

# RHD-genotyping ved bruk av allel-spesifikk «Loop-mediated isothermal DNA Amplification»

Av THOMAS HUNDHAUSEN<sup>1</sup>, NANCY LACSAMANA<sup>2</sup>,  
URAIWAN TEDENES<sup>3</sup> og AUDUN SLETTAN<sup>4</sup>  
E-post: thomas.hundhausen@uia.no

1. Førstelektor, dr. med., Universitetet i Agder, Fakultet for teknologi og realfag. Spesialist i immunologi og transfusjonsmedisin og lege i spesialisering, Avdeling for medisinsk biokjemi, Sørlandet Sykehus.
2. Bioingeniør, Universitetssykehuset i Nord-Norge, bachelorstudent ved UiA 2010-2013.
3. Bioingeniør, Sørlandet sykehus, Arendal, bachelorstudent ved UiA 2010-2013.
4. PhD, Førsteamanuensis, Universitetet i Agder, Fakultet for teknologi og realfag.

**M**ED UNNTAK AV «ABO», er «Rh» det klinisk viktigste blodtypesystemet. Genetisk består det av to homologe, kodominante og tett koblede genloci på kromosom 1, *RHCE* og *RHD*. *RH*-genene har ti eksoner hver og koder for to forskjellige, men nært beslektede erytrocytære membranproteiner, RhCE og RhD. Sistnevnte uttrykker det mest immunogene Rh-antigenet, D. Omtrent 15 prosent av nordmenn er RhD-negative (1), noe som oftest skyldes delesjon av hele *RHD*-genet (2).

Når RhD-negative personer kommer i kontakt med D-antigenet, som regel gjennom graviditet med et RhD-positivt foster eller blodtransfusjon med RhD-positivt blod, danner noen anti-D, et antistoff som kan forårsake hemolytisk sykdom av fostre/nyfødte og alvorlige transfusjonsreaksjoner (3). Derfor er det viktig å kjenne til RhD-statusen til pasienter, gravide og blodgivere. Serologisk fenotyping av RhD er rutine i alle norske blodbanker, men av og til er serologi alene utilstrekkelig eller utilgjengelig. Dette gjelder for eksempel blodgivere med betydelig svekket/avvikene-

de RhD-uttrykk på grunn av mutasjoner i *RHD*-genet, men også noninvasiv prenatal fosterdiagnostikk der det brukes genotyping av fritt føtalt DNA i maternalt plasma for å bestemme fosterets RhD-fenotype og styre prenatal Rh-profylakse (4). Flere PCR-baserte metoder for *RHD*-genotyping er beskrevet (5). Det er imidlertid en utfordring i den laboratoriemedisinske hverdagen at alle disse avhenger av avansert utstyr og høyspesialisert kompetanse, slik at *RHD*-genotyping per i dag er begrenset til referanselaboratorier.

Formålet med vår studie var å prøve ut *Loop-Mediated Isothermal-Amplification* (LAMP), som er en forholdsvis ny og enkel teknikk for amplifisering av DNA eller RNA (6). Metoden legger til rette for å kunne utføre DNA-baserte analyser i mindre velutstyrte laboratorier og med lavere krav til teknisk kompetanse.

I motsetning til PCR, skjer amplifiseringen ved konstant temperatur (isotermisk), og kan derfor utføres med enkel varmeblokk eller til og med i vannbad. I tillegg til å være en enkel metode, kan sensitiviteten til LAMP være 100 - 1000 ganger høyere enn stan-

## Sammendrag

**Bakgrunn:** Med unntak av «ABO» er «Rh» det klinisk viktigste humane blodtypesystemet. Antistoffer mot D-antigenet (RhD) kan forårsake hemolytisk sykdom hos fostre/nyfødte og hemolytisk transfusjonsreaksjon. RhD-typing er derfor rutine i alle immunhematologiske laboratorier. Som supplement til fenotyping finnes flere *RHD*-genotypingsmetoder, siden det kan være vanskelig å type RhD korrekt kun ved serologiske metoder. Genotyping krever imidlertid ofte avansert utstyr og kompetanse. Formålet med denne studien er å prøve ut «loop mediated isothermal amplification» (LAMP), et raskt og mindre ressurskrevende alternativ for *RHD*-genotyping.

**Materiale og metode:** Femten personer ble fenotyper og genotyper for RhD ved både blodtypeserologiske standardmetoder og en selvutviklet LAMP-genotyping-protokoll. Som utgangsmateriale ble det benyttet isolert DNA og epitelceller fra kinnslimhinne. Analytisk sensitivitet og spesifisitet ble vurdert med hjelp av *RHD*-DNA- og *RHD/RHCE*-DNA-fortynningsrekker.

**Resultater og konklusjon:** LAMP-metoden viser høy analytisk sensitivitet idet det kan detekteres så lite som 9,6 pg *RHD*-DNA per reaksjon, og god analytisk spesifisitet; vi påviser ingen teknisk betinget kryssreaktivitet mellom *RHD* og *RHCE*. Andelen av *RHD*-DNA som kan påvises i en *RHCE*-DNA positiv bakgrunn er 0,4 prosent. Dette er godt nok for å kunne påvise *RHD*-positivt fritt føtalt DNA i plasma fra RhD-negative gravide kvinner. Per i dag gjenstår imidlertid den kliniske valideringen av LAMP-*RHD*-genotyping.

Metoden fungerer også med varmebehandlede epitelceller som templat, og viser at den ikke krever rensed DNA for å fungere.

**Nøkkelord:** Rh blodtypesystem, D-antigen, genotyping metoder, DNA amplifiseringsmetoder.

■ Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfellevurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

■ Artikkelen er basert på en bacheloroppgave utført våren 2013. Studien er finansiert av, og utført ved Universitetet i Agder, Fakultet for teknologi og realfag.

Oligo navn	Sekvenser
RhD-F3	5'-CTCCATCATGGGCTACAA-3'
RhD-B3	5'-CAGCTAAGGACTCTGCACAC-3'
RhD-FIP	5'-TCCGACGGTATCAAGCACCAGTTTTCTTCAGCTTGCTGGGTCTG-3'
RhD-BIP	5'-GCCGGCAATGGCATGTGGGTTTTCTGAGTTGGAGGGGAGTGT-3'
RhD-LF	5'-CAGCACAATGTAGATGATCTCTCC-3'
RhD-LB	5'-ACTGGGCTTACCCCCATCC-3'
Bact-F3	5'-AGGCTGTGCTATCCCTGTAC-3'
Bact-B3	5'-CACGATTTCCCGCTCGG-3'
Bact-FIP	5'-GATGGGCACAGTGTGGGTGATTTGGCCGTACCACTGGCA-3'
Bact-BIP	5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGGCTTTTGTGAAGCTGTAGCCGCG-3'
Bact-LF	5'-CACCGGAGTCCATCACGA-3'
Bact-LB	5'-GCCGGGACCTGACTGACTA-3'

**TABELL 1:** LAMP-primere til deteksjon av RHD-genet og kontrollgenet beta-aktin.

dard PCR, på linje med de mest avanserte real-time-PCR-metodene (7). Avlesning av resultatet, det vil si deteksjon av produktet, kan gjøres visuelt uten bruk av avansert utstyr. Essensielt i teknikken er at reaksjonen foregår ved 60 – 65 °C, hvor trådene i DNA-molekylet er i konstant skifte mellom hybridisering og denaturering. Videre er det sentralt at DNA-polymerasen som benyttes har *strand displacement*-egenskap, det vil si at den kan skille DNA-trådene nedstrøms for syntesen.

Figur 1 (neste side) viser prinsippet for LAMP. I tillegg til de beskrevne primerne i figur 1, kan man bruke

et ekstra sett med loop primers (LF og LB) som hybridiserer til den enkelttrådige loopen i LAMP-produktet (8). Dette effektiviserer amplifiseringen, og er benyttet i dette arbeidet.

Vi beskriver i denne artikkelen hvordan man ved hjelp av LAMP kan, med høy sensitivitet og spesifisitet, utføre RHD-genotyping på rensed DNA så vel som på enkle slimhinneceletterprøver.

### Materiale og metode

EDTA-fullblod ble tappet fra 15 frivillige personer etter informert samtykke. Alle prøvene ble anonymisert før fenotypering og genotyping for RhD. RhD fenotyping ble gjennomført i rørteknikk etter blodbankens standardprosedyre (9). Resultatene fra denne RhD-typingen ble brukt som gullstandard, og benyttet til å bekrefte riktigheten av resultatene fra genotyping ved LAMP-analyse (tabell 2). DNA ble isolert fra 100 µl av fullblodprøvene ved hjelp av DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) ved å følge produsentens anbefalte prosedyre. Konsentrasjon og renhet av isolert DNA ble målt på NanoDrop spektrofotometer (Thermo Scientific).

DNA fra epitelceller fra kinn ble isolert ved en enkel prosedyre: Fire av forsøkspersonene skylte munnen med 5 ml fysiologisk saltvann. 1,5 ml av dette ble sentrifugert ved 9000 g i to minutter, og pellet ble resuspendert i 200 µl H<sub>2</sub>O før prøven ble inkubert i vannbad ved 100 °C i 10 minutter. Prøvene ble satt på is i fem minutter

## Abstract

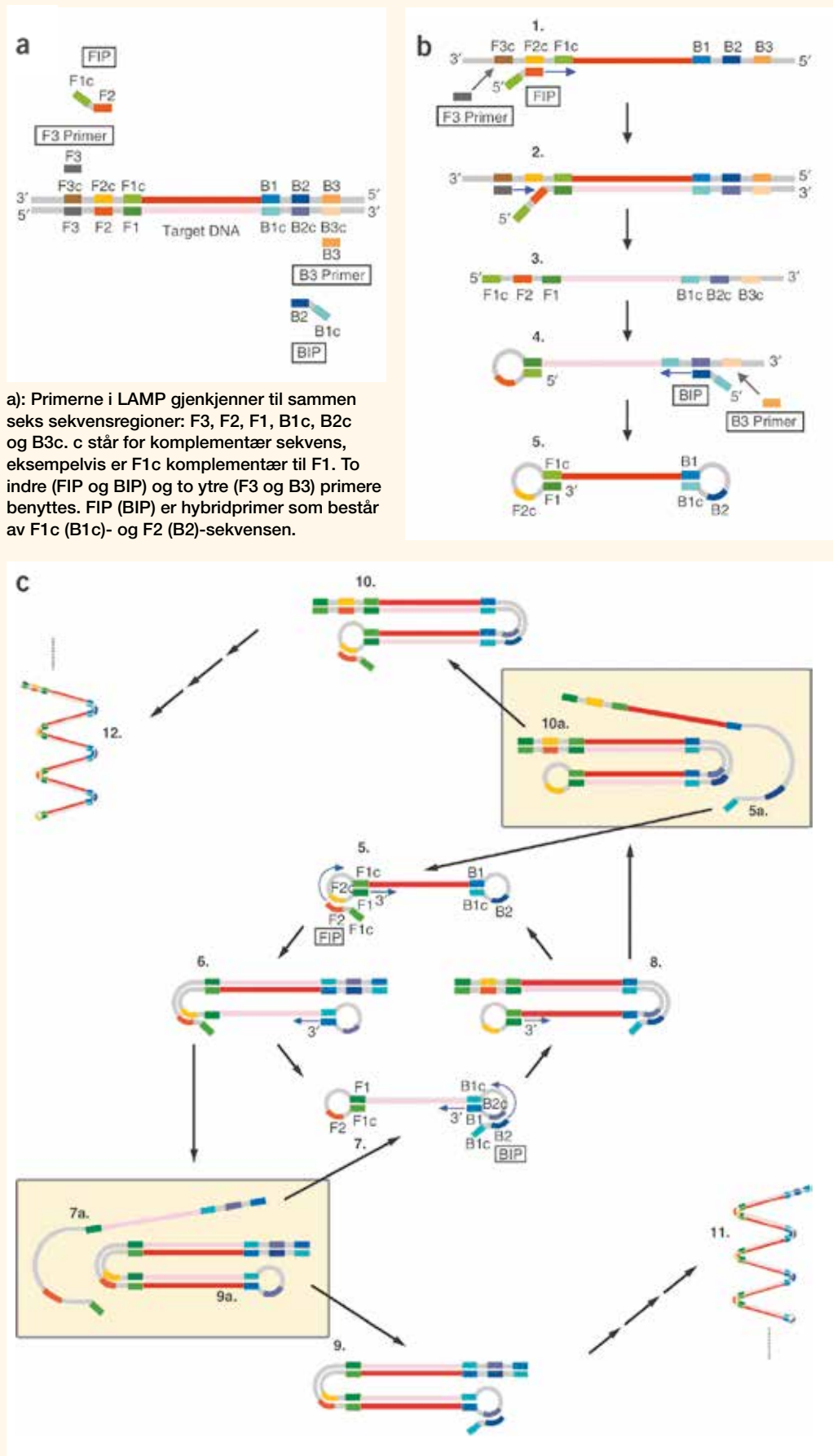
### **RHD genotyping by allele specific “Loop-mediated isothermal DNA Amplification”**

**Background:** The “Rh” cluster, with its main antigen D, is the most important blood group system after “ABO”. Because anti-D antibodies can cause hemolytic disease of the fetus and newborn as well as hemolytic transfusion reactions, phenotyping for RhD is routinely used in every immunohematology laboratory. As it is not always possible to determine RhD antigens by serology alone, several RHD genotyping methods have been developed; these, however, necessitate advanced equipment and specially trained operators. The aim of this study is to introduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) as a robust, fast and simple method for RHD genotyping.

**Material and methods:** Fifteen persons were fenotyped and genotyped for RhD by standard serology and our proprietary LAMP protocol, using isolated DNA and cheek cells, respectively. Analytic sensitivity and specificity was determined by serial dilutions of solutions containing RHD DNA and RHD/RHCE DNA.

**Results and conclusion:** LAMP is highly sensitive; it detects as little as 9.6 pg RHD positive DNA per reaction. There is complete agreement between genotypes and phenotypes, while it is possible to specifically detect 0.4 percent RHD DNA in a background of RHCE DNA. This shows that LAMP may be capable of detecting cell free fetal RHD positive DNA in plasma from RhD negative pregnant women. Clinical evaluation of LAMP RHD genotyping, however, is pending to date. The method also works with heat treated epithelia cells as template, which demonstrates that the method does not require purified DNA for successful amplification.

**Keywords:** Rh blood group system, D-antigen, genotyping techniques, DNA amplification techniques.



a): Primerne i LAMP gjenkjenner til sammen seks sekvensregioner: F3, F2, F1, B1c, B2c og B3c. c står for komplementær sekvens, eksempelvis er F1c komplementær til F1. To indre (FIP og BIP) og to ytre (F3 og B3) primere benyttes. FIP (BIP) er hybridprimer som består av F1c (B1c)- og F2 (B2)-sekvensen.

b): Danning av startstruktur: F2-regionen på FIP binder seg til F2c på mål-DNA, og DNA-polymerase med **strand displacement**-egenskap syntetiserer komplementær tråd. F3-primer binder seg til F3c og ny **strand displacement**-syntese frigjør tråden initiert av FIP-primer. Til denne tråden fester BIP og B3 seg på samme måte som FIP og F3, og tilsvarende syntese foregår. F1c-halen til FIP gjør at enden av den dannede tråden danner en loop og hybridiserer med F1-regionen. Det tilsvarende skjer med BIP-enden av tråden (struktur 5). Dette er startstrukturen for videre amplifisering.

c): Syklisk amplifisering: F1-regionen i 3'enden av struktur 5 selvprimer og syntese kan starte. FIP-primer binder seg til F2-region i loop i struktur 5 og **strand displacement** syntese starter også her. Etter flere trinn dannes struktur 7, som er komplementær til struktur 5, og struktur 5 dannes fra struktur 8 gjennom reaksjoner tilsvarende de som er vist i 5-7. Intermediære strukturer 7a og 9a, samt 5a og 10a, er dannet fra henholdsvis 6 og 8. 9a og 10a danner så 9 og 10 mens 7a og 5a danner nye 7 og 5. Flere lange strukturer, 11 og 12, dannes. Figuren er hentet fra Nature Protocols, 2008; 3(5): s. 877-82, med tillatelse fra forlaget. Animasjon av LAMP kan ses på [www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html](http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html)

FIGUR 1. Prinsipp for loop-mediated isothermal amplification, LAMP.

og deretter sentrifugert ved 9000 g i 30 sekunder. Alle DNA-prøver ble lagret ved -20 °C.

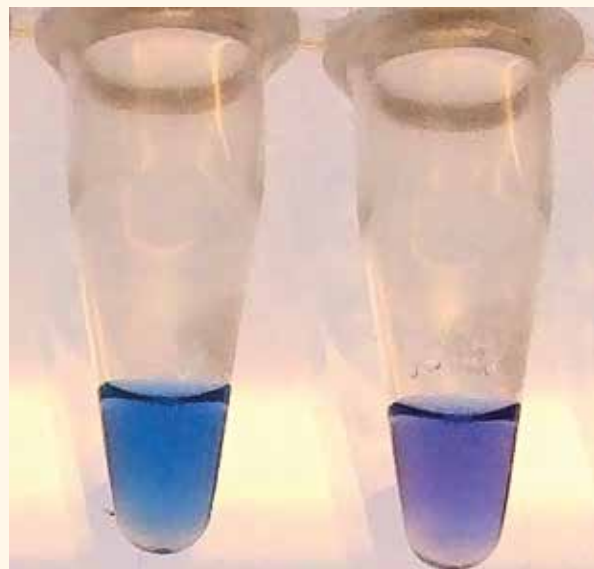
LAMP-analyse ble utført i 25 µl reaksjonsvolum med følgende sammensetning: 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 10mM KCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,10 % Tween-20, 0,8 M Betaine, dNTP mix (1,4 mM av hvert nukleotid), 120 µM Hydroxy naphthol blue (HNB, Sigma-Aldrich), primere: 1,6 µM FIP og BIP, 0,2 µM F3 og B3 og 0,8 µM FL og BL, 8U Bst 2.0 warm start DNA polymerase (New England Biolabs). Templat-DNA til LAMP ble først varmet opp i varmeblokk til 95 °C i to minutter og deretter kjølt ned på is i to minutter. 2 µl DNA ble deretter blandet med 23 µl reaksjonsløsning og inkubert i varmeblokk (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) ved 63 °C i 75 minutter etterfulgt av 80 °C i 15 minutter for inaktivering av enzym. Primerne er designet ved hjelp av online software Primer Explorer (<http://primerexplorer.jp/e/>). Primere for spesifikk amplifisering av RHD-genet og kontrollgenet beta-aktin er vist i tabell 1.

Avlesning ble gjort manuelt i denne studien. Fargeskifte fra fiolett til lys blå indikerer pyrofosfatproduksjon når nukleinsyrer blir amplifisert og derved en positiv LAMP-analyse (figur 2).

For test av analytisk sensitivitet og allelsesifisitet til LAMP-analysen, ble det laget to 5 x fortynningsrekker av RHD-positivt DNA både i H<sub>2</sub>O og i RHD-negativt RHCE-positivt DNA med konsentrasjon 1,14 ng/µl (tabell 3). Begge fortynningsrekkene ble analysert i triplikater med den beskrevne LAMP-proseduren.

## Resultater

15 personer ble RhD-feno- og genotypet med blodtype-serologiske standardmetoder og LAMP. Tabell 2 dokumenterer 100 prosent samsvar mellom RHD-geno- og RhD-fenotyper for rensset (blodprøver) og urensset (munnskyllprøver) DNA. Alle kontroller viser forventet resultat, positivt for kontrollgenet beta-aktin og negativt for reaksjonene uten DNA. Sensitivitetsanalysen viser at vår LAMP-prosedyre kan detektere ned til 9,6



**FIGUR 2.** Prinsipp for LAMP-avlesning.

HNB i reaksjonsløsningen er en metallionindikator som reagerer med Mg<sup>2+</sup>ioner og danner fiolett farge. Når DNA amplifiseres dannes det store mengder pyrofosfat som vil binde til seg Mg<sup>2+</sup> ioner i løsningen. Dermed blir det mindre Mg<sup>2+</sup> tilgjengelig for HNB, og fargen blir lys blå. Positivt resultat for RHD til venstre (lys blå), negativt resultat til høyre (fiolett).

pg RHD-positivt DNA i 25 µl reaksjonsvolum (tabell 3). I tillegg viser vi at det er mulig å gjenfinne 9,6 pg RHD-DNA i 2280 pg «villtype» RHCE-DNA (25µl x 91,2 pg/µl = 2280 pg, tabell 3, rad b). RHD-positivt DNA kan altså detekteres i en bakgrunn av inntil 99,6 prosent RHD-neg/RHCE-pos DNA. Analytisk spesifisitet kan dermed demonstreres helt ned til sensitivitetensgrensen.

## Diskusjon

### Metode og resultater

Denne studien introduserer Loop-Mediated-Isothermal-

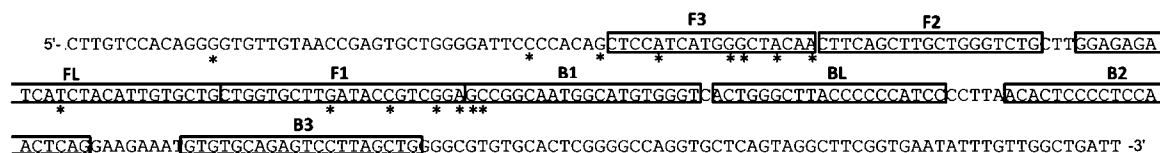
**TABELL 2:** Samsvar mellom serologiske RhD-fenotyper og LAMP-RHD-genotyper

Serologi	LAMP	RHD-positiv, LAMP, rensset DNA	RHD-positiv, LAMP, urensset DNA	RHD-negativ, LAMP, rensset DNA	RHD-negativ, LAMP, urensset DNA	LAMP-negativ kontroll (ingen DNA)	LAMP-positiv kontroll (β-aktin-primer)
RhD-positiv		10	2	0	0	alle negativ	alle positiv
RhD-negativ		0	0	5	2	alle negativ	alle positiv

**TABELL 3:** Analytisk sensitivitet og allelsesifisitet for RHD-LAMP. Fortynningsrekker av RHD-DNA er analysert i triplikater med like resultater.

Løst i	RHD-DNA-mengde							Neg. ktr. (ingen DNA)	Pos. ktr. (β-aktin-primer)
	30 ng	6 ng	1,2 ng	240 pg	48 pg	9,6 pg	1,9 pg		
(a) H <sub>2</sub> O	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	negativ	positiv
(b) RHCE-pos. DNA (91,2 pg/µl)	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.	negativ	positiv





**FIGUR 3:** DNA-sekvens til RHD-genet med markering av posisjon til LAMP-primere. Symbolet \* markerer forskjellene mellom RHD- og RHCE-genet.

Amplification som en ny og enkel metode for allelspesifikk genotyping av RHD. LAMP er en rask, sensitiv og spesifikk nukleinsyre-amplifikasjonsteknikk som er i ferd med å etableres i kliniske laboratorier, spesielt innenfor patogendeteksjon (11). Allelspesifikk LAMP er imidlertid mindre etablert, siden det er kjente utfordringer knyttet til metodens analytiske spesifisitet hvis sekvensforskjellene mellom allelene er små (12).

For å designe spesifikke primere for RHD har vi derfor valgt en 178-baseparregion i ekson 7 med flere nukleotider forskjell mellom RHD og RHCE (figur 3), slik at muligheten for krysshybridisering med RHCE-DNA blir lavest mulig.

Resultatene viser at LAMP-analysen har høy analytisk spesifisitet med fullt samsvar mellom RhD geno- og fenotyper. Det har vært mulig å detektere 0,4 prosent RHD-positiv DNA i en bakgrunn av RHCE-positiv DNA (tabell 3). Den analytiske spesifisiteten er sammenlignbar med den nyeste generasjonen av allelspesifikk PCR («droplet-AS-PCR»), det vil si 0,1 - 5 prosent detekterbar «mutant» DNA i en «villtype» bakgrunn (13). Dette er tilstrekkelig for de fleste kliniske bruksområder, blant annet prenatal RhD-diagnostikk,

siden føtalt DNA utgjør ca. 3,4 - 6,2 prosent av total DNA i maternalt plasma, riktignok med store individuelle variasjoner (14).

Likewise vurderes den analytiske sensitiviteten som høy; vi kunne påvise mellom 9,6 pg og 48 pg RHD-positiv DNA i 25 µl reaksjonsvolum, tilsvarende omtrent den DNA-mengden som finnes i henholdsvis 1,5 og 7,5 humane cellekjerener (15). Dette er nær grensen til teoretisk mulig sensitivitet og er godt nok for de aller fleste formål, inklusivt deteksjon av føtalt DNA i maternalt plasma (14). Sensiviteten er helt på linje med avanserte PCR-baserte RHD-genotyping-metoder (16). De to fortynningsrekkene (fortynnet i vann og RHCE-positiv DNA) viser reproducerbar deteksjon til henholdsvis 4. og 5. fortykning (48 og 9,6 pg RHD-positiv DNA i den påfølgende 25 µl LAMP-reaksjon). Grunnen til denne forskjellen kan vi per i dag ikke forklare. Dette må undersøkes i nye studier, for eksempel ved flere replikater eller nærmere studier av LAMP-produktene ved hjelp av DNA-sekvensering.

Analysemetoden vi beskriver stiller lave krav til kvaliteten på materialet som skal undersøkes. Analysene av munnskyllprøvene, hvor varmebehandlede epitelceller brukes som templat (tabell 2), bekrefter at urensset DNA kan brukes for allelspesifikk LAMP (17).

#### Svakheter og mangler

RHD-genotyping kan være komplisert. Det er derfor spesielt viktig å se separat på analytisk og diagnostisk spesifisitet og sensitivitet. Flere enn 200 RH-alleler er kjent, og mange av dem kan gi opphav til svekket eller strukturelt avvikende D-uttrykk på erytrocyttene (18). De fleste RhD-varianter er sjeldne, og deres kumulative frekvens estimeres til 1 - 2 prosent i et multi-etnisk, kaukasiske dominert samfunn (19, 20). Noen få av disse kan gi opphav til falske positive eller falske negative resultater når kun én RHD-genregion types (21). Dette er for tiden et lite problem i Norge, men kan være en reell utfordring i andre verdensregioner. Nullallelet RHD $\Psi$ , finnes for eksempel ikke sjeldent hos personer av afrikansk etnisitet (estimert til 3,3 - 6,7 prosent av befolkningen) og vil kunne forårsake falske positive prøvesvar når kun RHD ekson 7 types (22). Internasjonalt brukes det derfor minst to forskjellige genområder for RHD-genotyping, noe som kan bidra til

## I tråd med WHO's «ASSURED» anbefalinger

Verdens helseorganisasjon, WHO, erklærer at en ideell diagnostisk test bør være «ASSURED», det vil si «Affordable, Specific, Sensitive, User-friendly, Robust and Rapid, Equipment free and Deliverable». Nukleinsyre-amplifikasjonstester, som for eksempel PCR, har generelt høy sensitivitet og spesifisitet, men er kostbare og krever avansert instrumentering. Isotermale nukleinsyre-amplifikasjonstester, som LAMP, opererer ved én enkelt temperatur og krever lite instrumentering og ressurser. Disse oppfyller dermed «ASSURED»-kravene fra WHO.

Kilde: Research and Markets, Rapport publisert oktober 2012. «Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies Market 2012-2017: Molecular Diagnostics, Infectious Disease Testing, Blood Screening, Cancer Research, Rapid Testing». <http://www.researchandmarkets.com/reports/2303338> Oktober

økt klinisk spesifisitet i etnisk blandete samfunn (23).

I denne studien har vi kun analysert ekson 7 i *RHD* for å demonstrere at LAMP fungerer til å påvise genet. Den analytiske sensitiviteten og spesifisiteten har vært høy, men for å kunne skille diagnostisk mellom de ulike og sjeldne *RH*-allelene som er nevnt, vil man inkludere analyse av flere eksoner i fremtidige undersøkelser. Per i dag er den diagnostiske sensitiviteten og spesifisiteten av metoden i den norske populasjonen ukjent.

#### Perspektiv

Denne studien underbygger nyere resultater som viser at LAMP, ved omhyggelig primerdesign, kan være effektiv til å skille mellom lignende alleler. Metoden har vært benyttet til å skille mellom DNA-sekvenser med kun én base forskjell (24). For å kunne implementere *RHD*-LAMP i rutinediagnostikk er det imidlertid noe som gjenstår: Passende design av LAMP for flere *RHD*-eksoner må utvikles og det må kunne vises hvorvidt LAMP-primere kan skille andre *RHD*-eksoner fra liknende sekvenser i *RHCE*. Det bør implementeres en intern amplifikasjonskontroll som kan kjøres i samme brønn som selve *RHD*-reaksjonen. Dette oppfattes ofte som god praksis ved diagnostisk bruk av nukleinsyre-amplifikasjonsmetoder (25). Det må dessuten inkluderes flere personer i en klinisk realistisk setting for å kunne fastslå hvorvidt *RHD*-genotyping ved hjelp av allelsesifikk LAMP er brukbar i rutinediagnostikk.

#### Konklusjon

Genotyping av 15 personer viser at LAMP-teknikken prinsipielt kan benyttes i påvisning av *RHD*-genet. Det er imidlertid for få eksoner, for få personer og for snever etnisk bakgrunn for å betrakte LAMP-*RHD*-genotyping som ferdig validert. Sensitiviteten og spesifisiteten er høy i denne studien, og indikerer at metoden er sensitiv nok til å påvise konsentrasjoner av mål-DNA som er like lave som fritt føtalt DNA i serum hos gravide kvinner. Videre studier vil vise om metoden kan benyttes klinisk til slik genotyping. Dersom man finner at LAMP kan benyttes til dette, vil metoden kunne tas i bruk i land med begrenset tilgang til velutstyrte laboratoriefasiliteter, hvor etablerte analysemetoder vanskelig kan benyttes. ■

#### Referanser

- Solheim BG, Thorsby E. Klinisk Blodtransfusjon - Hemoterapi. Oslo: Immunologisk Institutt, Rikshospitalet-Radiumhospitalet, 2007.
- Colin Y, Chérif-Zahar B, Le Van Kim C, Raynal V 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.
- Walker RH, Lin DT, Hartrick MB. Alloimmunization following blood transfusion. *Arch Pathol Lab Med*. 1989;113(3):254-61.
- Avent ND. Large-scale blood group genotyping: clinical implications. *Br J Haematol*. 2009;144(1):3-13.
- Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang*. 2009;97(3):198-206.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(12):e63.
- Kim J, Easley CJ. Isothermal DNA amplification in bioanalysis: strategies and applications. *Bioanalysis*. 2011;3(2):227-39.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 2002;16(3):223-29.
- Øvland E., Nævdal, S., Steinsvåg C. RhD-typing i rør, saltvannsteknikk. ImTra SSK. Kristiansand, Sørlandet Sykehus HF, 2013.
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*. 2009;46(3):167-72.
- Fu S, Qu G, Guo S, Ma L et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;163(7):845-50.
- Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, Oka A et al. Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity. *Immunogenetics*. 2013;65:405-15.
- Taira C, Matsuda K, Yamaguchi A, Sueki A et al. Novel high-speed droplet-allele specific-polymerase chain reaction: Application in the rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Clin Chim Acta*. 2013;424C:39-46.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*. 1998;62(4):768-75.
- Kleinig H, Sitte P. Zellbiologie. 3. utg. Stuttgart, New York: Fischer, 1992, p. 207.
- Grill S, Banzola I, Li Y, Rekhviashvili T et al. High throughput non-invasive determination of foetal Rhesus D status using automated extraction of cell-free foetal DNA in maternal plasma and mass spectrometry. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;279: 533-37.
- Chen S, Ge B. Development of a toxR-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*. 2010; Epub 10.2.2010.
- Flegel WA. Molecular genetics and clinical applications for RH. *Transfus Apher Sci*. 2011;44(1):81-91.
- Denomme GA, Wagner FF, Fernandes BJ, Li W et al. Partial D, weak D types, and novel RHD alleles among 33,864 multiethnic patients: implications for anti-D alloimmunization and prevention. *Transfusion*. 2005;45(10):1554-60.
- Quinley ED. Immunohematology: Principles and Practice. 3. utg. Lippincott, Williams & Wilkins, 2011.
- Simsek S, Faas BH, Bleeker PMM, Overbeeke MA et al. Rapid Rh D Genotyping by Polymerase Chain Reaction-Based Amplification of DNA. *Blood*. 1995;85(10):2975-80.
- Ekman GC, Billingsly R, Hessner MJ. Rh genotyping: avoiding false-negative and false-positive results among individuals of African ancestry. *Am J Hematol*. 2002;69(1):34-40.
- Grootkerk-Tax MGHM, Soussan AA, de Haas M, Maaskant-van Wijk PA et al. Evaluation of prenatal RHD typing strategies on cell-free fetal DNA from maternal plasma. *Transfusion*. 2006;46(12):2142-48.
- Badolo A, Okado K, Guelbeogo WM, Aonuma H et al. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malar J*. 2012;11(1):227-33.
- Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol*. 2005;43:5835-41.