

P R A C E O R Y G I N A L N E

położnictwo

Standaryzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowowej z użyciem przeciwciał anti-D

Standardization of the quantitative flow cytometric test with anti-D antibodies for fetomaternal hemorrhage in RhD negative women

Justyna Spsychalska¹, Małgorzata Uhrynowska¹, Hanna Pyl¹, Edyta Klimczak-Jajor¹, Izabella Kopec², Małgorzata Peciakowska³, Renata Gutowska³, Maciej Gawlak⁴, Sylwia Słomska⁵, Sylwia Dąbkowska⁵, Roman Szczecina⁶, Marzena Dębska⁷, Ewa Brojer¹

¹ Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, Polska

² Poradnia Hematologiczna dla Kobiet w Ciąży, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa, Polska

³ Pracownia Diagnostyki Laboratoryjnej, Szpital Specjalistyczny im. Św. Rodziny, Warszawa, Polska

⁴ Oddział Położnictwa, Szpital Specjalistyczny im. Św. Rodziny, Warszawa, Polska

⁵ I Klinika Położnictwa i Ginekologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny im. prof. W. Orłowskiego, Warszawa, Polska

⁶ II Klinika Położnictwa i Ginekologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Szpital Kliniczny im. Ks. Anny Mazowieckiej, Warszawa, Polska

⁷ II Klinika Położnictwa i Ginekologii Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Szpital Bielański im. ks. Jerzego Popiełuszki, Warszawa, Polska

Streszczenie

Wstęp: Ocena liczby erytrocytów płodu, które dostały się do krwioobiegu matki w wyniku przecieku płodowo-matczynego (fetomaternal hemorrhage, FMH) jest niezbędna do ustalenia właściwej dawki immunoglobuliny anti-D w celu profilaktyki choroby hemolitycznej płodu / noworodka w kolejnej ciąży. Jedną z metod oceny FMH jest oparta na cytometrii przepływowowej z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych do antygenów RhD (test anti-D). Celem pracy było opracowanie tej metody oraz ocena jej czułości i powtarzalności w porównaniu z metodą opartą na wykrywaniu hemoglobiny płodowej (HbF).

Materiał i metody: Badania techniką cytometrii przepływowowej wykonano u 20 kobiet ciężarnych i 80 kobiet po porodzie. Stosowano następujące przeciwciała monoklonalne: BRAD 3 FITC (do antygeny RhD), CD45 PerCP (do antygeny CD45 leukocytów) oraz przeciwciała HbF PE.

Wyniki: Wykazano, że intensywność fluorescencji komórek znakowanych przeciwciałem BRAD 3 FITC zależy od stopnia ekspresji antygeny RhD, lecz test wykrywa też słabą odmianę tego antygeny. Zastosowanie przeciwciał CD45 PerCP pozwoliło na wyeliminowanie z analizy leukocytów, które nieswoiście wiążą anti-D i zwiększyło czułość testu anti-D. Obecność przeciwciał odpornościowych anti-D w osoczu matki nie wpływa na ilościową ocenę krwinek płodu RhD dodatnich za pomocą BRAD 3 FITC. W przypadkach FMH test anti-D daje porównywalne wyniki do testu z zastosowaniem przeciwciał anti-HbF.

Corresponding author:

Justyna Spsychalska
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej,
ul. Indyry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, Polska
tel. 22 34 96 673, fax 22 34 96 611,
e-mail: jspsychalska@ihit.waw.pl

Otrzymano: 26.02.2015
Zaakceptowano do druku: 25.03.2015

Justyna Spychalska et al. *Standaryzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*

Wnioski: Przedstawiony test cytometryczny z jednoczesnym zastosowaniem przeciwciał anti-D oraz anti-CD45 jest przydatny do oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych. Jego czułość wynosi 0,05%.

Słowa kluczowe: **przeciek płodowo-matczyny / choroba hemolityczna płodu / noworodka / immunoglobulina anti-RhD / profilaktyka konfliktu Rh / hemoglobina płodowa / cytometria przepływowa /**

Abstract

Background: In order to determine the appropriate dose of anti-D immunoglobulin to be administered as a preventive measure against hemolytic disease of the fetus/newborn in the subsequent pregnancy, it is necessary to assess the number of fetal red blood cells that infiltrate/penetrate into the maternal circulation as a result of fetomaternal hemorrhage (FMH). One of the quantitative methods of FMH analysis is based on flow cytometry (FACS) which makes use of monoclonal antibodies to RhD antigen (anti-D test). The aim of the study was to further develop the method, evaluate its sensitivity and reproducibility, and to compare it with the test based on the detection of fetal hemoglobin (HbF).

Material and methods: The FACS study involved 20 RhD negative pregnant women and 80 RhD negative women after delivery. The following monoclonal antibodies were used: BRAD 3 FITC (anti-RhD antigen), CD45 PerCP (anti leukocyte antigen CD45), and anti-HbF PE.

Results: The fluorescence intensity of cells incubated with BRAD 3 FITC was demonstrated to depend on the RhD antigen expression, though the anti-D test also detects the weak D variant. The CD45 PerCP antibodies increased the sensitivity of anti-D test since they eliminated the leukocytes which non-specifically bind anti-D from the analysis. The presence of anti-D antibodies in maternal plasma does not affect the quantitative assessment of the fetal RhD positive fetal cells with BRAD 3 FITC. In case of FMH, the results of the anti-D test were similar to those with anti-HbF antibodies.

Conclusions: The flow cytometric test with anti-D and anti-CD45 is useful in the assessment of the fetomaternal hemorrhage in RhD negative women. The sensitivity of the test is estimated at 0.05%.

Key words: **fetomaternal hemorrhage / hemolytic disease of the fetus/newborn / immunoglobulin anti-D / Rh immunoprophylaxis / fetal hemoglobin / flow cytometry /**

Wstęp

Profilaktyka konfliktu serologicznego w zakresie antygeny RhD opiera się na podawaniu kobietom preparatów immunoglobulin anti-RhD (RhIg) w ciągu 72 godzin od porodu lub zdarzenia, które może doprowadzić do przecieku płodowo-matczynego (*fetomaternal hemorrhage*, FMH). Około 8% kobiet RhD ujemnych, które nie miały profilaktyki konfliktu RhD podczas ciąży i urodziły pierwsze dziecko RhD dodatnie (zgodnie serologicznie pod względem ABO) wytwarza alloprzeciwciała anti-D. W przypadku niezgodności w układzie ABO ryzyko immunizacji kobiety jest niższe (1,5-2 %). Do alloimmunizacji antygenem D może dojść również wtedy gdy płód ma na swoich krwinkach antygen D o słabej ekspresji [1, 2]. Produkowane przez kobietę przeciwciała anti-D mogą doprowadzić do ciężkiej niedokrwistości hemolitycznej płodu lub noworodka, a w skrajnych przypadkach do obrzęku płodowego i zgonu [3-6].

W Polsce od 1972 roku profilaktyką objęte są kobiety RhD ujemne po urodzeniu dziecka RhD dodatniego. Obecnie zaleca się podanie RhIg domięśniowo kobietom w dawce 150 µg w przypadku porodu fizjologicznego lub 300 µg jeżeli poród był patologiczny lub mnogi [7]. W wielu krajach, w tym w Wielkiej Brytanii i USA, kobietom po porodzie oprócz podania standardowej dawki RhIg wykonuje się rutynowo testy w kierunku FMH i na ich podstawie podejmuje się decyzję o ewentualnym podaniu uzupełniającej dawki RhIg [4, 8].

Wielkość przecieku płodowo-matczynego u 93% kobiet w trzecim trymestrze ciąży nie przekracza 0,5 ml, a w czasie porodu u 98% kobiet do ich krwioobiegu dostaje się nie więcej niż 2 ml krwi płodu [9-11]. Dawka 150 µg RhIg jest w tych przypadkach wystarczająca do usunięcia z krwioobiegu matki krwinek płodu. Około 0,3% kobiet w ciąży wymaga podania większej niż standardowa dawki RhIg do pełnej immunoprofilaktyki [9, 12]. W celu ustalenia niezbędnej porcji RhIg konieczne jest określenie ilości erytrocytów płodu, które przeniknęły do krwioobiegu matki. Niedoszacowanie przecieku krwinek RhD dodatnich i zbyt mała dawka immunoglobulin może prowadzić do poważnych konsekwencji dla kolejnych ciąż RhD dodatnich. Przeszacowanie FMH i podanie zbyt dużej dawki RhIg niepotrzebnie zwiększa koszty leczenia [1, 13]. Dodatkowo, należy brać pod uwagę, że immunoglobulina jest produkowana z osocza i nie można całkowicie wykluczyć przeniesienia przez nią czynników zakaźnych.

Istnieje kilka metod wykrywania komórek płodu we krwi obwodowej matki. Najstarsza – test Kleihauera-Betke – oparta na ocenie mikroskopowej rozmazów krwi poddanych kwaśnej elucji i barwieniu eozyną ma liczne ograniczenia, takie jak: subiektywna ocena, niska czułość, mała powtarzalność, a także trudności w interpretacji w związku z podwyższoną zawartością hemoglobiny F (HbF) w krwinkach matki [9, 13]. Jest ona obecnie zalecana jako badanie przesiewowe, a nie ilościowe [8, 14,

Justyna Spychalska et al. *Standardyzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*

15]. Wielokrotnie wykazano, że testy biochemiczne służące do oznaczenia stężenia HbF nie nadają się do oceny FMH, ponieważ nie można za ich pomocą rozróżnić erytrocytów matki zawierających HbF (HbF+) od rzeczywistych krwinek płodu zawierających głównie HbF (HbF++) [13, 14].

Popularne w wielu krajach testy serologiczne - rozetowy oraz aglutynacyjny techniką kolumnową - należą również do badań przesiewowych w kierunku FMH, ponieważ mają niską czułość (wykrywają $\geq 0,2\%$ krwinek płodu, czyli ok. 10ml pełnej krwi płodu w krwioobiegu matki) [10, 16, 17]. Przyczyną fałszywie dodatnich wyników powyższych testów może być obecność autoprzeciwciał w osoczu matki [9, 14].

Rozwój cytometrii przepływowej pozwolił na wprowadzenie czułych (wykrywających $\leq 0,04\%$ krwinek, czyli ok. 2 ml krwi płodu) i powtarzalnych testów do oceny ilościowej krwinek płodu w krążeniu matki. Do ilościowej oceny FMH zaleca się stosowanie przeciwciał monoklonalnych skierowanych do HbF w erytrocytach. Badania opierają się na różnicach w ekspresji HbF pomiędzy krwinkami matki i płodu [18]. Wykazano, że w niektórych przypadkach wysoki odsetek krwinek matki z HbF oraz zwiększona synteza HbA w krwinkach donoszonego zdrowego płodu mogą utrudnić interpretację wyniku tego testu [14, 19]. Modyfikacją testu anti-HbF jest jednoczesne użycie przeciwciał skierowanych do anhidrazy węglanowej (*carbonic anhydrase*, CA), która w erytrocytach płodu występuje w niewielkich ilościach lub wcale, a jest obecna w krwinkach matki. Podwójne znakowanie pozwala na odróżnienie krwinek HbF+ (CA+) matki od rzeczywistych krwinek płodu z niższą ekspresją HbF (CA-) [9, 14, 20].

Alternatywny test cytometryczny opiera się na różnicach w fenotypie w zakresie antygeny RhD. Ekspresja RhD na krwinkach wykrywalna jest od 6 tygodnia życia płodowego. Test z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych do antygeny RhD (test anti-D) jest badaniem tańszym ze względu na mniejszą ilość stosowanych odczynników i skrócenie czasu pracy. W niektórych krajach (Wielka Brytania, Australia) wynik testu anti-D jest podstawą do ustalenia dawki preparatu RhIg [21-23]. Przydatność testu anti-D w rozpoznawaniu FMH ogranicza się do przypadków, w których dziecko odziedziczyło antygen RhD po ojcu, a matka jest RhD ujemna.

Cel pracy

Celem pracy była ocena czułości i powtarzalności cytometrycznego testu anti-D z zastosowaniem komercyjnych przeciwciał monoklonalnych BRAD 3 FITC. Wprowadzono modyfikację metody w celu wyeliminowania niespecyficznego wiązania przeciwciał BRAD 3 do leukocytów. Oceniono wpływ obecności przeciwciał odpornościowych anti-D na wiązanie BRAD3.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na próbkach krwi pobranych na antykoagulant (EDTA) od 100 kobiet RhD ujemnych. Pierwszą grupę stanowiło 20 kobiet ciężarnych będących w 22-36 tygodniu ciąży z niezgodnością w zakresie RhD (n=8) lub z konfliktem RhD (n=12). Druga grupa zawierała 76 kobiet, które urodziły dziecko RhD dodatnie. U tych kobiet krew pobrano do 24 godzin od porodu. Trzecią grupę stanowiły 4 matki, które urodziły dziecko RhD dodatnie z objawami głębokiej niedokrwistości i podejrzeniem przetoczenia płodowo-matczynego.

Materiał kontrolny stanowiły próbki krwi pochodzące od dawców RhD ujemnych, Rh dodatnich i o słabej ekspresji antygeny D oraz noworodków RhD dodatnich i o słabej ekspresji antygeny D (D^{slabe}). W testach wykorzystywano również komercyjne zestawy krwi kontrolnej FETALtrol (Trillium Diagnostics, USA) – kontrola negatywna i dwie pozytywne (0% oraz ok. 0,15% i ok. 1,5% erytrocytów płodu) [14].

Test anti-D

Do znakowania komórek RhD dodatnich (próbka badana) stosowano przeciwciała monoklonalne anti-RhD FITC, klon BRAD 3 (IBGRL Research Products, UK) [19]. Krwinki płodu (erytrocyty D+) oceniano na podstawie intensywności fluorescencji (wyrażanej jako mediana, Md) odpowiadającej krwinkom RhD dodatnim z kontroli pozytywnej. W celu eliminacji leukocytów próbkę badaną znakowano jednocześnie anti-D oraz przeciwciałami CD45 PerCP jako markera leukocytów (Becton-Dickinson, USA).

Test anti-HbF

Do oceny krwinek zawierających HbF stosowano przeciwciała monoklonalne anti-HbF PE (Invitrogen, USA) i zastosowano procedurę producenta. Krwinki płodu (erytrocyty HbF++) oceniano na podstawie intensywności fluorescencji odpowiadającej krwinkom płodu z kontroli pozytywnej [24].

Ocena w cytometrze przepływowym

Próbki wyznakowane przeciwciałami analizowano w cytometrze FACSCalibur (Becton-Dickinson, USA). W teście anti-D każdorazowo analizowano 250 000–500 000 erytrocytów, a w teście anti-HbF 100 000 erytrocytów przy pomocy programu CellQuest Pro. Wyniki wyrażano jako odsetek erytrocytów płodu. Wielkość FMH szacowano wg wzoru: [% erytrocytów płodu x 50] i wyrażano w mililitrach (ml) pełnej krwi płodu.

Wyniki

Wykrywanie FMH w przypadku krwinek płodu ze słabą ekspresją antygeny D

Na rycinie 1 przedstawiono wyniki analizy wiązania przeciwciał anti-D BRAD3 FITC do erytrocytów dawców: RhD ujemnego, ze słabą ekspresją antygeny D oraz RhD dodatnich. Erytrocyty o fenotypie D słabe (Md 14,86) były odróżnialne od krwinek RhD ujemnych (Md 1,65). Na sztucznym modelu sporządzonym z zawiesiny erytrocytów noworodka z D^{slabe} w erytrocytach RhD ujemnych pochodzących od dwóch osób wykazano, że krwinki ze słabą ekspresją są wykrywane przeciwciałami BRAD3. (Ryc. 2). Odsetek krwinek płodu oznaczony testem anti-D w obu próbkach był porównywalny z wynikami testu anti-HbF (dane nie pokazane).

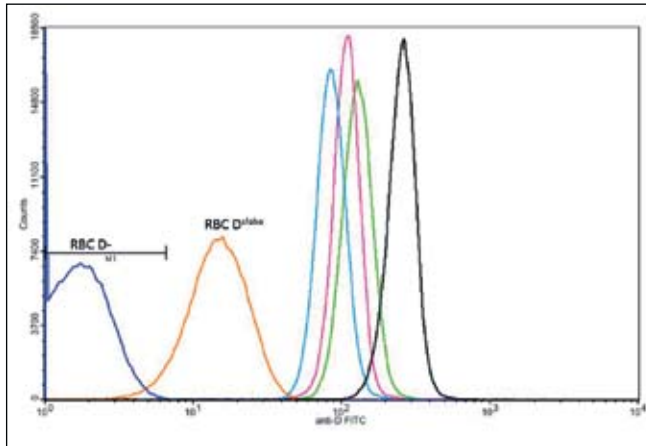
Powtarzalność wyników testu anti-HbF i anti-D

W tabeli I przedstawiono wyniki powtarzalności testów cytometrycznych i wykazano, że test anti-HbF charakteryzuje się większą powtarzalnością (niższe SD) niż test anti-D, zwłaszcza w przypadku większego odsetka krwinek płodu (próbka 3).

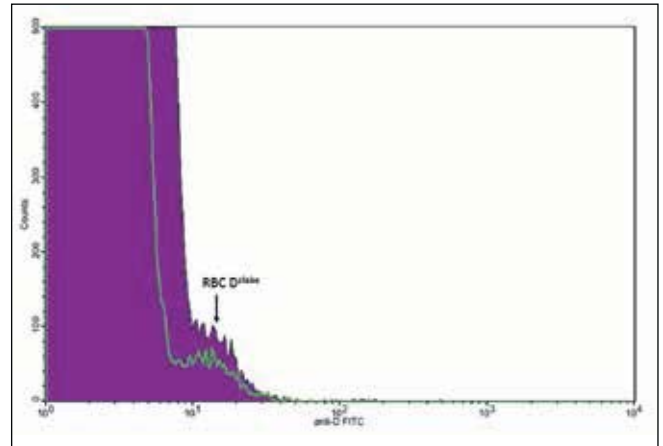
Niespecyficzne wiązanie przeciwciał anti-D

W próbkach krwi pobranych od kobiet w 1 dobie od porodu (grupa 2) zaobserwowano znaczny wpływ zanieczyszczeń innymi komórkami na ocenę erytrocytów w cytometrze - wykazano

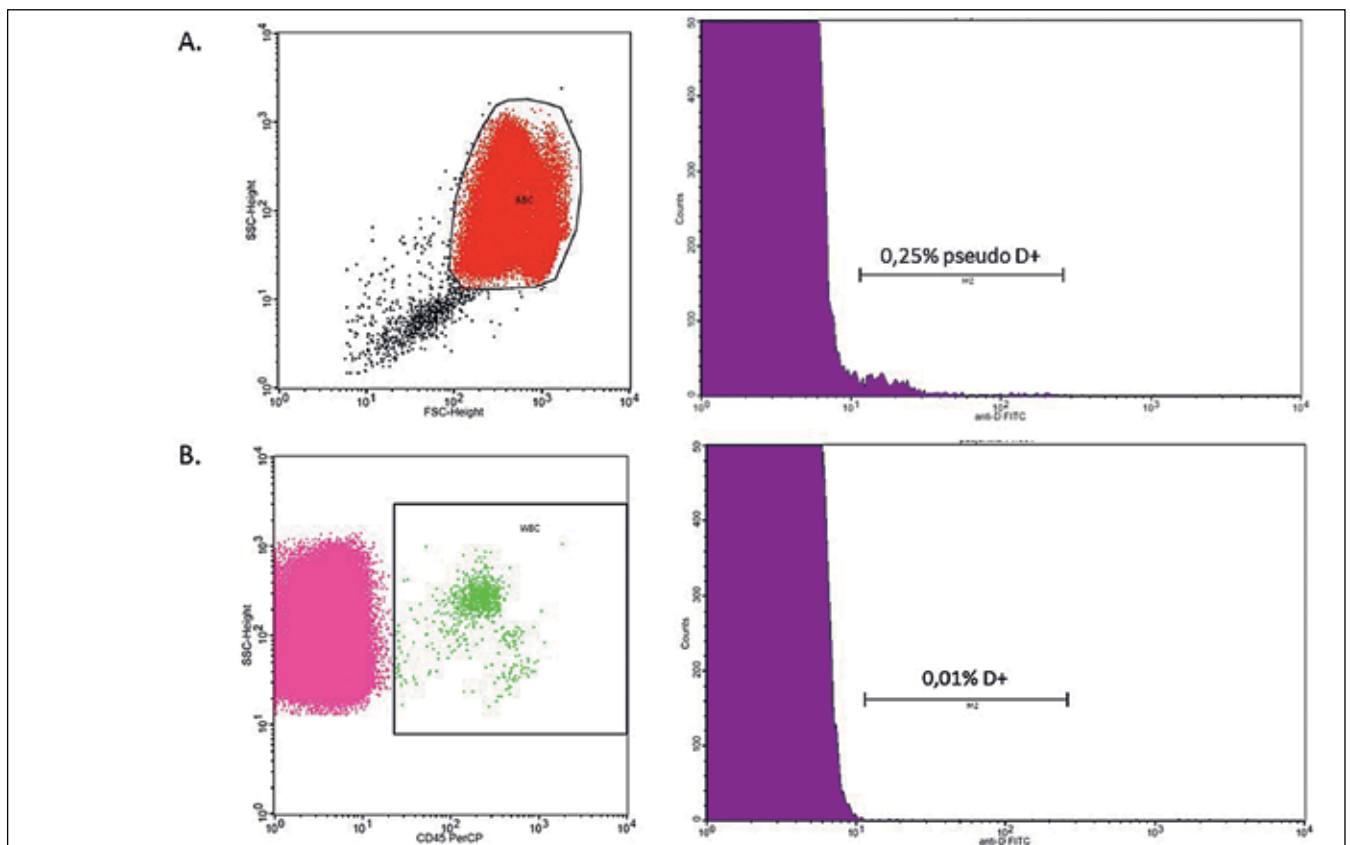
Justyna Spychalska et al. *Standaryzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*



Rycina 1. Wiązanie przeciwciał anti-D BRAD3 FITC do erytrocytów dawców (RBC RhD ujemne —, RBC RhD słabe — oraz RBC RhD dodatnie o różnym fenotypie).



Rycina 2. Identyfikacja krwinek noworodka ze słabym antygenem D we krwi RhD ujemnej (próbka A ■, próbka B ■) za pomocą przeciwciał anti-D BRAD3 FITC.



Rycina 3. Podwójne znakowanie krwinek przeciwciałami anti-D oraz CD45 PerCP w próbce krwi pobranej od matki 6 godzin po porodzie. A) W regionie ustalonym dla analizy erytrocytów (RBC) znajdują się komórki wiążące anti-D (pseudo D+). B) Usunięcie z regionu dla erytrocytów komórek pseudo D+ poprzez wyznaczenie leukocytów (WBC) przeciwciałami CD45PerCP podwyższa czułość testu anti-D.

średnio 0,13% leukocytów (0,04-0,42%) lokujących się w regionie wyznaczonym dla erytrocytów. Część z tych komórek wiązała także przeciwciała anti-D (komórki pseudo D+). (Ryc. 3A). Usunięcie z regionu dla erytrocytów komórek pseudo D+ (tzn. leukocytów CD45+) znacznie zmniejszyło niespecyficzne tło. (Ryc. 3B).

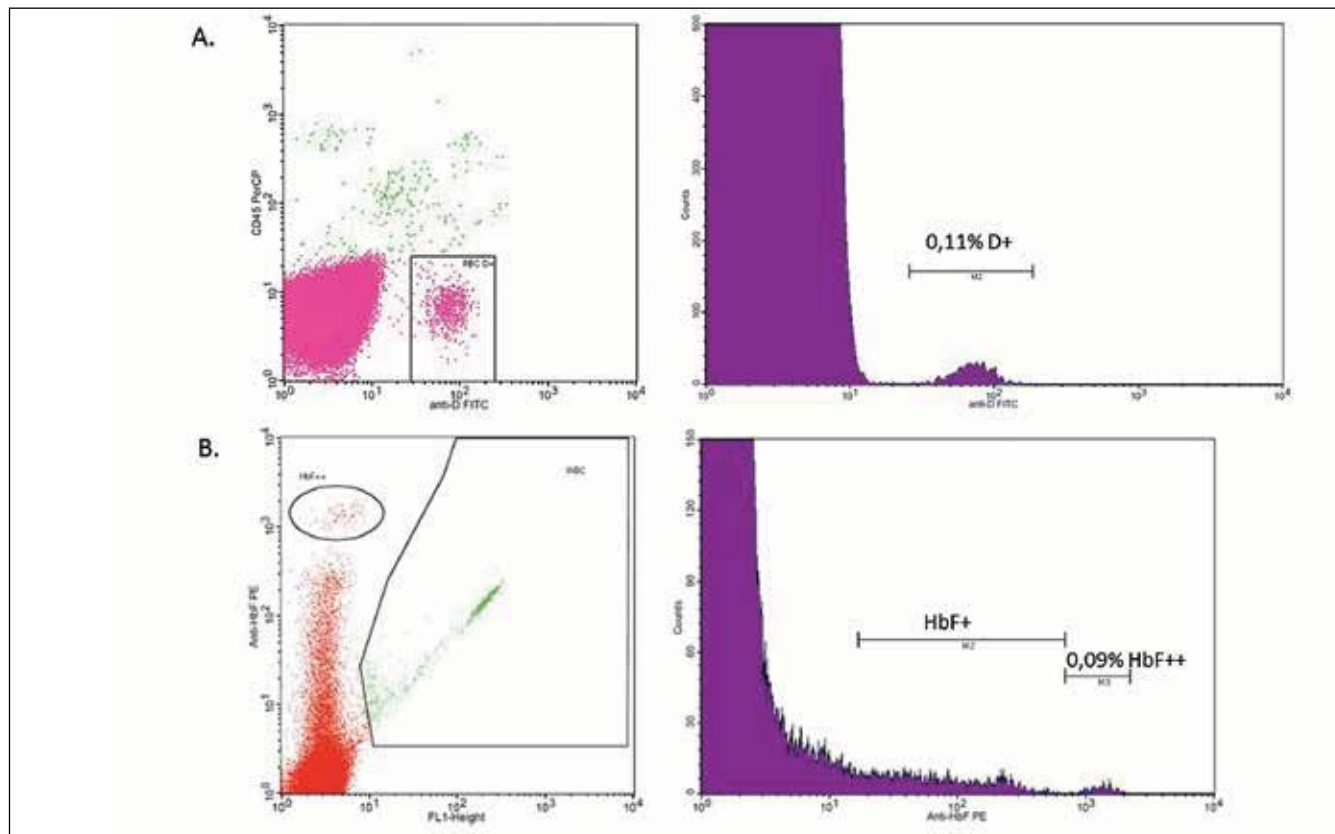
Ocena czułości testu anti-D

W tabeli II przedstawiono wyniki oceny czułości testu anti-D/CD45. W naszym laboratorium osiągnął czułość $\geq 0,05\%$.

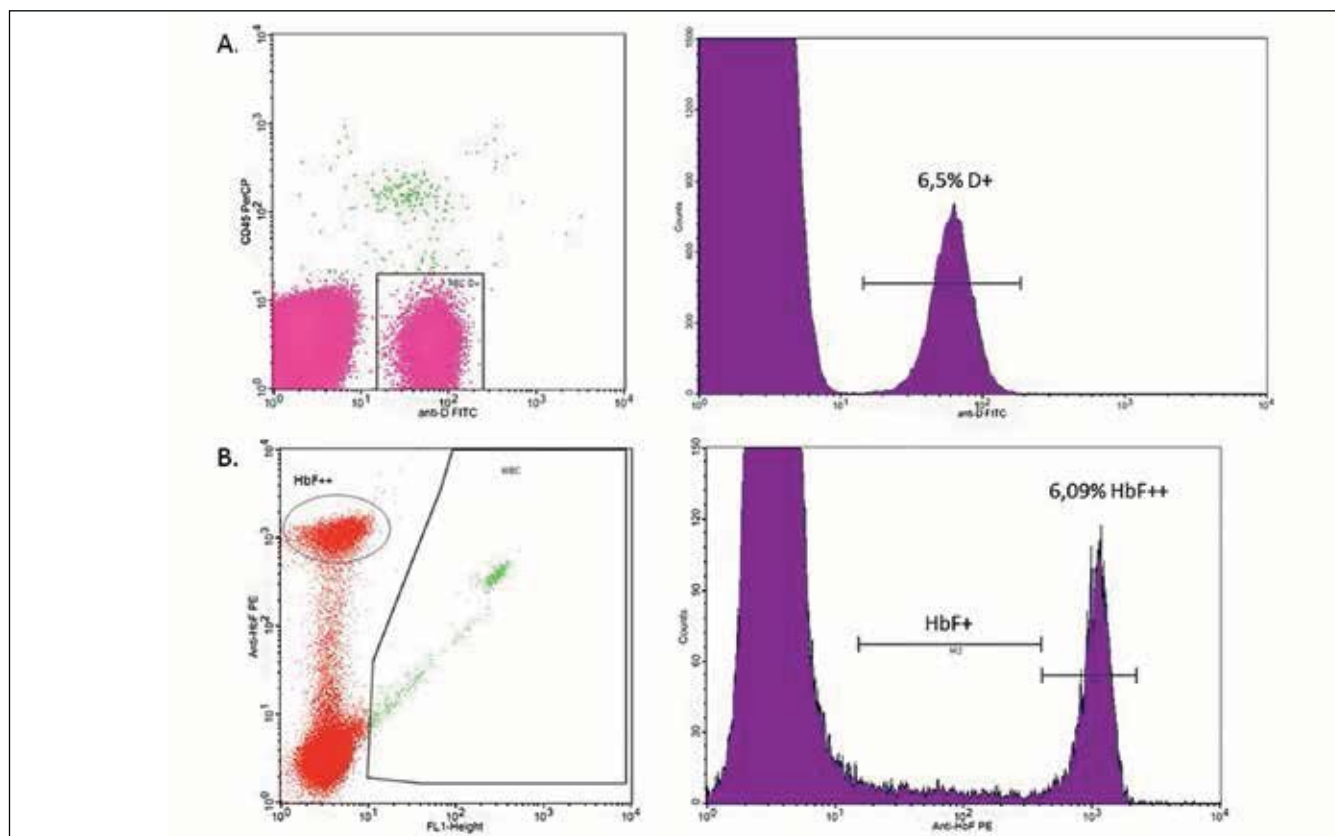
Wpływ obecności przeciwciał odpornościowych na wiązanie BRAD3

Wykazano, że na wiązanie anti-D BRAD 3 miała wpływ obecność przeciwciał odpornościowych ciężarnej. (Tabela III i IV). Im bardziej stężone osocze, tym niższa Md wyznakowanych krwinek płodu, to znaczy mniejsza dostępność miejsc wiążących przeciwciała komercyjne anti-D na pojedynczym erytrocycie. Zmniejszone wiązanie anti-D BRAD 3 nie wpłynęło na ilościową ocenę odsetka komórek D+ (średnia $1,54 \pm 0,067$ dla $n = 7$). Na intensywność fluorescencji erytrocytów nie miało

Justyna Spychalska et al. *Standaryzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*



Rycina 4. Niewielki przeciek płodowo-matczyny (FMH) – obecność krwinek płodu w krążeniu matki (próbka pobrana 24 godziny po porodzie) wykryta: A) testem anti-D/CD45, B) testem anti-HbF.



Rycina 5. Masywny FMH wykryty u matki dziecka urodzonego z ciężką niedokrwistością. Próbkę krwi pobrana 2 godziny po porodzie analizowana: A) testem anti-D/CD45, B) testem anti-HbF.

Justyna Spychalska et al. *Standaryzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*

Tabela I. Ocena powtarzalności testu anti-HbF i anti-D przy pomocy komercyjnego zestawu FETALtrol. Każda próbka 1-3 była znakowana pięciokrotnie w odstępach kilkudniowych.

próbka	% krwinek płodu (n=5)			
	HbF++		D+	
	średnia	SD	Średnia	SD
1	0,00	0,00	0,02	0,02
2	0,14	0,01	0,15	0,02
3	1,84	0,07	1,02	0,28

Tabela II. Analiza czułości testu anti-D/CD45 uzyskana na podstawie oceny przygotowanych in vitro różnych stężeń krwinek noworodka ORhD dodatniego w krwi dawcy ORhD ujemnego.

% krwinek płodu w badanej zawieszynie	
przygotowane rozcieńczenie	wynik testu anti-D/CD45
0,012	0,00
0,025	0,01
0,05	0,05
0,10	0,10

wpływu odplukiwanie krwinek od osocza przed inkubacją z komercyjnymi przeciwciałami (plukanie nie usunęło przeciwciał odpornościowych z powierzchni erytrocytów).

Intensywność fluorescencji erytrocytów D+ w próbkach po inkubacji z osoczem zawierającym alloprzeciwciała anti-D i anti-C była porównywalna pomiędzy próbkami (Md 51,42 ± 1,81), ale ponad połowę niższa niż w próbkach kontrolnych – bez alloprzeciwciał odpornościowych (Md 105,56 ± 2,19). Odsetek krwinek płodowych w wyżej przedstawionych eksperymentach nie różnił się znacząco pomiędzy testami anti-D i anti-HbF (dane nie pokazane).

Ocena ilościowa przecieku płodowo-matczynego

Grupa 1: u jednej z 20 ciężarnych wykryto krwinki płodu (0,12% erytrocytów D+). Wynik badania nie potwierdził się w teście anti-HbF – erytrocytów HbF++ nie wykryto. U pozostałych ciężarnych nie wykryto krwinek płodu.

Grupa 2: na 76 kobiet po porodzie u jednej (próbka nr 26 w tabeli V) wykryto 0,11% erytrocytów RhD dodatnich. Wynik badania był zbliżony do wyniku testu anti-HbF (0,09%). (Ryc. 4A,B). W pozostałych przypadkach po odjęciu tła (komórek CD45+) zidentyfikowano średnio 0,02% krwinek D+ (0,00-0,07%). U tych kobiet nie wykryto krwinek płodu testem anti-HbF.

Grupa 3: Przebadano próbki krwi od czterech kobiet, które urodziły dziecko z niedokrwistością. U pierwszej pacjentki za pomocą obu testów nie wykryto erytrocytów płodu w próbce krwi pobranej 8 godzin po porodzie (próbka nr 75). W trzech przypadkach obecne były krwinki płodu we krwi obwodowej matek. U drugiej kobiety z powodu uogólnionego obrzęku płodu wykonano cesarskie cięcie. Matka podczas ciąży otrzymała

Tabela III. Ocena wiązania przeciwciał BRAD 3 FITC do erytrocytów RhD dodatnich w obecności alloprzeciwciał anti-D. Zawiesinę ok. 1,5 % krwinek RhD dodatnich noworodka w erytrocytach RhD ujemnych dawcy inkubowano przez 30 minut w temperaturze 37°C z różnymi stężeniami (rozcieńczeniami) osocza ciężarnej o wysokim mianie alloprzeciwciał anti-D i anti-C w pośrednim teście antyglobulinowym. Krwinki dwukrotnie odplukano buforem CellWASH i przeprowadzono test anti-D. Jedną próbkę (nr 1), po inkubacji z 100% osocza, znakowano bez odplukiwania krwinek.

próbka	% osocza anti-D (rozcieńczenie)	Md	% wiązania anti-D	% krwinek D+
1	100 / bez odplukiwania	46,98	60,4	1,58
2	100	45,32	58,3	1,55
3	50 (2x)	52,33	67,3	1,51
4	25 (4x)	60,43	77,7	1,60
5	12,5 (8x)	60,43	77,7	1,41
6	6,25 (16x)	74,99	96,5	1,60
7	0,0	77,74	100	1,57

Tabela IV. Wpływ matczynych przeciwciał odpornościowych anti-D na ocenę niewielkich FMH (≤ 0,5 %) testem anti-D. Różne stężenia erytrocytów noworodka RhD dodatniego we krwi RhD ujemnej inkubowano ze 100% osoczem (1:1) ciężarnej z alloprzeciwciałami (jak wyżej), następnie znakowano (bez odplukiwania osocza) przeciwciałami w kierunku FMH. Kontrolą dla testu anti-D były krwinki bez inkubacji z osoczem.

próbka	Obliczony	% krwinek płodu			
		bez osocza anti-D		z osoczem anti-D	
		D+	Md	D+	Md
1	0,50	0,52	103,66	0,54	52,33
2	0,25	0,27	107,46	0,28	52,33
3	0,125	0,14	103,66	0,16	52,33
4	0,062	0,07	107,46	0,11	48,70

RhIg. We krwi obwodowej tej kobiety, pobranej po 1 godzinie od porodu (próbka nr 73), obecne były tylko nieliczne krwinki płodu. Wyniki obu testów były zgodne: 0,03% erytrocytów D+ i 0,03% krwinek HbF++.

U trzeciej matki, która urodziła cesarskim cięciem dziecko z głęboką niedokrwistością, został wykryty masywny FMH we krwi pobranej 2 godziny od porodu (próbka nr 71/1). W teście anti-D wykryto 6,5% erytrocytów D+ (co odpowiada ok. 325 ml pełnej krwi płodu). W teście anti-HbF zidentyfikowano 6,09% erytrocytów HbF++ (szacunkowa wartość FMH 304,5 ml). (Ryc. 5A,B). U tej pacjentki po 48 godzinach od podania domięśniowego uzupełniającej dawki preparatu RhIg (13 ampulek po 300 µg) pobrano próbkę krwi obwodowej i wykonano badania ponowne w kierunku FMH (próbka nr 71/2). Testem anti-D nie zidentyfikowano krwinek RhD dodatnich (wynik 0,02% - poniżej czułości testu). Natomiast testem anti-HbF wykryto 0,06% krwinek HbF++ (szacunkowo 3 ml pełnej krwi płodu).

U czwartej pacjentki, po cesarskim cięciu, badanie w kierunku FMH wykonano z powodu głębokiej niedokrwistości dziecka ujawnionej w drugiej dobie życia. Oba testy wykazały masywny FMH (próbka nr 76/1).

Justyna Spychalska et al. *Standaryzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*

W teście anti-D wykryto 6,0% erytrocytów płodu (ok. 300 ml pełnej krwi), a testy anti-HbF podobnie - 6,1% krwinek płodu (szacunkowo 305 ml pełnej krwi). Pacjentce podano domięśniowo RhIg (2 ampułki po 300 µg) oraz dodatkową dawkę RhIg (4 ampułki po 300 µg). Powtórzono badanie na próbce krwi pobranej w 7 dobie od porodu (próbka nr 76/2). Oba testy były dodatnie – wykryto 2,66% krwinek D+ oraz 2,65 % krwinek HbF++ w krążeniu matki. Pacjentce podano domięśniowo kolejne dawki RhIg (4 ampułki po 300 µg). W próbce krwi pobranej w 10 dobie od porodu (nr 76/3) zarówno test anti-HbF jak i anti-D nie wykazały krwinek płodu we krwi obwodowej matki.

Porównanie dodatnich wyników obu testów w kierunku FMH dla pacjentek z grup 2 i 3 przedstawia tabela V.

Dyskusja

W obecnej pracy zaprezentowano wyniki standaryzacji testu cytometrycznego z użyciem przeciwciał anti-D do oceny ilościowej FMH, czyli odsetka krwinek płodu w krwi matki i porównano jej wyniki z testem z użyciem przeciwciał anti-HbF. Ilościowa ocena przecieku jest w niektórych krajach rekomendowana do obliczenia dawki RhIg, podawanej kobiecie RhD ujemnej po urodzeniu dziecka RhD dodatniego [19]. Jest to szczególnie istotne w przypadkach masywnych przecieków, gdy podawana dawka musi być wyższa od standardowej. Dwa takie przypadki są opisane w obecnej pracy.

W procesie standaryzacji wzięto pod uwagę różne czynniki, które mogą wpływać na ocenę ilościową FMH. Sprawdzono metodę pod kątem wykrywania erytrocytów o słabej ekspresji RhD, wpływu leukocytów nieswoiście wiążących przeciwciała anti-D oraz obecności przeciwciał odpornościowych anti-D na wyniki badania.

Liczba cząsteczek antygeny RhD w przeliczeniu na krwinkę zależna jest od genotypu i fenotypu erytrocytów [25, 26]. Na ocenę ekspresji antygenów w cytometrze ma również wpływ klon zastosowanych przeciwciał [1]. Wybór przeciwciał do oceny krwinek D+ jest więc bardzo istotny, zwłaszcza dla zapewnienia wykrywania wariantów o słabej ekspresji związanych z polimorfizmem genu *RHD* [9, 14, 27]. Antygen D^{slabe} ma możliwość wywołania reakcji immunologicznej u matki RhD ujemnej, choć prawdopodobieństwo wystąpienia takiego przypadku jest minimalne [1, 2].

Wykorzystywane przez nas przeciwciała BRAD 3 FITC pozwalają na identyfikację różnych wariantów RhD, w tym antygen D^{slabe} (≥ 1000 cząsteczek/ erytrocyt) za wyjątkiem rzadko spotykanych typów: D^{IV} i R₀^{har}. Nie ma takiego ograniczenia w teście anti-HbF. W teście anti-D udało się nam zidentyfikować i poprawnie oszacować ilość krwinek D^{slabe} noworodka w mieszaninach z erytrocytami RhD ujemnymi.

W populacji erytrocytów ocenianych cytometrią przepływową mogą występować nieznaczne zanieczyszczenia leukocytami (komórki CD45+) [28]. W teście anti-HbF utrwalanie glutaraldehydem komórek krwi jest koniecznym etapem umożliwiającym permeabilizację błon i wnikiwanie przeciwciał do wnętrza erytrocytów. Zabieg ten wzbudza autofluorescencję leukocytów, co pozwala na ich eliminację z analizy [29]. W teście anti-D krwinki nie są utrwalane, a przeciwciała wiążą się bezpośrednio do antygenów znajdujących się na powierzchni komórek. Wykazano, że natywne leukocyty (głównie granulocyty) mogą również wiązać niespecyficznie przeciwciała klasy IgG, w tym anti-D, co pod-

Tabela V. Porównanie wyników testu anti-D i testu anti-HbF u czterech kobiet u których doszło do przecieku płodowo-matczynego.

Grupa badana	Nr próbki	% krwinek płodu	
		D+	HbF++
2	26	0,11	0,09
3	73	0,03	0,03
	71/1	6,50	6,09
	71/2	0,02	0,06
	76/1	6,00	6,10
	76/2	2,66	2,65
	76/3	0,02	0,00

wyższa tło [19, 30]. Im wyższa leukocytoza we krwi pacjentki po porodzie, tym wyższe jest tło (komórki pseudo D+), co wydatnie utrudnia identyfikację niewielkich FMH (<0,1 % erytrocytów płodu).

Kalkulacja FMH po odjęciu tła na podstawie kontroli negatywnej (równoległe znakowanie przeciwciałami izotypowymi IgG3 FITC w dodatkowej próbce) nie pozwala na odróżnienie niewielkich ilości krwinek płodu D+ od leukocytów [19, 28]. W naszych badaniach tło wywołane niespecyficznym wiązaniem przeciwciał anti-D do leukocytów wynosiło średnio 0,13 %. Zastosowanie przeciwciał anti-D jednocześnie z CD45 PerCP jako markera leukocytów pozwoliło na prawie całkowite wyeliminowanie komórek pseudo D+ i osiągnięcie wyższej czułości testu (0,05%).

W badaniach FMH przy użyciu anti-D nie ma etapów utrwalania, permeabilizacji i kilkukrotnego odplukiwania komórek, co wydatnie skraca czas badania. Samo znakowanie przeciwciałami jest jednak dwukrotnie dłuższe oraz musi być przeprowadzone w wyższej temperaturze (wymaga posiadania ciepłarki) w porównaniu do testu anti-HbF [19].

Problemy z detekcją krwinek płodu testem anti-D mogą wyłonić się u kobiet z przeciwciałami odpornościowymi anti-D lub u kobiet, którym podano preparaty RhIg [9]. Wykazaliśmy, że występujące we krwi matki alloprzeciwciała anti-D mogą pogorszyć wiązanie komercyjnych przeciwciał BRAD 3 FITC do erytrocytów płodu. Intensywność fluorescencji wyznakowanych krwinek RhD dodatnich zmniejszała się wraz ze zwiększonym stężeniem osocza. Jednakże obecność alloprzeciwciał nie miała wpływu na ilościową ocenę krwinek płodu w teście anti-D.

Podobnie preparaty RhIg podawane profilaktycznie ciężarnym przez blokowanie miejsc antygenowych na krwinkach płodu ograniczają wiązanie do komórek przeciwciał użytych w teście, co wykazano *in vitro* [31]. W tym przypadku można uzyskać fałszywie ujemny wynik badania w kierunku FMH, jednak według autorów pracy nie popełnia się błędów nie podając kolejnych dawek RhIg – profilaktyka jest wystarczająca, ponieważ wszystkie krwinki płodu zostały opłaszczane immunoglobulinami anti-D.

W przypadku ocenianego przez nas jednego z dwóch masywnych FMH zaobserwowano różnicę w wynikach pomiędzy obu testami cytometrycznymi. W rutynowym badaniu anti-HbF wykryto 6,09% krwinek HbF++, co wskazywało na szacunkowy przeciek 304,5 ml pełnej krwi płodu. Natomiast test anti-D wskazywał na 6,5% erytrocytów D+ odpowiadający przeciekowi

Justyna Spychalska et al. *Standardyzacja metody ilościowej oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych przy pomocy cytometrii przepływowej z użyciem przeciwciał anti-D.*

325 ml pełnej krwi płodu. Badania Kennedy i innych wykazały, że wyniki testu anti-HbF mogą być zaniżone w porównaniu z wynikami testu anti-D jeśli w próbkach krwi występuje powyżej 1% krwinek płodu (FMH > 50ml) [32]. Autorzy sugerują, że przyczyną rozbieżnych wyników może być zmniejszona ekspresja HbF w krwinkach płodu będącego w okresie przed porodem, podczas gdy liczba antygenów RhD na erytrocytach pozostaje stała.

W interpretacji wyniku testu anti-HbF mogą przeszkadzać liczne komórki matki HbF+ [19, 33]. U 25% ciężarnych podnosi się poziom HbF oraz wzrasta odsetek erytrocytów zawierających HbF. Według Kumpel i wsp. wysoki odsetek krwinek HbF+ matki nie ma związku z przebytą ciążą, a raczej jest uwarunkowany genetycznie [14]. Potwierdza to przypadek opisany przez Gieleżyńską i in. [33].

Wydaje się zasadne stosowanie do ilościowej oceny FMH (i tym samym kalkulacji odpowiedniej dawki RhIg) łatwiejszego w interpretacji testu anti-D/CD45 zamiast anti-HbF, zwłaszcza u kobiet w zaawansowanej ciąży i w przypadkach głębokiej niedokrwistości noworodka RhD dodatniego. Podobne sugestie mają inni autorzy [14, 19, 34].

Wnioski

Przedstawiony test cytometryczny z jednoczesnym zastosowaniem przeciwciał anti-D oraz anti-CD45 jest przydatny do oceny przecieku płodowo-matczynego u kobiet RhD ujemnych. Jego czułość wynosi 0,05%.

Oświadczenie autorów

1. Justyna Spychalska – autor koncepcji i założeń pracy, opracowanie metod, wykonanie badań cytometrycznych i opracowanie ich wyników, zbiorcza analiza i interpretacja wyników, przechowywanie dokumentacji, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Małgorzata Uhrynowska – autor koncepcji i założeń pracy, współautor protokołu, akceptacja manuskryptu.
3. Hanna Pyl – wykonanie badań cytometrycznych.
4. Edyta Klimczak-Jajor – wykonanie badań cytometrycznych i opracowanie ich wyników.
5. Izabella Kopeć – zebranie materiału, opracowanie i interpretacja danych klinicznych, analiza i interpretacja wyników, akceptacja manuskryptu.
6. Małgorzata Peciakowska – zebranie materiału, wykonanie badań laboratoryjnych.
7. Renata Gutowska – zebranie materiału, wykonanie badań laboratoryjnych.
8. Maciej Gawlak – zebranie materiału, opracowanie i interpretacja danych klinicznych.
9. Sylwia Słomska – zebranie materiału, opracowanie danych klinicznych.
10. Sylwia Dąbkowska – zebranie materiału, opracowanie danych klinicznych.
11. Roman Szczecina – zebranie materiału, opracowanie i interpretacja danych klinicznych.
12. Marzena Dębska – zebranie materiału, opracowanie i interpretacja danych klinicznych, akceptacja manuskryptu.
13. Ewa Brojer – autor koncepcji i założeń pracy, współautor protokołu, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.

Źródło finansowania:

Praca wykonana w ramach planu naukowego Instytutu Hematologii i Transfuzjologii – temat nr: 4.19/2014.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Lloyd-Evans P, Guest AR, Voak D, [et al.]. Detection of weak D and D-VI red cells in D-negative mixtures by flow cytometry: implications for feto-maternal haemorrhage quantification and D typing policies for newborns. *Brit J Haematol.* 1999, 104 (3), 621-625.
2. Orzinska A, Guz K, Polin H, [et al.]. RHD variants in Polish blood donors routinely typed as D. *Transfusion* 2013, 53 (11), 2945-2953.
3. Bowman J. Thirty-five years of Rh prophylaxis. *Transfusion.* 2003, 43 (12), 1661-1666.
4. Qureshi H, Massey E, Kirwan D, [et al.]. BCSH guideline for the use of anti-D immunoglobulin for the prevention of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Transf Med.* 2014, 24 (1), 8-20.
5. Urbaniak SJ, Greiss MA. RhD haemolytic disease of the fetus and the newborn. *Blood Rev.* 2000, 14 (1), 44-61.
6. Scholz C, Hermann C, Kachler A, [et al.]. Association of placental inflammation with fetomaternal hemorrhage and loss of placental mucin-1. *Arch Gynecol Obstet.* 2012, 285 (3), 605-612.
7. Seyfriedowa H. Immunoprofilaktyka konfliktu RhD. W: *Immunologia krwinek czerwonych. Niedokrwistości immunohemolityczne.* Red. Fabijarska-Mitek J. Warszawa: OINPHARMA, 2008, 106-118.
8. Sandler SG, Delaney M, Gottschall JL, [et al.]. Proficiency tests reveal the need to improve laboratory assays for fetomaternal hemorrhage for Rh immunoprophylaxis. *Transfusion.* 2013, 53 (9), 2098-2102.
9. Kim YA, Makar RS. Detection of fetomaternal hemorrhage. *Am J Hematol.* 2012, 87 (4), 417-423.
10. Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal Hemorrhage. *Obstet Gynecol.* 2010, 115 (5), 1039-1051.
11. Uriel M, Subira D, Plaza J, [et al.]. Identification of feto-maternal haemorrhage around labour using flow cytometry immunophenotyping. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010, 151 (1), 20-25.
12. Ramsey G. Inaccurate Doses of Rh Immune Globulin After Rh-Incompatible Fetomaternal Hemorrhage Survey of Laboratory Practice. *Arch Pathol Lab Med.* 2009, 133 (3), 465-469.
13. Chambers E, Davies L, Evans S, [et al.]. Comparison of haemoglobin F detection by the acid elution test, flow cytometry and high-performance liquid chromatography in maternal blood samples analysed for fetomaternal haemorrhage. *Transf Med.* 2012, 22 (3), 199-204.
14. Kumpel BM, MacDonald AP, Bishop DR, [et al.]. Quantitation of fetomaternal haemorrhage and F cells in unusual maternal blood samples by flow cytometry using anti-D and anti-HbF. *Transf Med.* 2013, 23 (3), 175-186.
15. Chen JC, Davis BH, Wood B, [et al.]. Multicenter clinical experience with flow cytometric method for fetomaternal hemorrhage detection. *Cytometry.* 2002, 50 (6), 285-290.
16. Gieleżyńska A, Fabijarska-Mitek J. Feto-maternal haemorrhage - detection and quantification. *Pol Merkurusz Lek.* 2011, 30 (177), 219-223.
17. Gomez-Arbonas X, Pinacho A, Ortiz P, [et al.]. Quantification of foetomaternal haemorrhage. An analysis of two cytometric techniques and a semiquantitative gel agglutination test. *Clin Lab Haematol.* 2002, 24 (1), 47-53.
18. Yamada T, Morikawa M, Yamada T, [et al.]. Changes in hemoglobin F levels in pregnant women unaffected by clinical fetomaternal hemorrhage. *Clin Chim Acta.* 2013, 415, 124-127.
19. Kumpel B, Hazell M, Guest A, [et al.]. Accurate quantitation of D+ fetomaternal hemorrhage by flow cytometry using a novel reagent to eliminate granulocytes from analysis. *Transfusion.* 2014, 54 (5), 1305-1316.
20. Porra V, Bernaud J, Gueret P, [et al.]. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit. *Transfusion.* 2007, 47 (7), 1281-1289.
21. Kelsey P, Reilly JT, Chapman JF, [et al.]. The estimation of fetomaternal haemorrhage. *Transfus Med.* 1999, 9 (1), 87-92.
22. Australian and New Zeland Society of Blood Transfusion. Guidelines for laboratory assessment of fetomaternal hemorrhage. http://www.anzsb.org.au/publications/documents/ANZSBTguide_Nov02a.pdf (access: 2015.01.21).
23. British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the estimation of fetomaternal haemorrhage. http://www.bcsbhguidelines.com/documents/BCSBH_FMH_bcsbh_sept2009.pdf (access: 2015.01.21).
24. Subira D, Uriel M, Serrano C, [et al.]. Significance of the Volume of Fetomaternal Hemorrhage After Performing Prenatal Invasive Tests. *Cytometry Part B.* 2011, 80B (1), 38-42.
25. Kulkarni S, Mohanty D, Gupte S, [et al.]. Flow cytometric quantification of antigen D sites on red blood cells of partial D and weak D variants in India. *Transfus Med.* 2006, 16 (4), 285-289.
26. McGann PT, Despotovic JM, Howard TA, [et al.]. A novel laboratory technique demonstrating the influences of RHD zygosity and the RhCcEe phenotype on erythrocyte D antigen expression. *Am J Hematol.* 2012, 87 (3), 266-271.
27. Grey DE, Davies JL, Connolly M, [et al.]. The role of RhD agglutination for the detection of weak D red cells by anti-D flow cytometry. *Clin Lab Haematol.* 2005, 27 (2), 127-133.
28. Kumpel BM. Analysis of factors affecting quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Transfusion.* 2000, 40 (11), 1376-1383.
29. Radel DJ, Penz CS, Dietz AB, [et al.]. A combined flow cytometry-based method for fetomaternal hemorrhage and maternal D. *Transfusion.* 2008, 48 (9), 1886-1891.
30. Kumpel BM. Quantification of anti-D and fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Transfusion.* 2000, 40 (1), 6-9.
31. Kumpel BM. Labeling D+ RBCs for flow cytometric quantification of fetomaternal hemorrhage after the RBCs have been coated with anti-D. *Transfusion.* 2001, 41 (8), 1059-1063.
32. Kennedy GA, Shaw R, Just S, [et al.]. Quantification of feto-maternal haemorrhage (FMH) by flow cytometry: anti-fetal haemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with anti-D. *Transfus Med.* 2003, 13 (1), 25-33.
33. Gieleżyńska A, Stachurska A, Fabijarska-Mitek J, [et al.]. Feto-maternal haemorrhage assessment in a woman with a large population of red blood cells containing fetal haemoglobin. *Ginekol Pol.* 2014, 85 (8), 614-618.
34. Tazzari PL, Ricci F, Manfredi S, [et al.]. Experience in the evaluation of foeto-maternal haemorrhage by flow cytometry. *Blood Transfus.* 2013, 11 (3), 462-463.