



Contents lists available at ScienceDirect

## Acta Haematologica Polonica

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/achaem](http://www.elsevier.com/locate/achaem)

### Praca poglądowa/Review

## Metody oznaczania hemoglobiny płodowej

### Methods for determination of fetal hemoglobin



Elżbieta Górską<sup>1</sup>, Anna Lemańska<sup>2</sup>, Katarzyna Popko<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

<sup>2</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Kierownik: Prof dr hab. n. med. Urszula Demkow, Warszawa, Polska

#### INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 12.09.2016

Zaakceptowano: 23.12.2016

Dostępne online: 04.05.2017

Słowa kluczowe:

- hemoglobina płodowa
- wysokosprawna chromatografia cieczowa
- elektroforeza kapilarna
- kapilarne ogniskowanie izoelektryczne
- cytometria przepływowa
- test Kleihauera-Betke

Keywords:

- Fetal hemoglobin
- High-performance liquid chromatography HPLC
- Capillary electrophoresis
- Isoelectric focusing
- Capillary isoelectric focusing
- Kleihauer–Betke test

#### A B S T R A C T

The identification of the new form of hemoglobin in fetus red blood cells (HbF), different from adult hemoglobin (HbA), was made over one hundred years ago. Since this time, various methods of fetal hemoglobin measurement have been designed. Most of them are based on the different biochemical characteristics of HbF. Fetal hemoglobin's affinity for oxygen is substantially greater than that of adult hemoglobin. The first techniques for the determination of fetal hemoglobin were based on its resistance to denaturation by alkaline solutions. Currently, the measurement of hemoglobin F is an important part of diagnosis of sickle cell disease, thalassemia, hereditary persistence of fetal hemoglobin, and fetomaternal hemorrhage. Amongst the most commonly used and clinically important methods, high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, isoelectric focusing, capillary isoelectric focusing, Kleihauer–Betke test, and flow cytometry should be listed.

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

\* Adres do korespondencji: Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Żwirki i Wigury 63A, 02-091 Warszawa, Polska.

Adres email: [Katarzyna.popko@wum.edu.pl](mailto:Katarzyna.popko@wum.edu.pl) (K. Popko).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2016.12.001>

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

## Wstęp

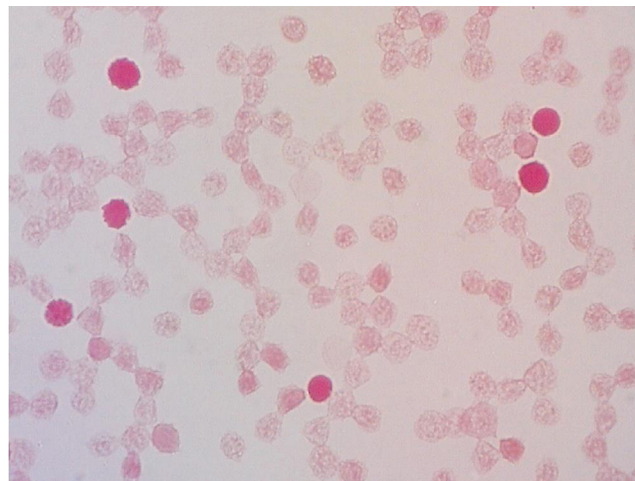
Pierwsze naukowe informacje sugerujące istnienie różnych typów hemoglobiny pojawiły się już w drugiej połowie wieku XIX. W roku 1866 von Körber dokonał obserwacji wykazującej, że roztwór hemoglobiny przygotowany z krwi pępowinowej jest bardziej odporny na działanie zasadowego środowiska wodorotlenku sodu niż hemoglobina uzyskana z krwi osób dorosłych [1]. W 1951 roku właściwość ta została wykorzystana do wynalezienia testu laboratoryjnego umożliwiającego rozróżnienie hemoglobiny płodowej (HbF; fetal hemoglobin) od hemoglobiny występującej u osób dorosłych (HbA; adult hemoglobin). Singer i Chernoff opracowali jednoczynny test denaturacji zasadowej stosowany ówczesnie do oceny zawartości hemoglobiny płodowej w erytrocytach [2]. Opierał się on na ocenie zmian absorpcji promieniowania, wynikających z przekształcania hemoglobiny z formy oksydowanej do zasadowego chromogenu. Inna opracowana wówczas metoda wykorzystywała precypitację białka roztworem siarczanu amonu i ocenę procentową niezdenaturowanej hemoglobiny [3]. W 1986 roku wyprodukowano pierwszy standard HbF (WHO International Reference Material) przeznaczony do użycia w dwuminutowym teście denaturacji. Jest to stabilizowany, liofilizowany preparat cyjanomethemoblobiny sporządzony z krwi pobranej od ojca pacjenta z  $\beta$ -talasemią major i jest przechowywany w NIBSC (National Institute of Biological Standards and Controls) w South Mimms, UK [4].

W 1980 roku wprowadzono metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC; high-performance liquid chromatography), co uprościło i przyspieszyło badanie próbek krwi matek w poszukiwaniu hemoglobiny  $A_2$  (HbA<sub>2</sub>) i HbF oraz innych częstych wariantów hemoglobiny. Pod koniec lat 80. XX wieku bardzo intensywnie zaczęła rozwijać się technika elektroforezy kapilarnej, stanowiąca alternatywę dla HPLC. Inną dostępną techniką jest kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF; capillary isoelectric focusing). W przypadku konieczności oszacowania proporcji krwinek czerwonych pochodzących od płodu można wykorzystać technikę cytochemiczną, np. metodę Kleihauera, a także cytometrię przeplywową [5–8].

## Metody oznaczania hemoglobiny płodowej

### Test Kleihauera-Betke

Test Kleihauera-Betke opiera się na oporności hemoglobiny płodowej na denaturację w środowisku kwaśnym. Rozmazy krwi obwodowej poddawane są działaniu 3% roztworu kwasu cytrynowego. Hemoglobina A zostaje wymyta z erytrocytów, natomiast krwinki czerwone zawierające hemoglobinę płodową F po wybarwieniu rozmazów erytrozyną i hematoksyliną są widoczne pod mikroskopem świetlnym jako ciemno wybarwione komórki (Ryc. 1). Erytrocyty pozbawione hemoglobiny A uwiadcniają się jako cienie komórkowe. W celu uzyskania wiarygodnych wyników wymagana jest ocena minimum 2000 erytrocytów w badanym preparacie. Metoda ta jest czasochłonna, a prawidłowa ocena rozmazów wymaga od wykonującego badanie dużego doświadczenia [9, 10].



Ryc. 1 – Obraz mikroskopowy preparatu uzyskany metodą Kleihauer-Betke [19]

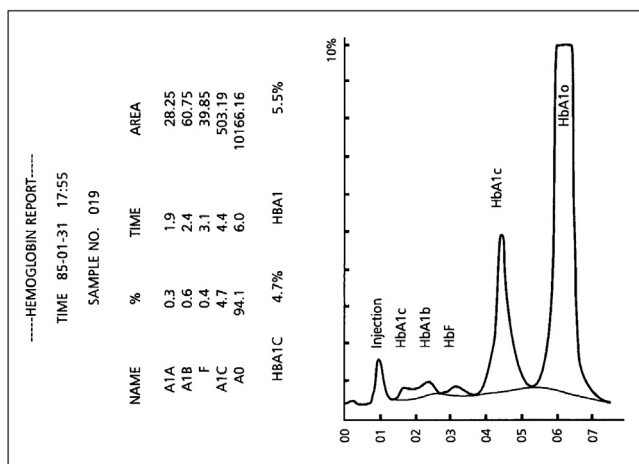
Fig. 1 – Microscopic image of Kleihauer-Betke test [19]

Zasada wysokosprawnej chromatografii cieczowej opiera się na rozdziale składników analizowanej próbki pomiędzy fazę stacjonarną i fazę ruchomą (eluat). Fazę stacjonarną może stanowić ciało stałe lub ciecz, natomiast faza ruchoma stanowi jednocześnie rozpuszczalnik dla próbki. Substancje zawarte w próbce przemieszczają się wraz z eluatem przez kolumnę. W analizatorach wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykorzystywane są słabe kolumny kationowymienne. Po wstrzyknięciu próbki hemolizatu do aparatu cząsteczki hemoglobiny przylgają się do kolumn, do których następnie wstrzykiwany jest eluent. Frakcje hemoglobiny zostają wymyte z kolumny, jeżeli siła jonowa roztworu elucyjnego jest wyższa niż retencja kolumny. Na podstawie różnicy ładunku oraz charakterystycznego czasu retencji rozdzielane są różne typy hemoglobiny. Po wymyciu poszczególnych frakcji hemoglobiny z kolumn są one wykrywane przez detektor mierzący poziom absorpcji fal o długościach 415 lub 690 nm. Procentowy udział każdego rodzaju hemoglobiny jest obliczany na podstawie pola powierzchni pod wykresem dla każdego piku (Ryc. 2) [8, 11].

### Elektroforeza kapilarna

Rozdział próbki metodą elektroforezy kapilarnej przeprowadza się w rurkach kapilarnych, wykonanych zazwyczaj ze stopionej krzemionki (kwarcu) SiO<sub>2</sub>, wypełnionych roztworem elektrolitu nośnego. Najczęściej stosowane są kapilary o średnicy wewnętrznej 25–75  $\mu$ m i długości około 50 cm. Końce kapilary umieszczone są w dwóch naczyniach, również wypełnionych elektrolitem podstawowym. W jednym z naczyń znajduje się katoda (-), a w drugim anoda (+). Elektrody połączone są ze źródłem wysokiego napięcia, w granicach od 10 do 30 kV, pracującym w zakresie prądowym od 0 do 200 mA.

Próbkę badaną wprowadza się do anodowego końca kapilary, natomiast przy katodowym końcu najczęściej znajduje się detektor.



**Ryc. 2 – Rozdział frakcji hemoglobin metodą jonowymiennej wysokociśnieniowej chromatografii ciekowej (IE-HPLC) [12]**

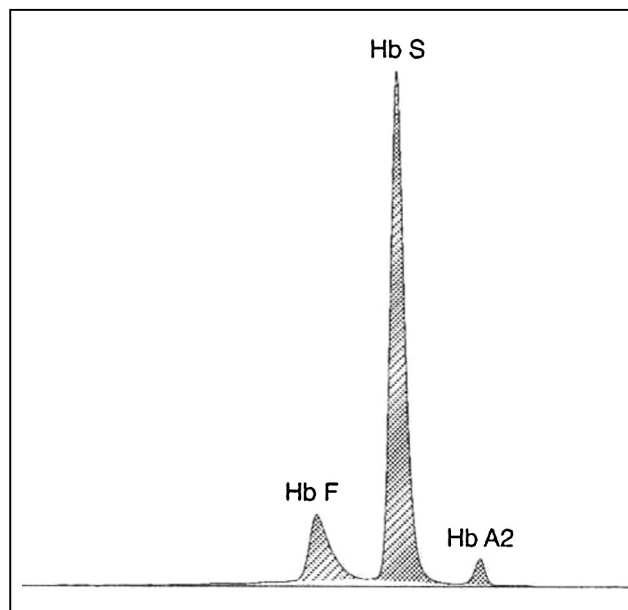
**Fig. 2 – Ion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography (IE-HPLC) separation of hemoglobin fractions [12]**

Metoda ta wykorzystuje zjawisko elektroendoosmozy, której siła przesuwu zasadowy bufor w stronę katody. Jony krzemianowe zawarte w ścianie kapilary ulegają dysocjacji, oddając kationy do zasadowego buforu wypełniającego kapilarę. Nieruchoma ściana kapilary jest więc naładowana ujemnie, natomiast w roztworze znajdują się jony dodatnie, co powoduje powstawanie w rurce kapilarnej podwójnej warstwy elektrycznej. Po przyłożeniu pola elektrycznego jony dodatnie wraz ze sferami hydratacji migrują do ujemnej katody. Dzięki niewielkiej średnicy kapilary razem z warstwą dodatnich jonów znajdującą się wzdłuż ściany kapilary przesuwu się reszta buforu wypełniającego kapilarę. Jednocześnie różne jony zawarte w roztworze migrują zgodnie ze swoimi ładunkami do odpowiednich elektrod, jednak z mniejszą prędkością, niż zachodzi elektroendoosmoza [12, 13].

Po zaaplikowaniu próbki hemolizatu do systemu przepływającego prąd elektryczny powoduje separację hemoglobin na podstawie ich różnicy ładunków i mobilności elektroforetycznej. Na katodowym końcu kapilary frakcje hemoglobiny są wykrywane przez odczyt absorbancji fali o długości 415 nm. Powstający elektroforegram przedstawia udział procentowy każdej obecnej frakcji hemoglobiny (Ryc. 3) [12].

#### Kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (cIEF)

Ogniskowanie izoelektryczne (IEF) odbywa się w nośniku, w którym wartość pH buforu zmienia się w sposób ciągły od wartości najwyższej przy katodzie do najniższej przy anodzie. Ustalenie gradientu pH jest możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych nośników pH zwanych amfolitami. Amfoteryczne substancje (białka, peptydy) migrują w polu elektrycznym w kierunku elektrod o znaku przeciwnym ich ładunkowi. Napotykać jednak po drodze zmieniając się wartości pH elektrolitu, zatrzymują się w miejscu, w którym



**Ryc. 3 – Elektroforegram przedstawiający HbA, HbF oraz HbA2**

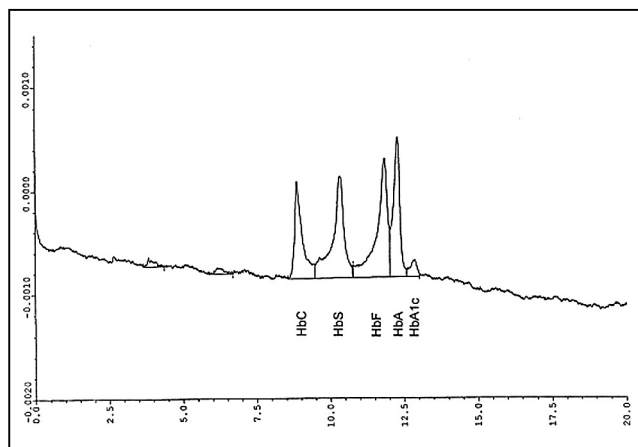
**Fig. 3 – Electropherogram of HbA, HbF, or HbA2**

$pH=pI$ . W elektrolicie o wartości pH równej wartości pI (punktu izoelektrycznego) wypadkowy ładunek makrocząsteczki równa się zero i obojętna elektrycznie makrocząsteczka zatrzymuje się, nie doznając działania sił pola elektrycznego. Uzyskuje się w ten sposób separację molekuł białkowych zgodnie z ich wartościami pI.

Technika kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego, oprócz migracji elektroforetycznej w kapilarze, wykorzystuje dodatkowo zjawisko przepływu elektroosmotycznego, czyli ruchu całości cieczy wypełniającej kapilarę. W metodzie tej przepływ elektroosmotyczny jest zminimalizowany przez pokrycie wnętrza kapilary roztworem neutralizującym silanole. Kapilara jest wypełniona mieszaniną amfolitów, tworzących gradient pH i hemolizatu. Po przyłożeniu napięcia elektrycznego cząsteczki hemoglobiny zostają zatrzymane w swoim punkcie izoelektrycznym, co powoduje ich mobilizację i następnie odczyt absorbancji przy długości fali 280 nm. Białka o niższym punkcie izoelektrycznym wykazują dłuższy czas retencji. Poszczególne typy hemoglobiny są identyfikowane na podstawie znanych, charakterystycznych dla nich wartości pI. Wynik podający odsetki procentowe każdej frakcji hemoglobiny jest przedstawiony w postaci elektroforegramu (Ryc. 4) [14, 15].

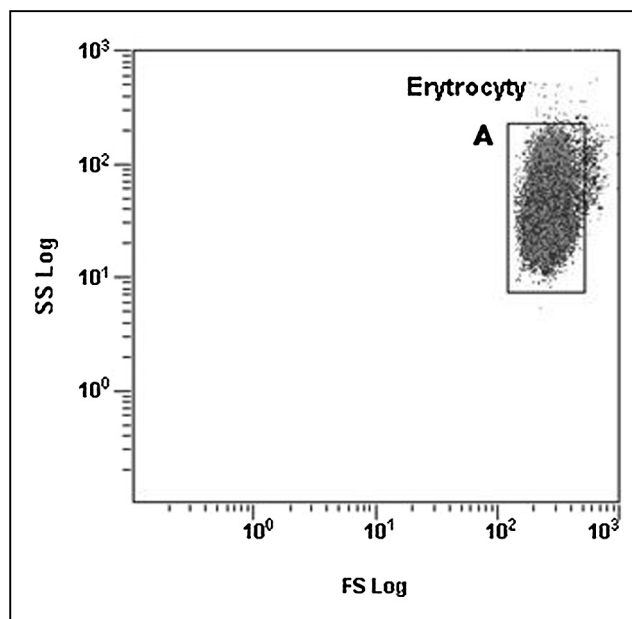
#### Cytometria przepływowa

Cytometria przepływowa jest metodą pozwalającą na ocenę wielkości, ziarnistości oraz ekspresji określonych antygenów na powierzchni lub/i wewnątrz analizowanej komórki. Zasada techniki opiera się na wykorzystaniu światła lasera padającego na pojedyncze komórki przesuwające się w postaci pojedynczego łańcucha przez komorę pomiarową. Promień lasera, padając na komórkę, ulega odbiciu



**Ryc. 4 – Elektroforegram kapilarnego ogniskowania izoelektrycznego próbki pochodzącej od pacjenta z niedokrwistością sierpowatokrwinkową (HbS), zawierającej różne typy hemoglobiny od lewej: HbC, HbS, HbF, HbA, HbA1c [15]**

**Fig. 4 – Electropherogram of capillary isoelectric focusing and blood sample from known HbS patient (from left: HbC, HbS, HbF, HbA, and HbA1c) [15]**



**Ryc. 5 – Cytogram zależności FSC-log/SSC-log przedstawiający obramkowaną populację erytrocytów zawierających domieszkę krwinek jądrazstych (A)**

**Fig. 5 – Flow cytometry dot-plot FSC-log/SSC-log of erythrocyte population with impurity of nuclear cells (gated A)**

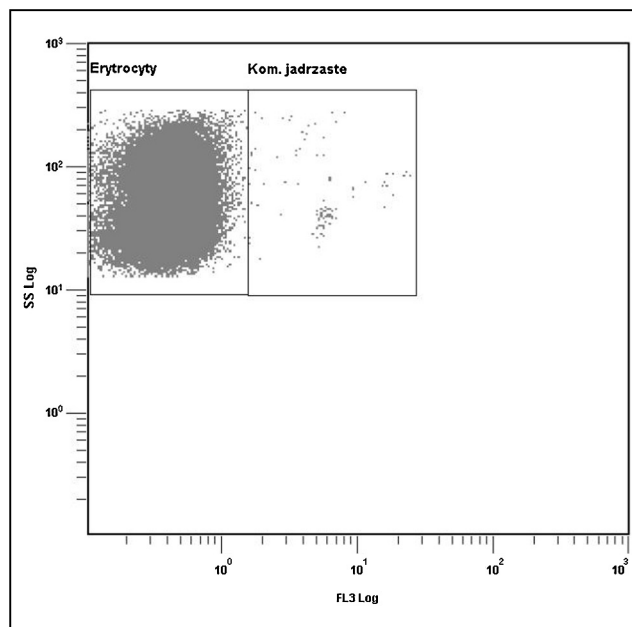
(FS; forward scatter) i rozproszeniu na strukturach wewnątrzkomórkowych (SS; side scatter). Dodatkowo analizowane antygeny mogą być znakowane barwnikami fluorescencyjnymi (najczęściej koniugowanymi z przeciwciałami monoklonalnymi), których świecenie jest wzbudzone przez padające światło lasera.

Test Trillium FMH QuickQuant™ jest nowym zestawem przeznaczonym do wykrywania i oznaczania liczby komórek zawierających hemoglobinę płodową oraz do oceny komórek F we krwi pacjenta metodą cytometrii przepływowej [16]. Test ten najczęściej jest wykorzystywany do oceny przecieku maczyno-płodowego, w celu dobrania odpowiedniej dawki immunoglobuliny Rh podawanej profilaktycznie w przypadku niezgodności antygenówD u matki i płodu [17].

Komórki F we krwi u osób dorosłych są erytrocytami zawierającymi zarówno HbA jak i HbF. Szacuje się, że u zdrowych dorosłych stanowią one średnio 2,7% komórek. Obliczenie liczby komórek F może być pomocne w monitorowaniu pacjentów z anemią sierpowatokrwinkową leczonych hydroksymocznikiem, a także w monitorowaniu pacjentów z mielodysplazją. Handlowe testy opracowano głównie w celu oznaczania przecieku maczyno-płodowego [18].

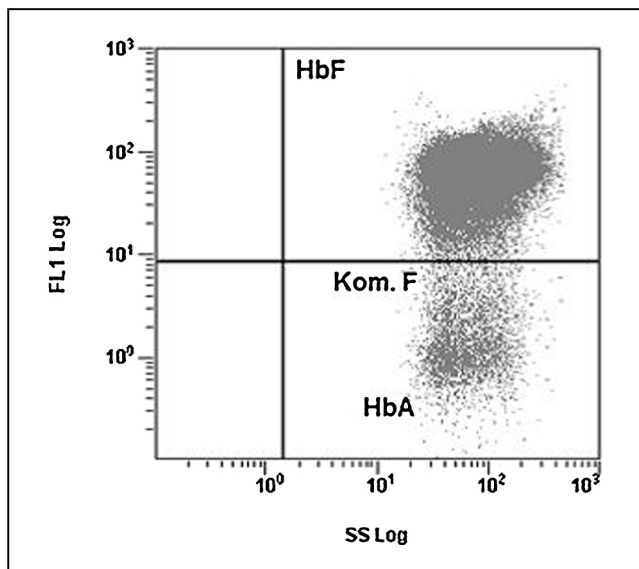
W metodzie tej wykorzystywane są swoiste przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromami skierowane przeciwko hemoglobinie płodowej (anty-HbF) oraz jodek propidyny (PI; propidium iodide), stosowany w celu wyeliminowania z analizy komórek jądrazstych (Ryc. 5, 6) [9, 17].

Do połączenia przeciwciała z łańcuchem  $\gamma$  hemoglobiny płodowej dochodzi wewnątrz erythrocytu, dlatego pierwszym krokiem jest utrwalenie komórek za pomocą glutaraldehydu, a następnie permeabilizacja błony komórkowej roztworem



**Ryc. 6 – Cytogram zależności SSC-log/PI (FL3) odzwierciedlający komórki z bramki A, przedstawiający odseparowane populacje erytrocytów (B) oraz komórek jądrazstych (C)**

**Fig. 6 – Flow cytometry dot-plot SSC-log/PI (FL3) related to cells from gate A, presenting separated erythrocytes (B) and nuclear cells (C)**



**Ryc. 7 – Cytogram przedstawiający zależność anti-HbF (FL1)/SS-log odzwierciedlającą erytrocyty (bramka B), przedstawiający populację komórek zawierających HbF, HbA oraz komórek F**

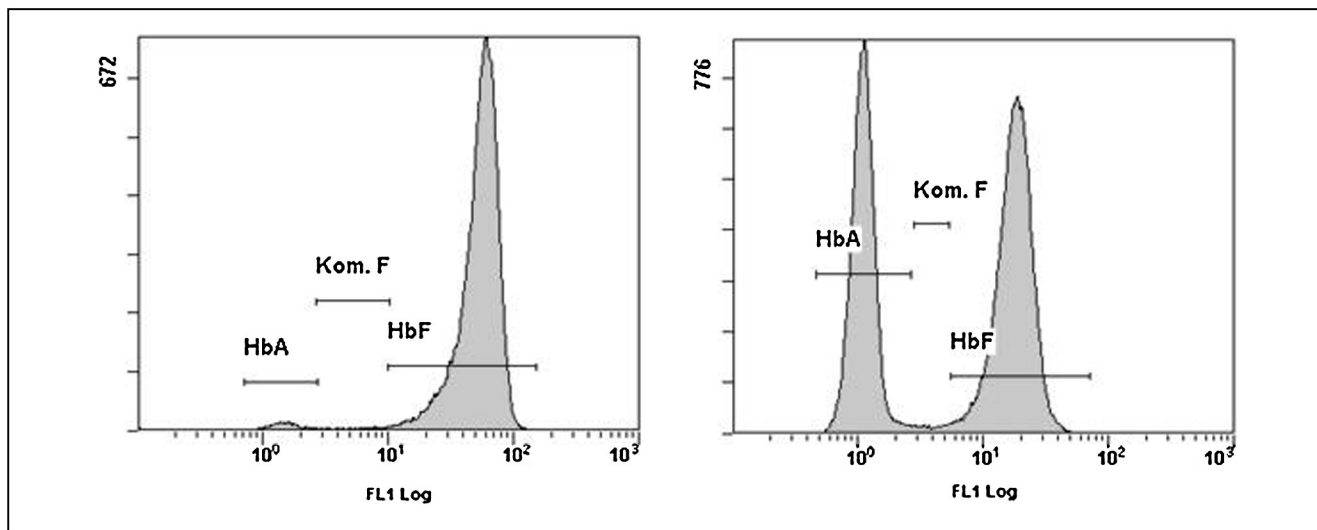
**Fig. 7 – Flow cytometry dot-plot anti-HbF (FL1)/SS-log of the erythrocytes (B) separated into the following three populations: HbF, HbA, and F cells**

Trillium Intra-Cell™. Po wstępnym przygotowaniu próbki oraz po inkubacji z przeciwciałem monoklonalnym dokonuje się analizy cytometrycznej. Wyniki są przedstawiane w postaci jedno- lub wieloparametrowych wykresów (Ryc. 7, 8).

## Omówienie

Hemoglobinę płodową oznacza się kilkoma uznanymi i dostępnymi metodami. Ustalenie procentowej zawartości hemoglobiny płodowej wydaje się mieć największe znaczenie kliniczne w monitorowaniu leczenia anemii sierpowato-krwinkowej, ocenie przecieku matczyno-płodowego oraz diagnostyce talasemii. Jednakże podwyższone stężenie HbF występuje w wielu innych chorobach, a także fizjologicznie u noworodków oraz u kobiet w ciąży [17, 19, 20]. Nabyty wzrost poziomu hemoglobiny płodowej pojawia się w anemii aplastycznej, ostrych białaczkach szpikowych i limfocytowych i młodzieńczej białaczce mielomonocytowej [21]. Mallick i wsp. [22] wykazują w swojej publikacji z 2014 roku, że podwyższony poziom HbF u dzieci może korelować z czynnikami prognostycznymi niektórych białaczek.

W latach 80. ubiegłego wieku wprowadzono prostą i szybką metodę rozdzielenia frakcji hemoglobin – wysoko-sprawną chromatografię cieczową (HPLC), która jest dziś jedną z głównych metod oznaczania hemoglobiny płodowej. Pomiar HbF jest wystarczająco precyzyjny dla celów klinicznych, jeśli pik hemoglobiny płodowej jest prawidłowo oddzielony od pozostałych frakcji i wariantów hemoglobiny. Obecność kilku wariantów hemoglobiny, spowodowany wystąpieniem mutacji (np. Hb Camperdown, Hb Dagestan), o zbliżonych czasach retencji do HbF, może zawyżać poziom HbF. Występowanie frakcji acetylowanych, wysoki poziom hemoglobiny glikowanej, obecność wariantów o krótkim czasie retencji (np. HbH, Hb Barta), a także wariantów hemoglobiny z mutacjami w łańcuchu  $\gamma$  lub  $\beta$  mogą zaburzać prawidłowy rozdział frakcji i prowadzić do niedokładnych pomiarów [20]. Alternatywą dla HPLC jest elektroforeza kapilarna. Te dwie automatyczne, szybkie metody stały się głównymi narzędziami w oznaczaniu HbF i HbA<sub>2</sub>



**Ryc. 8 – Histogramy przedstawiające zależność liczby komórek od fluorescencji FITC (FL1) oparte na bramce B, przedstawiające populacje komórek zawierających HbF, HbA oraz komórek F**

**Fig. 8 – Flow cytometry histograms of two blood samples showing number of red blood cells (RBCs) enumerated (y-axis) to log of fluorescent intensity of FITC (FL1, x-axis), showing distinct RBC populations with HbA, HbF, and F cells**

w związku z rozszerzaniem panelu badań diagnostycznych. W elektroforezie kapilarnej addukty hemoglobiny nie oddzielają się od głównego piku hemoglobiny, przez co interpretacja powstającego elektroforegramu jest łatwiejsza w porównaniu do chromatogramu. Jednak zarówno elektroforegramy, jak i chromatogramy powinny być odczytywane przez doświadczonych osoby. Klasyczna metoda identyfikacji HbF, nazwana testem Kleihauera-Betkego, stosowana w wielu laboratoriach, opiera się na oporności hemoglobiny płodowej na denaturację w środowisku kwaśnym. Test ten daje zadowalające rezultaty, zwłaszcza w wykrywaniu hemoglobiny płodowej we krwi matki i jest uważany za dobry test przesiewowy [23]. Natomiast jego wykonanie jest czasochłonne, wymagające doświadczenia i nie spełnia warunków kontroli jakości badania z powodu braku standaryzacji i zależności od subiektywnej oceny badacza [24]. Przy podejrzeniu przecieku maczyno-płodowego test ten wykazuje korelację z nowymi metodami cytometrycznymi, jednak przy niższych wartościach FMH korelacja ta spada [19]. Dla ustalenia dokładnej niezbędnej dawki immunoglobuliny anti-D test Kleihauera-Betkego jest zbyt niedokładny i powinien być zastąpiony bardziej wiarygodną i powtarzalną metodą cytometryczną [23, 24]. HPLC również nie jest najlepszą metodą oceny FMH, ponieważ, analizując zawartość wolnej HbF w hemolizacie, nie determinuje jej komórkowego pochodzenia [17]. Metoda cytometryczna wyróżnia się możliwością oceny poziomu HbF, jak i komórek F, czyli rozkładu hemoglobiny płodowej w erytrocytach, co ma znaczenie także w monitorowaniu pacjentów z mielodysplazją oraz przyjmujących leki, takie jak hydroksymocznik, indukujące syntezę HbF. Metoda wykorzystuje specyficzne znakowane fluorochromami przeciwciała skierowane przeciwko hemoglobinie płodowej. Producenci testów stosują także różne strategie oznaczania komórek i hemoglobiny płodowej, łącząc przeciwciała anti-HbF z innymi dodatkowymi przeciwciałami. Jako marker erytrocytów pochodzących od dorosłych może służyć anhydraza węglanowa, której synteza rozpoczyna się dopiero po porodzie, zatem wydaje się być cennym wskaźnikiem rozróżniającym komórki płodowe od komórek matki, nawet jeśli zawierają one duże ilości HbF [17]. Jednakże Prus i Fibach [25] w swoich badaniach stwierdzili występowanie u pacjentów z  $\beta$ -talasemią wszystkich rodzajów komórek, także typowych dla płodu, czyli CA ujemnych i HbF silnie dodatnich (CA-HbF++), co sugeruje, że metoda ta nie jest odpowiednia dla oceny FMH u ciężarnych kobiet chorych na talasemię. Dla wykrycia przecieku maczyno-płodowego u kobiet Rh ujemnych stosuje się dodatkowo przeciwciała anti-D, co również pozwala określić, które komórki są pochodzenia płodowego, w przypadku zaistnienia konfliktu serologicznego w zakresie układu Rh [26].

Najlepsze rezultaty otrzymuje się, wykonując badanie jak najszybciej po pobraniu krwi. Producent testu Trillium FMH QuickQuant™ zaleca, żeby oznaczenie wykonać do 4 godzin od pobrania materiału lub po tym czasie zamrozić próbkę i przechowywać do 72 godzin [16]. Według niektórych źródeł, najlepiej oznaczać HbF w natywnych próbkach nie starszych niż tydzień, a hemolizaty do wykonania elektroforezy, mogą być przechowywane do trzech miesięcy w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  [20]. Jak podaje Kumpel i wsp. [23], przetrzymywanie

próbek po wyznakowaniu przeciwciałami, może sprzyjać aglutynacji krwinek czerwonych, zwłaszcza jeśli zawierają one dużo hemoglobiny płodowej. Cytometria przepływowa oraz elektroforeza kapilarna są ogólnie akceptowanymi metodami oznaczania zawartości procentowej hemoglobiny płodowej we krwi. Obie metody są proste i szybkie oraz rozdzielają frakcje HbF oraz HbA. Dodatkowo test Trillium FMH QuickQuant™ pozwala na łatwą identyfikację komórek F z pośrednią zawartością hemoglobiny płodowej, a także jest czulszy niż metoda elektroforetyczna. Z doświadczeń własnych autorów wynika, że metoda cytometryczna wykazuje wyższą czułość i wydaje się być odpowiedniejsza w przypadku diagnostyki noworodków.

---

### 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 ujednoliczonymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

---

### PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

- [1] Von Körber E. Über Differenzen des Blutfarbstoffes, Inaugural dissertation. Dorpat, 1866. Cited by Bischoff H., *Ztschr. f. d. ges. ExperMed* 1926;48:472-489.
- [2] Singer K, Chernoff AI, Singer L. Studies on abnormal hemoglobins. I. their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 1951;6:413-428.
- [3] Chernoff AI. Immunologic studies of hemoglobins. I. Production of antihemoglobin sera and their immunologic characteristic. *Blood* 1953;8:399-412.
- [4] World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization. Biological Standardization Forty Fourth Report. WHO Technical Report Series -848. Geneva: World Health Organization; 1994.
- [5] Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verveij M, De Korte M, Baylan U, Hartevelde C, et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *International Journal of Laboratory Hematology* 2009;31:484-495.
- [6] Savithrisowmya S, Singh M, Kriplani A, Agarwal N, Mehra NK, Bhatla N. Assessment of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry and Kleihauer-Betke test in Rh-negative pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2008;65:84-88.

- [7] Scholz Ch, Kachler A, Hermann Ch, et al. Flowcytometric assessment of fetomaternal hemorrhage during external cephalic version at term. *J Perinat Med* 2009;37:334-337.
- [8] Wilson JB, Lam H, Pravatmuang P, Huisman THJ. Separation of tryptic peptides of normal and abnormal  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  hemoglobin chains by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1979;179(2):271-290.
- [9] Chambers E, Davies L, Evans S. Comparison of hemoglobin F detection by the acid elution test, flow Cytometry and high-performance liquid chromatography in maternal blood samples analysed for fetomaternal haemorrhage. *Transfusion Medicine* 2012;22:199-204.
- [10] Kumpel B, Hazell M, Guest A. Accurate quantitation of D+ fetomaternal hemorrhage by flow cytometry using novel reagent to eliminate granulocytes from analysis. *Transfusion* 2014;54(5):1305-1316.
- [11] Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Phanasgaonkar S, Nadkarni AH, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr* 2007;74(7):657-662.
- [12] Solnica B. Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (HbA1C)-jak, kiedy i po co? *In Vitro Explorer Przegląd Medycyny Laboratoryjnej* 2013;1(14).
- [13] Munkongdee T, Pichanun D, Butthep P. Quantitative analysis of Hb Bart's in cord blood by capillary electrophoresis system. *Ann Hematol* 2011;90:741-746.
- [14] Koval D, Kasicka V, Cottet H. Analysis of glycosylated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Analytical Biochemistry* 2011;413(1):8-15.
- [15] Jenkins MA, Ratnaike S. Capillary isoelectric focusing of haemoglobin variants in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 1999;289(1-2):121-132.
- [16] Pastoret C, Le Priol J, Fest T, Roussel M. Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84(1):37-43.
- [17] Stachurska A, Fabijańska-Mitek J. Zastosowanie cytometrii przepływowej w immunohematologicznej ocenie krwinek czerwonych. *Borgis – Postępy Nauk Medycznych* 2012;7:583-588.
- [18] Trillium Diagnostics, LLC, FMH QuickQuant Rapid Assay for Fetomaternal Hemorrhage Quantification, Product Information, FMH.QQF v10-2012 EN A4.
- [19] Sapa A, Janus A. Walidacja analityczna wybranych metod stosowanych w ocenie przecieku maczyno-łożniowego. *Journal of Laboratory Diagnostics* 2011;47:69-75.
- [20] Mosca A, Paleari R, Leone D. The relevance of hemoglobin F measurement in the diagnosis of thalassemias and related hemoglobinopathies. *Clinical Biochemistry* 2009;42:1791-1801.
- [21] Amato A, Cappabianca MP, Perri M. Interpreting elevated fetal hemoglobin in pathology and health at the basic laboratory level: new and known  $\gamma$ -gene mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Int J Lab Hematol* 2014;36(1):9-13.
- [22] Mallick D, Karmakar R, Barui G. The Prognostic Significance of HbF In Childhood Haematological Malignancies. *Indian J Hemtol Blood Transfus* 2015;31(1):116-120.
- [23] Kumpel BM, MacDonald AP, Bishop DR. Quantitation of fetomaternal haemorrhage and F cells in unusual maternal blood samples by flow cytometry using anti-D and anti-HbF. *Transfusion Medicine* 2013;23:175-186.
- [24] Pastoret C, Le Priol J, Fest T. Evaluation of FMH QuickQuant for the Detection and Quantification of Fetomaternal Hemorrhage. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 2013;84B:37-43.
- [25] Prus E, Fibach E. Heterogeneity of F cells in  $\beta$ -thalassemia. *Transfusion* 2013;53:499-503.
- [26] Fabijańska-Mitek J. Przeciek łożniowo-maczniny: skutki kliniczne i metody oceny. *Acta Haematologica Polonica* 2011;42(3):445-451.