

Strokovni prispevek/Professional article

DOLOČANJE PLODOVE KRVNE SKUPINE MED NOSEČNOSTJO

DETERMINATION OF FETAL BLOOD GROUP IN PREGNANCY

*Irena Bricl¹, Tadeja Dovč-Drnovšek¹, Tanja Blejec², Primož Rožman¹*¹ Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana² Klinični oddelek za perinatologijo, Ginekološka klinika, Klinični center, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

Prispelo 2004-02-13, sprejeto 2004-03-10; ZDRAV VESTN 2004; 73: Suppl. I: 139-42

Ključne besede: genotipizacija; krvnoskupinski antigeni; RhD; periferne kri nosečnice**Izvleček** – Izhodišča. Prenatalna diagnostika z genotipizacijo plodove deoksiribonukleinske kisline (DNK) zavzema pomembno mesto v modernem porodništvu. V zadnjem času je možno iz venske krvi matere osamiti plodovo DNK, kar omogoča neinvazivno prenatalno genotipizacijo.

Material in metode. V 23. do 33. tednu nosečnosti smo 96 RhD-negativnim nosečnicam odvzeli vensko kri, iz nje osamili plodovo DNK s prilagojenim načinom po Finningu s sod. in določili plodov genotip RHD. Detekcijo gena RHD smo izvedli z metodo PCR v realnem času na instrumentu ABI Prism 7900 Sequence Detection System. Določali smo prisotnost treh delov genskega zapisa gena RHD, tj. introna 4, eksona 7 in eksona 10. Za potrditev, da gre za plodovo DNK, smo pri moških plodih sklepali na podlagi prisotnosti gena SRY. Če sta bila rezultata PCR reakcije za gena RHD in SRY negativna, smo sklepali, da nosi nosečnica plod ženskega spola, ki je RhD-negativen. V teh primerih smo za potrditev, da gre za plodovo DNK, določali še prisotnost osmih naključnih polimorfnihih alelov iz vzorca DNK matere in vzorca DNK ploda iz materine plazme in tako posredno potrdili, da je šlo za plodovo DNK.

Rezultati. V raziskavi smo 96-im RhD-negativnim nosečnicam iz vzorca venske krvi pravilno napovedali plodov genotip RHD in njegov spol. Napovedane rezultate preiskav smo primerjali z dejanskim spolom in fenotipom RhD novorojenčka, ki smo ju določili po rojstvu. Natančnost napovedi spola in prisotnosti gena RHD z našo metodo PCR v realnem času je bila 100%.

Zaključki. Pričakujemo, da bo določitev plodovega genotipa na podlagi proste DNK v periferni krvi nosečnice zavzela pomembno mesto v prenatalnih preiskavah, še posebno v primerih imunizacije na RhD antigen med nosečnostjo in pri izvajanju predporodne preventivne z imunoglobulinom anti-D v 28. tednu nosečnosti.

Uvod

Prenatalna diagnostika s preiskavami plodove deoksiribonukleinske kisline (DNK) zavzema pomembno mesto v modernem porodništvu. Za pridobitev plodovih celic in DNK sta bila

Key words: genotyping, blood group antigens, RhD, peripheral blood of pregnant woman**Abstract** – Background. Prenatal diagnostics with the genotyping using the PCR analysis of the fetal DNA holds an important place in modern gynaecology. Lately, noninvasive fetal genotyping became feasible after fetal DNA was proven and isolated from the peripheral blood of the mother.

Methods. Peripheral blood samples of ninety-six RhD negative women in their 23–33 week of pregnancy were collected and the DNA of the fetus isolated with the modified method of Finning et al. Fetal RHD genotype was then determined with real time PCR method using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System. The presence of the three parts of the RHD gene, intron 4, exon 7 as well as 10, was assessed. In order to confirm the presence of fetal DNA, the presence of the SRY gene was used with male fetuses. If the PCR reaction results of the RHD and SRY gene were negative, we assumed that the fetus was a female whose RhD was negative. In order to verify that, a presence of eight chosen polymorphic alleles was determined from the DNA samples of the mother and from her plasma, thus indirectly confirming that it was the DNA of the fetus which was being tested.

Results. In this research we accurately predicted the genotype and gender of the fetuses of 96 RhD negative pregnant women from their peripheral blood. The predicted results of the research were compared with the actual gender and RhD phenotype of the newborn, that were determined at birth. Our accuracy in predicting the gender and the presence of the RHD gene using our real-time PCR method was 100%.

Conclusions. We anticipate the fetal genotype, determined on the basis of the fetal DNA being present in the peripheral blood of the mother, to take on a leading role in prenatal investigations, especially in cases of RhD immunisation during pregnancy and in prevention of RhD immunisation with anti-D immunoglobulin in the 28th week of pregnancy.

še do nedavnega potrebna invazivna postopka amniocenteza in biopsija horionskih resic, ki predstavljata določeno tveganje za nosečnico in plod (1). V zadnjem času so odkrili, da se v periferni krvi nosečnice nahajajo tudi celice ploda in celo nje-

gova prosta DNK, kar je odprlo možnosti za neinvazivno prenatalno diagnostiko (2, 3). Ker so plodove celice v krvi nosečnice maloštevilne in postopki njihove osamitve zahtevni, celice pa včasih v krvnem obtoku obstanejo še desetletja po porodu, celična DNK ni najprimernejša za rutinsko diagnostiko (4, 5). Šele po odkritju večje količine proste plodove DNK in ribonukleinske kisline (RNK) v krvi nosečnice, sta DNK in RNK postali lahko dostopen vir plodovega genskega materiala (6, 7).

V prenatalni diagnostiki ima pomembno vlogo določitev prisotnosti plodovih krvnospinskih genov oziroma njihovih alelov. Še posebej je pomembna njihova določitev v primerih imunizacije nosečnice in posledične hemolitične bolezni ploda in novorojenčka (HBPN), ki nastane zaradi skrajšane življenjske dobe plodovih oziroma novorojenčkovih eritrocitov. Hemolizo povzročijo eritrocitna protitelesa razreda IgG v krvi nosečnice, ki prehajajo skozi posteljico v plodov krvni obtok in se vežejo na eritrocitne antigene, podedovane od očeta (8, 9). Za hudo obliko HBPN so najpogostejše odgovorna protitelesa anti-D. HBPN lahko povzročijo še številna druga protitelesa; najpogostejše so to protitelesa specifičnosti anti-A in anti-B, sledijo anti-K, anti-c in anti-E. Poleg teh so opisani tudi bolj ali manj številni primeri protiteles drugih specifičnosti, kot so npr. anti-C^w, -C^x, -C, -e, -ce, -k, -Kp^a, -Kp^b, -Js^a, -Js^b, -Fy^a, -Fy^b, -Jk^a, -Jk^b, -M, -N, -S, -s, -Lw, -U, -Le^a in -Le^b (10, 11).

Določitev plodovega genotipa *RHD* je pomembna za vodenje nosečnosti pri RhD-negativnih nosečnicah, imuniziranih na antigen RhD predvsem takrat, ko je partner heterozigot za antigen RhD, torej je lahko plod RhD-pozitiven ali -negativen (12). Določitev plodovega genotipa *RHD* pri RhD-negativnih nosečnicah bi v prihodnosti lahko imela pomembno vlogo tudi pri odločitvi o predporodni zaščiti z imunoglobulinom (Ig) anti-D v 28. tednu nosečnosti.

V zadnjem času so razvili izjemno občutljive metode za ugotavljanje proste DNK ploda v periferni krvi nosečnice. Med njimi je najbolj zanesljiva metoda verižne reakcije s polimerazo v realnem času (real-time PCR) (6).

Namen naše raziskave je bil razvoj in uvedba zgornje metode, ki bi omogočala določiti plodov genotip *RHD* iz venske krvi RhD-negativne nosečnice.

Material in metode

Vzorci krvi nosečnic in novorojenčkov

V 23. do 33. tednu nosečnosti smo 96 RhD-negativnim nosečnicam odvzeli 6–10 mL venske krvi v epruveto z antikoagulantom (EDTA). Iz teh vzorcev smo najprej pripravili običajne serološke preiskave pred vbrizgavanjem preventivnega odmerka IgG anti-D, nato pa iz njih osamili plodovo DNK in iz nje določili njegov *RHD* genotip. Po porodu smo prejeli podatek o novorojenčkovem spolu in nato iz vzorca popkovnične krvi z načinom v gelu določili krvno skupino ABO in RhD. Od vseh odvzetih in testiranih vzorcev je imelo šest nosečnic prisotna protitelesa anti-D. Vse nosečnice so podpisale pristopno izjavo za sodelovanje v raziskavi, ki jo je odobrila republiška Komisija za medicinsko etiko.

Osamitev DNK iz plazme

Za osamitev DNK smo uporabili način po Fanningu s sod. (13). Vzorec venske krvi nosečnice smo najkasneje 24 ur po odvzemu centrifugirali 10 minut pri 2500 × g. Plazmo smo previdno odstranili v novo epruveto, ne da bi se dotaknili plasti mononuklearnih celic, preostanek krvi pa smo shranili na -20°C za morebitne nadaljnje preiskave. Plazmo smo nato 10 minut centrifugirali pri 10000 × g. Supernatant smo prenesli v novo tubo in ga do uporabe shranili na -20°C. DNK smo osamili iz 600–800 µL supernatanta plazme s pomočjo pripravka *QIAamp*

Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) po navodilih proizvajalca. DNK smo eluirali v 70 µL vode in jo takoj preskusili. Osamitev DNK iz popkovnične krvi ter preostale materine venske krvi smo ravno tako osamili s pomočjo pripravka *QIAamp Blood Mini Kit*.

PCR v realnem času

Ugotovitev gena *RHD* DNK, ki smo ga osamili iz plazme nosečnice, smo izvedli z metodo PCR v realnem času z napravo *ABI Prism 7900 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, USA), ki je kombinacija termalnega pomnoževalca DNK in detektorja fluorescence. Z metodo PCR v realnem času lahko optično spremljamo pomnoževanja železnega zaporedja DNK (6, 14). Metoda temelji na 5'-3' nukleazni aktivnosti Taq polimeraze (*Thermophilus aquaticus*) (15), ki odceplja fluorescentni reporter s hibridizirane sonde (16). Začetne oligonukleotide in sonde, označene s fluorescentnim reporterjem VIC ali FAM (na 5') in dušilcem signala (quencher) MGB (minor groove binder) ali TAMRA (na 3'), smo izbrali s pomočjo programa primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA), pripravili pa so jih v Applied Biosystems (Applied Biosystems, Warrington, GB).

Reakcijske mešanice za PCR v realnem času smo pripravili v ploščah s 96 vdolbinicami. 20 µL reakcijske mešanice je vsebovalo dva začetna oligonukleotida in sondo oziroma štiri začetne oligonukleotide in dve sondi pri t. i. dupleks reakciji PCR, vodo, univerzalno mešanico reagentov za PCR (Universal PCR Mastermix; Applied Biosystems, Foster City, USA) in 5 µL DNK. Vsak vzorec smo preskusili v dvojniku oziroma v trojniku. Reakcijski pogoji so bili enaki za vse PCR reakcije, in sicer 50 °C za 2 minuti, 95 °C za 10 minut, nato 45 ponovitev na 95 °C za 15 sekund in 60 °C za 1 minuto.

Rezultate pomnoževanja smo ovrednotili s programom Sequence Detector System 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Antikontaminacijski ukrepi, pozitivna in negativna kontrola

Za preprečitev lažno pozitivnih rezultatov in kontaminacije med posameznimi postopki smo upoštevali stroge preventivne ukrepe (17–19). Pri vsaki preiskavi smo vključili tudi več slepih poizkusov z vodo.

Za pozitivno kontrolo prisotnosti DNK smo pomnožili del gena za humani serumski albumin. Zaporedje začetnih oligonukleotidov in sonde za albumin smo izbrali s programom Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) na osnovi nukleotidnega zaporedja iz baze podatkov genske banke (GenBank M12523). Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde so bile 200 nM in 75 nM.

Ugotavljanje gena RHD

Z metodo PCR v realnem času smo določali prisotnost več delov gena *RHD*, in sicer introna 4, eksona 7 in eksona 10. Z detekcijo omenjenih treh regij namreč znatno povečamo pravilno napovedno vrednost prisotnosti antigena RhD pri kavkazijcih (20).

Zaporedje začetnih oligonukleotidov in sonde smo izbrali s programom Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) na podlagi nukleotidnega zaporedja iz baze podatkov genske banke (za intron 4: GenBank Y10605; za eksona 7 in 10: GenBank X63097).

Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde za detekcijo introna 4 so bile 400 nM in 150 nM, za detekcijo eksona 7 350 nM in 250 nM, za detekcijo eksona 10 pa 300 nM in 100 nM.

Pomnoževalna reakcija za detekcijo eksona 7 in eksona 10 je bila narejena v skupni reakcijski vdolbinici – s t. i. dupleks reakcijo.

Za pozitiven rezultat – tj. prisotnost nukleotidnega zaporedja na DNK, ki smo ga preskusili v krvi matere – smo se odločili, če sta bili dve reakciji od treh za določeno zaporedje na DNK pozitivni.

Ugotavljanje gena *SRY*, prisotnega pri plodu moškega spola

Za potrditev prisotnosti proste plodove DNK smo v vseh preskušanih vzorcih določali tudi prisotnost gena *SRY*, ki se nahaja samo na moškem kromosomu Y. Na ta način smo v primeru negativnega rezultata za gen *RHD* potrdili prisotnost plodove DNK (6).

Zaporedje začetnih oligonukleotidov in sonde smo izbrali s programom Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) na osnovi nukleotidnega zaporedja iz baze podatkov genske banke (GenBank L08063).

Koncentracije začetnih oligonukleotidov in sonde so bile 300 nM in 100 nM.

Ugotavljanje genetičnih označevalcev pri *RHD*-negativnem plodu ženskega spola

Če sta bila rezultata PCR reakcije za gena *RHD* in *SRY* negativna, smo sklepali, da ima nosečnica plod ženskega spola, ki je *RHD*-negativen. Za potrditev, da smo v teh primerih dejansko preiskovali prosto plodovo DNK, ne pa materine, smo izbrali naslednji način:

iz objavljenih podatkov po Alizadeh s sod. 2002 smo izbrali osem bialelnih polimorfizmov (S 01a, S 03, S 04a, S 05b, S 06, S 08b, S 10a in S 11a) z velikim odstotkom heterozigotnosti (21). Nosečnicam, ki naj bi nosile *RHD*-negativen plod ženskega spola, smo iz DNK venske krvi določali prisotnost vseh osmih izbranih alelov. V primeru, ko smo našli v vzorcih DNK, dobljenih iz materine plazme, vsaj en alel, ki ga v vzorcu DNK, dobljenem na standarden način iz mononuklearnih celic (MNC) matere ni bilo, smo lahko sklepali, da je to plodov alel. S tem smo potrdili, da gre za plodovo DNK. Vse te rezultate smo preverili tudi na DNK novorojenčka, dobljeni po rojstvu.

Rezultati

V raziskavi smo 96 *RhD*-negativnim nosečnicam iz vzorca venske krvi napovedali plodov genotip *RHD* in njegov spol. Napovedane rezultate preiskav smo primerjali z dejanskim spolom in fenotipom *RhD* novorojenčka, ki smo ju določili po rojstvu. Natančnost napovedi spola in prisotnosti gena *RHD* s PCR v realnem času je bila 100% (Razpr. 1). *RhD*-pozitivnih moških smo napovedali 41, *RhD*-pozitivnih žensk 25, *RhD*-negativnih moških pa 15.

Razpr. 1. Natančnost napovedi genotipa *RHD* in spola ploda iz materine plazme kot vira fetalne DNK.

Table 1. The accuracy of prediction of fetal *RHD* genotype and gender from maternal plasma as a source of fetal DNA.

Število Number	Število napovedanih <i>RHD</i> + No. of predicted <i>RHD</i> +		Število napovedanih <i>RHD</i> - No. of predicted <i>RHD</i> -		Natančnost genotipizacije <i>RHD</i> Accuracy of <i>RHD</i> genotyping (%)
	Moški Male	Ženska Female	Moški Male	Ženska Female	
96	41	25	15	15	100

V 15 (15,6%) primerih so bili izsledki PCR reakcije za gen *RHD* in *SRY* negativni, zato smo sklepali, da gre za plod, ki je *RhD*-negativna deklita. Pri teh 15 primerih smo z določitvijo izbranih osmih alelov po Alizadeh s sod. 2002 v 14 primerih zasledili vsaj en plodov alel. Le v enem primeru nismo dokazali

prisotnosti plodovega (očetovega) alela. Vseh petnajst nosečnic je dejansko rodilo *RhD*-negativne deklite.

Prišli smo tudi do zanimivih rezultatov. Tako sta dve od 96 nosečnic nosili dvojčke. Z analizo njunih vzorcev krvi smo pri obeh napovedali vsaj enega *RhD*-pozitivnega dečka. Obe sta rodili po dva *RhD*-pozitivna dečka. Pri šestih nosečnicah s protitelesi anti-D smo pravilno predvideli *RhD*-pozitiven plod moškega spola, pri eni pa *RhD*-pozitiven plod ženskega spola.

Razpravljanje

Prednost določitve plodovega genotipa *RHD* iz materine plazme je v tem, da niti nosečnica niti plod nista ogrožena pri pridobivanju plodovega materiala. V ta namen smo oblikovali nov način za določitev plodove krvne skupine *RhD*. Z raziskavo smo pokazali, da je naš način primeren za prenatalno genotipizacijo *RHD* iz plazme *RhD*-negativne nosečnice. Do podobnih zaključkov so prišli tudi pri drugih podobnih raziskavah (13). Vzorci venske krvi nosečnice, odvzeti v drugem in zadnjem trimesečju nosečnosti, vsebujejo dovolj proste plodove DNK za uspešno genotipizacijo (22). Izbrani deli zaporedja gena *RHD*, ki smo jih uporabili, so se izkazali primerni za preizkušanje v naši populaciji. Za druge rase je potrebno prilagoditi izbrana zaporedja gena *RHD* glede na frekvenco različnih haplotipov sistema *RhD* oziroma je za pravilno vrednotenje rezultatov v pomoč informacija o etničnem poreklu staršev (13, 20). Pri dokazovanju prisotnosti proste plodove DNK v plazmi *RhD*-negativne nosečnice je pri rezultatu, ki potrjuje, da je plod ženskega spola in *RhD*-negativen, priporočljivo določiti še polimorfizme drugih genov, da lahko dokažemo, da smo preiskovali plodovo DNK. Izbrana kombinacija 8 alelnih polimorfizmov se je potrdila za zelo primerno, saj je bil v 14 od 15 primerov vsaj en polimorfizem „informativen“.

Kljub trditvam, da prosta plodova DNA obstaja v materini plazmi še desetletja po porodu, v naši raziskavi nismo imeli napadnih napovedi glede spola ali prisotnosti gena *RHD* v nosečnosti (23).

Določitev plodovega gena *RHD* iz materine plazme je bila možna tudi pri *RhD*-negativnih nosečnicah kljub prisotnosti protiteles anti-D. Pravilna napoved otrokovega genotipa *RHD* v takih primerih je še posebno pomembna za nadaljnje vodenje nosečnosti. Metoda daje možnost, da se preventiva imunizacije *RhD* v 28. tednu nosečnosti po dosedanji doktrini omeji le na tiste nosečnice, katerih plod je *RhD*-pozitiven.

Zaključki

Pričakujemo, da bo določitev plodovega genotipa na osnovi proste DNK ploda v venski krvi nosečnice z metodo PCR v realnem času zavzela danes v porodništvu pomembno mesto. Predvsem je pomembno poznati plodov genotip *RHD* v primeru imunizacije na antigen *RhD* med nosečnostjo in pri izvajanju preventivnega programa zaščite v 28. tednu nosečnosti pred senzibilizacijo *RhD*.

Literatura

1. Brandenburg H, Jahoda MG, Pijper L, Reuss A, Kleyer WJ, Wladimiroff JW. Fetal loss rate after chorionic villus sampling and subsequent amniocentesis. *Am J Med Genet* 1990; 35: 178–80.
2. Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll Jh, Latt SA. Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3279–83.
3. Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Sargent IL, Redman CWG, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350: 485–7.
4. Bianchi DW, Zickwol GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male progenitor cell persist in maternal blood as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 705–8.

5. Little MT, Langlois S, Douglas Wilson R, Lansdorp P. Frequency of foetal cells in sorted subpopulations of nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood. *Blood* 1997; 89: 2347-58.
6. Lo YM, Tein MS, Lau TK et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998; 62: 768-75.
7. Poon LLM, Leung TN, Lau TZ, Lo YMD. Presence of fetal RNA in maternal plasma. (Technical Brief). *Clin Chem* 2000; 46: 1832-4.
8. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. Haemolytic disease of the fetus and newborn. In: Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M eds. *Blood transfusion in clinical medicine*. 10th ed. Oxford: Blackwell Science, 1997: 390-424.
9. Bowman JM. Historical overview: Haemolytic disease of the fetus and newborn. In: Kennedy HS, Wilson SM, Kelton JG eds. *Perinatal transfusion medicine*. Arlington: AABB, 1990: 1-52.
10. Carreras Versico LA, Torres OW, Virgilio OS, Pizzolato M. Mild haemolytic disease of the newborn due to Anti-Lewis a. *Vox Sang* 1993; 64: 194-5.
11. Bharucha ZS, Joshi SR, Bhatia HM. Haemolytic disease of the newborn due to Anti-Le^b. *Vox Sang* 1981; 41:36-9.
12. Tonn T, Westrup D, Seidl C, Kirchmaier CM, Seifried E. Sensitive determination of the Rh D genotype in mixed samples using fluorescence-based polymerase chain reaction. *Vox Sang* 1997; 57: 177-81.
13. Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avnt ND. Prediction of fetal status from maternal plasma. Introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *Transfusion* 2002; 42: 1079-85.
14. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-94.
15. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-80.
16. Honda H, Miهارu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001; 47: 41-6.
17. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-8.
18. Honda H, Miهارu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clin Chem* 2001; 47: 41-6.
19. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93: 125-8.
20. Wagner FF, Frohmayer A, Flegl WA. *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* 2001; 2: 10.
21. Alizadeh M, Bernard M, Danic B et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; 99: 4618-25.
22. Lo YMD, Hjelm NM, Path FRC et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N Engl J Med*, 1998; 339: 1734-8.
23. Invernizzi P, Biondi ML, Battezzati PM et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma decades after pregnancy. *Hum Genet* 2000; 110: 587-91.