

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)**Acta Haematologica Polonica**journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)**Praca poglądowa/Review**

## Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach immunohematologicznych krwinek czerwonych

*Application of flow cytometry to immunohematological tests of red blood cells*



Jadwiga Fabijańska-Mitek\*, Anna Stachurska

Zakład Immunohematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska

### INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 28.06.2017

Zaakceptowano: 18.07.2017

Dostępne online: 27.07.2017

Słowa kluczowe:

- cytometria przepływowa
- przeciek płodowo-matczyny
- erytrofagocytoza
- CD komórek krwi
- przechowywanie KKCz
- mikrocząstki

Keywords:

- Flow cytometry
- Feto-maternal hemorrhage
- Erythrophagocytosis
- CD of erythrocytes
- RBCs storage
- Microparticles

### ABSTRACT

Flow cytometry (FC) has been primarily applied to the diagnosis of hematological malignancies, and thereafter, to detection and quantification of CD34+ cells in bone marrow transplants, and granulocytes in neutropenias and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). In PNH and hereditary spherocytosis, changes in some of the erythrocyte membrane proteins are tested (CD59, CD55, and band 3). The purpose of this paper is to focus on the use of FC in RBC testing. With anti-D, -HbF, and -CA (carbonic anhydrase), we can detect RhD+, HbF+, and CA- fetal RBCs in the maternal RhD-, HbF-, and CA+ blood sample. Obtained results allow to select the appropriate dose of anti-D Ig in the RhD prophylaxis of feto-maternal incompatibility, or to detect the cause of fetal anemia. Expression of antigens and their weak variants, and concentration of specific antibodies, can also be assessed. It is possible to observe changes in selected CD molecules during storage of RBC units. If RBCs for transfusion are unavailable, due to patient's unusual antibody specificity, some of the available RBCs are opsonised, and then phagocytosis with the recipient monocytes is assessed. The microscopic time-consuming and subjective assay is usually used. Stained CD14+ monocytes and CD235a+ erythrocytes are visible on cytograms as well as their interaction. It makes evaluation of phagocytosis easier and objective. Microparticles of RBCs released during storage are also detected. They are 235a+. In differentiation of hemolysis causes, it is important to measure osmotic fragility, and that can be also achieved using FC. Flow cytometry should be applied to immunohematological testing of red blood cells more often than now.

© 2017 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

\* Adres do korespondencji: Zakład Immunohematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99/103, 01-813 Warszawa, Polska. Tel.: +48 22 569 38 20.

Adres email: [immunohematologia@cmkp.edu.pl](mailto:immunohematologia@cmkp.edu.pl) (J. Fabijańska-Mitek).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2017.07.005>

0001-5814/© 2017 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Sp. z o.o. All rights reserved.

Cytometria przepływowa jest czułą techniką badawczą, w której ocenia się pojedyncze komórki, przepływające przez wiązki światła laserowego. Analizuje się je na cytogramach jako zbiory o określonych cechach wielkości i ziarnistości oraz charakterystycznych markerach zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowych uwidocznionych za pomocą swoistych przeciwciał związanych z barwnikami fluorescencyjnymi. Bada się zazwyczaj 50 000–500 000 komórek. W hematologii wykonuje się w ten sposób immunofenotypowanie komórek białaczkowych i chłoniakowych, które ma kluczowe znaczenie dla ustalenia rozpoznania, klasyfikacji i wyboru leczenia chorób rozrostowych. Badaniu podlega występowanie cząsteczek różnicowania CD (*cluster of differentiation*), które są swoiście charakterystyczne dla poszczególnych stadiów hematopoetyzy oraz dla różnych procesów nowotworowych [1]. Za pomocą FC ustala się liczbę macierzystych komórek krwiotwórczych CD34+ w materiale do transplantacji (szpik, komórki z krwi obwodowej). Stosuje się też FC do oceny i różnicowania wrodzonych i nabytych neutropenii [2]. W nocnej napadowej hemoglobinurii (NNH), mimo że głównym objawem choroby jest hemoliza krwinek czerwonych, ocenia się stan granulocytów i monocytów, co umożliwia postawienie rozpoznania. Chorobowo zmienione granulocyty i monocyty cechuje brak lub obniżona ekspresja niektórych cząstek CD umiejscowionych na kotwicy glikozylo-fosfatydylo-inozytolowej (GPI), której synteza w NNH jest zaburzona. Bada się także krwinki czerwone i ocenia te, które nie posiadają lub mają mało inhibitorów dopełniacza CD59 (MIRL – *membrane inhibitor of reactive lysis*) i CD55 (DAF – *decay accelerating factor*), zależnych od ubytku GPI [3]. We wrodzonej sferocytocie wykonuje się test EMA (od nazwy barwnika 5-maleimid eozyny), który służy do oceny białka prążka 3. Gdy białko jest defektywne, to wiązanie barwnika jest obniżone w stosunku do krwinek prawidłowych. Uzyskanie wartości <75% wiązania w stosunku do krwinek kontrolnych jest ważnym kryterium rozpoznania choroby [4].

Oprócz powyższych dwóch zastosowań FC w badaniu krwinek czerwonych, inne wykonuje się w Polsce rzadko. Niektóre z niżej opisanych powinny być upowszechnione w laboratoriach diagnostycznych i badawczych.

### **Badanie przecieku krwinek czerwonych płodu do krążenia matki (FMH – *feto-maternal hemorrhage*)**

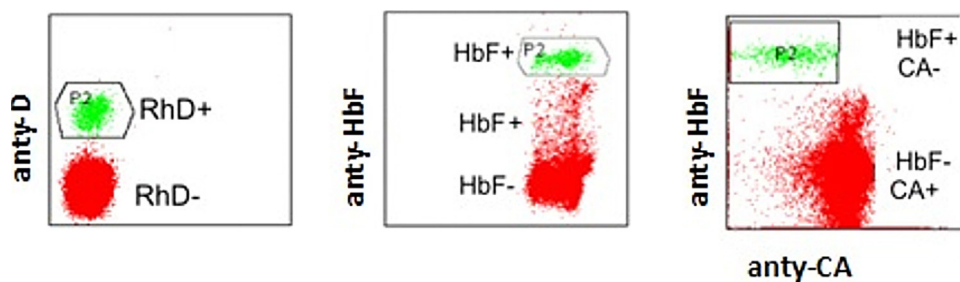
Wiadomo, że podczas ciąży i szczególnie podczas porodu pewna ilość krwinek płodowych może dostać się z krążenia dziecka do sąsiadujących w łożysku naczyń krwionośnych matki. Antygeny tych krwinek mogą uodpornić matkę i w kolejnej ciąży doprowadzić do choroby hemolitycznej płodu/novorodka (ChHPN). W zależności od swoistości przeciwciał, ich stężenia, podklas IgG i aktywności makrofagów płodu, hemoliza może mieć różny przebieg, ale często bywa nasilona, a jej skutkiem jest obrzęk płodu, żółtaczka gwałtownie narastająca w pierwszych dobach po porodzie, powiększenie śledziony, wątroby i serca. Bez leczenia, głównie przetaczania krwi w ciąży i po porodzie, może dojść do śmierci płodu lub noworodka. Ze względu na dużą immunogenność antygeny RhD oraz jego obecność u ponad 80% ojców oraz brak

u ok. 20% matek, zagrożenie ChHPN w zakresie RhD jest największe wśród antygenów grupowych. Na przełomie lat 60. i 70. XX wieku wprowadzono profilaktykę konfliktu RhD polegającą na podawaniu kobietom RhD ujemnym, po urodzeniu dziecka RhD dodatniego, immunoglobuliny (Ig) anti-D w celu zneutralizowania krwinek RhD dodatnich. W różnych krajach standardowe dawki są różne, od 100 µg do 300 µg przeciwciał; w Polsce 150 µg. Mimo ich stosowania od 1% do 2% kobiet wytwarza przeciwciała anti-D. W Europie zachodniej i w Ameryce Północnej bada się obligatoryjnie kobiety RhD ujemne na obecność krwinek płodowych w ich krążeniu i sprawdza się, czy zastosowana dawka jest odpowiednia. Dodatkowo w tych krajach wprowadzono profilaktykę śródciażową polegającą na podawaniu Ig anti-D w okresie od 28. do 34. tygodnia i zmniejszono immunizację do 0,1%. Podstawowym badaniem FMH może być test mikroskopowy Kleihauera-Betkego (KB), w którym wykrywa się krwinki płodu HbF+ wśród krwinek matki z HbA. Hemoglobina płodowa (HbF) nie ulega elucji w środowisku kwaśnym, natomiast krwinki matki pozostają w rozmazie krwi jako „cienie”. Wykrycie objętości krwinek większej niż 2 ml jest wskazaniem do wykonania badania za pomocą FC. Rozpoznaje się krwinki czerwone płodu na podstawie ich różnic z krwinkami matki i może to być obecność HbF, brak anhidrazy węglanowej (*carbonic anhydrase*; CA) lub obecność jakiegoś antygeny, najczęściej RhD [5, 6].

W różnych ośrodkach oceniano poszczególne testy cytometryczne, zazwyczaj porównując je z testem KB lub z drugim testem FC. Opinie nie były jednoznaczne [7, 8]. W naszym zakładzie przeprowadzono badania porównawcze trzech testów cytometrycznych i testu KB. Stosowano mieszaniny krwinek kobiet z krwinkami z pepowiny o ściśle określonej procentowości i wykonywano wszystkie testy w tych samych próbkach. Uzyskane wyniki wskazały, że testy cytometryczne miały porównywalną czułość, swoistość, powtarzalność i odtwarzalność [9]. Jednakże, badając kobiety po porodach oraz śledząc doniesienia literaturowe, stwierdzono występowanie przypadków, w których każdy z testów mógł mieć ograniczenia [10, 11].

Stosowanie przeciwciał anti-D znakowanych fluorochromem umożliwia wykrycie w próbce krwi RhD ujemnej matki krwinek RhD dodatnich płodu. Nie można mieć jednak pewności, że u wszystkich matek oznaczonych jako RhD ujemne, które posiadają słaby antygen D (i zgodnie z obowiązującymi przepisami są zaliczane do RhD ujemnych), nie zdarzy się wynik fałszywy, ponieważ przeciwciała może zareagować z takimi krwinkami. Z kolei jest bardzo prawdopodobne, że przeciwciała te nie wykryją nawet dużego FMH, gdy dziecko będzie miało słabą odmianę RhD.

Można stosować przeciwciała anti-HbF, które wykrywa krwinki płodowe. Mimo że HbF zanika stopniowo po porodzie, to jej niewielkie ilości występują też u osób dorosłych. HbF dodatnie krwinki osoby dorosłej różnią się najczęściej od krwinek płodu małą zawartością tej hemoglobiny i stanowią przeważnie 1–2% wszystkich erytrocytów. Poza tym osoba dorosła ma zazwyczaj krwinki czerwone o średniej objętości (MCV) ponad 20% mniejszej od MCV krwinek płodu i na cytogramie znajdują się one w innym miejscu. Zdarza się jednak, że krwinki płodu nie odróżniają



**Ryc. 1 – Wykrywanie krwinek czerwonych płodu w próbce krwi matki z zastosowaniem przeciwciał anti-D, anti-HbF i anti-HbF + anti-CA (P2 – krwinki płodu)**

**Fig. 1 – Detection of fetal RBCs in maternal blood samples using anti-D, anti-HbF, and anti-HbF+anti-CA (P2 – fetal RBCs)**

się od krwinek matki, szczególnie gdy ma ona hemoglobinopatię, talasemię, zespół przetrwałej hemoglobiny płodowej lub dużą populację krwinek HbF dodatnich o innej, niewyjaśnionej etiologii [10]. Wówczas można odróżnić jej krwinki od krwinek płodowych, stosując przeciwciała anti-CA, bowiem anhydraza węglanowa jest enzymem ujawniającym się w krwinkach czerwonych po urodzeniu (oddychanie płucami). Krwinki płodowe są HbF dodatnie i CA ujemne, a matki HbF ujemne CA dodatnie, nieliczne HbF dodatnie i CA dodatnie. Nie można wykluczyć, że w chorobach krwi jakaś populacja krwinek czerwonych matki będzie nieprawidłowa i dlatego CA ujemna [11]. Wniosek z badań jest w takim razie następujący: testy cytometryczne do oceny FMH są bardzo czułe, ale czasem, choć bardzo rzadko, mogą być nieswoiste. Wskazana jest możliwość wykonania w laboratorium więcej niż jednego testu cytometrycznego.

Procedura znakowania krwinek czerwonych płodu może być mniej lub bardziej skomplikowana. Oznaczając antygen powierzchniowy, stosuje się przeciwciała bezpośrednio z nim reagujące. Jeżeli jest to antygen D, to można użyć gotowych sprzężonych z fluorochromem przeciwciał anti-D (Ryc. 1). Jeżeli chce się szukać różnicy w innych antygenach, to trzeba użyć przeciwciała o danej swoistości, a następnie znakowanego przeciwciała anti-IgG. W obu przypadkach krwinki pozostają żywe. Do wykrywania HbF i CA trzeba poddać krwinki utrwaleniu i permeabilizacji, czyli trzeba uczynić ich błonę komórkową przepuszczalną dla przeciwciała. Procedura testu może być opracowana w danym laboratorium. Dobiera się odpowiednie roztwory, ustala ich stężenia do permeabilizacji i miareczkuje się przeciwciała dla uzyskania optymalnego rozcieńczenia. Można też kupić gotowy zestaw odczynników z instrukcją krok po kroku dla danego testu [12].

Ocena ilościowa FMH umożliwia dobór odpowiedniej dawki Ig anti-D dla kobiet RhD ujemnych, rodzących dziecko RhD dodatnie. Dodatkowo ma ona znaczenie diagnostyczne przy ustaleniu przyczyny nieoczekiwanej niedokrwistości płodu, która może być spowodowana FMH. Jeśli wynik FMH jest ujemny, to poszukuje się innych przyczyn np. niedokrwistości wrodzonej lub nabytej – spowodowanej patogenem hemolitycznym (parwowirus B19, paciorkowiec, laseczka zgorzeli) lub nieoczekiwanymi przeciwciałami. Jeżeli istnieje różnica antygenowa między matką a dawcą krwinek użytych do transfuzji dopłodowej, to można ocenić efektywność transfuzji. Zazwyczaj dobiera się krwinki

O RhD ujemne, gdyż przed pierwszym przetoczeniem nie wiadomo, jaką grupę krwi ma płód. Jeżeli matka jest RhD dodatnia, to można w jej krążeniu szukać krwinek dawcy RhD ujemnych oraz HbF ujemnych i ewentualnie znaleźć przyczynę braku poprawy stanu płodu, gdy ze względu na defekt łożyska zarówno krwinki HbF dodatnie i CA ujemne płodowe jak i krwinki HbF ujemne i CA dodatnie dawcy przedostają się do krążenia matki. W takim przypadku, zależnie od okresu ciąży i stanu płodu, można podjąć decyzję o cesarskim cięciu i leczeniu noworodka transfuzją uzupełniającą [12].

W Polsce nie stosuje się rutynowo badania FMH. Dla ustalenia dawki Ig anti-D próbka krwi matki powinna być pobrana po upływie ok. 1 godziny po porodzie, podobnie jak w przypadku poszukiwania przyczyn niedokrwistości noworodka, w tym nieoczekiwanej śmierci noworodka. Badanie powinno się odbyć w ciągu 2–3 godzin. Jest to szczególnie ważne, gdy matka ma grupę krwi O, a dziecko A lub B, gdyż takie krwinki są niszczone przez przeciwciała anti-A lub anti-B w jej krążeniu. Pobranie krwi matki dzień lub dwa po porodzie, szczególnie gdy płód urodził się martwy i nie wiadomo, jaką miał grupę krwi, a także przechowywanie i transport do odległego laboratorium mogą być przyczyną wyniku fałszywie ujemnego.

## Wykrywanie oraz ocena przeciwciał i antygenów

W badaniach immunohematologicznych krwinek czerwonych rutynowo stosuje się aglutynacyjne techniki serologiczne do wykrywania przeciwciał i antygenów. Cytometrię przepływową, jako technikę bardzo czułą wprowadza się w celu wykrycia bardzo słabych reakcji. Służy ona też do ilościowej oceny przeciwciał i obserwacji zmian w ich liczbie na powierzchni krwinki lub stężenia w surowicy. Intensywność fluorescencji może być miarą liczby przeciwciał związanych z krwinką czerwoną np. w niedokrwistości autoimmunohemolitycznej (NAIH) [13], a stworzenie krzywej wzorcowej dla surowicy o znanym stężeniu Ig pozwala na ocenę stężenia w innych surowicach, np. u kobiety w ciąży lub dla celów produkcyjnych w surowicy immunizowanych dawców, np. Ig anti-D [14].

FC jest jedną z nowoczesnych metod wykorzystywanych w badaniach nad nowymi układami grupowymi oraz słabymi odmianami antygenów. Stosuje się ją do poszukiwania

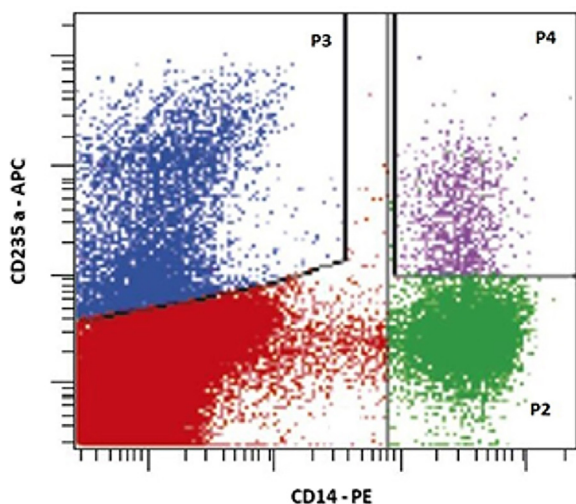
nowych antygenów oraz oceny liczby determinant antygenowych [15, 16].

### Ocena erytrofagocytozy

Gdy nie można znaleźć zgodnego antygenowo dawcy dla biorcy z przeciwciałami skierowanymi do antygenów powszechnego, wykonuje się test mikroskopowy MMA (*monocyte monolayer assay*). Użyte są monocyty z krwi biorcy, które kontaktuje się z erytrocytami kolejnych dawców opłaszczonymi przeciwciałami biorcy. Reakcja zachodzi na specjalnych szkiełkach i ocenia się ją mikroskopowo. Liczy się, ile erytrocytów zostało pochłoniętych i zaadherowanych przez monocyty. Wybiera się tego dawcę, którego krwinki najslabiej reagowały z monocytami biorcy. Ograniczeniem metody jest subiektywność odczytu i niemożność odróżnienia na szkiełku, czy krwinki czerwone przylegające do monocytów weszły w reakcję z nimi, czy przypadkowo dotykają do nich. FC daje w tym zakresie lepsze możliwości. Dla potrzeb odczytu znajduje się monocyty swoistymi dla nich przeciwciałami anti-CD14 i erytrocyty swoistymi przeciwciałami anti-CD235a. Na cytogramie widoczne są oddzielnie monocyty, erytrocyty oraz monocyty z erytrocytami. Odczyt jest obiektywny, bez reakcji fałszywie dodatnich [17, 18] (Ryc. 2).

### Badania immunohematologiczne krwinek czerwonych przechowywanych jako jednostki koncentratów przeznaczonych do transfuzji

Od kilku lat rozważa się problem jakości koncentratów krwinek czerwonych (KKCz) w końcowym okresie ich przechowywania (obecnie 42 dni) z leukocytami lub filtrowanych. Prowadzi się badania kliniczne i laboratoryjne. Ocena erytrofagocytozy okazała się przydatna. W końcowym okre-



Ryc. 2 – Cytogram z badania erytrofagocytozy (P2 – monocyty, P3 – erytrocyty, P4 – monocyty z erytrocytami)  
Fig. 2 – Cytogram of erythrophagocytosis test (P2 – monocytes, P3 – erythrocytes, and P4 – monocytes with erythrocytes)

się przechowywania więcej krwinek było fagocytowanych niż wkrótce po pobraniu oraz oddziaływania erytrocyt – monocyty dotyczyły większej liczby komórek, gdy opłaszczono „stare” erytrocyty przeciwciałami, niż gdy badano tak samo opłaszczone krwinki świeże.

W ocenie jakości świeżych i przechowywanych KKCz, FC ujawniła różną ekspresję następujących wybranych cząstek CD odpowiedzialnych za funkcje życiowe, starzenie i usuwanie krwinek czerwonych z krążenia: CD44, CD47, CD55, CD58, CD59, CG235a (GPA – glikoforyna A). Okazało się, że ekspresja CD związanych z adhezją, wymianą gazową, ochroną przed hemolizą, mierzona nasileniem fluorescencji z odpowiednimi znakowanymi przeciwciałami, istotnie statystycznie zmieniała się w końcowym okresie przechowywania, szczególnie, gdy były to KKCz niefiltrowane, czyli przechowywane w obecności leukocytów [19].

W badaniach nad jakością KKCz zainteresowanie skupia się także na uwalnianych w trakcie przechowywania mikrocząstkach – mikropęcherzykach. Cytometria przepływowa jest bardzo dobrym narzędziem do ich wykrywania i analizy ilościowej [20]. W nadsączu, uzyskanym po wirowaniu krwi ocenia się mikrocząstki, znakując je swoistym dla krwinek czerwonych przeciwciałem anti-CD325a i dla krwinek płytkowych anti-CD41. Poszukuje się mikrocząstek wśród struktur o określonej wielkości, porównując je do standardowych kulek o różnych średnicach, przeznaczonych do badań metodą FC.

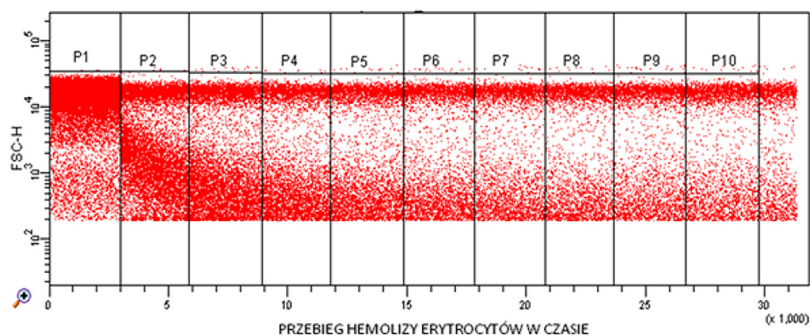
### Oporność osmotyczna krwinek czerwonych

Badania immunohematologiczne krwinek czerwonych mają na celu poszukiwanie przyczyn hemolizy lub sposobu jej uniknięcia. W hematologii do różnicowania przyczyn skróconego czasu przeżycia erytrocytów bada się ich oporność osmotyczną. Tradycyjnie mierzy się ją, dodając dejonizowaną wodę do próbki zawiesiny krwinek i obserwuje się tempo zwiększania stężenia uwalnianej hemoglobiny. FC umożliwia ocenę oporności osmotycznej przez pomiar ilości pozostałych erytrocytów po hemolizie w określonym czasie np. co 30 sekund przez 200 lub 300 sekund. Uzyskuje się cytogramy dokumentujące przebieg hemolizy krwinek pacjenta w odniesieniu do krwinek prawidłowych [21] (Ryc. 3).

### Problemy techniczne

Krwinki czerwone są specyficznymi komórkami, są małe w stosunku do innych komórek krwi, nie mają jądra komórkowego, mają mało organelli komórkowych i cytoplazmy (wypełnia je hemoglobina), mają szczególny kształt i dużą elastyczność oraz błonę komórkową bogatą w kwas sialowy nadający im ujemny ładunek, dzięki któremu odpychają się. Pod wpływem zmian w środowisku reakcji, utrwalanu, wirowaniu, stosowaniu różnych temperatur można spowodować agregację erytrocytów, używając niewłaściwych przeciwciał aglutynację. W odczycie w FC należy stosować skalę logarytmiczną zamiast liniowej, używanej dla krwinek białych. Przeprowadzona w 2010 roku analiza artykułów opublikowanych przez 88 zespołów





**Ryc. 3 – Cytogram z badania oporności osmotycznej**  
**Fig. 3 – Cytogram of osmotic fragility test**

badawczych wykazała, że 75% z nich stosowało procedury znakowania takie jak dla krwinek białych, nie uwzględniając możliwości aglutynacji i agregacji, a tym samym uzyskania fałszywych wyników [22]. Wdrożenie badań krwinek czerwonych z użyciem FC jest wyzwaniem dla pracowników laboratoriów medycznych, jednak po ich rozwiązaniu uzyskuje się nowe bardzo ważne narzędzie do badania krwinek czerwonych w różnych sytuacjach klinicznych.

#### Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

#### Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

#### Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

#### Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

#### P I Ś M I E N N I C T W O / R E F E R E N C E S

- [1] Kopeć-Szlęzak J. Immunofenotypowanie komórek białczkowych i chłoniakowych. Zastosowanie w diagnostyce – przewodnik. Warszawa: Fundacja Pro Pharmacia Futura; 2011.
- [2] Piątosa B, Klaudel-Dreszler M. Zastosowanie cytometrii przepływowej w diagnostyce neutropenii. *Post N Med* 2012;25:569–575.
- [3] Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B* 2010;78B:211–230.
- [4] Adamowicz-Salach A. Sferocytoza wrodzona u dzieci – badania diagnostyczne i postępowanie terapeutyczne. *Post N Med* 2013;9:646–650.
- [5] Campbell TA, Ware RE, Mason M. Detection of Fetal Hemoglobin in Erythrocytes by Flow Cytometry. *Ann New York Acad Sci* 1998;850:446–448.
- [6] Kumpel BM, MacDonald AP, Bishop DR, Yates AF, Lee E. Quantitation of fetomaternal haemorrhage and F cells in unusual maternal blood samples by flow cytometry using anti-D and anti-HbF. *Transfus Med* 2013;23:175–186.
- [7] Kennedy GA, Shaw R, Just S, Bryson G, Battistutta F, Rowell J, et al. Quantification of feto-maternal haemorrhage (FMH) by flow cytometry: anti-fetal hemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with anti-D. *Transfus Med* 2002;13:25–33.
- [8] Fong EA, Finlayson J, Robins F, Davies J, Joseph J, Rossi E, et al. Evaluation of a new rapid anti-HbF FITC assay, Trillium QuickQuant for detection and quantitation of foetomaternal haemorrhage. *Int J Lab Hem* 2013;35:106–110.
- [9] Gieleżyńska A, Stachurska A, Fabijańska-Mitek J, Dębska M, Muzyka K, Kraszevska E. Quantitative fetomaternal hemorrhage assessment with the use of five laboratory tests. *Int J Lab Hematol* 2016;38:419–425.
- [10] Gieleżyńska A, Stachurska A, Fabijańska-Mitek J, Dębska M, Burzyńska B, Rawa K, et al. Feto-maternal haemorrhage assessment in a woman with a large population of red blood cells containing fetal hemoglobin. *Ginekolog Pol* 2014;85:614–618.
- [11] Prus E, Fibach E. Heterogeneity of F cells in  $\beta$ -thalassemia. *Transfusion* 2013;53:499–504.
- [12] Fabijańska-Mitek J, Bochenek Jantczak D, Gajewska A, Wieczorek K. Konflikt serologiczny matczyno- płodowy. Profilaktyka i leczenie krwii w chorobie hemolitycznej płodu/norowodka (ChHPN). W: *Badania immunohematologiczne I organizacja krwiolecznictwa – compendium*. Warszawa: Fundacja Pro Pharmacia Futura; 2017. p. 76–89.
- [13] Wang Z, Shi J, Zhou Y. Detection of red blood cell-bound immunoglobulin G by flow cytometry and its application in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia. *Int J Hematol* 2001;2:188–193.
- [14] Christensson M, Bremme K, Shanwell A, Westgren M, Christensson B. Flow cytometric quantitation of serum anti-D in pregnancy. *Transfusion* 1996;36:500–505.
- [15] Helias V, Saison C, Ballif BA, Peyrard T, Takahashi J, Takahashi H, et al. ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group systems Langereis. *Nat Genet* 2012;44:170–173.

- 
- [16] Nicholson G, Lawrence A, Ala FA, Bird GW. Semi-quantitative assay of D antigen site density by flow cytometric analysis. *Transfus Med* 1991;1:87-90.
- [17] Stachurska A, Gmerek K, Fabijańska-Mitek J. Application of flow cytometry and microscopy methods in erythrophagocytosis measurement. *Centr Eur J Immunol* 2013;38:208-213.
- [18] Stachurska A, Król T, Trybus T, Szary K, Fabijańska-Mitek J. 3D visualization and quantitative analysis of human erythrocyte phagocytosis. *Cell Biol Int* 2016;40:1195-1203.
- [19] Gmerek K, Fabijańska-Mitek J. Zmiany zachodzące w krwinkach czerwonych przechowywanych w bankach krwi. *Post N Med* 2016;29:119-125.
- [20] Stachurska A. Possible diagnostic role of cell membrane microparticles. *Post N Med* 2016;29:132-136.
- [21] Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Zgodzińska A, Łazowska M, Kotuła I. Flow cytometric osmotic fragility test: increased assay sensitivity for clinical application in pediatric hematology. *Cytometry B* 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.b.21511>.
- [22] Arndt PA, Garratty G. A critical review of published methods for analysis of red cell antigen-antibody reactions by flow cytometry, and approaches for resolving problems with red cell agglutination. *Transfus Med Rev* 2010;24: 172-194.