

Analiza porównawcza typu probówek i warunków przechowywania materiału do nieinwazyjnych badań grupy krwi płodu z wolnokrążącego DNA płodowego

Comparative analysis of the type of tubes and storage conditions of material for non-invasive prenatal testing (NIPT) of fetal blood group and platelet antigens

Agnieszka Orzińska¹, Katarzyna Guz¹, Sylwia Purchla-Szepiōła¹,
Magdalena Krzemienowska¹, Pamela Bartoszewicz¹, Marzena Dębska², Izabela Kopeć³,
Małgorzata Uhrynowska¹, Ewa Brojer¹

¹Institut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Warszawa

²Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, II Klinika Położnictwa i Ginekologii, Warszawa

³Institut Hematologii i Transfuzjologii, Poradnia Hematologiczna dla Kobiet w Cięży, Warszawa

Streszczenie

Wstęp. *Stabilność kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) płodowego w osoczu ciężarnej i zahamowanie uwalniania się z komórek DNA matczynego są kluczowe dla uzyskiwania wiarygodnych wyników nieinwazyjnych badań prenatalnych antygenów krwi płodu w konfliktach serologicznych.*

Cel. *Analiza porównawcza nieinwazyjnej diagnostyki konfliktów matczyno-płodowych wykonywanej z probówek obecnie używanych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHIT) z probówkami przeznaczonymi do badań wolnokrążącego DNA stabilizującymi frakcję komórkową matki.*

Materiał i metody. *Krew 29 kobiet ciężarnych RhD ujemnych pobierano równolegle do probówek na EDTA z barierą żelową (BD Vacutainer PPT, USA) i do probówek Cell-Free DNA Collection (Roche). Z tych ostatnich DNA izolowano od razu po pobraniu ($n = 18$), w 48–96 godzin po przechowywaniu probówek w temperaturze pokojowej ($n = 24$), lub po mrożeniu frakcji osocza odseparowanego od razu po pobraniu ($n = 27$). W DNA z osocza izolowanego przy użyciu ekstraktora easyMag (Biomérieux) prowadzono amplifikacje fragmentów genów płodu — metodą real-time PCR przy zastosowaniu aparatu LC480II (Roche).*

Wyniki. *Uzyskane różnice w stężeniu frakcji DNA płodowego były nieistotne statystycznie we wszystkich porównywanych grupach ($p > 0,05$). Frakcja całkowitego DNA izolowanego z osocza z probówek przeznaczonych do badań wolnokrążącego DNA badanych do 24 godzin po pobraniu ($p = 0,03$) oraz z mrożonego osocza ($p = 0,03$) była statystycznie niższa niż dla materiału z probówek rutynowo stosowanych do NIPT w IHIT.*

Wnioski. *Rodzaj zastosowanych probówek do pobierania krwi nie ma wpływu na poziom wykrywanej frakcji DNA płodowego, ale pobranie krwi do probówek przeznaczonych do badań*

Adres do korespondencji: dr n. med. Agnieszka Orzińska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Institut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00–791 Warszawa, tel. (22) 34 96 611, faks (22) 34 96 611, e-mail: aorzinska@ihit.waw.pl

wolnokrążącego DNA i jej przechowywanie w temperaturze pokojowej do 96 godzin zapobiega rozpadowi komórek matki, co pozwala rekomendować ten system pobrań do badań antygenów komórek krwi płodu z osocza ciężarnej prowadzonych w IHiT.

Słowa kluczowe: wolnokrążące DNA płodowe, nieinwazyjne badania prenatalne, antygeny krwinki czerwonej i płytkowej

J. Transf. Med. 2018; 11: 137–143

Summary

Background. *The stability and proportion of fetal/maternal DNA isolated from maternal plasma are crucial for the accuracy of non-invasive prenatal testing (NIPT) of fetal blood group and platelet antigens.*

Aim. *Comparative analysis of NIPT of material collected into tubes routinely used at the Institute of Hematology and Transfusion Medicine (IHTM) and into special tubes dedicated for cell-free (cf) DNA that stabilizes maternal blood cells.*

Material and methods. *Blood from 29 pregnant RhD-negative women was collected in parallel into EDTA vacutainer tubes with gel barrier (BD Vacutainer PPT, USA) and into Cell-Free DNA Collection tubes (Roche). From the latter samples plasma was processed immediately after collection (n = 18), after 48–96h of storage in ambient temperature (n = 24) and after freezing plasma fractions separated immediately after collection (n = 27). DNA was isolated using easyMag (Biomérieux) and examined by real-time PCR on LC480II (Roche) for the presence of fetal and maternal markers.*

Results. *In all study groups the differences in fetal fraction were not statistically significant (p > 0.05). However the maternal fraction in plasma collected into special cfDNA tubes and tested within 24h or from frozen plasma was significantly lower than from the tested standard tubes.*

Conclusion. *The type of tubes into which maternal blood is collected does not affect the level of fetal DNA fraction. On the other hand, collection of blood into special cfDNA tubes contributes to stabilization of the level of maternal fraction provided blood is stored at ambient temperature and processed within 96h of venipuncture. Such conditions are recommended for NIPT of fetal antigens performed in IHTM.*

Key words: cell-free fetal DNA, non-invasive prenatal testing, red blood cell and platelet antigens

J. Transf. Med. 2018; 11: 137–143

Wstęp

Nieinwazyjne badanie prenatalne (NIPT, *non-invasive prenatal testing*) antygenów komórek krwi płodu oparte na analizie wolnokrążącego kwasu deoksyrybonukleinowego płodu (cffDNA, *cell free fetal deoxyribonucleic acid*) uzyskanego z krwi ciężarnej jest coraz szerzej stosowane w procesie diagnostycznym konfliktów matczyno-płodowych [1–4]. Znajduje też zastosowanie w badaniach masowych przy kwalifikacji kobiet RhD ujemnych do celowanej immunoprofilaktyki w czasie ciąży [4–5]. Tylko u ciężarnych, których dziecko odziedziczyło od ojca antygen niezgodny z antygenem matki (np. kobieta RhD ujemna nosi płód, który odziedziczył antygen RhD), może dojść do stymulowania pro-

dukcji przeciwciał u matki. W przypadku przeciwciał rozpoznających antygeny erytrocytarne może dojść do choroby hemolitycznej płodu/novorodka (ChHP/N), a w przypadku przeciwciał do antygenów płytek do alloimmunologicznej małopłytkowości płodu/novorodka (AIMP/N). Badanie genetyczne określające genotyp dziecka w trakcie trwania ciąży z jego DNA krążącego w osoczu ciężarnej pozwala przewidzieć, czy płód jest dodatni, czy ujemny pod względem niezgodnego z matką antygeny w sposób całkowicie nieinwazyjny. W przypadku niezimmunizowanych kobiet RhD ujemnych wynik genotypu *RHD* i przewidywanej grupy RhD płodu umożliwia sformułowanie odpowiedniego zalecenia: podać immunoprofilaktykę śródciażową zgodnie z rozporządzeniem ministra zdrowia z 2017 roku czy od

niej odstąpić [6]? Według danych literaturowych około 40% ciężarnych RhD ujemnych nosi zgodny antygenowo RhD ujemny płód i nie wymaga podania deficytowego produktu krwiopochodnego — immunoglobuliny anti-D w trakcie ciąży [4–5].

Takie wysokospecjalistyczne badania NIPT wymagają nie tylko znajomości genetyki badanego regionu i możliwych przyczyn rozbieżności genotypu z fenotypem w celu prawidłowej interpretacji obrazu amplifikacji, ale także dokładnego ustalenia i monitorowania czynników fazy przedanalizy, mogących mieć wpływ na wynik. Wiarygodność badań opartych na materiale genetycznym izolowanym z osocza ciężarnej — mieszance płodowego i matczyne DNA — jest szczególnie zależna od czasu, jaki upłynął od pobrania materiału do momentu wykonania badania; od warunków transportu i od możliwości szybkiego odseparowania osocza ciężarnej od elementów morfotycznych jej krwi, by nie dopuścić do uwolnienia się z nich DNA genomowego matki [7]. Stabilność DNA płodowego wobec jego niskiego stężenia w stosunku do frakcji DNA matczyne jest kluczowa dla otrzymania specyficznych, prawdziwych wyników genotypu płodu. Jest to szczególnie istotne w genotypowaniu allelicznych form kodujących antygeny komórek krwi, w których DNA matki i płodu różni się jednym nukleotydem (np. antygeny K/k z układu Kell czy antygeny HPA1a/1b krwinki płytkowej) [8–9].

Rozwój nieinwazyjnych badań przesiewowych określających aneuploidalność płodu rozpowszechnił badania z cffDNA i przyczynił do pojawienia się produktów przeznaczonych do pobierania krwi od ciężarnych w celu badania frakcji płodowej. Probówki umożliwiają stabilizację komórek matki, zmniejszają rozpad komórek jądrzastych w pobranej krwi, a przez to utrzymują korzystną — wysoką — proporcję DNA płodu w stosunku do DNA matczyne.

Doniesienia te skłoniły autorów artykułu do przeprowadzenia badań porównawczych próbek obecnie używanych w IHiT do nieinwazyjnej diagnostyki konfliktów matczyno-płodowych z próbkami przeznaczonymi do badań wolnokrążącego DNA, stabilizującymi frakcję komórkową matki i zapewniającymi wysoką proporcję DNA płodowego.

Materiał i metody

Materiałem do badań była krew 29 kobiet ciężarnych RhD ujemnych, które wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniach porównawczych. Krew pobrano równoległe do próbek na kwas

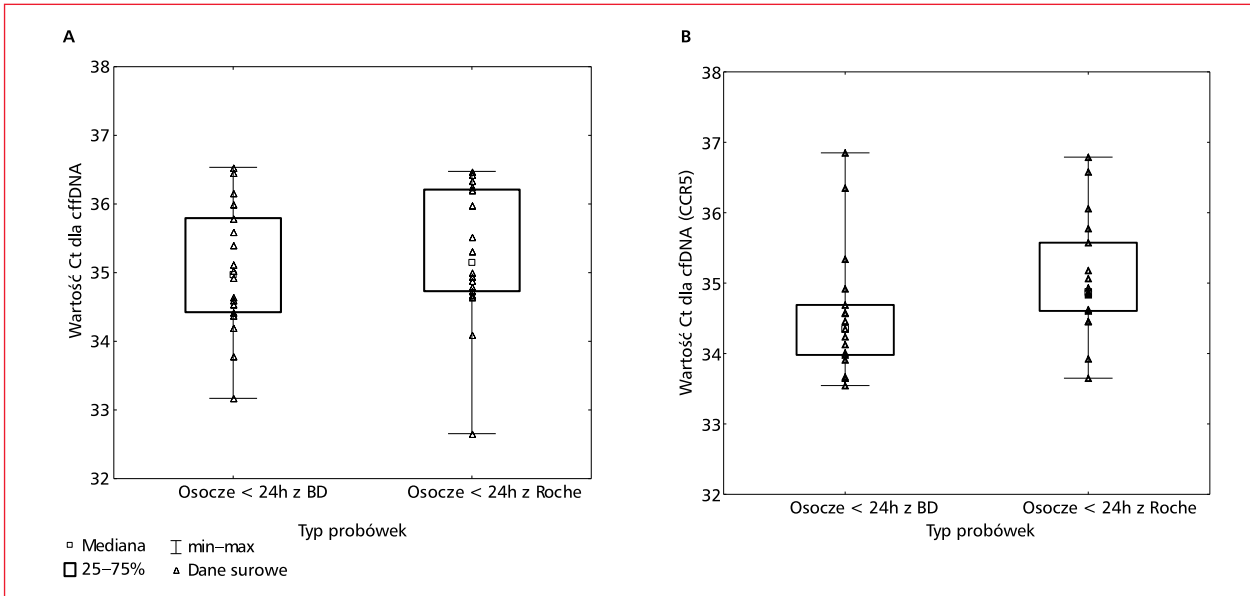
wersenowy (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*) z barierą żelową (BD Vacutainer PPT, USA) oraz do próbek *Cell-Free DNA Collection* (Roche). Osocze separowano przez wirowanie zgodnie z zaleceniami producenta próbek: w ciągu 2 godzin od pobrania w przypadku próbek z barierą żelową (nr 1) lub bezpośrednio przed procesem izolacji DNA w przypadku materiału pobranego do próbek *Cell-Free DNA Collection* (nr 2). Proces izolacji DNA rozpoczynano w materiale pobranym do próbek numer 1 w ciągu 24 godzin od pobrania krwi (czyli zgodnie z rutynowymi warunkami obecnie prowadzonej diagnostyki w IHiT), a w materiale z próbek numer 2 izolację DNA z osocza prowadzono:

- do 24 godzin po pobraniu (n = 18), (grupa 2a);
- od 48 do 96 godzin po przechowywaniu próbek w temperaturze pokojowej 20–22°C (n = 24), (grupa 2b);
- po rozmrożeniu osocza, które separowano i zamrażano w temperaturze –20°C w ciągu 2 godzin od pobrania (n = 27), (grupa 2c).

Kwas deoksyrybonukleinowy z osocza izolowano automatycznie przy użyciu ekstraktora *easyMag* (Biomerieux). Metodą *real-time PCR* przy użyciu aparatu LC480II (Roche) prowadzono amplifikację fragmentów genów płodu: *RHD* (gen kodujący antygen RhD, marker fenotypu RhD dodatniego płodu) lub *SRY* (z chromosomu Y, marker płci męskiej płodu), oraz genu konstytutywnego *CCR5* (kodującego receptor chemokinin typu 5) jako markera całkowitego DNA wyizolowanego z osocza, zgodnie z wcześniej opisanym protokołem [3]. Do analizy porównawczej wartości Ct (numer cyklu reakcji, w którym poziom amplifikacji przekroczył wartość progową), uzyskanych metodą *real-time PCR* dla genów płodu oraz całkowitego DNA zastosowano test Whitneya-Manna i program Statistica 13.1.

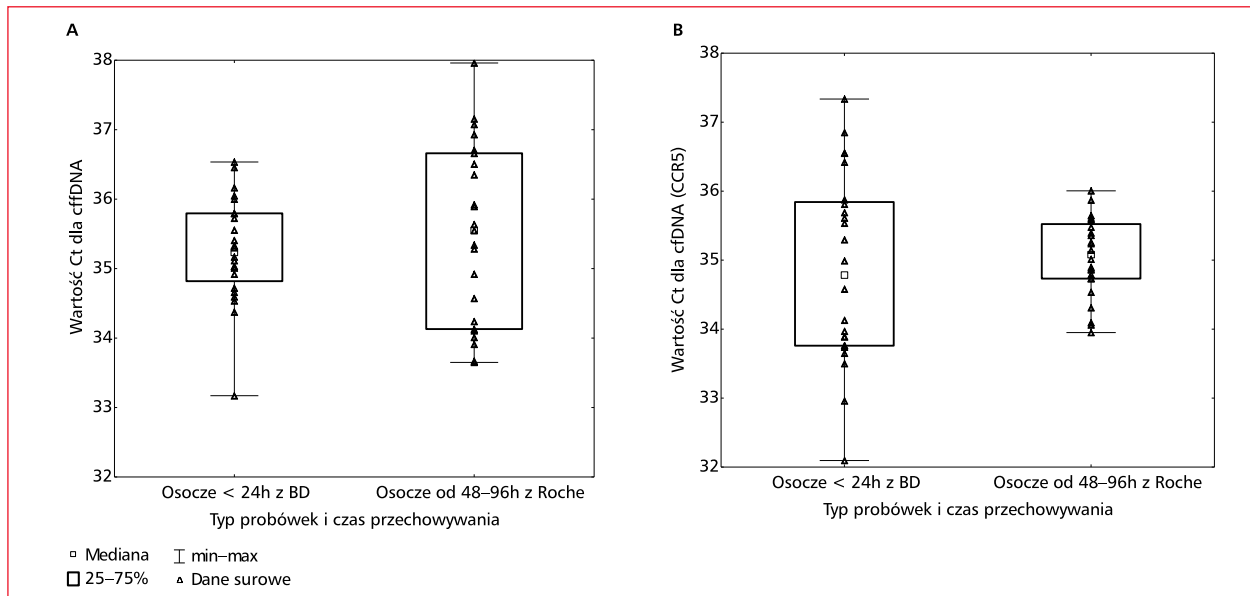
Wyniki

Porównanie wartości Ct amplifikacji metodą *real-time PCR* dla genów płodu (*RHD* i *SRY*) oraz całkowitego DNA (*CCR5*) uzyskane dla próbek krwi pobranej równoległe do dwóch typów próbek przedstawiono na rycinach 1–5. Różnice wartości Ct uzyskanych dla genów płodu były nieistotne statystycznie we wszystkich porównywanych grupach. Wartości Ct dla amplifikacji genu *CCR5*, obrazujące stężenie całkowitego DNA izolowanego z osocza w próbkach pobranych do próbek *Cell-Free DNA Collection* i badanych do 24 godzin (grupa 2a), wskazywały na jego statystycznie niższe stężenie w tym materiale niż



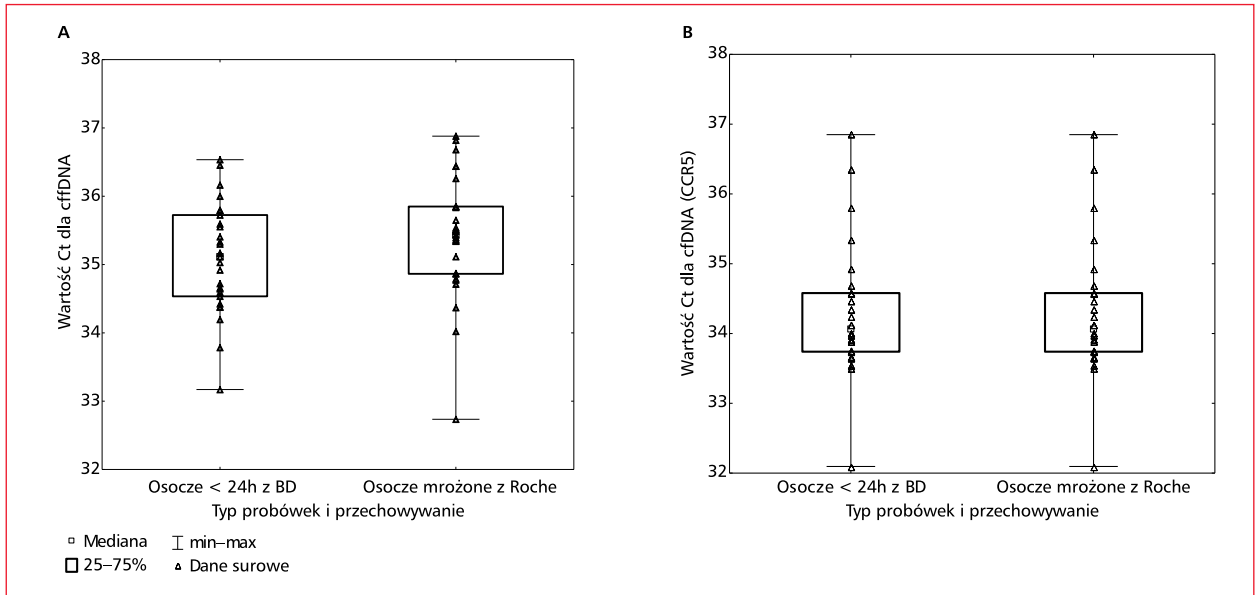
Rycina 1. Poziom amplifikacji mierzony wartością Ct amplifikacji: **A.** wolnokrążącego DNA płodu ($p = 0,3$) i **B.** wolnokrążącego DNA — (*CCR5*) całkowitego ($p = 0,03$), uzyskanych metodą *real-time PCR* w badaniu porównawczym 18 przypadków analizowanych do 24 godzin po pobraniu do próbek BD (używanych rutynowo do NIPT) lub *Cell-Free DNA Collection Roche*

Figure 1. Comparison of Ct values from real-time PCR detection of: **A.** fetal cfDNA ($p = 0.3$) and **B.** total cfDNA — *CCR5* ($p = 0.03$) in 18 cases tested within 24 hours after collection into BD (routinely used for NIPT) and Cell-Free DNA Collection Roche tubes



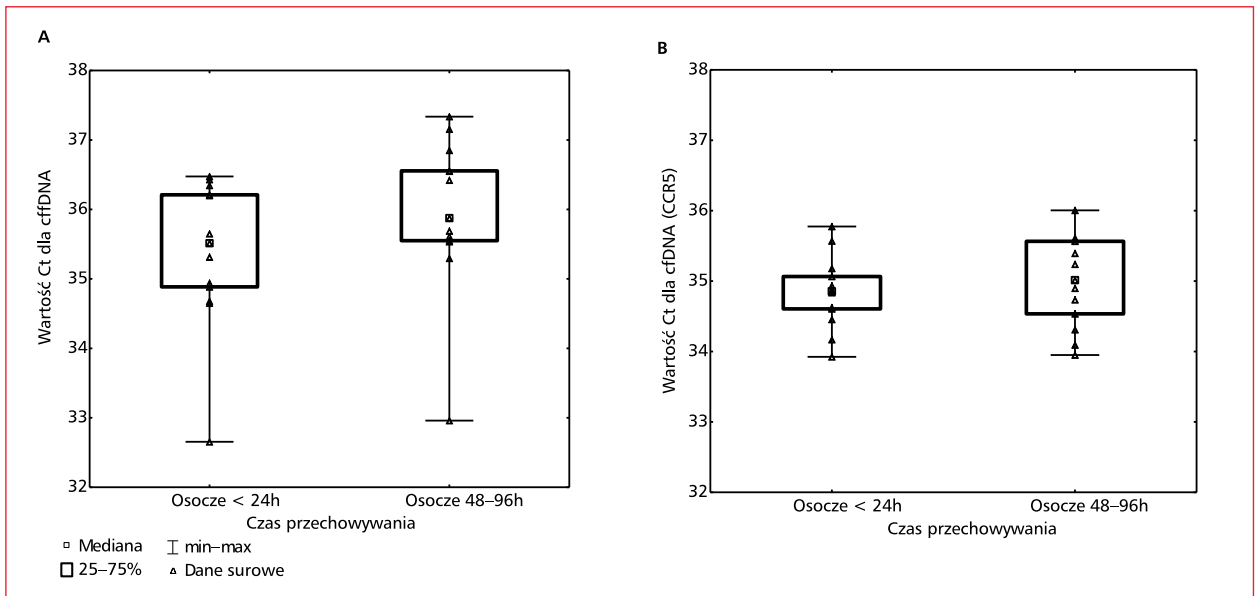
Rycina 2. Poziom amplifikacji mierzony wartością Ct amplifikacji: **A.** wolnokrążącego DNA płodu ($p = 0,6$) i **B.** wolnokrążącego DNA — (*CCR5*) całkowitego ($p = 0,5$), uzyskanych metodą *real-time PCR* w badaniu porównawczym 24 przypadków analizowanych do 24 godzin po pobraniu do próbek BD (używanych rutynowo do NIPT) lub analizowanych od 48 do 96 godzin po pobraniu do próbek *Cell-Free DNA Collection Roche* i przechowywanych w temperaturze pokojowej

Figure 2. Comparison of Ct values from real-time PCR detection of fetal: **A.** cfDNA ($p = 0.6$) and **B.** total cfDNA — *CCR5* ($p = 0.5$) in 24 cases tested within 24 hours after collection into BD (routinely used for NIPT) and tested within 48-96 hours after collection into Cell-Free DNA Collection Roche tubes and storing at ambient temperature



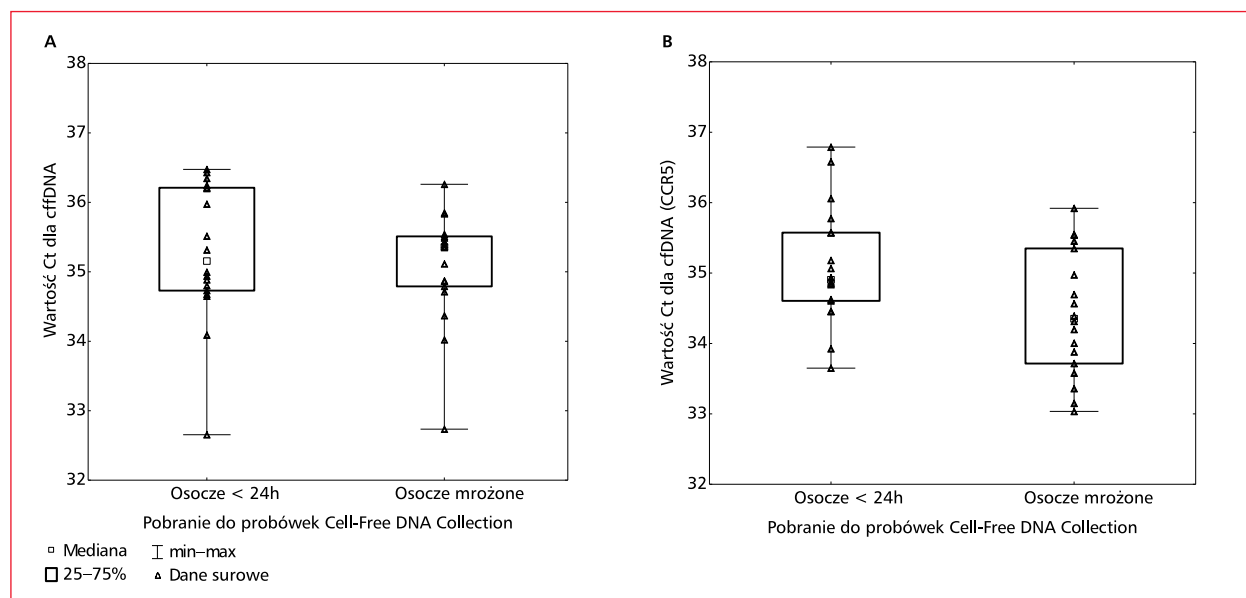
Rycina 3. Poziom amplifikacji mierzony wartością Ct amplifikacji: **A.** wolnokrążącego DNA płodu ($p = 0,1$) i **B.** wolnokrążącego DNA — (*CCR5*) całkowitego ($p = 1$), uzyskanych metodą *real-time PCR* w badaniu porównawczym 27 przypadków analizowanych do 24 godzin po pobraniu do próbek BD (używane rutynowo do NIPT) lub analizowanych po pobraniu do *Cell-Free DNA Collection Roche* i separacji oraz zamrożeniu osocza

Figure 3. Comparison of Ct values from real-time PCR detection of: **A.** fetal cfDNA ($p = 0.1$) and **B.** total cfDNA — *CCR5* ($p = 1$) in 27 cases tested within 24 hours after collection into BD (routinely used for NIPT) and tested after plasma freezing after collection into Cell-Free DNA Collection tubes



Rycina 4. Poziom amplifikacji mierzony wartością Ct amplifikacji: **A.** wolnokrążącego DNA płodu ($p = 0,08$) i **B.** wolnokrążącego DNA — (*CCR5*) całkowitego ($p = 0,4$), uzyskanych metodą *real-time PCR* w badaniu porównawczym 13 przypadków analizowanych do 24 godzin lub 48–96 godzin po pobraniu do próbek *Cell-Free DNA Collection Roche* i przechowywanych w temperaturze pokojowej

Figure 4. Comparison of Ct values from real-time PCR detection of: **A.** fetal cfDNA ($p = 0.08$) and **B.** total cfDNA — *CCR5* ($p = 0.4$) in 13 cases collected into Cell-Free DNA Collection Roche tubes and tested within 24 hours and within 48–96 hours after storing at ambient temperature



Rycina 5. Poziom amplifikacji mierzony wartością Ct amplifikacji: **A.** wolnokrążącego DNA płodu ($p = 0,5$) i **B.** wolnokrążącego DNA — (*CCR5*) całkowitego ($p = 0,03$), uzyskanych metodą *real-time PCR* w badaniu porównawczym 18 przypadków pobranych do próbek *Cell-Free DNA Collection* Roche i analizowanych do 24 godzin lub po zamrożeniu osocza

Figure 5. Comparison of Ct values from real-time PCR detection of: **A.** fetal cfDNA ($p = 0.5$) and **B.** total cfDNA — *CCR5* ($p = 0.03$) in 18 cases collected into Roche tubes and tested within 24 hours and after plasma freezing

w materiale z próbek rutynowo stosowanych do NIPT w IHiT (grupa 1) — $p = 0,03$. W próbkach pobranych do próbek *Cell-Free DNA Collection* frakcja matczyego całkowitego DNA była statystycznie niższa w osoczu poddanym zamrożeniu (grupa 2c) niż w próbkach z tych samych próbek, ale badanych w ciągu 24 godzin (grupa 2a) — $p = 0,03$. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie frakcji matczyego całkowitego DNA w próbkach pobranych do próbek *Cell-Free DNA Collection* i badanych do 24 godzin (grupa 2a) lub od 48 do 96 godzin (grupa 2b) — $p = 0,4$.

Wyniki i wnioski

Przeprowadzone techniką *real-time PCR* badania stężenia frakcji DNA pochodzenia płodowego i matczyego wykazały, że rodzaj zastosowanych próbek do pobierania krwi (rutynowo stosowane dotychczas w badaniach NIPT w IHiT próbki próżniowo-żelowe z żelem separującym *vs* próbki *Cell-Free DNA Collection*) nie ma wpływu na poziom wykrywanej frakcji DNA płodowego. Podobnie w próbkach materiału z próbek *Cell-Free DNA Collection* przechowywanego do 4 dni po pobraniu lub jako osocze w stanie zamrożenia nie było różnic w stężeniu frakcji DNA płodowego. Obserwacja ta pokrywa się z doniesieniami innych

autorów, których wyniki badań świadczą o wysokiej stabilności fragmentów DNA płodowego do 5 dni od pobrania [9].

Wyniki badań frakcji matczyego DNA w próbkach pobranych do próbek *Cell-Free DNA Collection* i następnie przechowywanych w temperaturze pokojowej do 96 godzin od pobrania wykazały, że ten rodzaj próbek zapobiega rozpadowi komórek matki i uwalnianiu jej materiału genetycznego do osocza. Ma to szczególne znaczenie w odniesieniu do badań, w których podłoże genetyczne obecności lub braku antygeny jest spowodowane występowaniem polimorfizmu jednego nukleotydu, jak w większości konfliktów serologicznych, na przykład w układzie Kell, Duffy, Kidd czy MNS, i płytkowych w zakresie układu HPA-1, 3, 5 czy 15 [10]. Wykrycie mutacji jednonukleotydowej różniącej płód od matki w mieszaninie DNA z osocza ciężarnej techniką *real-time PCR* napotyka na problem niespecyficznego amplifikacji nadreprezentowanego allelu matki, co prowadzi do uzyskania fałszywie dodatniego wyniku na obecność antygeny u płodu [11–12]. Zachowanie, niezależnie od czasu przechowywania, korzystnej proporcji DNA płodowego względem DNA matki przez pobranie krwi do próbek typu *Cell-Free DNA Collection* pozwala z jednej strony ograniczyć tę techniczną trudność. Z drugiej strony wysoki poziom DNA matki także

może prowadzić — przez konkurowanie o substraty reakcji — do zablokowania amplifikacji DNA płodowego, co powoduje uzyskanie fałszywie ujemnych wyników płodu.

Podobne wyniki opisywane są w pracach ośrodków zajmujących się badaniami NIPT aneuploidalności, chorób monogenowych oraz w konfliktach matczyno-płodowych [13]. W zależności od stosowanej techniki detekcji materiału genetycznego oraz charakterystyki badanych fragmentów podwyższona ilość materiału matki w próbce może stanowić istotną przeszkodę w uzyskaniu wiarygodnego wyniku genetycznego płodu. Do badania NIPT autorzy zgodnie zalecają pobieranie krwi od ciężarnych do próbek typu *Cell-Free DNA Collection*. Probówki te nie są stosowane do pobierania materiału do badań przesiewowych przy celowanej immunoprofilaktyce śródciążowej konfliktu Rh, gdzie powszechnie stosuje się pobranie do klasycznych próżniowych próbek z EDTA i przesyłanie do 48–96 godzin w dowolnej temperaturze powyżej 0°C [2]. W tym badaniu identyfikacja obecności (lub braku) płodowego genu *RHD* jest łatwiejsza technicznie; różnica między matką a płodem dotyczy bowiem obecności całego genu, a nie pojedynczego nukleotydu.

Na podstawie uzyskanych przez autorów artykułu wyników sformułowano nowe wytyczne dla nieinwazyjnych badań antygenów komórek krwi płodu dotyczące możliwości pobierania krwi od kobiet ciężarnych do próbek typu *Cell-Free DNA Collection* i transportu tak pobranego materiału w ciągu 4 dni w temperaturze pokojowej do IHiT w Warszawie. Możliwość zastosowania takiej procedury znacząco ułatwia przesyłanie materiału, co jest bardzo istotne, ponieważ zarówno w Polsce, jak i na świecie badania NIPT w konfliktach wykonywane są jedynie przez wysokospecjalistyczne laboratoria. Na podstawie przeprowadzonych badań szczególnie wskazane jest zastosowanie próbek typu *Cell-Free DNA Collection* do badań NIPT antygenów, których podłożem jest wykrycie w materiale płodowym zmiany jednego nukleotydu względem materiału matki — jak w konflikcie czerwonokrwinkowym dla kobiet z przeciwciałami

anty-K z układu Kell lub w konflikcie płytkowym z przeciwciałami anty-HPA-1a.

Piśmiennictwo

1. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997; 350(9076): 485–487, doi: [10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0), indexed in Pubmed: [9274585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274585/).
2. Guz K, et al. Nieinwazyjna prenatalna diagnostyka molekularna. W: Bal J. (red.). *Genetyka Medyczna i Molekularna*. PWN, Warszawa. ; 2017: 193–203.
3. Orzińska A, Guz K, Dębska M, et al. 14 Years of Polish Experience in Non-Invasive Prenatal Blood Group Diagnosis. *Transfus Med Hemother*. 2015; 42(6): 361–364, doi: [10.1159/000440821](https://doi.org/10.1159/000440821), indexed in Pubmed: [26733766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733766/).
4. Daniels G, Finning K, Lozano M, et al. Vox Sanguinis International Forum on application of fetal blood grouping: summary. *Vox Sang*. 2018; 113(2): 198–201, doi: [10.1111/vox.12616](https://doi.org/10.1111/vox.12616), indexed in Pubmed: [29282745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29282745/).
5. van der Schoot CE, de Haas M, Clausen FB. Genotyping to prevent Rh disease: has the time come? *Curr Opin Hematol*. 2017; 24(6): 544–550, doi: [10.1097/MOH.0000000000000379](https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000379), indexed in Pubmed: [28937404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28937404/).
6. <https://www.infor.pl/dziennik-ustaw/r2017/p1766>.
7. Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, et al. Pre-analytical conditions in non-invasive prenatal testing of cell-free fetal RHD. *PLoS One*. 2013; 8(10): e76990, doi: [10.1371/journal.pone.0076990](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076990), indexed in Pubmed: [24204719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24204719/).
8. Norton SE, Lechner JM, Williams T, et al. A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem*. 2013; 46(15): 1561–1565, doi: [10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002), indexed in Pubmed: [23769817](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23769817/).
9. Müller SP, Bartels I, Stein W, et al. Cell-free fetal DNA in specimen from pregnant women is stable up to 5 days. *Prenat Diagn*. 2011; 31(13): 1300–1304, doi: [10.1002/pd.2889](https://doi.org/10.1002/pd.2889), indexed in Pubmed: [22030893](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22030893/).
10. Reid ME. Rh Blood Group System. W: Reid M.E., Lomas-Francis C., Olson M. (red.). *The blood group antigen*. Wyd. 3. Elsevier Ltd. : London.
11. Rieneck K, Bak M, Jønson L, et al. Next-generation sequencing: proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Transfusion*. 2013; 53(11 Suppl 2): 2892–2898, doi: [10.1111/trf.12172](https://doi.org/10.1111/trf.12172), indexed in Pubmed: [23550721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23550721/).
12. Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, Fröhner V, et al. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*. 2015; 55(6 Pt 2): 1538–1544, doi: [10.1111/trf.13102](https://doi.org/10.1111/trf.13102), indexed in Pubmed: [25873286](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25873286/).
13. Page-Christiaens L., Klein H.-G. *Noninvasive Prenatal Testing (NIPT)*. Elsevier Inc., London 2018.