHD'nin genetik varyantlarının tam RhD ekspresyonu yapamamasından dolayı genotipik olarak RhD pozitif, fenotipik olarak RhD negatif fetus insidansı %0.8'dir (88,89). Bu yanlış pozitifliklerin klinik önemi fazla değildir çünkü bunun yol açacağı problem sadece bir kaç anne adayının gereksiz yere Anti D immunoglobulin almaya devam etmesidir (90). Aslında bu

fetuslarda da serolojik olarak tespit edilemeyen, düşük miktarlarda RhD antijen üretimi olabileceğinden bu gebelerin aşılması makul görünmektedir (90).

Yanlış negatif sonuçlar, yanlış pozitif sonuçlara göre daha ciddi bir problem teşkil etmektedirler çünkü bu gebelere antenatal D immunoglobulin profilaksisi yapılmamış olacaktır ki antenatal profilaksi ile % 0.3 civarında görülen alloimmunizasyon sadece doğumdan sonra yapılan Anti – D immunoglobulin ile % 1 civarındadır. NICE kılavuzlarına göre 28 ve 34. Haftalarda uygulanan anti D immunoglobulin ile RhD negatif kadınlardan 1/86000 İnin bir sonraki gebeliğinde sorun olacaktır. Duyarlılık gelişen gebeliklerin % 5'inde fetal veya neonatal ölüm, %5'inde ise ciddi gelişimsel sorunlar ortaya çıkacaktır. Bu nedenle yanlış negatif sonuç, 860000 kadında bir görülen fetal veya neonatal ölüm ve ciddi gelişimsel problemlili çocuk vakalarına bir vaka ekleyecektir (38).

Bizim çalışmamızda örneklerin hiçbirinde anlamsız amplifikasyonlar izlenmemiş, kontaminasyona rastlanmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 50 hastanın 5 tanesinin RhD negatif olduğu tespit edilmiştir. Aslında toplumdaki Rh negatif kadınların %40'ının Rh negatif fetus taşıdığı bilinmektedir (91) ancak bizim çalışmamızda bu oran %10 olarak tespit edilmiştir. Oranlardaki bu farklılık muhtemelen çalışma grubumuzdaki hasta sayısının az olmasından kaynaklanmaktadır. RhD negatif fetusların toplum ortalamasından daha az bulunmuş olmasının muhtemel bir sebebi de çalışma grubumuzdaki heterozigot babaların toplum genelinden fazla oranda olmasıdır. Yanlış negatif sonuçlara sebep olan, anlatım yapamayan ya da düşük seviyede anlatım yapan RhD varyantları toplumumuzda bulunmamaktadır. Yanlış pozitif sonuçların varlığı ise Rh negatif fetusların oranının daha da artması anlamına

geleceğinden sonuçlarımız her durumda, fetal RhD tayininin bir gerçeklik haline gelmesinin sanılandan daha büyük yararları olacağını göstermektedir.

RT-PCR kullanımına rağmen yanlış pozitif sonuç elde edilmesinin bir nedenin de materyalin transport zamanının uzun olması olduğu düşünülmektedir. Müller ve arkadaşları çalışmalarında 6 gün oda ısısında bekleyen örneklerdeki fetal DNA oranının değişmediğini ancak anneye ait DNA'nın konsantrasyonunun arttığını ve bu nedenle maternal DNA kontaminasyon riskinin artabileceğini bildirmişler bu nedenle güvenilir sonuçlar elde edebilmek için 5 günden fazla beklemiş olan materyali çalışmaya dahil etmeme kararı almışlardır (74). Minon ve arkadaşları 48 saatten fazla beklemiş örneklerle çalışmayı güvensiz olarak tanımlarken, Finning ve arkadaşları 14 günden fazla bekleyen örneklerle yapılan çalışmalarda yanlış pozitif sonuçların arttığını bildirmiştir (86,90).

Bizim çalışmamızda materyallerin toplanması aşamasında örnekler alınır alınmaz, santrifüjü takiben ilk 48 saat içinde, DNA izolasyonu yapılacak güne kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Bu nedenle yanlış pozitif sonucun materyalin transport zamanıyla ilişkili olduğunu düşünmüyoruz.

Finning ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucunda gebelik haftası ilerledikçe anne plazmasındaki fetal DNA oranının arttığını gösteren çalışma, bu çalışmadan önce fetal DNA miktarlarının ikinci trimesterdeki değerlerinin birinci trimesterden daha az olduğunu gösteren Smid ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla tezat oluşturmaktadır (92,93).

Örnekleme amaçlı kan alma zamanını seçmek için anne kanındaki maksimum fetal DNA konsantrasyonlara ne zaman ulaşıldığının belirlenmesi erken prenatal tanı için önemlidir ve daha geniş hasta sayılı çalışmalarla bu

zamanlama teyid edilmelidir. Bizim çalışmamızda 28 hastadan ilk trimesterde, 22 hastadan ikinci trimesterde kan alınmıştır. İlk trimester örneklerinin hepsinde Rh durumu doğru olarak tespit edilmiş, ikinci trimester alınan örneklerden bir tanesinde yanlış pozitif sonuç elde edilmiştir. Holtzman tarafından yapılan bir metaanalizde 37 çalışma irdelenmiş, 3261 örnekte analiz yapıldığı bunlardan % 30'unda gestasyonel yaş ile ilişkinin ortaya konduğu bildirilmiştir. Bu hastaların 240'i ilk trimester, 412 si ikinci trimester, 272si de üçüncü trimesterdeydi ve doğruluk oranları ilk trimesterde % 90.8, ikinci trimesterde % 85, üçüncü trimesterde % 85.3 olarak bildirilmişti. Bu çalışmaya göre ilk ve ikinci trimesterler arasında doğruluk oranlarına anlamlı fark varken ikinci ve üçüncü trimester örneklerinin doğruluk oranlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır (94).

Daha önce küçük hasta gruplarıyla yapılan çalışmalarda anne kanındaki fetal DNA konsantrasyonu üzerine etkisi olabilecek özel durumlar araştırılmıştır. Preterm doğum, Preeklampsi gibi plasental fonksiyon bozukluklarında anne kanına geçen fetal DNA miktarının normal gebeliklerden fazla olduğu tespit edilmiştir (72, 95).

Bizim çalışmamızdaki hastalardan hiçbirinde gebeliğe bağlı hipertansiyon veya preterm doğum görülmemiştir. Lo ve arkadaşları benzer bir ilişkinin anormal karyotipe sahip fetus taşıyan annelerde de olduğunu bildirmiştir (96) ancak yine bizim hasta grubumuzda kromozomal anomalili fetus bulunmamaktadır. Alberry ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada anembryonik gebeliklerde de normal gebeliklerdeki kadar serbest fetal DNA bulunmuş olması (97) bu fetal DNA'nın apoptoza uğrayan , dolayısıyla DNA'nın ayrıştığı, sinsitiyotrofoblastlardan kaynaklandığına inanılmaktadır. Serbest fetal

DNA'nın büyüklüğüne göre dağılımı üzerine çalışmalar, ortalama büyüklüğünün, belirgin şekilde daha büyük olan maternal DNA parçalarının aksine, 300 bp veya daha küçük olduğunu göstermiştir (98,99).

Pregnancy Associated Placental Protein (PAPP-A) İnsulin growth faktor (IGF) bağlayıcı protein – 4 için proteazdır dolayısı ile düşük PAPP-A seviyeleri yüksek IGF bağlayıcı protein-4 seviyesi ile, dolayısıyla düşük IGF ile ilişkilidir. İnsülin, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenlemek suretiyle fetusun büyümesinde rol oynamakta ve trofoblast invazyonunda etkin görev üstlenmektedir (100,101). Gebeliğin erken döneminde trofoblast invazyonunda problem olup plasental gelişim yetersiz olduğunda plasentada apoptotik süreç hızlanmakta, serbest fetal DNA oranlarındaki artışa paralel olarak PAPP-A seviyelerinde düşme gözlenecektir, ancak bu hipotezi doğrulamak için çalışmalara ihtiyaç vardır (102). Biz çalışmamızda serbest DNA miktarlarını PAPP-A seviyeleriyle karşılaştırmadık.



## SONUÇ

Çalışmamızda, Rh uygunsuzluğu bulunan gebelerde, maternal kanda, serbest fetal DNA'nın genotiplendirmesinde real-time PCR kullanımının etkinliğini araştırdık. Maternal kanda serbest fetal DNA genotiplendirmesiyle, bu amaçla yapılan invaziv yöntemlere ait riskleri ortadan kaldırmayı, Rh D (-) fetus taşıyan Rh D (-) gebelere, elde edilmesi kolay olmayan bir kan ürününün gereksiz yere uygulanmasını sınırlandırmayı, Rh D (+) fetus taşıdığı bilinen Rh D (-) gebelerin hidrops açısından daha yakından takibinin mümkün olmasını amaçladık.

Çalışmamızın sonucunda, literatürle paralel olarak, maternal kandan serbest fetal DNA izolasyonu ve RhD durumunun belirlenmesinin yüksek duyarlılık ve özgüllükle yapılabileceğini saptadık. Çalışmamızda ortaya çıkan yanlış pozitif sonucu, sadece exon 7 bölgesini çalışmış olmamıza bağlıyoruz ve genin daha fazla bölgesinin çalışılarak yanlış pozitif sonuçların azalabileceğini düşünüyoruz.

Gelecekte, bu konuda yapılacak çalışmaların daha yüksek hasta popülasyonu ile yapılması, yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçların nedenlerini araştırmaya yoğunlaşılması uygun olur. Bu sayede, fetusun DNA'sının anne kanında güvenilir bir şekilde saptanabilir hale gelmesinden sonra, perinatolojide bir çığır açacak olan anöplidilerin, non invazif olarak saptanması mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Diseases and injuries of the fetus and newborn. Williams Obstetrics. Twenty-one edition. 2001. New York: McGraw-Hill Company. New York, USA.
2. van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13(1-2):53-57.
3. Freeman K, Szczepura A, Osipenko L. Non-invasive fetal RHD genotyping tests: a systematic review of the quality of reporting of diagnostic accuracy in published studies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;142(2):91-98.
4. Walker RH. Technical manual. Eleventh edition. 1993. American Association of Blood Banks. Bethesda, USA.
5. Aubin J-T, Le Van Kim C, Mouro I. Specificity and sensitivity of RHD genotyping methods by PCR-based DNA amplification. *Br J Haematol* 1997;98:356–364.
6. Daniels G, Finning K, Martin P, Soothill P. Fetal blood group genotyping from DNA from maternal plasma: an important advance in the management and prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 2004;87:225–232.
7. Wright CF, Burton H. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. *Hum Reprod Update* 2009;15(1):139-151.

8. Lo YM, Lo ES, Watson N, Noakes L, Sargent IL, Thilaganathan B, Wainscoat JS. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. *Blood* 1996;88(11):4390-4395.
9. Barss VA, Frigoletto FD, Konugres A. The cost of irregular antibody screening. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159(2):428.
10. Gabbe SG, Niebly JR, Simpson JL. *Obstetrics normal and problem pregnancies*. Fourth edition. 2002. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA.
11. Moise, KJ Jr. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002;100:600-611.
12. Cherif-Zahar B, Mattei M, Le Van Kim C, Bailly P, Cartron JP, Colin Y. Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region by in situ hybridization. *Hum Genet* 1991;86:398–400.
13. Creasy R, Resnik R. *Maternal fetal medicine principle and practice*. Third edition. 1994. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA.
14. Brown PJ, Evans JP, Sinor LT, Tilzer LT, Plapp FV. The Rhesus D antigen. A dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid. *Am J Pathol* 1983;110(2):127-134.
15. Cannon M, Pierce R, Taber EB. Fatal hydrops fetalis caused by anti-D in a mother with partial D. *Obstet Gynecol* 2003;102:1143-1145.
16. Dönbak L, Salaçin S. Rh kan grubu antijenlerinin mikro yöntemlerle fenotiplendirilmesi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 2006;9(1):23-27.
17. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı. Mesleki ve Teknik Eğitim. <http://megep.meb.gov.tr>.

18. Brouwers HA, Overbeeke MA, Huiskes E, Bos MJ, Ouwehand WH, Engelfriet CP. Complement is not activated in ABO-haemolytic disease of the newborn. *Br J Haematol* 1988;68(3):363-366.
19. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Reviews* 2000;14:44–61.
20. Taylor JF. Sensitization of Rh-negative daughters by their Rh-positive mothers. *N Engl J Med* 1967;276(10):547-551.
21. Choavaratana R, Uer-Areewong S. Feto-maternal transfusion in normal pregnancy and during delivery. *J Med Assoc Thai* 1997;80(2):96-100.
22. Bowman JM. Controversies in Rh prophylaxis. Who needs Rh immune globulin and when should it be given? *Am J Obstet Gynecol* 1985;151(3):289-294.
23. Howell PJ, Allen DL, Entwistle CC. Blood group antibody screening tests during pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 1986;93(10):1038-1043.
24. Howard H, Martlew V, McFadyen I, Clarke C, Duguid J, Bromilow I, Eggington J. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunisation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998;78(1):F62-66.
25. Mayne KM, Howell PJ, Pratt GA. The significance of anti-Kell sensitization in pregnancy. *Clin Lab Haematol* 1990;12(4):379-385.
26. Caine ME, Mueller-Heubach E. Kell sensitization in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154(1):85-90.
27. Bowman JM, Pollock JM, Manning FA, Harman CR, Menticoglou S. Maternal Kell blood group alloimmunization. *Obstet Gynecol* 1992;79(2):239-244.
28. Alper CA. *Hematology*. 1977. Cambridge, UK.

29. Nicolini U, Nicolaidis P, Tannirandorn Y, Fisk NM, Nasrat H, Rodeck CH. Fetal liver dysfunction in Rh alloimmunization. *Br J Obstet Gynaecol* 1991;98(3):287-293.
30. Sagol S, Akercan F, Solmaz P, Kazandı M, Çırpan T. Rhesus alloimmunizasyon olan gebeliklere yaklaşım: Olgu sunumu. *Ege Tıp Dergisi* 2005;44(2):119-122.
31. Ocak V, Demirkıran F, Sen C, Colgar U, Oçer F, Kilavuz O, Uras Y. The predictive value of fetal heart rate monitoring: a retrospective analysis of 2165 high-risk pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;44(1):53-58.
32. Braun T, Brauer M, Fuchs I, Czernik C, Dudenhausen JW, Henrich W, Sarioglu N. Mirror syndrome: a systematic review of fetal associated conditions, maternal presentation and perinatal outcome. *Fetal Diagn Ther* 2010;27(4):191-203.
33. Hadley A, Soothill P. *Alloimmune disorders in pregnancy*. 2002. Cambridge, UK.
34. Hudon L, Moise KJ, Hegemier SE. Long-term neurodevelopmental outcome after intrauterine transfusion for the treatment of fetal hemolytic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:858-863.
35. Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ Jr, Dorman KF, Ludomirsky A, Gonzalez R, Gomez R, Oz U, Detti L, Copel JA, Bahado-Singh R, Berry S, Martinez-Poyer J, Blackwell SC. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative group for Doppler

- assessment of the blood velocity in anemic fetuses. *N Engl J Med* 2000;342(1):9-14.
36. Queenan JT, Tomai TP, Ural SH, King JC. Deviation in amniotic fluid optical density at a wave length of 450 nm in Rh immunized pregnancies from 14 to 40 weeks' gestation: A proposal for clinical management. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1370-1376.
  37. Kenneth J, Moise K Jr. Management of Rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2002;100:600-611.
  38. Guidance on the use of routine antenatal anti-D prophylaxis for D-negative women. National Institute for Clinical Excellence. 2002. London, UK.
  39. Behrens O, Lellé RJ. Rhesus prophylaxis--history and current status. *Zentralbl Gynakol* 1997;119(5):204-210.
  40. T.C. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. Rhogam. <http://www.iegm.gov.tr>.
  41. Bowman JM. The prevention of Rh immunization. *Transfus Med Rev* 1988;2:129–150.
  42. Crowther C, Middleton P. Anti-D administration after childbirth for preventing Rhesus alloimmunisation. *The Cochrane Database* 2000;(2):CD000021.
  43. Mouro I, Colin Y, Chérif-Zahar B, Cartron JP, Le Van Kim C. Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system. *Nat Genet* 1993;5(1):62-65.

44. Geifman-Holtzman O, Bernstein IM, Berry SM, Holtzman EJ, Vadnais TJ, DeMaria MA. Fetal RhD genotyping in fetal cells flow sorted from maternal blood. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:818-822.
45. Lo YMD, Pate IP, Wainscoat JS, Sampietro M, Gillmer MD, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989;2:1363-1365.
46. Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am J Hum Genet* 1997;61:822-829.
47. Lo YMD, Howell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD. Prenatal determination of fetal rhesus D status by DNA amplification of peripheral blood of rhesusnegative mothers. *Ann NY Acad Sci* 1994;731:229-236.
48. Toth T, Papp C, Toth-Pal E, Nagy B, Papp Z. Fetal RhD genotyping by analysis of maternal blood. A case report. *J Reprod Med* 1998;43:219-222.
49. Lo YMD, Howell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gillmer MD. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. *Lancet* 1993;341:1147-1148.
50. Sekizawa A, Watanabe A, Kimura T, Saito H, Yanaihara T, Sato T. Prenatal diagnosis of the fetal RhD blood type using a single fetal nucleated erythrocyte from maternal blood. *Obstet Gynecol* 1996;87:501-505.

51. Hamada H, Arinami T, Hamaguchi H, Kubo T. Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood after delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1188-1193.
52. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Maternal fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:705-708.
53. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, Bean MA, Ober C, Bianchi DW. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* 1998;351:559-562.
54. Nelson JL. Microchimerism and autoimmune disease. *N Engl J Med* 1998;388:1224-1225.
55. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997;350:485-487.
56. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM, Ann N. Circulating fetal RNA in maternal plasma. *Y Acad Sci* 2001;945:207-210.
57. Levy R, Nelson DM. To be or not to be, that is the question. Apoptosis in human trophoblast. *Placenta* 2000;21(1):1-13.
58. Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ, Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:271-275.
59. Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AMZ, Hjelm NM. Quantitative



- analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998;62:768-775.
60. Lo YMD, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999;64:218-224.
  61. Rijnders RJ, van der Luijt RB, Peters ED, Goeree JK, van der Schoot CE, van Amstel PJK. Earliest gestational age for fetal sexing in cell-free maternal plasma. *Prenat Diagn* 2003;23:1042–1044.
  62. Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by Molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med* 1998;339:1734-1738.
  63. Bischoff FZ, Nguyen DD, Marquez-Do D, Moise K Jr, Simpson JL, Elias S. Non-invasive determination of fetal RhD status using fetal DNA in maternal serum and PCR. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:64-69.
  64. Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. *BJOG* 2000;107:766-769.
  65. Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetoplacental DNA. *Am J Pathol* 2006;169(2):400-404.
  66. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;260(2):248-256.

67. Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, Kaufmann P. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta* 2003;24:181-190.
68. Fomigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000;182:41-49.
69. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
70. Lo YMD, Chiu RW. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat Rev Genet* 2007;8:71-77.
71. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 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;4:357–362.
72. Hahn S, Chitty LS. Noninvasive prenatal diagnosis: current practice and future perspectives. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20:146-151.
73. Kubista M, Andrade MJ, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjöbak R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlbeg A, Zoric N. The real – time polymerase chain reaction. *Mol Asp Med* 2006;27:95-125.
74. Müller SP, Bartels I, Stein W, Emons G, Gutensohn K, Köhler M, Legler TJ. The determination of the fetal D status from maternal

- plasma for decision making on Rh prophylaxis is feasible. *Transfusion* 2008;48(11):2292-2301.
75. Daniels G, Finning K, Martin P, Massey E. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *Prenat Diagn* 2009;29(2):101-107.
  76. Rouillac-Le SC, Puillandre P, Gillot R, Baulard C. Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004;8:23-31.
  77. Scheffer P, van der Schoot C, Page-Christiaens G, de Haas M. 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;118:1340-1348.
  78. Bennett PR, Le Van Kim C, Colin Y, Warwick RM. Prenatal determination of fetal RhD type by DNA amplification. *N Engl J Med* 1993;329:607-610.
  79. Gunel T, Kalelioglu I, Gedikbasi A, Ermis H, Aydinli K. Detection of fetal RHD pseudogene (RHD $\Psi$ ) and hybrid RHD-CE-Ds from RHD-negative pregnant women with a free DNA fetal kit. *Genet Mol Res* 2011;10(4):2653-2657.
  80. Faas BHW, Beckers EAM, Wildoer P, Lightart PC. Molecular background of VS and weak C expression in blacks. *Transfusion* 1997;37:38-44.
  81. Rodrigues A, Rios M, Pellegrino J Jr, Costa FF. Presence of the RHD pseudogene and the hybrid RHD-CE-D(s) gene in Brazilians with the D-negative phenotype. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:767-773.

82. Wagner FF, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA. Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93(1):385-393.
83. Flegel WA, Khull SR, Wagner FF. Primary anti-D immunization by weak D type 2 RBCs. *Transfusion* 2000;40(4):428-434.
84. Flegel WA, Denomme GA, Yazer MH. On the complexity of D antigen typing: a handy decision tree in the age of molecular blood group diagnostics. *J Obstet Gynaecol Can* 2007;29(9):746-752.
85. Denomme GA, Dake LR, Vilensky D, Ramyar L, Judd WJ. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion* 2008;48(3):473-478.
86. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008;48(2):373-381.
87. van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LG, de Haas M. Non-invasive antenatal RHD typing. *Transfus Clin Biol* 2006;13(1-2):53-57.
88. Wagner FF, Frohmajer A, Flegel WA. RHD positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genet* 2001;2:10.
89. Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W, Flegel WA. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion* 2005;45(10):1554-1560.
90. Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. 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;12:336(7648):816-818.
91. Szczepura A, Osipenko L, Freeman K. A new fetal RHD genotyping test: costs and benefits of mass testing to target antenatal anti-D prophylaxis in England and Wales. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;18;11-15.
  92. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002;42(8):1079-1085.
  93. Smid M, Lagona F, de Benassuti L, Ferrari A, Ferrari M, Cremonesi L. Evaluation of different approaches for fetal DNA analysis from maternal plasma and nucleated blood cells. *Clin Chem* 1999;45(9):1570-1572.
  94. Geifman-Holtzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood--a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195(4):1163-1173.
  95. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. *Lancet* 1998;352:1904–1905.
  96. Lo YM, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AM, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. *Clin Chem* 1999;45(10):1747-1751.
  97. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007;27(5):415-418.

98. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004;50(1):88-92.
99. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms *Clin Chem* 2004;50(6):1002-1011.
100. Dugoff L, Hobbins JC, Malone FD, Porter TF, Luthy D, Comstock CH, Hankins G, Berkowitz RL, Merkatz I, Craigo SD, Timor-Tritsch IE, Carr SR, Wolfe HM, Vidaver J, D'Alton ME. First-trimester maternal serum PAPP-A and free-beta subunit human chorionic gonadotropin concentrations and nuchal translucency are associated with obstetric complications: a population-based screening study (the FASTER Trial). *Am J Obstet Gynecol* 2004;191(4):1446-1451.
101. Byun D, Mohan S, Yoo M, Sexton C, Baylink DJ, Qin XJ. Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 in vitro. *Clin Endocrinol Metab* 2001;86(2):847-854.
102. Vora NL, Johnson KL, Lambert-Messerlian G, Tighiouart H, Peter I, Urato AC, Bianchi DW. Relationships between cell-free DNA and serum analytes in the first and second trimesters of pregnancy. *Obstet Gynecol* 2010;116(3):673-678.