

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA ČAS

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA ČAS

**UVEDBA IN VREDNOTENJE NOVE METODE ZA DOLOČANJE PRISOTNOSTI
PLODOVIH ERITROCITOV V MATERINI KRVI**

**IMPLEMENTATION AND EVALUATION OF A NEW METHOD FOR
DETERMINATION OF THE PRESENCE OF FETAL RED BLOOD CELLS IN
MATERNAL BLOOD**

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljala na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Elvire Maličev, univ. dipl. biol. Vzorci venske in popkovnične krvi so bili odvzeti v slovenskih porodnišnicah.

Zahvala:

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorju izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., in somentorici doc. dr. Elviri Maličev, univ. dipl. biol., za vso strokovno pomoč in koristne nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Zahvaljujem se tudi prim. Ireni Brič dr. med., ki je s strokovnimi komentarji pripomogla k izboljšanju magistrske naloge. Rezultate testa Kleihauer-Betke so nam posredovali iz laboratorija Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Vsem, ki so sodelovali v teh procesih, se iskreno zahvaljujem, hkrati pa se zahvaljujem tudi vsem zaposlenim na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino za prijazno pomoč in praktične nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela magistrske naloge.

Na koncu se želim zahvaliti vsem mojim bližnjim, ki so me vedno podpirali, spodbujali in razumevajoče spremljali mojo študijsko pot.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. Matjaža Jerasa, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Elvire Maličev, univ. dipl. biol.

Ljubljana, 2014

Teja Čas

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Kazalo vsebine

Povzetek.....	VI
Abstract.....	VII
Seznam okrajšav	VIII
1. Uvod	1
1.1. Nosečnost.....	1
1.2. Fetomaternalna krvavitev.....	1
1.3. Eritrociti	2
1.3.1. Hemoglobin	2
1.3.2. Krvne skupine in aglutinogeni.....	3
1.3.3. Karboanhidraza.....	5
1.4. Mehanizem nastanka fetomaternalne krvavitve.....	6
1.5. Ocena obsega fetomaternalne krvavitve	7
1.6. Laboratorijske metode za določanje fetomaternalne krvavitve	9
1.6.1. Kvalitativni test.....	9
1.6.2. Test Kleihauer-Betke	10
1.6.3. Pretočna citometrija.....	11
1.6.4. Pretočna citometrija z uporabo protiteles anti-RhD	11
1.6.5. Pretočna citometrija z uporabo protiteles anti-HbF in anti-CA.....	12
2. Namen dela.....	14
3. Materiali in metode	15
3.1. Pretočna citometrija	15
3.2. Metoda s protitelesi anti-HbF/anti-CA	18
3.3. Metoda z uporabo protiteles anti-RhD.....	22
3.4. Priprava kontrolnih suspenzij	24

3.5. Statistične metode	25
4. Rezultati in razprava.....	28
4.1. Umeritvena krivulja	28
T-test.....	30
Bland-Altmanov test	32
Pearsonov koeficient korelacije, linearna in Demingova regresija	34
T-test.....	36
Bland-Altmanov test	36
Pearsonov koeficient korelacije, linearna in Demingova regresija	37
4.2. Klinični primeri.....	40
T-test.....	43
Bland-Altmanov test	46
Pearsonov koeficient korelacije, linearna in Demingova regresija	49
4.3. Primerjava rezultatov umeritvenih kontrolnih suspenzij in dejanskih vrednosti ..	51
4.4. Zunanje kontrole UK NEQAS	53
4.5. Primerjava med metodami	54
5. Sklep.....	57
6. Literatura	59

Kazalo slik

Slika 1: Placentarni horionski vilus.....	1
Slika 2: Izražanje globinskih verig hemoglobinov med plodovim razvojem	3
Slika 3: Transport ogljikovega dioksida s krvjo	5
Slika 4: Mehanizem senzibilizacije RhD ⁻ matere ob prvi nosečnosti in liza plodovih RhD ⁺ eritrocitov v nadaljnjih nosečnostih.....	7
Slika 5: Rozetni test.....	10
Slika 6: Test Kleihauer-Betke.....	11

Slika 7: Shema pretočnega citometra BD FACSCalibur	16
Slika 8: Citogrami nastavitvev pretočnega citometra za analizo fetomaternalne krvavitve s kompletom Fetal Cell Count®	18
Slika 9: Primer rezultatov analize vzorca, označenega s protitelesi anti-HbF R-PE in anti-CA FITC	21
Slika 10: Primer rezultatov analize vzorca označenega s protitelesi anti-RhD.....	23
Slika 11: Citograma pri pacientu z β -talasemijo.	42

Kazalo preglednic

Preglednica I: Krvne skupine AB0	4
Preglednica II: Meritve vzorcev kontrolnih suspenzij za primerjav umeritvenih krivulj....	29
Preglednica III: Rezultati parnega dvostranskega T-testa za primerjavo metode s protitelesi anti-HbF/anti-CA s tisto s protitelesi anti-RhD.....	31
Preglednica IV: Bland-Altmanov test – povprečna vrednost odstopanja (bias) med primerjanimi razlikami meritev ter 95 % interval ujemanja za metodi s protitelesi anti-RhD in s protitelesi anti-HbF/anti-CA pri meritvah kontrolnih suspenzij.	32
Preglednica V: Rezultati parnega dvostranskega T-testa za primerjavo metode z anti-HbF/anti-CA in tisto s protitelesi anti-RhD, ob upoštevanju le zadnjih petih serij umeritvenih kontrolnih suspenzij.....	36
Preglednica VI: Bland-Altmanov test - povprečna vrednost odstopanja (bias) med primerjanimi razlikami meritev ter zgornja in spodnja meja 95 % intervala ujemanja med metodama anti-RhD in anti-HbF/anti-CA pri meritvah petih kontrolnih suspenzij.	37
Preglednica VII: Vrednosti volumnov fetomaternalne krvavitve določene v vzorcih kliničnih primerov z metodami KBT, anti-RhD in anti-HbF/anti-CA	40
Preglednica VIII: Rezultati parnega dvostranskega T-testa za primerjavo analizne metode KBT z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, KBT z metodo s protitelesi anti-RhD in metod s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD.	44
Preglednica IX: Bland-Altmanov test - povprečne vrednosti odstopanja (bias) med primerjanimi razlikami meritev ter spodnja in zgornja meja 95 % intervala ujemanja za analizni metode KBT in s protitelesi anti-HbF/anti-CA, KBT in metodo s protitelesi anti-RhD ter metodama s protitelesoma anti-HbF/anti-CA in anti-RhD pri meritvah kliničnih vzorcev pacientk.....	47

Preglednica X: Vrednosti Pearsonovih koeficientov korelacije, enačba premic določenih z linearno regresijo, vrednosti koeficientov determinacije R^2 ter enačbe premic izračunane z Demingovo regresijo, za primerjane pare analiznih metod KBT in anti-HbF/anti-CA, KBT in anti-RhD ter anti-HbF/anti-CA in anti-RhD, ki smo jih uporabili za meritve kliničnih vzorcev pacientk.	49
Preglednica XI: Rezultati parnega dvostranskega T-testa primerjave rezultatov z analiznima metodama s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD z dejanskimi vrednostmi deležev plodovih eritrocitov v umeritvenih kontrolnih suspenzijah.	51
Preglednica XII: Bland-Altmanov test - povprečne vrednosti odstopanj (biasov) med primerjanimi razlikami meritev ter spodnje in zgornje meje 95 % intervalov ujemanja za metodi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA, glede na znane vrednostmi umeritvenih kontrolnih suspenzij.	52

Kazalo grafov

Graf 1: Oblika porazdelitve meritev kontrolnih umeritvenih suspenzij z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA.	30
Graf 2: Oblika porazdelitve meritev kontrolnih umeritvenih suspenzij z metodo s protitelesi anti-RhD.	31
Graf 3: Grafični prikaz analize rezultatov meritev kontrolnih suspenzij plodovih eritrocitov s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA.	32
Graf 4: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev vseh sedmih kontrolnih suspenzij z metodama s protitelesi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA.	33
Graf 5: Grafični prikaz rezultatov linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premic in vrednostjo R^2	35
Graf 6: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kontrolnih suspenzij plodovih eritrocitov s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA, ob upoštevanju zadnjih petih serij.	36
Graf 7: Bland-Altmanov test s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati meritev z metodama s protitelesi anti-RhD in protitelesi anti-HbF/anti-CA petih serij kontrolnih suspenzij.	37

Graf 8: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vrednostjo R^2 pri analizi rezultatov zadnjih petih serij kontrolnih suspenzij RhD ⁺ plodovih eritrocitov.....	38
Graf 9: Oblika porazdelitve meritev kliničnih primerov pacientk z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA.	43
Graf 10: Oblika porazdelitve meritev kliničnih primerov pacientk z metodo s protitelesi anti-RhD.....	44
Graf 11: Oblika porazdelitve meritev kliničnih primerov pacientk z metodo KBT.....	44
Graf 12: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-HbF/anti-CA in KBT.	45
Graf 13: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-RhD in KBT.....	46
Graf 14: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD.	46
Graf 15: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in s protitelesi anti-HbF/anti-CA. ..	47
Graf 16: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in s protitelesi anti-RhD.....	48
Graf 17: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama s protitelesi anti-RhD in protitelesi anti-HbF/anti-CA.	48
Graf 18: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vsebnostjo R^2 za analizo rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in anti-HbF/anti-CA.....	50
Graf 19: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vsebnostjo R^2 za analizo rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in anti-RhD.	50
Graf 20: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vsebnostjo R^2 za analizo rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama anti-RhD in anti-HbF/anti-CA.	51

Povzetek

Fetomaternalna krvavitev je prisotnost plodovih eritrocitov v materinem krvnem obtoku. Do vstopa plodove v materino kri lahko pride pred porodom ali med njim, in sicer zaradi različnih dejavnikov. Gre za patološko stanje z različnimi možnimi kliničnimi variacijami, ki zahteva hitro in pravilno ukrepanje. Največkrat se za določanje fetomaternalne krvavitve uporabljajo test Kleihauer-Betke in analizne metode s pretočno citometrijo z različnimi detekcijskimi protitelesi oziroma njihovimi kombinacijami. Tovrstne preiskave izvajamo pri vseh RhD negativnih otročnicah, ki nosijo oziroma so rodile RhD pozitivnega otroka, ter pri vseh tistih, pri katerih obstaja sum na fetomaternalno krvavitev.

V sklopu magistrske naloge smo za potrebe Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino smo kritično in celovito ovrednotili ter pripravili postopke za uvedbo nove metode, ki temelji na pretočni citometriji in uporabi kombinacije protiteles proti hemoglobinu F, ki se nahaja v plodovih eritrocitih in protiteles proti karboanhidrazi, ki je izražena v odraslih rdečih krvnih celicah. Vpeljano metodo smo nato kritično in celovito ovrednotili. Njene rezultate smo primerjali s tistimi, dobljenimi z že obstoječima analiznima postopkoma, to je s klasičnim testom Kleihauer–Betke in z metodo s pretočno citometrijo, ki kot detekcijski reagent uporablja protitelesa anti-RhD. Primerjali in statistično ovrednotili smo rezultate meritev sedmih serij umeritvenih kontrolnih suspenzij eritrocitov in 18 kliničnih vzorcev pacientk. Pretočna citometrija ponuja možnost avtomatizirane analize velikega števila celic in s tem pridobitev natančnejših informacij o opazovani celični vrsti. Statistično smo uspeli dokazati, da z novo analizno metodo dobimo rezultate, ki so povsem primerljivi s tistimi, ki jih izmerimo z rutinskima obstoječima metodama, torej s testom Kleihauer–Betke in s pretočno citometrijo z uporabo protiteles anti-RhD. Vsaka nova metoda po eni strani predstavlja številne izzive, s katerimi se mora laboratorij soočiti med njeno vpeljavo, hkrati pa ponuja nove možnosti za izboljšanje diagnostike. Zaključimo lahko, da nova metoda, ki temelji na pretočni citometriji z uporabo kombinacije protiteles proti fetalnemu hemoglobinu in karboanhidrazi, daje zanesljive rezultate glede prisotnosti in obsega fetomaternalne krvavitve, ki so primerljivi tistim, ki jih generiramo z že obstoječimi analiznimi postopki, poleg tega pa omogoča vrednotenje fetomaternalne krvavitve tudi pri tistih pacientkah, kjer za to stanje ni kriva neskladnost v antigenskem sistemu Rh.

Ključne besede: fetomaternalna krvavitev, protitelesa anti-HbF, karboanhidraza, faktor Rh D, pretočna citometrija

Abstract

Fetomaternal haemorrhage is the presence of fetal erythrocytes within the maternal circulation. It can occur before or during labour, due to several reasons. It is a pathological condition with a wide spectrum of clinical variation, which demands a quick and appropriate treatment. The most frequently used diagnostic tests for its determination are the Kleihauer-Betke test or the flow cytometry, using detection antibodies and their combinations. These tests are regularly performed on all RhD negative mothers that gave birth to RhD positive children and in cases where a suspicion of fetomaternal haemorrhage exists.

The aim of our thesis was the introduction of a new diagnostic method, responding to the needs of the Blood Transfusion Centre of Slovenia. It is a flow cytometry-based method using a combination of fluorescence labelled detection antibodies against haemoglobin F (HbF), which is present in fetal erythrocytes and those against carboanhydrase (CA), being expressed in adult red blood cells. After being introduced and optimized, its performance was thoroughly and critically evaluated. The results obtained were compared to those, generated by standard methods, i.e. the Kleihauer-Betke screening test and the flow cytometric method using anti-RhD antibodies as detection reagent. We have statistically compared and evaluated the results of seven series of calibrated control suspensions containing various defined amounts of fetal erythrocytes, as well as 18 blood samples of patients, that were measured by all three methods. Statistically we were able to prove that the new method provides results that are comparable to those, obtained by both, the Kleihauer-Betke test and the flow cytometry method, using anti-RhD detection antibodies. The flow cytometry offers automatic analysis of huge cell numbers and therefore generates quite accurate information regarding the monitored cell population. But one has to be aware that every new method presents numerous different challenges which a laboratory must deal with during its introduction. We can conclude that the newly introduced flow cytometry method, using a combination of detection antibodies against HbF and CA generates reliable results regarding the presence, as well as the extent of fetomaternal haemorrhage and is comparable to standard analytical procedures. It also provides a way of assessing this pathology in those patients where mismatched Rh antigens are not its causative factor.

Key words: Fetomaternal haemorrhage, anti-HbF antibodies, carboanhydrase, Rh D factor, flow cytometry

Seznam okrajšav

FMK – fetomaternalna krvavitev

Rh – sistem rhesus

RhD+ – sistem rhesus D pozitivni

RhD- – sistem rhesus D negativni

Hb – hemoglobin

HbF – fetalni hemoglobin

CA – karboanhidraza

HBPN – hemolitična bolezen ploda in novorojenčka

IgM – protitelesa imunoglobulinskega razreda M

IgG – protitelesa imunoglobulinskega razreda G

KBT – test Kleihauer-Betke

FSC – detektor, ki zaznava prednje sipanje

SSC – detektor, ki zaznava stransko sipanje

FL1 – fotodetektor 1

FL2 – fotodetektor 2

R-PE – R-fikoeritrin

FITC – fluorescein izotiocianat

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

BRAD-3-FITC – imunoglobulini razreda G3, označeni s fluorescein izotiocianatom

AVEZ 5.3-FITC – imunoglobulini razreda G1, označeni s fluorescein izotiocianatom

IBGRL – mednarodni referenčni laboratorij za krvne skupine

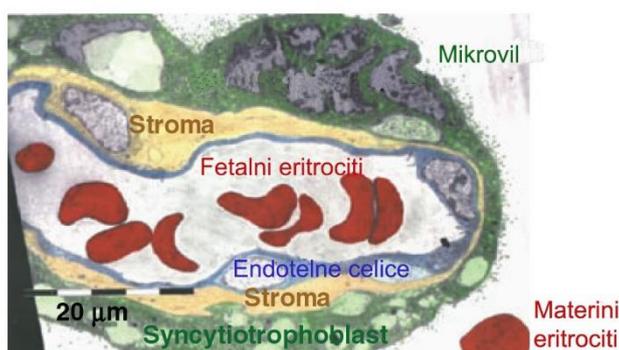
PBS/1% BSA – fosfatni pufer z govejim serumskim albuminom

UK-NEQAS – United Kingdom National External Quality Assessment Service

1. Uvod

1.1. Nosečnost

Nosečnost je posebno fiziološko stanje ženskega organizma, ki spodbuja obrambne mehanizme organizma bodoče mame; je skrbno uravnavana s hormoni in vpliva na celoten organizem nosečnice. Tako lahko pride do pojave jutranje slabosti, povečanja minutnega volumna srca, povečanja volumna krvi, povečane porabe kisika, povečanja prehrabnih potreb, povečanja telesne teže in številnih drugih sprememb (1). Evolucijsko se je nosečnost razvila v posebno imunosupresivno stanje, ki preprečuje zavrnitev ploda. Placenta, ki načeloma ščiti plod, pa ni popolnoma neprehodna, saj preko nje potekajo izmenjave hranil in odpadnih snovi, obenem pa tudi imunske interakcije med materjo in plodom (2).



Slika 1: Placentarni horionski vilus preko katerega poteka izmenjava snovi med nosečnico in plodom, ki onemogoča prehod plodovih eritrocitov v materin krvni obtok. Prirejeno po (3).

1.2. Fetomaternalna krvavitev

Fetomaternalna krvavitev je prisotnost plodovih eritrocitov v materinem krvnem obtoku (1). S populacijskimi študijami so dokazali, da gre za kar pogost fenomen. Nevarne pa so predvsem velike količine plodovih celic v materini krvi. Normalno ob koncu nosečnosti ali med porodom nekaj teh preide v krvni obtok matere (4). Kadar je volumen plodovih eritrocitov v krvi matere večji od 15 mL, kar je enako 30 mL polne krvi, govorimo o obsežni fetomaternalni krvavitvi, ki zahteva ustrezno in hitro ukrepanje. Obsežna fetomaternalna krvavitev je hud zaplet v nosečnosti in se zgodi pri treh 3 od 1000 porodov. Povzroči lahko hude anemije ploda in novorojenčka, ki se lahko končajo s smrtjo. Pri plodu z anemijo običajno opazijo sinusoidno krivuljo bitja srca. Plodovi eritrociti v krvnem obtoku matere lahko povzročijo tudi njeno imunizacijo in številne zaplete pri morebitnih kasnejših

transfuzijah krvi in naslednjih nosečnostih (5, 6). Meja, pri kateri naj bi prišlo do senzibilizacije, je različna glede na vrsto antigena, ki le-to povzroča (4).

1.3. Eritrociti

Pri fetomaternalni krvavitvi določamo delež plodovih eritrocitov v krvi matere. Da pa lahko plodove eritrocite ločimo od materinih, moramo poznati, kako se razlikujejo. Odrasel človek ima 5 do 6 litrov krvi (1, 7). Rdeče krvne celice ali eritrociti predstavljajo manj kot polovico volumna krvi. Skrbijo za prenos kisika vezanega na hemoglobin ter tudi ogljikovega dioksida. So visoko specializirane celice brez jedra, ki v krvnem obtoku preživijo približno 120 dni (7). Eritrociti imajo obliko bikonkavnih ploščic s premerom 7,5 μm . Njihova koncentracija v krvi je med 4,2 in 6,3 $\times 10^{12}/\text{L}$ (1). Na površinah eritrocitov so izražene molekule aglutinogenov, značilne za krvne skupine ABO, Rh ter druge (7).

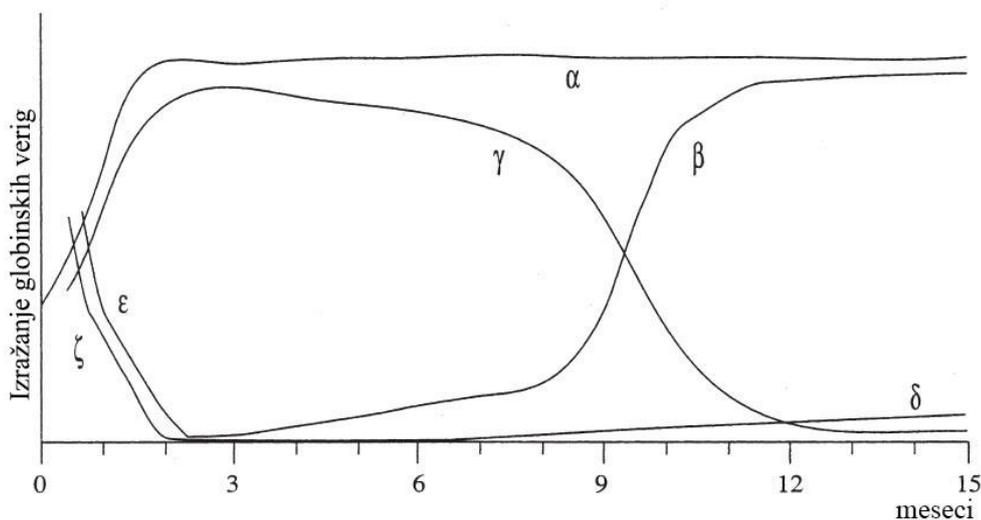
Hematopoeza se v plodu začne že v tretjem tednu nosečnosti, in sicer v rumenjakovi vrečki, nadaljuje se v jetrih in vranici, v petem tednu pa se ustali v kostnem mozgu. Sestava plodove krvi se nekoliko razlikuje od odrasle, saj vsebuje višje koncentracije hemoglobina in večji delež hematokrita. Vrednosti se spreminjata tekom plodovega razvoja (5).

1.3.1. Hemoglobin

Hemoglobin je glavni prenašalec kisika v krvi. Nahaja se znotraj rdečih krvnih celic in jim daje rdečo barvo, ki je značilna barva krvi (8). Je konjugiran protein, sestavljen iz štirih polipeptidnih globinskih verig in štirih skupin hema, ki imajo vezavna mesta za kisik (8, 5). Hemoglobin, ki je najpogostejši pri odraslih (97 %), imenujemo HbA. Zgrajen je iz dveh α in dveh verig β ($\alpha_2\beta_2$) (8). Poleg tega najdemo pri odraslih tudi hemoglobin A₂ (HbA₂), ki je sestavljen iz dveh α in dveh δ verig. Hemoglobina F zaznamo pri približno 0,5 do 0,7 % odraslih, in sicer kot celice F (4). Število F celic pri nosečnicah fiziološko naraste in doseže vrh med 18 in 22 tednom nosečnosti (9).

Eritroidne celice ploda vsebujejo najprej embrionalni hemoglobin (HbE), sestavljen iz verig $\zeta_2\varepsilon_2$, $\alpha_2\varepsilon_2$, $\zeta_2\gamma_2$. Kasneje, v 6-7 tednu, pa pride do njegovega preklopa v fetalni hemoglobin (HbF). Ta je zgrajen iz dveh α in dveh γ verig (5,10). Proti koncu nosečnosti se začne fetalni hemoglobin spreminjati v odrasli hemoglobin tipa HbA in HbA₂ (5,3). Hemoglobin F predstavlja 90 do 95 % vsega hemoglobina pri plodu do 36. tedna nosečnosti. Slika 2

prikazuje razvoj hemoglobina in izražanje različnih verig globina tekom plodovega razvoja (5,10).



Slika 2: Izražanje globinskih verig hemoglobinov med plodovim razvojem (16).

1.3.2. Krvne skupine in aglutinogeni

Krvne skupine določajo antigeni, izraženi na površinah eritrocitov. To so podedovane polimorfne ogljikohidratne ali proteinske strukture. Do sedaj so odkrili že več kot 250 različnih antigenov, ki so jih razvrstili v 29 krvnoskupinskih sistemov. Vsi ti lahko povzročijo reakcijo antigen-protitelo na površini eritrocitov (11, 5, 12, 13). Številni od teh antigenov niso ali pa so šibko izraženi na plodovih celicah, zato ti niso vključeni v patogenezo hemolitične bolezni ploda in novorojenčka (HBPN) (12). Glavni imunogeni so sistema AB0 in Rh ter Kell, Duffy, Kidd in nekateri drugi. Protitelesa usmerjena proti tem aglutinogenom lahko povzročijo tudi hemolitično bolezen ploda in novorojenčka (5).

Krvnoskupinski sistem AB0

Sistem krvnih skupin AB0 je bil odkrit in opisan prvi in ostaja najpomembnejši v transfuzijski medicini. Antigena tipa A in B sta izražena na eritrocitih velikega deleža prebivalstva, pri čemer se nahaja en antigen ali drugi, lahko oba, ali pa nobeden. V odvisnosti od tega ločimo krvne skupine. Kadar je prisoten antigen A, imamo krvno skupino A, če je izražen B, je to krvna skupina B, ko sta prisotna oba, je to krvna skupina AB, v primeru, ko sta odsotna, pa govorimo o krvni skupini 0. Krvno skupino določata dva gena, izražena na različnem paru kromosomov. Gena kodirata tri osnovne tipe krvnih skupin, in sicer po enega

na vsakem kromosomu. Vsak izmed genov določa en tip, tip-0, tip-A, tip-B. Iz njih lahko nastane šest možnih genotipov: 00, 0A, 0B, AA, BB in AB (11, 13).

Preglednica I: Krvne skupine AB0

Krvna skupina	Genotip	Antigeni na površini eritrocitov	Protitelesa
0	00	Nobeni	Anti-A in anti-B
A	0A ali AA	A	Anti-B
B	0B ali BB	B	Anti-A
AB	AB	A in B	Nobena

Neskladnost v krvnem sistemu AB0 med materjo in otrokom ima le redko za posledico hemolitično bolezen ploda in novorojenčka. Razlog je najverjetneje ta, da se antigena A in B na plodovih eritrocitih izrazita zelo pozno v nosečnosti (5).

Krvnoskupinski sistem Rh

Poleg sistema AB0 poznamo tudi sistem rhesus ali Rh, ki prav tako povzroča hude hemolitične reakcije. Pri neskladnosti Rh med materjo (RhD⁺) in otrokom (RhD⁻) med nosečnostjo, plodove rdeče krvne celice prehajajo v materin krvni obtok in povzročijo senzibilizacijo matere in tvorbo protiteles anti-RhD. Ta nato v naslednji nosečnosti, v primeru enakega neskladja, povzročijo hemolitično bolezen ploda in novorojenčka (4). Izraženost antigenov RhD na površini plodovih eritrocitov je zelo zgodnja, saj se pojavi že okoli 38 dneva po zanositvi.

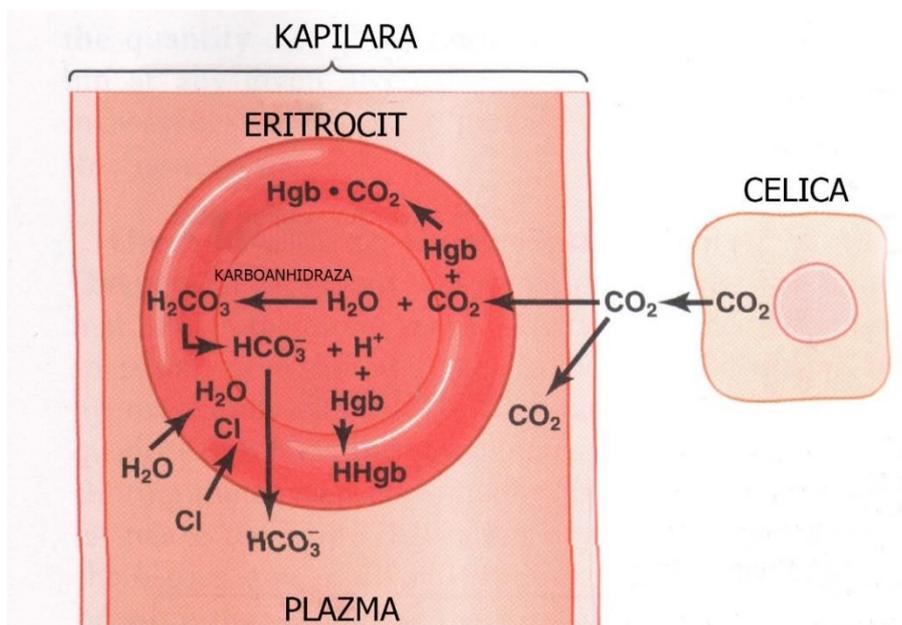
Sistem Rh imenujemo tudi faktor Rh, pri čemer poznamo več kot 45 antigenov, med katerimi so najbolj poznani in pomembni C, c, D, E in e. Če ima oseba antigen C, potem nima antigena c, v kolikor pa nima antigena C, potem ima zagotovo antigen c. Enako velja tudi za ostale antigene. Najpogostejši tip antigena v populaciji je D. Kadar je ta antigen RhD prisoten, pravimo, da je oseba RhD pozitivna, tisti pa, ki ga nimajo, so RhD negativni. Za antigene tega sistema nimamo že v naprej sintetiziranih protiteles, tako kot v primeru antigenov AB0. Za njihov nastanek je potrebna senzibilizacija. Do te pride, ko eritrociti RhD⁺ otroka preidejo

v krvni obtok RhD⁻ matere ali pa če nekdo prejme Rh neskladno transfuziji krvi (RhD⁻ prejemnik in RhD⁺ krvodajalec) (11).

1.3.3. Karboanhidraza

Karboanhidraza je cinkov metaloencim, ki sodeluje v procesu transporta plinov s krvjo. Vključen je v vzdrževanje kislinsko-bazičnega ravnotežja, sodeluje pa tudi pri sekreciji ionov (5, 14).

Ogljikov dioksid prehaja preko membran eritrocitov iz plazme v njihovo notranjost. V eritrocitih odraslih se nahaja encim karboanhidraza (CA), in sicer v obliki izoencimov I in II (15). Ta katalizira reakcijo med CO₂ in vodo, pri čemer nastaneta bikarbonatni ion in molekula vodika. Brez encima karboanhidraze, bi bila ta reakcija mnogo počasnejša, z njeno pomočjo pa CO₂ hitro zapusti kapilare v obliki bikarbonatnega iona. Transport CO₂ s krvjo prikazuje Slika 4 (11).



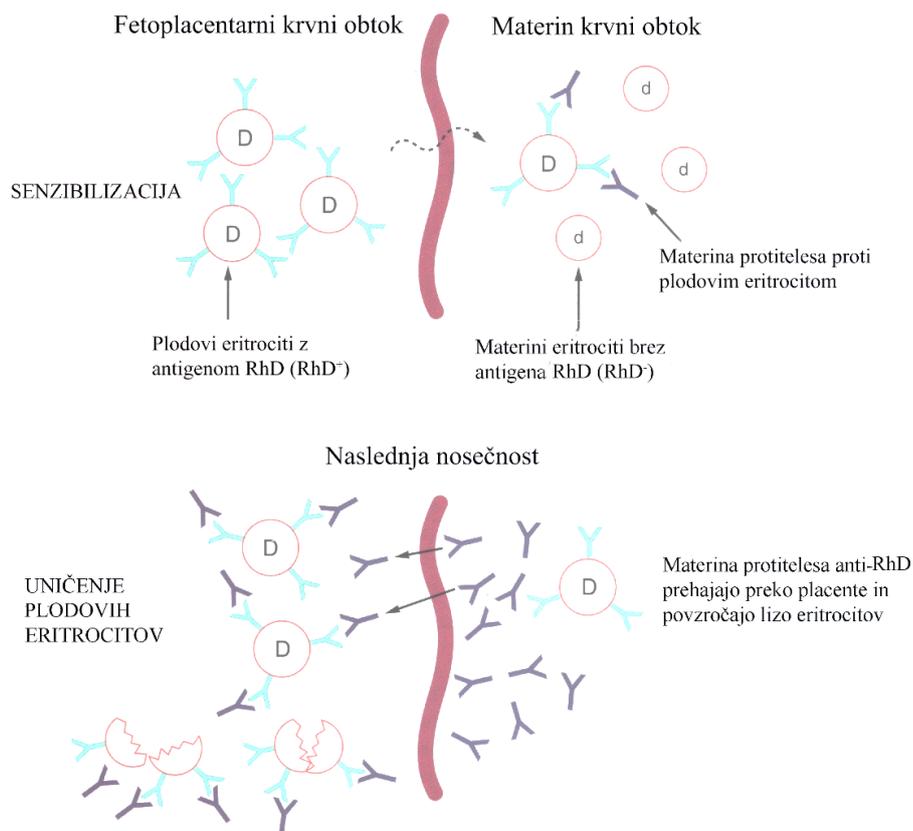
Slika 3: Transport ogljikovega dioksida s krvjo (11).

Karboanhidraza je izražena v odraslih eritrocitih, vendar tudi plodovi niso povsem brez nje. Izražajo jo namreč v manjšem obsegu, ki je 100-krat nižji kot pri odraslih. V štiridesetem tednu nosečnosti namreč pride do preklopa in sinteze karboanhidraze tudi v plodovih eritrocitih (15). Vendar pa dosežejo nivo koncentracije enako, kot je v odraslih eritrocitih šele po 6 mesecu. To velja predvsem za izoencim CA I (9).

1.4. Mehanizem nastanka fetomaternalne krvavitve

Fetomaternalna krvavitve lahko nastane spontano ali kot posledica invazivnih diagnostičnih postopkov med nosečnostjo, pri patoloških spremembah posteljice, pri prezgodnji ločitvi pravilno ležeče posteljice, pri posegih v zadnji tretjini nosečnosti (npr. zunanji obrat) ali pri poškodbi matere (16). V več kot 80 % primerkov, ko je krvavitve večja kot 30 mL, pa vzrok za nastanek ostaja nepojasnen (13).

Fetomaternalna krvavitve povzroči senzibilizacijo matere v prvi nosečnosti. Vendar pa za to sam prehod plodovih eritrocitov ni dovolj, potreben je namreč volumen, da pri materi izzovejo imunsko reakcijo in tvorbo protiteles. Nastala protitelesa lahko nato prehajajo preko placente in lizirajo eritrocite ploda. V prvi nosečnosti, med katero je prišlo do imunizacije, je imunski odziv običajno šibek zaradi primarno nastalih protiteles razreda IgM, ne morejo prehajati preko placente. Zato RhD⁺ plod med prvo nosečnosti pogosto ni tarča napada materinega imunskega sistema, tako da ne pride do hujših zapletov ter hemolitične bolezni ploda in novorojenčka, razen takrat, ko so zapleti posledica krvavitve. Kasneje materin imunski sistem začne proizvajati protitelesa razreda IgG, ki pa lahko prehajajo preko placente, zato v nadaljnjih nosečnostih povzročajo lizo RhD⁺ plodovih eritrocitov (17).



Slika 4: Mehanizem senzibilizacije RhD⁻ matere ob prvi nosečnosti in liza plodovih RhD⁺ eritrocitov v nadaljnjih nosečnostih (20).

Dejstvo je, da imunizacija matere proti antigenu RhD in s tem tvorba protiteles, povzroča hemolitično bolezen ploda in novorojenčka. Vendar pa to ni edini antigen, ki lahko povzroči imunizacijo matere in tvorbo protiteles in posledično zaplete v nosečnosti. Do imunizacije lahko pride tudi z drugimi antigeni, kot so Kell, Rh c, Duffy in drugi, vendar pa se to zgodi redkeje in tudi redkeje ti antigeni povzročijo hemolitično bolezen ploda in novorojenčka. Imunizacija z RhD je lahko posledica predhodnih nosečnosti ali danes že skoraj nikoli transfuzije neskladne krvi, pri drugih antigenih pa je najpogosteje posledica transfuzije neskladne krvi (5, 6, 34)

1.5. Ocena obsega fetomaternalne krvavitve

Zanesljiva ocena obsega fetomaternalne krvavitve je pomembna predvsem pri RhD⁻ nosečnicah, pri katerih lahko pride do imunizacije, ter v vseh ostalih primerih, ko sicer ne gre za neskladnost RhD med materjo in plodom, vendar pa lahko pride do hudih zapletov pri plodu in neonatalne anemije (5). V Sloveniji in mnogih drugih državah so sprejete strokovne smernice o pred in poporodnih preiskavah ter injiciranju imunoglobulina anti-

RhD. Priporočen je komplet preiskav v različnih obdobjih nosečnosti, da bi se izognili imunizaciji matere in zaščitili plod. Tako je pri nas potrebno vsaki nosečnici do 12. tedna nosečnosti določiti krvno skupino AB0 in RhD ter ugotoviti morebitno prisotnost eritrocitnih protiteles z indirektnim Coombsovim testom. Pri vseh RhD⁻ nosečnicah test ponovimo še v 28. tednu nosečnosti. Vsem tistim RhD⁻ nosečnicam, pri katerih nismo dokazali protiteles anti-RhD, vbrizgamo zaščitni odmerek imunoglobulinov anti-RhD. Nato indirektni Coombsov test ponovno izvedemo po porodu, sočasno pa določimo tudi krvno skupino AB0 in RhD ter opravimo direktni Coombsov test pri vseh novorojenčkih RhD⁻ mater. Vsem RhD⁻ neimuniziranim otročnicam, ki so rodile RhD⁺ otroka, ponovno vbrizgamo zaščitni odmerek imunoglobulinov anti-RhD. Zaščitni odmerek protiteles je odvisen od obsega fetomaternalne krvavitve. Pri RhD⁺ nosečnicah pa naredimo indirektni Coombsov test samo do 12. tedna nosečnosti in jim ne vbrizgavamo zaščitnih odmerkov imunoglobulinov, če to ni potrebno. Kadarkoli z indirektnim Coombsovim testom dokažemo navzočnost eritrocitnih aloprotiteles, jih moramo identificirati in ovrednotiti njihov klinični pomen. Temu sledi še določanje njihovega titra in njihove agresivnosti. Preiskavo titer protiteles nato ponavljamo na štiri oz. dva tedna. Na osnovi teh rezultatov pa se porodničarji odločajo za morebitne dodatne preiskave (18).

Imunskaprofilaksa RhD⁻ mater z imunoglobulinom anti-RhD prepreči primarno imunizacijo le takrat, ko je razmerje med protitelesi in eritrociti vsaj 20-25 μ L protiteles na mL eritrocitov. Manjše razmerje ne prepreči imunizacije. Za zagotovitev ustreznega odmerka imunoglobulinov anti-RhD moramo natančno določiti obseg fetomaternalne krvavitve (18, 19).

Najprej so menili, da pasivna imunizacija z imunoglobulini anti-RhD pri RhD⁻ nosečnicah škodi RhD⁺ plodu. Kasneje pa so ugotovili, da je ta bojazen neupravičena, saj poseg ne izzove tvorbe lastnih protiteles, zato ni posledičnih zapletov v prvi ali v naslednjih nosečnostih. Dokazali so namreč, da v kolikor nosečnici v 28. tednu nosečnosti vbrizgajo 300 μ g imunoglobulinov anti-RhD, jih nato v plodovem obtoku ne zasledijo več kot 30 μ g, saj je njihov prenos preko posteljice zelo počasen (18).

Za oceno obsega fetomaternalne krvavitve obstaja več različnih testov. S kvalitativnimi testi dobimo informacijo o prisotnosti RhD⁺ plodovih eritrocitov v krvi RhD⁻ matere. Ti testi

morajo biti 100 % občutljivi za zaznavo več kot 15 mL plodovih RhD⁺ eritrocitov v krvi matere (5). Takšen test je npr. rozetni test, ki pa pri nas ni v uporabi (4).

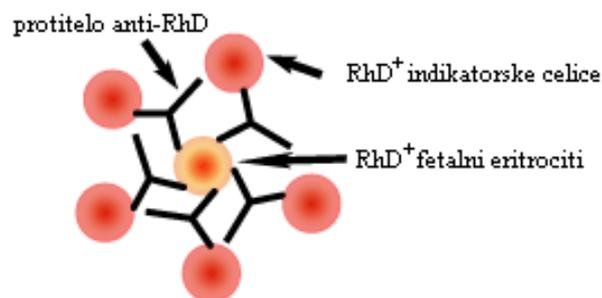
Pomembnejši pa so seveda kvantitativni testi, s katerimi dobimo natančnejše podatke o količini plodove krvi v materinem krvnem obtoku. Že dolgo je v uporabi test Kleihauer-Betke. Klinično je zelo uporaben, vendar pa ima kar nekaj omejitev. Z različnimi modifikacijami so ga izboljšali in tako zagotovili natančnejše rezultate. V zadnjih 15 letih za določitev obsega fetomaternalne krvavitve uporabljajo tudi pretočno citometrijo. V ta namen uporabljajo fluorescenčno označena protitelesa proti antigenu D, izraženem na površini plodovega eritrocita ali pa tiste, ki prepoznajo fetalni hemoglobin. Za vse metode, ki temeljijo na pretočni citometriji, je značilna visoka občutljivost in statistična natančnost meritev. S temi postopki namreč zaznamo že 0,1 % plodovih celic v materinem krvnem obtoku. Za analizo s pretočnim citometrom obstajajo na tržišču tudi že komercialno dostopni kompleti s kombinacijami protiteles in ostalimi reagenti za pripravo vzorca za analizo (5, 40). Z enim od takšnih kompletov smo izvedli raziskave v sklopu naše magistrske naloge.

1.6. Laboratorijske metode za določanje fetomaternalne krvavitve

Zelo pomembno je, da s čim manj invazivnimi postopki določimo, kar se da natančno, kolikšen je obseg fetomaternalne krvavitve. Obseg fetomaternalne krvavitve, količine plodovih eritrocitov v krvnem obtoku matere, moramo glede na priporočila določiti čim prej oziroma najkasneje v 72 urah (15).

1.6.1. Kvalitativni test

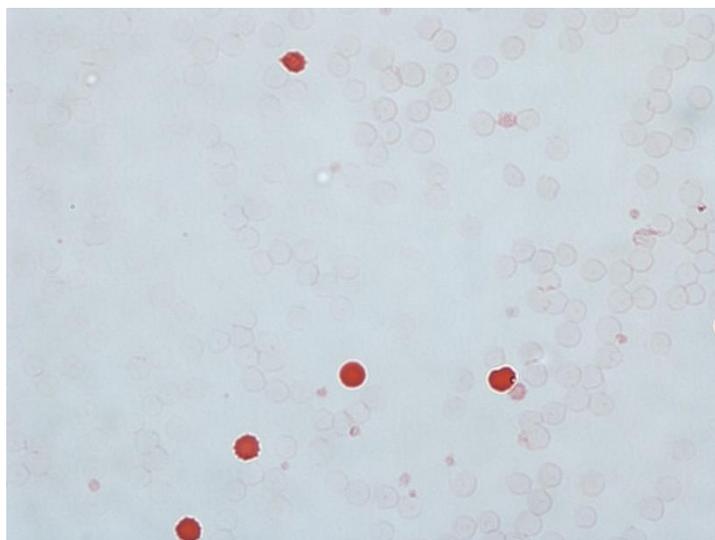
Rozetni test je kvalitativni presejalni test. Pri nas ga ne uporabljamo. Z njimi določamo, ali so med RhD⁻ odraslimi eritrociti prisotni RhD⁺ plodovi eritrociti. Okoli RhD⁺ plodovih eritrocitov se namreč po dodatku protiteles anti-RhD oblikujejo gruče ali rozete RhD⁺ indikatorskih celic, ki jih opazujemo pod mikroskopom (4, 39). To je zelo občutljiva metoda, ki zazna že 0,2 % plodovih celic v materinem krvnem obtoku (20).



Slika 5: Rozetni test - prikaz principa za rozetni test (21).

1.6.2. Test Kleihauer-Betke

Test Kleihauer-Betke je kvantitativen test, ki so ga leta 1975 prvič opisali Kleihauer, Braun in Betke. Temelji na dejstvu, da je fetalni hemoglobin, ki se nahaja v plodovih eritrocitih, bolj rezistenten na elucijo s kislino kot hemoglobin odraslih eritrocitov, s čimer torej lahko ločimo plodove eritrocite od odraslih. Za izvedbo testa potrebujemo tanek razmaz krvi. Tega moramo posušiti na zraku, nato pa ga potopiti v fiksativ, in sicer 80 % etanol. Sledi inkubacija v raztopini kisline in barvanje z eritrozinom B. Pri tem se plodovi eritrociti obarvajo češnjevo rdeče, odrasli pa se bodisi ne ali pa le malo obarvajo. Preparat nato pregledamo pod mikroskopom in ocenimo delež plodovih eritrocitov v preparatu. Pri tem pregledamo do 10.000 eritrocitov, temu pa sledi izračun volumske količine krvavitve. Poleg plodovih eritrocitov pa se v preparatu lahko češnjevo rdeče obarva tudi od 0,5 % do 7 % odraslih eritrocitov (4, 5, 38).



Slika 6: Test Kleihauer-Betke: plodovi eritrociti so obarvani intenzivno rdeče, odrasli pa le minimalno (37).

Kljub temu, da je test enostaven za izvedbo, pa so mnoge študije žal pokazale, da je slabo ponovljiv (4). Razlog za to je neobstoječa standardizacije izvedbe testa. Razlike v rezultatih so lahko posledica različnih debelin krvnih razmazov, vrednosti pH uporabljenega pufra in drugo. Problematične so tudi medlaboratorijske variacije in variacije med različnimi izvajalci testa. Zaradi tega lahko dobimo lažno previsoke ali lažno prenizke vrednosti obsega fetomaternalne krvavitve. Zaradi nujnosti po večji standardizaciji postopka so danes že na voljo različni testni kompleti in različne avtomatizirane oblike (20, 40).

1.6.3. Pretočna citometrija

Testi, ki jih izvajamo s **pretočnim citometrom**, predstavljajo alternativo ali dopolnilo za klasični test Kleihauer-Betke. Pri tem so v uporabi različna protitelesa, npr. proti RhD, proti HbF, proti HbF skupaj s tistimi proti karboanhidrazi ter druga. Podjetja so razvila tudi številne komercialno dostopne komplete, ki vsebujejo vse potrebne reagente in natančne protokole za izvedbo analize (4). V primerjavi s testom Kleihauer-Betke so analize na pretočnem citometru objektivnejše, omogočajo večjo natančnost in točnost ter medlaboratorijsko primerljivost rezultatov (4, 22). V eni od raziskav so preverjali koeficient variacije med različnimi laboratoriji. Izkazalo se je, da je bil ta pri testu Kleihauer-Betke ta 153 %, pri analizah, opravljenih s pretočnim citometrom, pa le 10 %. Prav tako se je izkazalo, da je čas analize pri nekaterih testih, izvedenih s pretočno citometrijo, krajši kot pri testu Kleihauer-Betke, poleg tega pa lahko v istem časovnem okviru pregledamo večje število celic. Analizne metode, ki temeljijo na pretočni citometriji, veliko manj obremenjujejo laboratorijsko osebje, ki lahko v krajšem času pregledajo več vzorcev (4). Precej študij je dokazalo, da so testne metode, izvedene na pretočnem citometru, veliko primernejše za potrditev obsega fetomaternalne krvavitve. Njihova slaba stran pa je, da so dražje in da, predvsem v primeru izvedbe sočasnih večbarvnih analiz, zahtevajo dobro usposobljeno osebje (20).

1.6.4. Pretočna citometrija z uporabo protiteles anti-RhD

Pretočna citometrija z uporabo protiteles anti-RhD je pogosto uporabljena metoda za določanje obsega fetomaternalne krvavitve. Žal je uporaba omejena samo na RhD⁻ nosečnice, ki nosijo RhD⁺ plod. S to metodo lahko zaznamo že zelo majhen obseg (0,1-0,2

%) fetomaternalne krvavitve. Ko je antigen izražen na površini eritrocitov, predhodna permeabilizacija celic ni potrebna. Prav tako meritev ne moti prisotnost F celic. Žal pa ne dobimo zanesljivih rezultatov v primerih, ko so prisotne variacije Rh in imamo izražen šibek ali delni antigen D. Težava je v tem, ker lahko tudi te antigenske variacije povzročijo imunizacijo matere, s tem pa zaplete v nosečnosti. V takih primerih testni rezultati niso zanesljivi, saj so lahko lažno znižani, zato obstaja velika verjetnost, da bo mati prejela premajhen profilaktični odmerek protiteles anti-RhD, ki ne bo preprečil neželene imunizacije. Določanje obsega fetomaternalne krvavitve je lahko moteno tudi, če materi najprej injiciramo zaščiten odmerek imunoglobulinov in ji šele nato vzamemo kri za analizo. Injicirana protitelesa se namreč vežejo na vezavna mesta na plodovih eritrocitih, kar ima za posledico napačen rezultat (20).

1.6.5. Pretočna citometrija z uporabo protiteles anti-HbF in anti-CA

Obstajajo tudi testi, pri katerih uporabljamo kombinacije različnih protiteles. Eden izmed njih vsebuje kombinacijo protiteles anti-HbF/anti-CA. Vsi reagenti, ki jih potrebujemo za njihovo izvedbo, vsebujejo komercialno dostopni komplet FetalCell Count®. Metode, ki temeljijo na pretočni citometriji in uporabljajo kombinacijo protiteles, so običajno nekoliko dražje. Z uporabo protiteles anti-HbF/anti-CA ločimo med plodovimi eritrociti, odraslimi eritrociti in celicami F. Plodovi eritrociti so namreč HbF⁺ in CA⁻, odrasli so HbF⁻ in CA⁺, celice F pa so HbF⁺ in CA⁺ (20). Glavna prednost te metode je, da jo lahko uporabljamo ne glede na krvno skupino matere in ploda. V testnem kompletu so monoklonska protitelesa proti HbF ter poliklonska protitelesa proti CA. Slednja so usmerjena proti izoforni encima CAII, s čimer je omogočeno boljše razlikovanje med plodovimi in odraslimi eritrociti (9,23).

Komplet Fetal Cell Count® so podrobneje analizirali v eni izmed študij (9). Pripravili so 124 suspenzije plodovih in odraslih eritrocitov ter izvedli meritve, ki so jih primerjali z rezultati pridobljenimi s testom Kleihauer-Betke. Poleg tega so analizirali tudi nekaj kliničnih primerov pacientk. Rezultati so pokazali, da je meja detekcije pri uporabi kompleta 0,02 %, meja kvantifikacije pa 0,05 %, in sicer v primeru, ko so prešteli 200.000 celic. V kolikor so prešteli 100.000 celic, pa je bila meja detekcije 0,03 %, meja kvantifikacije pa 0,10 %. Dokazali so tudi dobro korelacijo eksperimentalno določenih vrednosti s pričakovanimi, saj je bil korelacijski koeficient večji kot 0,95, vrednost p pa manjša od 0,01. Izvedli so tudi testiranje v kontrolni populaciji. Pri tem so manj kot 0,01 % celic zaznali v

zgornjem levem kvadrantu histograma, kjer se nahajajo plodove celice. Primerjava rezultatov, dobljenih s kompletom Fetal Cell Count® in klasičnim testom Kleihauer-Betke, je pokazala dobro korelacijo med metodama. Korelacijski koeficient je bil 0,94, vrednosti p pa manjše od 0,01. V primerjavi s testom, ki uporablja le protitelesa anti-RhD, se je metoda s kompletom Fetal Cell Coun® izkazala kot občutljivejša. Našli so tudi dva razloga, zakaj je test s protitelesoma anti-HbF/anti-CA natančnejši in bolj pod nadzorom kot test Kleihauer-Betke, in sicer večje število analiziranih celic v krajšem času, ter enostavnejša izvedba in objektivnejša ocena rezultatov. Obstaja tudi priporočilo za uporabo pretočne citometrije kot ene izmed metod, kadar je Kleihauer-Betke test pozitiven (9, 41).

Izvedli so tudi različne študije testov, ki temeljijo na pretočni citometriji z uporabo protiteles anti-HbF/anti-RhD. V eni izmed njih so izmerili nižje vrednosti, določene s protitelesi anti-HbF od pričakovanih. Kot možni vzrok za to so navedli različno koncentracijo HbF v plodovih eritrocitih, kar je posledica preklopa sinteze fetalnega hemoglobina v odrasel hemoglobin (20). V eni od tovrstnih študij pa so s primerjavo ugotovili, da je metoda s pretočnim citometrom z uporabo protiteles anti-RhD hitra in enostavna ter primerna za večino analiziranih vzorcev. Prav tako je tudi dobro ponovljiva in natančna. Metoda s pretočnim citometrom s protitelesi anti-HbF/anti-CA pa je primerna za vse krvne skupine, z njo lahko dobro ločimo F celice od plodovih celic in jo uporabimo tudi pri bolnicah s hemoglobinopatijami (3).

2. Namen dela

Fetomaternalna krvavitev je stanje, ki zahteva čim hitrejšo ukrepanje oz. zdravljenje ploda ali novorojenčka, da ne pride do hemolitične bolezni, ter sočasno zaščito matere pred senzibilizacijo in posledično tvorbo protiteles. Prisotnost fetomaternalne krvavitve ugotavljajo s testom Kleihauer–Betke pri vseh otročnicah, redkeje pa tudi pri nosečnicah. Pri tistih, pri katerih je test pozitiven, izvedejo še nadaljnjo diagnostiko s pretočnim citometrom in določijo količino plodove krvi v materinem krvnem obtoku. V ta namen se uporablja metoda, ki temelji na pretočni citometriji in s katero ugotavljamo prisotnost RhD⁺ eritrocitov ploda v vzorcu matrine krvi. Želimo vpeljati in primerjati novo metodo, ki temelji na pretočni citometriji z uporabo protiteles anti-HbF in anti-CA in bi bila primerna za določanje fetomaternalne krvavitve tudi v primerih, ko ta ni izzvana z antigenom RhD.

Namen našega dela bo tako za potrebe Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino uvesti ter kritično in celovito ovrednotiti novo metodo, ki temelji na uporabi protiteles proti hemoglobinu F, ki se nahaja v plodovih eritrocitih in protiteles proti karboanhidrazi, ki je izražena v odraslih eritrocitih. Na ta način bomo razlikovali med plodovimi in materinimi eritrociti. Rezultate bomo primerjali s tistimi, dobljenimi z že obstoječima analiznima postopkoma, in sicer s klasičnim testom Kleihauer–Betke in z metodo s pretočno citometrijo, ki kot detekcijski reagent uporablja protitelesa anti-RhD.

Hipoteza:

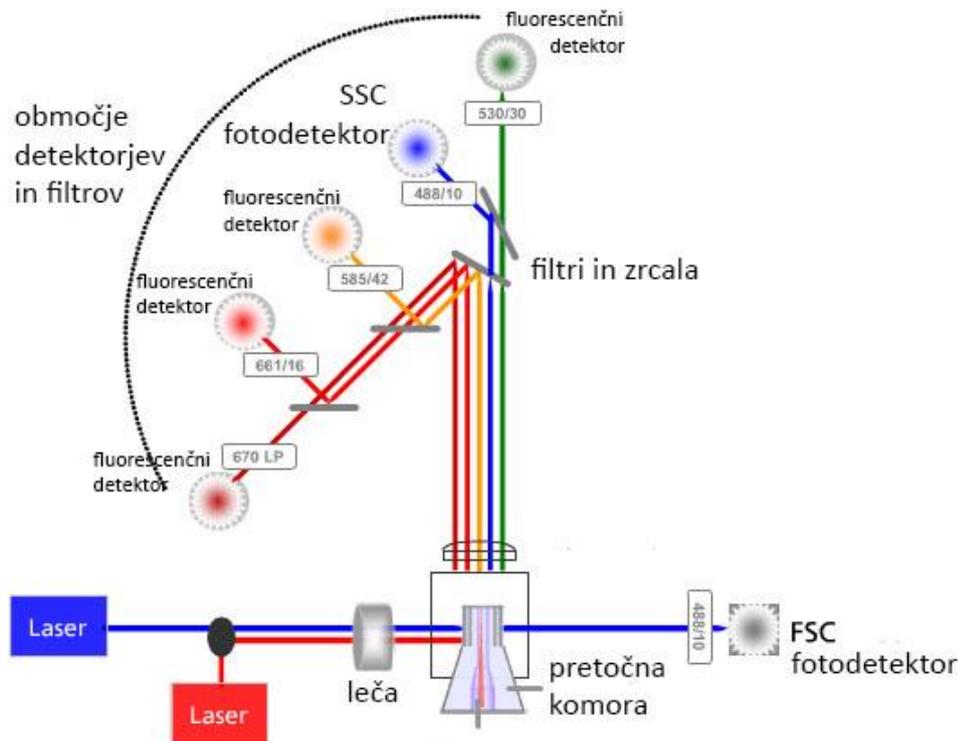
Z metodo, ki temelji na pretočni citometriji s protitelesi anti-HbF/anti-CA, dobimo zanesljive rezultate primerljive z rezultati testa Kleihauer-Betke in s tistimi, določenimi z metodo pretočne citometrije z uporabo izključno protiteles anti-RhD.

3. Materiali in metode

3.1. Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je široko uporabna metoda, s pomočjo katere lahko analiziramo površine celic, znotrajcelične molekule, karakteriziramo in definiramo različne vrste celic oziroma merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic. Celice, ki so v suspenziji, v pretočnem citometru potujejo skozi pretočno komoro. S pomočjo hidrodinamskega fokusiranja dosežemo, da potuje naenkrat skozi ozek snop laserske svetlobe samo ena celica. Pri interakciji laserskega žarka z vzorcem večina fotonov neovirano prispe skozi merilno komoro, nekateri pa zadenejo celico. Svetloba se lahko od nje odbije, se lomi ali pa absorbira v fluorokromih, s katerimi so označena detekcijska protitelesa. Spremembe smeri potovanja svetlobe oz. valovne dolžine ekscitirane svetlobe nato aparat analizira (24, 25, 26, 27).

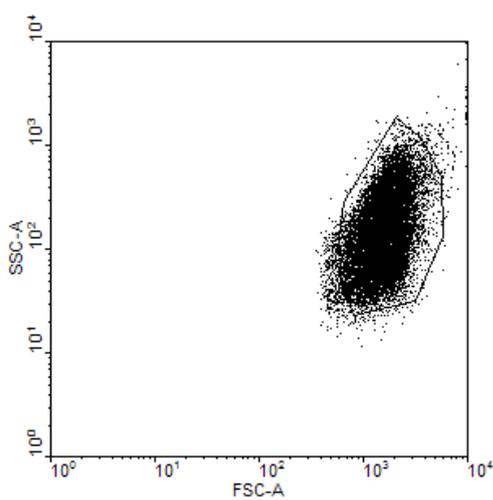
Pretočni citometer vsebuje dva fotodetektorja, ki merita količino razpršene svetlobe. Prvi je FSC (ang. forward scatter count), ki se nahaja v smeri laserskega žarka. Parameter, ki ga zaznava, je predvsem »prednje sipanje« (ang. forward scatter), ki nastane zaradi stika laserske svetlobe s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celic. Drugi je SSC (ang. Side scatter count) in je nameščen pravokotno na smer laserskega žarka. Ta zaznava tako imenovano »stransko sipanje« (ang. side scatter), ki nastane zaradi stika svetlobe s celičnimi organeli oz. membranskimi strukturami, ki se nahajajo znotraj celic. Večja kot je zrnatost celice, večje bo stransko sipanje in višji bo signal. Poleg teh dveh fotodetektorjev pa ima lahko pretočni citometer še dva do štiri (lahko tudi več) fluorescenčne detektorje. Ti merijo svetlobo, ki ima večje valovne dolžine kot vzbujevalna, laserska svetloba. Nahajajo se pravokotno na smer laserskega žarka. Preko ustreznega sistema filtrov in zrcal posamezni fluorescenčni fotodetektor zazna svetlobo določene valovne dolžine, ki jo oddaja določeni fluorokrom. Celice najpogosteje označimo s pomočjo zanje specifičnih protiteles, ki so konjugirana s fluorokromi. Na podlagi tega lahko ločimo celice z različnimi lastnostmi. Podatki, ki jih generirajo vsi fotodetektorji, pa nam po njihovi obdelavi daje informacije o vrsti in številu analiziranih celice. Pretočni citometer nam torej omogoča, da lahko v kratkem času izmerimo zelo veliko število različnih celic (24, 25, 26, 27, 35).



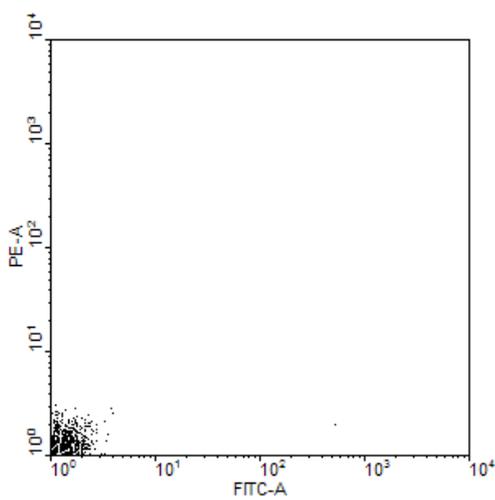
Slika 7: Shema pretočnega citometra BD FACSCalibur (35).

Za analizo smo uporabljali aparat BD FACSCalibur s pripadajočim programom Cell-Quest Pro BD Becton Dickinson. S slednjim spreminjamo nastavitve pretočnega citometra ter nastavljamo in analiziramo citograme. Za metodo s protitelesi anti-RhD smo uporabljali vnaprej pripravljene predloge, ki so vsebovale citograme in tabele izmerjenih deležev eritrocitov, saj je ta analizni postopek že bil v rutinski uporabi. Za novo metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA pa smo sami pripravili in nastavili analizne parametre pretočnega citometra in pripravili ustrezne predloge. Pri nastavitvah aparata smo upoštevali navodila proizvajalca. V ta namen smo pripravili 5-% mešanico popkovnične krvi in krvi odraslega krvodajalca. Nato smo del celične suspenzije označili samo s protitelesi anti-HbF, del s protitelesi anti-CA, del pa z obema protitelesoma sočasno. Preostalega dela vzorca nismo označili. Nato smo vse štiri vzorce analizirali. Analizator smo nastavili za analizo 100.000 dogodkov, za citogram FSC/SSC in FL1/FL2 pa izbrali logaritemske skale. Z neoznačeno kontrolo smo na citogramu FSC/SSC zamejili eritrocitno populacijo, ki smo jo v nadaljevanju vrednotili na podlagi vezave obeh vrst protiteles, označenih z različnima fluorescenčnima označevalcema. S pomočjo neoznačene kontrole smo nastavili tudi napetosti FL1 in FL2 fotopomnoževalke, s čimer smo zagotovili, da se je sicer šibek signal

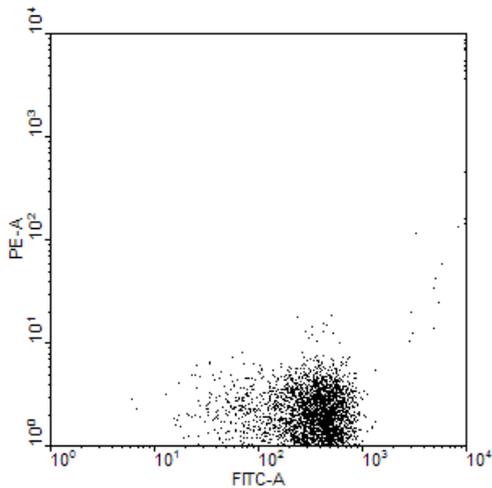
detektorja ojačil dovolj, da smo ga lahko nemoteno merili. Celice morajo biti na citogramu FL1/FL2 prisotne v spodnjem levem kotu, kjer ne zaznamo nobene fluorescence. Za analizo vzorcev, označenih s posameznimi protitelesi, pa smo nastavili zaznavanje fluorescence za fluorokroma FITC in R-PE, da bi lahko med seboj ločevali plodove in odrasle eritrocite. Najprej smo analizirali vzorec, v katerem smo celice označili samo s protitelesi anti-HbF R-PE. Pri tem smo nastavili kompenzacijo signala R-PE od FL1. Plodovi eritrociti so bili FL2 pozitivni in se nahajali v zgornjem levem kvadrantu citograma FL1/FL2. Za nastavitvev kompenzacije signala FITC od FL2 pa smo nato analizirali še vzorec z eritrociti, označenimi samo s protitelesi anti-CA FITC. Odrasli eritrociti so bili FL1 pozitivni in so se nahajali v spodnjem desnem kvadrantu citograma FL1/FL2. Na koncu smo analizirali še vzorec, ki smo ga označili z obema vrstama protiteles. Tako smo preverili vse nastavitve in postavili mejne osi. Vodoravno os smo namestili pod populacijo plodovih eritrocitov, navpično pa desno od te populacije in levo od CA pozitivne populacije. S tem smo zagotovili, da bodo plodovi eritrociti v levem zgornjem kvadrantu, odrasli eritrociti v desnem spodnjem ter delno v levem spodnjem kvadrantu, celice F pa v zgornjem desnem kvadrantu (28, 9).



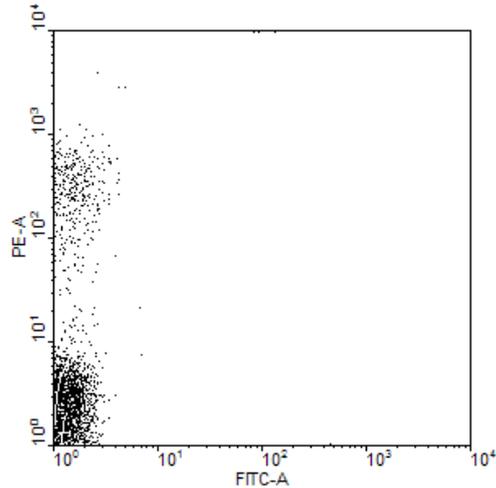
Citogram 1



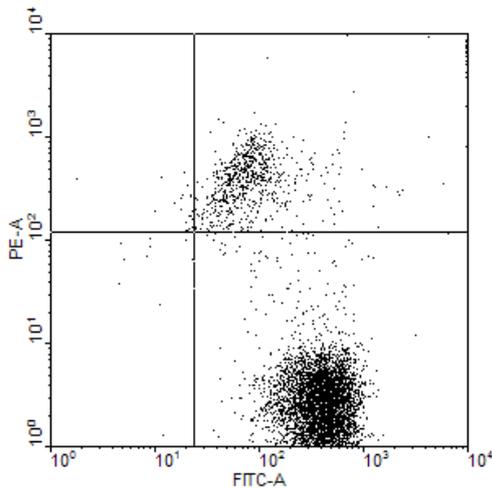
Citogram 2



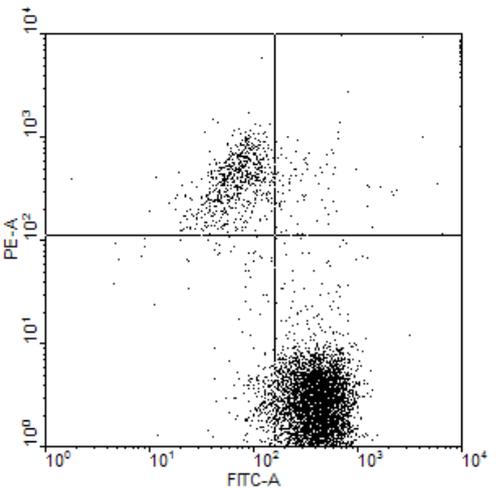
Citogram 3



Citogram 4



Citogram 5



Citogram 6

Slika 8: Citogrami nastavitve pretočnega citometra za analizo fetomaternalne krvavitve s kompletom Fetal Cell Count®. Na citogramu 1 je prikazana zamejitev eritrocitne populacije v neoznačenem kontrolnem vzorcu, ki jo uporabljamo za nadaljnje analize. Citogram 2 prikazuje meritev neoznačene kontrole, kjer so vse celice v spodnjem levem delu citograma. Na citogramu 3 vidimo le celice, označene samo s protitelesom anti-HbF R-PE, na citogramu 4 pa vidimo tiste z vezanimi protitelesi anti-CA FITC. Citogram 5 prikazuje rezultate analize vzorca, označenega z obema protitelesoma, anti-HbF in anti-CA, citogram 6 pa meritve istega vzorca z ustrezno prestavljenimi mejami, tako da so plodovi eritrociti v zgornjem levem kvadrantu, odrasli eritrociti v spodnjem desnem, celice F p v zgornjem desnem kvadrantu (28).

3.2. Metoda s protitelesi anti-HbF/anti-CA

Uporabljali smo komercialno dostopni komplet proizvajalca IO Products, v katerem so vsi reagenti, ki jih potrebujemo za izvedbo analize. Posamezni komplet vsebuje reagente za 25 testov. Reagent A je fiksacijska raztopina, v kateri je manj kot 0,1 % natrijevega azida. Tudi

reagent B je fiksacijska raztopina, in sicer puferirani formaldehid. Reagent C je permeabilizacijska raztopina, ki vsebuje natrijev dodecil sulfat (SDS), reagent D je 10-kratno koncentrirana raztopina za spiranje, ki vsebuje fosfatni pufer (PBS) z dodatkom heparina. Slednjega pred uporabo pripravimo, 10-krat redčimo s filtrirano demineralizirano vodo, tako da dobimo delavno raztopino (1x). Reagenta E in F vsebujeta fluorescentno označena protitelesa. V reagentu E se nahajajo poliklonska protitelesa proti človeški karbonski anhidrazi (CA), konjugirana z barvilom FITC, reagent F pa vsebuje monoklonska protitelesa proti človeškemu fetalnemu hemoglobinu, konjugirana z R-PE. Oba reagenta, E in F, vsebujeta manj kot 0,1-% natrijevega azida (28). Za pripravo in označevanje celic s protitelesi smo uporabljali centrifugo Eppendorf 5804R.

Vzorci je predstavljala venska kri, odvzeta v antikoagulant EDTA ali heparin. Do izvedbe testa smo jih hranili v hladilniku pri 4 °C ali pa na sobni temperaturi (28).

Postopek:

Fiksacija in permeabilizacija celic

1. Reagent C segrejemo na sobno temperaturo, s čimer se izognemo nastanku precipitativ.
2. Sto μL reagenta A odpipetiramo v 5 mL epruveto.
3. Dodamo 10 μL krvi odvzete v antikoagulant EDTA ali pripravljene suspenzije eritrocitov in premešamo.
4. Dodamo 100 μL reagenta B in ponovno premešamo. Epruveto zapremo s pokrovčkom.
5. Tako pripravljeno celično suspenzijo inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi in jo vsakih 10 minut premešamo.
6. Dodamo 2 mL reagenta D in zaprto epruveto nekajkrat obrnemo, da vsebino dobro premešamo.
7. Celično suspenzijo centrifugiramo na 300 g 3 minute in odlijemo supernatant.
8. Celični usedlini dodamo 100 μL reagenta D in celice resuspendiramo z nežnim stresanjem.
9. Dodamo 100 μL reagenta C, premešamo in vzorec inkubiramo natanko 3 minute.
10. Dodamo 2 mL reagenta D in vsebino premešamo z nekajkratnim obračanjem zaprte epruvete.
11. Celično suspenzijo centrifugiramo na 300 g 3 minute. Nato odlijemo supernatant.

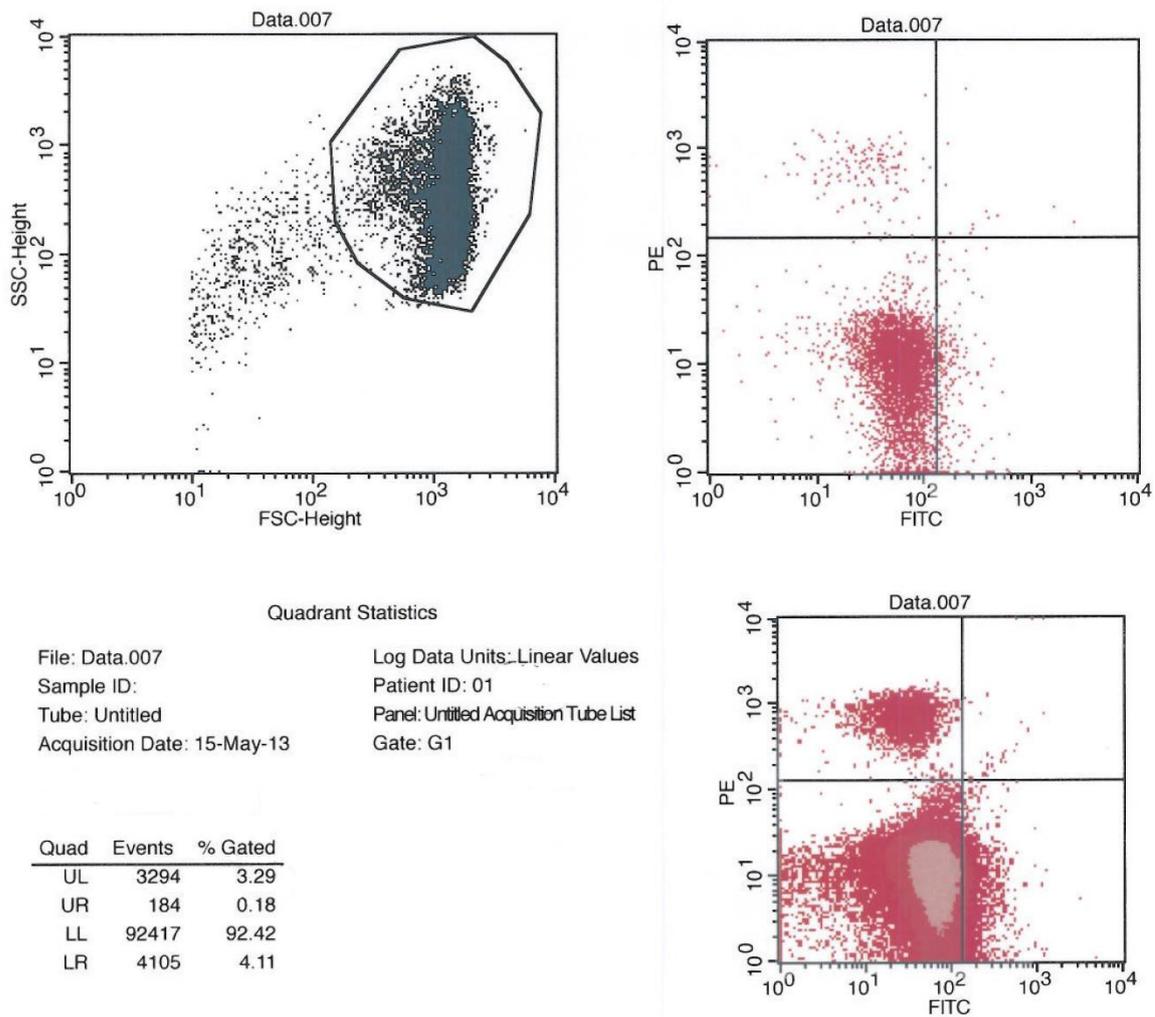
12. Celični usedlini dodamo 1 mL reagenta D in celice resuspendirajmo z nežnim stresanjem.

Imunofluorescenčno barvanje

1. V novo epruveto odpipetiramo 50 μ L reagenta F (protitelesa anti-CA, konjugirana z FITC), 50 μ L reagenta E (protitelesa anti-HbF, konjugiran z R-PE) in 50 μ L eritrocitne suspenzije ali vzorca krvi po fiksaciji in permeabilizaciji. Vsebino dobro premešamo s stresanjem.
2. Pred svetlobo zaščiten vzorec inkubiramo 15 minut na sobni temperaturi.
3. Dodamo 2 mL reagenta D.
4. Celično suspenzijo centrifugiramo na 300 g 3 minute in odlijemo supernatant.
5. Celice resuspendiramo z dodatkom 500 μ L reagenta D in najkasneje v 30 minutah izvedemo analizo na pretočnem citometru. Pri tem moramo izmeriti vsaj 100.000 dogodkov.

Analiza vzorcev s pretočnim citometrom

Na pretočnem citometru odpremo predlogo za izpis meritev, ki vsebuje tri citograme in tabelo, v kateri se izpišejo izmerjenimi deleži celic (Slika 10). Pred samo analizo odpremo ustrezne nastavitve aparata za želeno metodo.



Slika 9: Primer rezultatov analize vzorca, označenega s protitelesi anti-HbF R-PE in anti-CA FITC. Zgoraj levo je prikazan citogram prednjega in stranskega sipanja, v katerem smo zamejili eritrocitno populacijo. Zgoraj desno je citogram, na katerem so vse analizirane celice označene s točkami; razporejene glede na intenziteto obeh fluorescenc. Spodaj levo je tabela s statističnimi podatki za meritve prikazane v zgornjem desnem citogramu, iz katerih lahko odčitamo delež v vzorcu prisotnih plodovih eritrocitov. Spodaj desno je citogram, ki prikazuje različne intenzitete fluorescence glede na število označenih celic. Ta citogram služi za nastavitve mej, s katerimi v zgornjem levem kvadrantu zajamemo celotno populacijo plodovih eritrocitov.

Žal nam vertikalne meje na citogramu ni uspelo postaviti, tako da bi večji del celične populacije, ki predstavlja odrasle eritrocite, zamejili desno od nje. Da bi to lahko popravili, smo nastavitve in umerjanje pretočnega citometra opravili dvakrat, vendar pa je bila prvotna nastavitve najoptimalnejša. Zato smo horizontalne in vertikalne meje prilagajali pri vsaki meritvi, in sicer tako, da smo lahko populacijo plodovih eritrocitov nedvoumno zajeli v zgornji levi kvadrant.

3.3. Metoda z uporabo protiteles anti-RhD

Za izvedbo te metode potrebujemo 5-% suspenzije eritrocitov, ki jih pripravimo tako iz krvnih vzorcev kot tudi iz kontrolnih suspenzij. Slednje pripravimo tako, da uporabimo kri krvodajalca s krvno skupino 0 in RhD⁻ in ji dodamo točno določen delež krvi novorojenčka, ki mora biti RhD⁺. Vzorce venske krvi preiskovank pa pred analizo pripravimo tako, da suspenzijo izoliranih eritrocitov trikrat speremo s fiziološko raztopino, nato pa iz nje pripravimo 5-% suspenzijo z dodatkom Alsverjeve ohranitvene raztopine. Kontrolne eritrocitne suspenzije za rutinsko uporabo se pripravljajo enkrat mesečno, ko se izvajajo meritve kliničnih vzorcev.

Protitelo, ki smo ga uporabljali pri tej metodi, je človeško monoklonsko protitelo anti-RhD, konjugirano s fluorescein izotiocianatom BRAD-3-FITC (IBGRL). Veže se na večino RhD pozitivnih eritrocitov, razen na tiste, ki izražajo antigene D^{IV} in R₀^{HAR}. Drugi uporabljeni reagent je bilo človeško monoklonsko protitelo podrazreda IgG3, konjugirano s fluorescein izotiocianatom AVEZ 5.3-FITC (IBGRL). Protitelo prepozna Varicello Zoster in služi kot negativna kontrola. Te negativne kontrole pri primerjavi različnih metod nismo uporabili. Reagente, ki vsebujejo protitelesa, smo pred analizo razredčili s pufrom PBS/1% BSA (30).

Postopek:

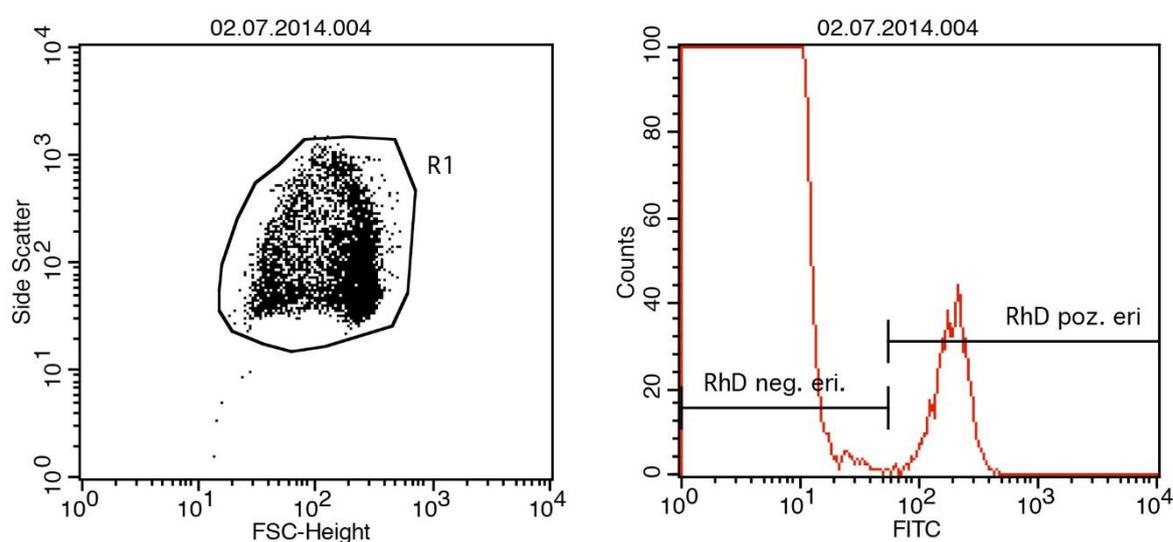
Najprej smo pripravili ustrezne redčitve protiteles. Za en test potrebujemo 50 µL razredčenega reagenta v razmerju 1:10. Pripravimo ga tako, da 45 µL PBS/1% BSA dodamo 5 µL reagenta anti-RhD BRAD-3-FITC ali AVEZ 5.3-FITC (30).

Označevanje vzorcev z monoklonskimi protitelesi

1. Epruvete ustrezno označimo.
2. Vanje odpipetiramo po 10 µL 5-% eritrocitnih suspenzij kontrolnih celičnih mešanic ali venske krvi preiskovank.
3. Dodamo 50 µL razredčenega reagenta s protitelesi in dobro premešamo.
4. Epruvete inkubiramo v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C 30 minut.
5. Po inkubaciji celicam dodamo približno 1,5 mL PBS/1% BSA in centrifugiramo 1 minutno pri 3000 obratih na minuto. Odljemo supernatant in še enkrat ponovimo.
6. Po drugem spiranju celicam dodamo 400 µL PBS/1% BSA in premešamo.
7. Vzorce zaščitimo pred svetlobo do analize s pretočno citometrijo (30).

Analiza vzorcev s pretočnim citometrom

Na predhodno pripravljene predloge imamo dva citograma in tabelo, v katero se bodo izpisovali statistični podatki. Prvi citogram nam prikaže razporeditev celice glede na velikost in zrnatost. V tem citogramu zajamemo populacijo eritrocitov, ki jo nadalje analiziramo v drugem citogramu. Tu so eritrociti razporejeni glede na intenziteto fluorescence, ki jo oddajajo. Večja populacija eritrocitov je na levi strani in predstavlja populacijo RhD negativnih eritrocitov matere, medtem ko na desni vidimo vrh z RhD pozitivnimi eritrociti.



Histogram Statistics

File: 02.07.2014.004 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: 2,4% RhD+ eri Patient ID:
 Tube: Panel: FMK
 Acquisition Date: 02-Jul-14 Gate: G1
 Gated Events: 100115 Total Events: 100252
 X Parameter: FITC (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak C
All	1, 9910	100115	100.00	99.86	8.10	3.28	354.78	3.22	
RhD neg. eri.	1, 56	97712	97.60	97.47	3.78	2.97	71.66	3.13	
RhD poz. eri	56, 9910	2403	2.40	2.40	183.80	176.95	27.19	179.43	19

Slika 10: Primer rezultatov analize vzorca označenega s protitelesi anti-RhD. Levo je citogram prednjega in stranskega sipanja, v katerem smo zamejili eritrocitno populacijo za nadaljnjo analizo. Desni citogram

prikazuje detekcijo plodovih RhD⁺ eritrocitov (desni vrh). Spodnja preglednica vsebuje izmerjene deleže RhD⁺ in RhD⁻ eritrocitov ter osnovne statistične parametre.

3.4. Priprava kontrolnih suspenzij

Za primerjavo med analiznimi metodami za ugotavljanje fetomaternalne krvavitve smo pripravili več serij kontrolnih suspenzij eritrocitov krvodajalca s krvno skupino 0 RhD⁻ z znanimi deleži RhD⁺ plodovih eritrocitov. Pri tem smo postopali enako kot v primeru analize z rutinsko metodo s protitelesi anti-RhD. Eritrocite smo najprej trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9-% NaCl). Uporabljali smo plastične epruvete velikosti 100 x 15 mm in 75 x 12 mm brez pokrovov ter epruvete s pokrovi 12 x 75 mm. Da se eritrociti ohranijo, njihovo končno suspenzijo pripravimo z ohranitveno Alsverjevo raztopino, proizvajalca Bio-Rad (29). To je izotonična raztopina soli, ki omogoča daljše shranjevanje polne krvi v hladilniku. Žal pa se je izkazalo, da povzroča motnje pri analizi metodi s sočasno uporabo protiteles anti-HbF in anti-CA, zato smo jo nadomestili s fiziološko raztopino in tako pripravljene kontrolne suspenzije uporabili za izvedbo meritev še isti dan ali pa najkasneje v 36 urah (31, 32).

Za spiranje in koncentriranje eritrocitov smo uporabljali laboratorijsko centrifugo DiaMed Diacent 12, nastavljeno na 1 minuto centrifugiranja pri 3000 obratih na minuto. Kot smo že omenili, smo pripravili 5-% suspenzije eritrocitov, pri čemer smo najprej pripravili suspenzije z enakih koncentracij tako RhD⁺ kot RhD⁻ eritrocitov. Koncentraciji suspenzij obeh raztopin celic smo določili s hematološkim števcem Abbot Cell Dyn 3200, nato pa ju redčili z dodajanjem Alsverjeve ohranitvene ali fiziološke raztopine tako, da smo izenačili celične koncentracije (29).

Za končno pripravo kontrolnih eritrocitnih suspenzij smo si pripravili deset epruvet in jih označili z vrednostmi deležev dodanih RhD⁺ plodovih eritrocitov v suspenziji RhD⁻ odraslih eritrocitov. Te vrednosti so bile: 0-%, 0,0375-%, 0,075-%, 0,15-%, 0,3-%, 0,6-%, 1,2-%, 2,4-%, 4,8-% in 9,6-%. V epruveti, označeni z 0-%, je bila suspenzija RhD⁻ odraslih eritrocitov. V epruveto z oznako 9,6-% smo odpipetirali 2 mL suspenzije RhD⁻ odraslih eritrocitov, v vse ostale pa po 1 mL. Nato smo iz epruvete z oznako 9,6-% odvzeli 192 µL suspenzije in jo zavrgli, ter v epruveto dodali 192 µL suspenzije RhD⁺ plodovih eritrocitov. Vsebino smo dobro premešali, 1 mL suspenzije prenesli v epruveto z oznako 4,8-% ter

mešanico dobro premešali. Nato smo 1 mL te suspenzije prenesli v epruveto z oznako 2,4-% ter postopek ponavljali do zadnje epruvete, iz katere odvzamemo 1 mL in ga zavržemo. Tako smo pripravili serijo suspenzijskih mešanic RhD⁺ plodovih in RhD⁻ odraslih eritrocitov. Vsaka od njih je vsebovala po 1 mL celične suspenzije (29).

3.5. Statistične metode

Rezultate smo uredili, analizirali in grafično predstavili s statističnim programom GraphPad Prism[®] Version 6.05 in izvedli nekaj statističnih analiz z MedCalc[®].

Najprej smo primerjali rezultate meritev kontrolnih suspenzij RhD⁺ plodovih eritrocitov, ki smo jih pridobili z obstoječo metodo s protitelesi anti-RhD, in tiste, izmerjene z novim postopkom, ob uporabi protiteles anti-HbF in anti-CA. Nato smo izvedli še meritve v kliničnih vzorcih pacientk, nosečnic oz. porodnic. Tudi v tem primeru smo primerjali izsledke obeh omenjenih metod, poleg tega pa smo za statistično analizo pridobili tudi rezultate testa Kleihauer-Betke (KBT).

Enakovrednost povprečij rezultatov primerjanih analiznih metod, s tem pa njuno primerljivost, preverjamo s **T-testom**, imenovanim tudi Studentov t-test. Ta test je načeloma primeren za preverjanje razlik med razmeroma majhnimi skupinami rezultatov ($n < 30$), z njim pa testiramo hipoteze. Je parametričen test, ki ga lahko uporabljamo kadar so naši rezultati normalno porazdeljeni. Ničelna hipoteza (H_0) pri dvostranskem testiranju pravi, da sta aritmetični sredini primerjanih vzorcev enaki, alternativna (H_a) pa, da sta različni.

Parametrični T-test je lahko enostranski ali dvostranski, pri testiranju pa moramo določiti stopnjo tveganja (α). Ta je običajno 0,05 ali 5 % in predstavlja tveganje, ki je povezano s tem, da nismo 100 % prepričani v neko trditev, temveč le 95 % ($\alpha = 0,05$). Kadar je torej izračunana vrednost p manjša od stopnje tveganja ($p < 0,05$), pravimo, da je test statistično značilen, zato ničelno hipotezo zavrnilo in sprejmemo alternativno. V obratnem primeru, ko je vrednost p večja od stopnje tveganja ($p > 0,05$), pa velja, da test ni statistično značilen, zato ničelne hipoteze ne zavrnilo oz. jo privzamemo. Za potrebe naše statistične analize smo postavili naslednji hipotezi:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 \rightarrow$ primerjani analizni metodi sta enaki, saj z njima izmerimo enake vrednosti;

$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \rightarrow$ primerjani analizni metodi nista enaki, saj z njima ne izmerimo enakih vrednosti.

Pri vseh meritvah smo najprej preverili normalnost porazdelitev meritev, za kar smo uporabili Shapiro-Wilkov test. Kadar je pri analizi vrednost p statistično značilna, torej večja od 0,05 ($p > 0,05$), gre za normalno porazdelitev, kadar pa je manjša od te vrednosti ($p < 0,05$), pa temu ni tako. Zavedali smo se možnosti, da statistično ne bomo mogli dokazati, da gre za normalno porazdelitev, saj ne moramo izvajati meritev nižjih od vrednosti 0 in s tem ne moremo dobiti celotne krivulje normalne porazdelitve. T-test pa smo izbrali tudi zato, ker so ga avtorji uporabili pri vseh dosedanjih študijah primerjave analiznih metod za določanje fetomaternalne krvavitve.

Za primerjavo dveh analiznih metod smo izvedli tudi **Bland-Altmanov test** in izrisali pripadajoče grafe, ki temeljijo na razlikah povprečnih vrednosti meritev (os y) proti samim povprečnim vrednostim (os x). Razlike povprečnih vrednosti meritev, pridobljenih s primerjanima metodama, naj bi ležale znotraj 95 % intervala ujemanja in kazale kar najmanj sipanja okoli linije povprečnega neujemanja med primerjanimi meritvami (biasa). Pri tem je pomembno, da je 95 % interval ujemanja čim ožji in sta njegovi spodnja in zgornja meja čim bolj enako oddaljeni od linije povprečnega neujemanja.

Stopnjo povezanosti med primerjanima spremenljivkama smo ocenjevali s **korelacijo oz. Pearsonovim koeficientom korelacije, linearno regresijo**, ki temelji na metodi najmanjših kvadratov in **Demingovo regresijo**.

Korelacijski koeficient ali Pearsonov koeficient korelacije (r) opredeljuje smer in jakost povezave med spremenljivkama, njegove vrednosti pa se gibljejo med -1 in 1.

Z **linearno regresijo** ocenjujemo stopnjo linearne povezanosti med dvema spremenljivkama. Pri tem prilagodimo vrednosti naklona in presečišča ($x = 0$) premice tako, da poiščemo njen potek, ki kar najbolj napoveduje vrednosti spremenljivke y v odvisnosti od x . Stopnjo linearne povezanosti lahko opredelimo tudi s kvadratom koeficienta korelacije, ki ga imenujemo koeficient determinacije (R^2). Koeficient determinacije R^2 lahko interpretiramo kot del variance, ki je porazdeljena med obema spremenljivkama. Če je njegova vrednost 1, je povezanost med njima popolna oz. funkcijska, če pa je vrednost 0, pa med seboj nista povezani.

Demingova regresija, za razliko od linearne, ne minimalizira le kvadratov razlik v smeri y (pri linearni regresiji namreč predpostavljamo, da je spremenljivka x brez napak), temveč

tako v smeri x in y , saj temelji na predpostavki, da sta obe spremenljivki podvrženi napakam. Zaradi tega predstavlja v našem primeru primernejše orodje za ugotavljanje stopnje linearne povezanosti med primerjanimi analiznimi metodami (33).

4. Rezultati in razprava

Želeli smo oceniti primerljivost rezultatov, dobljenih z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA in s protitelesi anti-RhD. Primerjali smo meritve večih serij kontrolnih suspenzij eritrocitov krvodajalca s krvno skupino 0 RhD⁻, ki so vsebovale znane deleže RhD⁺ plodovih eritrocitov. Nato smo primerjali tudi rezultate izmerjene v vzorcih krvi pacientk z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA s tistimi Kleihauer–Betke testom in z metodo s protitelesi anti-RhD.

Pri vsakem analiziranem vzorcu smo s pretočno citometrijo pridobili več citogramov in tabele izmerjenih vrednosti deležev celic v posameznih delih citogramov.

Izmerjene vrednosti deležev plodovih eritrocitov smo nato preračunali v mL s pomočjo naslednje formule:

$$\text{Volumen fetomaternalne krvavitve [mL]} = \frac{\% \text{ plodovih eritrocitov}}{100} \times 5.000 \text{ mL}$$

Primer izračuna: izmerili smo 0,6 % plodovih eritrocitov, kar pomeni prisotnost 30 mL plodove krvi v materinem krvnem obtoku. Vrednost 5.000 mL je ocena celotnega volumna krvi matere. Ta varira med 5.000 in 5.800 mL in je odvisen od telesne teže matere. Volumen krvi niha tudi tekom nosečnosti, vendar pa njegovala približna ocena, to je 5.000 mL, zadošča za opredelitev obsežnosti fetomaternalne krvavitve in s tem za nadaljnje ukrepanje. Tovrstne izračune smo uporabili za statistično primerjavo rezultatov, dobljenih z različnimi metodami pri vzorcih kliničnih primerov.

4.1. Umeritvena krivulja

Pri trenutno rutinsko uporabljani metodi s protitelesi anti-RhD se za umeritev in kontrolo analiznega postopka pripravljajo suspenzije eritrocitov, ki smo jih na enak način izdelali in uporabili tudi za ocenjevanje primerljivosti in korelacije med omenjeno in novo metodo. V postopku priprave kontrolnih suspenzij smo v posamezni seriji izdelali deset vzorcev z naraščajočimi deleži RhD⁺ plodovih eritrocitov v suspenziji RhD⁻ eritrocitov darovalca s krvno skupino 0, in sicer 0-%, 0,0375-%, 0,075-%, 0,15-%, 0,3-%, 0,6-%, 1,2-%, 2,4-%,

4,8-% in 9,6-%. Za umeritvene krivulje pa smo nato uporabili le tiste z 0,15-%, 0,3-%, 0,6-%, 1,2-%, 2,4-% in 4,8-% ter negativno kontrolo, ki ni vsebovala RhD⁺ plodovih eritrocitov.

Po meritvah prvih dveh kontrolnih suspenzij smo ugotovili, da je Alsverjeva ohranitvena raztopina, ki smo jo uporabili za njuno pripravo, interferirala z meritvami, saj so se na citogramu pojavile neznačilne celične populacije, ki jih po večkratnem spiranju eritrocitov in s tem odstranitvi omenjene raztopine nismo več opazili. Zato smo nadaljnje serije kontrolnih suspenzij pripravili brez Alsverjeve ohranitvene raztopine. Nadomestili smo jo s fiziološko raztopino. S tem smo skrajšali čas obstojnosti eritrocitov, zato smo meritve izvedli najkasneje v 36 urah.

Kot problematična se je izkazala tudi nizka koncentracija eritrocitov (okoli $0,4 \times 10^{12}$ eritrocitov/L) v pripravljenih suspenzijah. Ta je vsaj 10-krat manjša od tiste, ki je normalno prisotna v polni krvi (med $4,2 \times 10^{12}$ in $8,8 \times 10^{12}$ /L). Zaradi majhnega števila celic v kontrolnem vzorcu se je čas analize podaljšal, poleg tega se nam je zgodilo tudi to, da kljub porabi celotnega vzorca nismo uspeli izmeriti dovolj celic za zanesljivo analizo. Ker komplet Fetal Cell Count® predvideva uporabo vzorcev polne krvi, smo kontrolne suspenzije pred analizo koncentrirali s centrifugiranjem, in sicer 3 minute na 300 g, nato pa celice resuspendirali v 50 mL fiziološke raztopine (0,9-% NaCl). S tem smo zagotovili zadostno število celic v vzorcu za njihovo nemoteno in zanesljivo analizo.

Izmerjene vrednosti deležev (%) plodovih eritrocitov v kontrolnih vzorcih so prikazane v Preglednici II.

Preglednica II: Meritve vzorcev kontrolnih suspenzij za primerjav umeritvenih krivulj.

	Serija 1		Serija 2		Serija 3		Serija 4		Serija 5		Serija 6		Serija 7	
Dejanski deleži Erc suspenzij [%]	anti-RhD	anti-HbF/anti-CA												
0	0,07	0,08	0,07	0,09	0,05	0,18	0,06	0,11	0,04	0,11	0,01	0,10	0,03	0,09
0,15	0,22	0,34	0,15	0,31	0,2	0,37	0,20	0,21	0,21	0,32	0,18	0,28	0,14	0,19
0,3	0,38	0,4	0,27	0,22	0,31	0,49	0,37	0,38	0,36	0,50	0,32	0,36	0,26	0,30
0,6	0,71	0,72	0,44	0,32	0,62	0,69	0,66	0,65	0,68	0,63	0,69	0,59	0,50	0,54
1,2	1,3	1,31	0,77	0,5	1,26	1,26	1,25	1,00	1,32	1,21	1,23	1,15	0,87	0,84
2,4	2,53	2,3	1,61	1,24	2,44	2,48	2,57	2,53	2,52	2,15	2,54	2,41	1,80	1,68
4,8	4,84	4,16	3,18	2,47	4,8	4,54	5,00	4,03	5,04	4,18	4,93	4,53		3,29

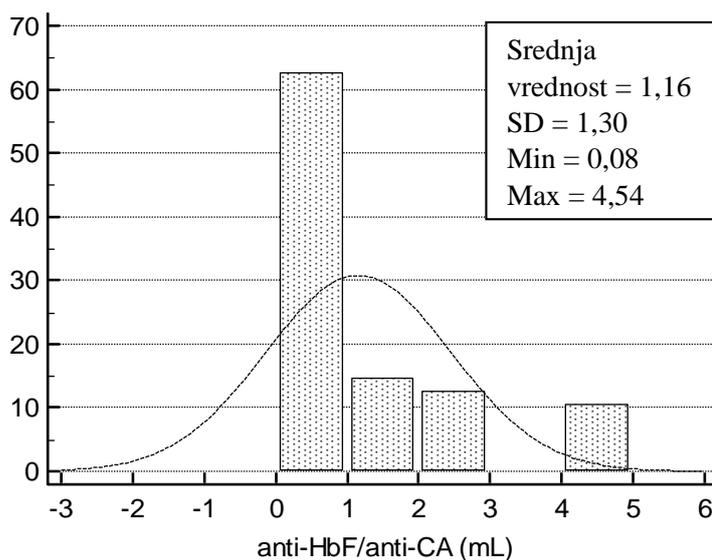
T-test

V statistično analizo smo vključili vseh 96 meritev, narejenih v sedmih serijah pripravljenih suspenzij. Z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA in tisto s protitelesi anti-RhD smo tako dobili 48 rezultatov in jih med seboj primerjali s parnim dvostranskim T-testom. S tem smo preverjali enakost aritmetičnih sredin primerjanih vzorcev oz. ničelne in alternativne hipoteze:

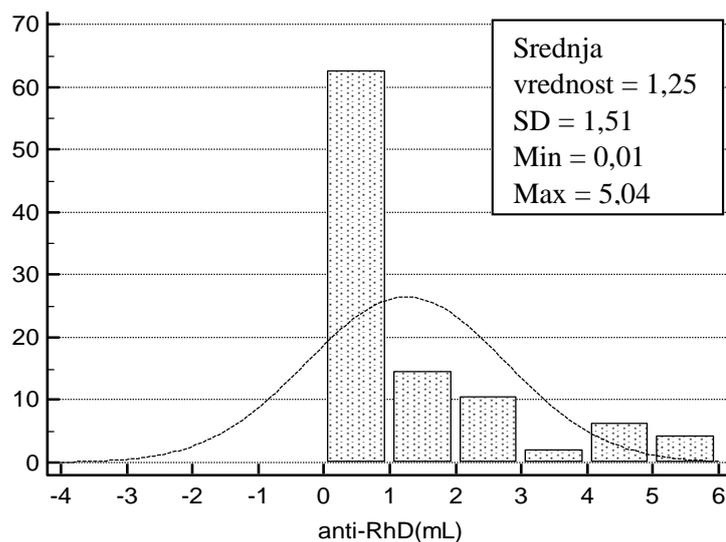
$H_0: \mu_1 = \mu_2 \rightarrow$ metodi sta enaki – z obema izmerimo enake vrednosti;

$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \rightarrow$ metodi nista enaki – z obema ne izmerimo enakih vrednosti.

Najprej smo s Shapiro-Wilkovim testom preverili ali se vrednosti meritev porazdeljujejo normalno. Ugotovili smo, da se meritve z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA ne porazdeljujejo normalno, saj smo dobili vrednost p ($p < 0,0001$) manjšo od 0,05. Prav tako pa smo dobili tudi pri metodi s protitelesi anti-RhD vrednost p ($p < 0,0001$) manjšo od 0,05. Takšen rezultat je bil povsem pričakovan, saj so bili vsi rezultati naših meritev večji od 0, negativnih vrednosti pa ne moremo izmeriti. Grafična predstavitev rezultatov omenjenega testa v grafih 1 in 2 pa nam prikazuje simulirano normalno porazdelitev meritev.



Graf 1: Oblika porazdelitve meritev kontrolnih umeritvenih suspenzij z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA.

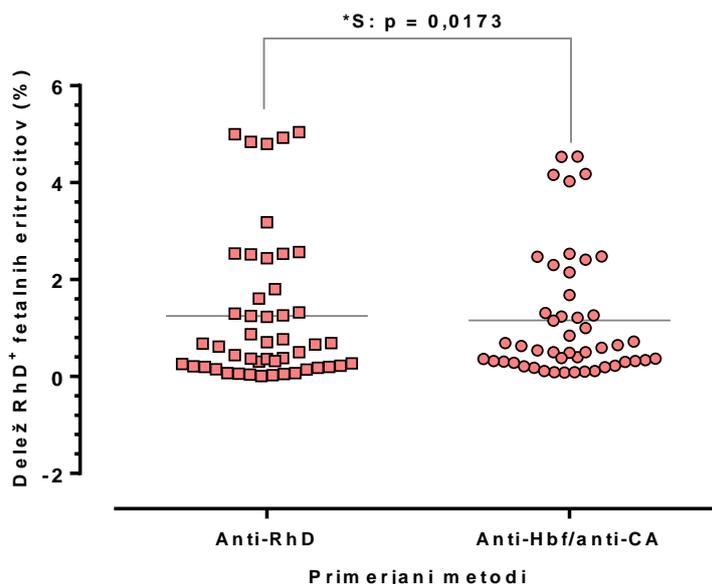


Graf 2: Oblika porazdelitve meritev kontrolnih umeritvenih suspenzij z metodo s protitelesi anti-RhD.

Preglednica III: Rezultati parnega dvostranskega T-testa za primerjavo metode s protitelesi anti-HbF/anti-CA s tisto s protitelesi anti-RhD

Parni dvostranski T-test	
P vrednost	0,02
Statistično značilna razlika? ($P < 0.05$)	Da
Dvostranski test, vrednost t in df = stopnje prostosti	t=2,47 df=47
Število primerjanih parov meritev	48

Podatki v Preglednici III kažejo, da obstaja med primerjanima metodama statistično značilna razlika, saj je vrednost P manjša od stopnje tveganja α , zato ničelno hipotezo zavržemo in sprejmemo alternativno. Rezultate smo prikazali tudi grafično, v Grafu 1.



Graf 3: Grafični prikaz analize rezultatov meritev kontrolnih suspenzij plodovih eritrocitov s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA.

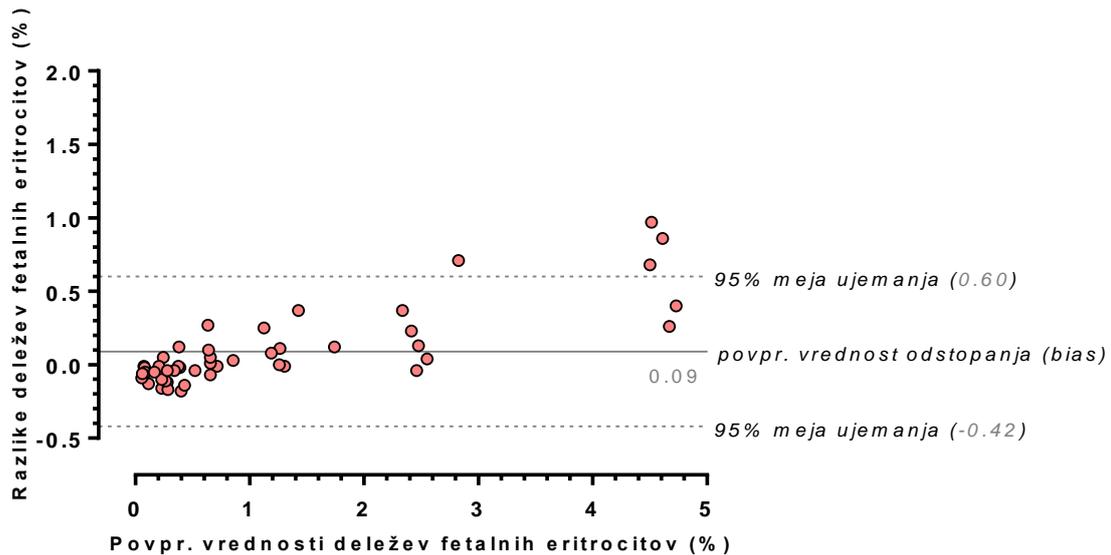
Bland-Altmanov test

Za primerjavo analiznih metod smo izvedli tudi Bland-Altmanov test, s katerim smo analizirali razlike povprečnih vrednosti meritev proti samim povprečnim vrednostim. Omenjeni rezultati naj bi ležali znotraj 95 % intervala ujemanja in kazale kar najmanjše sipanje okoli linije povprečnega neujemanja (biasa). Interval 95 % ujemanja mora biti čim ožji, prav tako naj bi bili zgornja in spodnja meja čim bolj enakomerno oddaljeni od linije povprečnega neujemanja.

Preglednica IV: Bland-Altmanov test – povprečna vrednost odstopanja (bias) med primerjanimi razlikami meritev ter 95 % interval ujemanja za metodi s protitelesi anti-RhD in s protitelesi anti-HbF/anti-CA pri meritvah kontrolnih suspenzij.

Povprečna vrednost odstopanja (bias)	0,09
SD biasa	0,26
95 % interval ujemanja	od -0,42 do 0,60

Iz podatkov v Preglednici IV lahko razberemo, da je izračunana povprečna vrednost odstopanja majhna 0,09, 95 % interval ujemanja pa je razmeroma velik, kar kaže na dobro primerljivost rezultatov, izmerjenih s primerjanima metodama.



Graf 4: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev vseh sedmih kontrolnih suspenzij z metodama s protitelesi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA.

Graf 2 grafično prikazuje povprečne vrednosti odstopanj med posameznimi meritvami. Pri majhnih vrednostih deležev plodovih RhD⁺ eritrocitov v krvnih suspenzijah vidimo veliko manjše sipanje rezultatov, ki se nahajajo nekoliko pod linijo povprečne vrednosti odstopanja (bias), blizu vrednosti 0. Žal pa opazimo tudi naraščajoči trend odstopanja vseh s povečanjem povprečnih vrednosti deležev RhD⁺ eritrocitov v vzorcih. Zelo neugodno je, da se nad povprečno vrednostjo 2,8 kar štiri od šestih izračunih razlik pojavijo nad zgornjo 95 % mejo intervala ujemanja. Klinično pa so sicer pomembnejši manjši deleži plodovih eritrocitov, ko je potrebna zanesljiva potrditev ali gre za fetomaternalno krvavitev ali ne in kolikšen odmerek zaščitnih imunoglobulinov anti-RhD potrebujemo. Trenutno se namreč v Republiki Sloveniji pri fetomaternalni krvavitvi v obsegu do 30 mL injicira le en odmerek zaščitnih protiteles, v primerih, ko je krvavitev obsežnejša, torej večja od 30 mL, pa moramo temu potrebno prilagoditi tudi odmerek imunoglobulinov anti-RhD. Tako nosečnica oz. otročnica prejme dve ali celo tri zaščitne odmerke protiteles. Kadar gre za zelo masivno fetomaternalno krvavitev, kar pomeni, da je volumen plodove krvi v materinem krvnem obtoku 150 mL, pa natančen podatek o volumnu krvavitve klinično ni več pomemben. V tem primeru je namreč pomembno zgolj to, da vemo, da gre za zelo obsežno krvavitev, ki potrebuje nujno in hitro ukrepanje.

Pearsonov koeficient korelacije, linearna in Demingova regresija

Stopnjo povezanosti med primerjanima analitičnima metodama smo ocenjevali s korelacijo oz. Pearsonovim koeficientom korelacije, linearno regresijo, ki temelji na metodi najmanjših kvadratov in Demingovo regresijo.

S pomočjo korelacijske analize smo izračunali Pearsonov koeficient korelacije in dobili vrednost 0,99, kar kaže na močno povezanost med rezultati, izmerjenimi z obema primerjanima metodama.

Z linearno regresijo ocenjujemo stopnjo linearne povezanosti med dvema spremenljivkama, ki jo lahko opredelimo tudi s koeficientom determinacije (R^2). Pri primerjavi rezultatov meritev umeritvenih suspenzij z obema metodama smo določili naslednje vrednosti:

Enačba premice: $Y = 0,85 * X + 0,09$

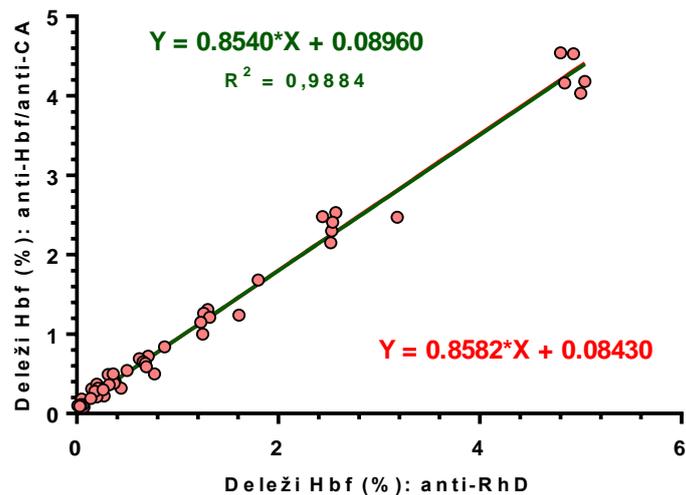
Koeficient determinacije: $R^2 = 0,99$

Vrednost R^2 je blizu 1, kar kaže na veliko stopnjo povezanosti med primerjanima spremenljivkama, ki je blizu popolne oz. funkcijske.

Tudi z Demingovo regresijo smo določili praktično enako stopnjo linearne povezanosti med primerjanima analiznima metodama, saj smo izračunali naslednjo enačbo:

$Y = 0,86 * X + 0,084$.

Linearna in Demingova regresija



Graf 5: Grafični prikaz rezultatov linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premic in vrednostjo R^2 .

Razlika med enačbama premic, izračunanima z linearno in Demingovo regresijo, je majhna. Ker Demingova regresija temelji na predpostavki, da sta obe spremenljivki podvrženi napakam, je primernejša za ugotavljanje stopnje linearne povezanosti med primerjanima analiznima metodama.

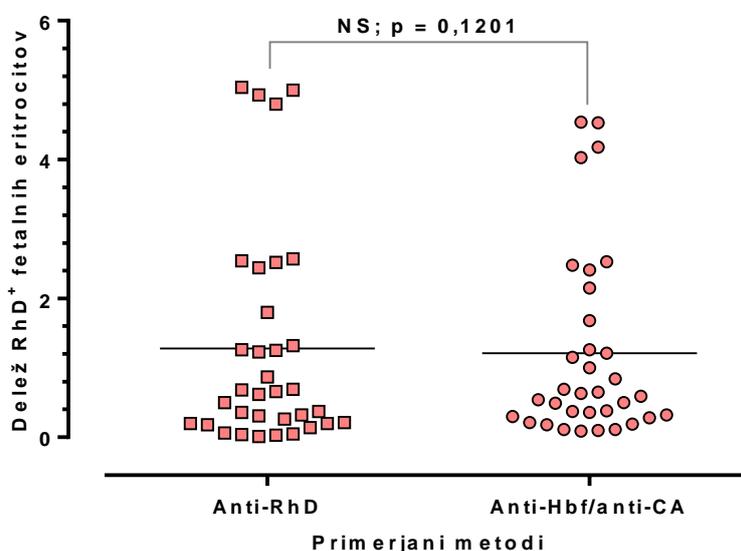
Ker smo prvi dve seriji kontrolnih suspenzij pripravili z Alsverjevo raztopino, ki je interferirala z meritvami in smo jo zato kasneje poskušali odstraniti s spiranjem, smo se odločili, da bomo enako statistično analizo izvedli še z rezultati, izmerjenimi v vzorcih zadnjih petih kontrolnih serij (serije 3-7). Na ta način smo v analizo vključili 68 rezultatov oz. po 34 za vsako od primerjanih analiznih metod. Rezultate dvostranskega parnega T-testa prikazuje Preglednica V.

T-test

Preglednica V: Rezultati parnega dvostranskega T-testa za primerjavo metode z anti-HbF/anti-CA in tisto s protitelesi anti-RhD, ob upoštevanju le zadnjih petih serij umeritvenih kontrolnih suspenzij.

Parni dvostranski T-test	
P vrednost	0,12
Statistično značilna razlika? ($P < 0.05$)	Ne
Dvostranski test, vrednost t in df = stopnje prostosti	t=1,60 df=33
Število primerjanih parov meritev	34

Vidimo, da med rezultati, določenimi z obema metodama ni statistično značilnih razlik, saj je vrednost P večja od stopnje tveganja α , zato ničelne hipoteze ne moremo zavreči, ampak jo privzamemo. Zato sklepamo, da z obema analiznima metodama dobimo enake rezultate. Rezultate statistične analize smo prikazani tudi grafično, in sicer v Grafu 4.



Graf 6: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kontrolnih suspenzij plodovih eritrocitov s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA, ob upoštevanju zadnjih petih serij.

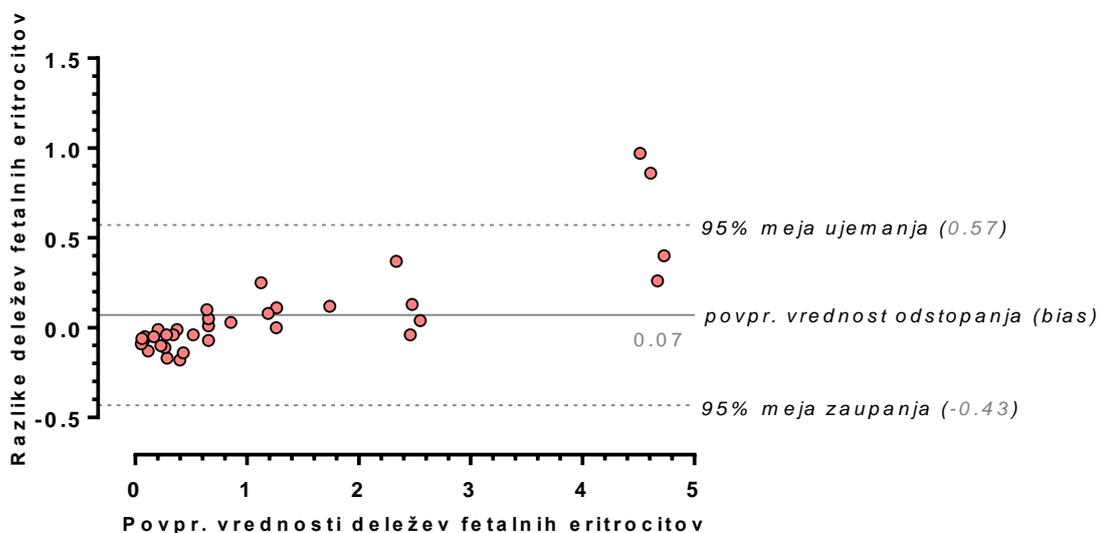
Bland-Altmanov test

Izvedli smo tudi Bland-Altmanov test in rezultate zbrali v Preglednici VI.

Preglednica VI: Bland-Altmanov test - povprečna vrednost odstopanja (bias) med primerjanimi razlikami meritev ter zgornja in spodnja meja 95 % intervala ujemanja med metodama anti-RhD in anti-HbF/anti-CA pri meritvah petih kontrolnih suspenzij.

Povprečna vrednost odstopanja (bias)	0,07
SD biasa	0,26
95 % meja ujemanja	od -0,43 do 0,57

Na osnovi predstavljenih podatkov lahko ugotovimo, da je izračunana povprečna vrednost odstopanja (bias) 0,07, 95 % interval ujemanja pa je razmeroma ozek in simetričen glede na bias. Graf 5 prikazuje Bland-Altmanov graf, na katerem sicer še vedno vidimo naraščajoči trend odstopanja razlik izmerjenih deležev RhD⁺ eritrocitov s povečanjem njihovih povprečnih vrednosti.



Graf 7: Bland-Altmanov test s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati meritev z metodama s protitelesi anti-RhD in protitelesi anti-HbF/anti-CA petih serij kontrolnih suspenzij.

Pearsonov koeficient korelacije, linearna in Demingova regresija

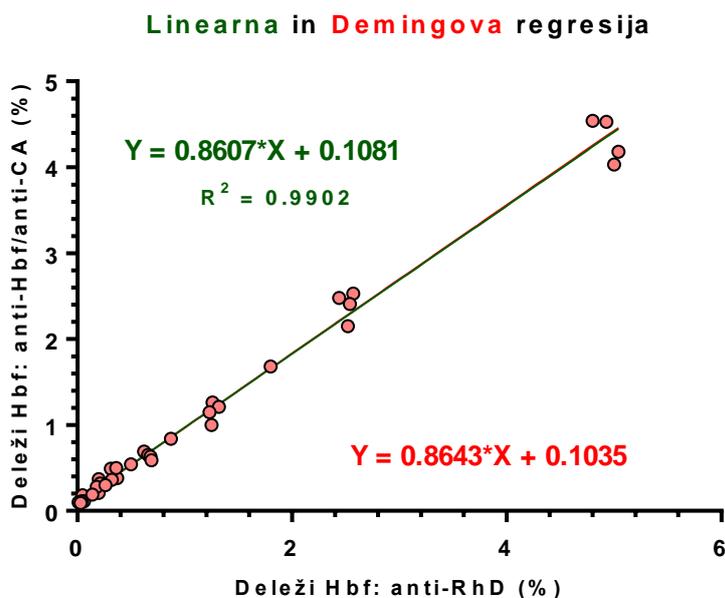
S primerjavo rezultatov, dobljenih s primerjanima analiznima metodama, s katerima smo analizirali vzorce zadnjih petih serij kontrolnih oz. umeritvenih suspenzij plodovih eritrocitov, smo izračunali naslednje vrednosti:

Pearsonov koeficient korelacije: 0,99

Enačba premice določene z linearno regresijo: $Y = 0,86 * X + 0,11$

Koeficient determinacije R^2 : 0,99

Enačba premice določene z Demingovo regresijo: $Y = 0,86 * X + 0,10$



Graf 8: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vrednostjo R^2 pri analizi rezultatov zadnjih petih serij kontrolnih suspenzij RhD⁺ plodovih eritrocitov.

Primerjava rezultatov statistične analize meritev deležev plodovih eritrocitov, ki smo jih določili s primerjanima analiznima metodama, in sicer tako v vseh sedmih serijah kontrolnih oz. umeritvenih suspenzij kot v samo zadnjih petih, je pokazala kar nekaj razlik. Prva je bila ta, da smo z analizo z dvostranskim parnim T-testom v primeru obravnave rezultatov vseh kontrolnih serij dobili statistično značilno razliko med primerjanima metodama in sprejeli alternativno hipotezo, ki predpostavlja, da primerjani analizni metodi ne dajeta enakih rezultatov. Nasprotno pa z enako analizo rezultatov, izmerjenih v zadnjih petih serijah, niso dobili statistično značilne razlike, zato ničelne hipoteze nismo mogli zavreči in smo jo privzeli ter s tem dokazali, da primerjani metodi zagotavljata enakovredne rezultate in sta zato povsem primerljivi. S primerjavo izidov Bland-Altmanovega testa smo prav tako potrdili večjo skladnost rezultatov, dobljenih s primerjanima metodama, ko smo analizirali samo pet serij umeritvenih suspenzij kot v primeru analize vseh serij umeritvenih suspenzij. Da je Alsverjeva raztopina, ki smo jo uporabili za pripravo prve in druge serije kontrolnih vzorcev, res vplivala na rezultate meritev, potrjujejo tudi statistične analize korelacije, linearne in Demingove regresije, s katerima smo določili linearnejšo povezanost med rezultati v primeru, ko smo obravnavali le pet serij kontrolnih oz. umeritvenih suspenzij.

Ugotovimo torej lahko, da za pripravo vzorcev, ki jih analiziramo z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, ni priporočljivo uporabiti Alsverjeve ohranitvene raztopine, saj ta očitno moti analizni postopek.

Z uporabljenimi statističnimi pristopi smo pokazali, da sta primerjani analizni metodi z uporabo protiteles anti-RhD in anti-HbF/anti-CA med seboj dobro primerljivi in da lahko z ustrežno verjetnostjo trdimo, da z njima dobimo enakovredne rezultate. Kljub temu pa so nas še vedno skrbele visoke vrednosti negativnih kontrol (Tabela 2), zato smo poskušali najti vzroke za tovrstne težave in morebitne napake. Možne vzroke za odstopanja in previsoke vrednosti negativnih kontrol smo iskali v tem, da smo v ta namen uporabili RhD⁻ kri nosečnice oziroma porodnice. Plodovi eritrociti naj bi se namreč med porodom pojavili v krvnem obtoku vseh porodnic, in sicer v različnih deležih. Med porodom namreč lahko pride do poškodbe posteljice in maternice, možne pa so tudi druge poškodbe matere in krvavitve (13). Razmišljali smo tudi o tem, da se lahko tekom nosečnosti zviša delež celic F. Te naj bi sicer z metodo pretočne citometrije z uporabo protiteles anti-HbF/anti-CA ločili, vendar pa bi bilo možno, da tega ne uspemo storiti, in sicer zaradi težav pri označevanju s protitelesi in zahtevnosti jasne postavitve mej med populacijami znotraj citograma. Eden od možnih vzrokov za previsoke vrednosti negativnih kontrol bi lahko bil tudi v tem, da so koncentracije plodovih eritrocitov v umeritvenih suspenzijah vsaj 10-krat nižje od tistih v polni krvi. Posledično smo uporabljali previsoko koncentracijo protiteles, zato bi lahko prišlo do njihove nespecifične vezave, s tem pa do lažno previsokih vrednosti. Prebitna oz. nevezana protitelesa smo sicer sprali, a možno bi bilo, da jih kljub temu nismo v celoti odstranili.

Pri meritvah negativnih kontrol ne bi smeli dobiti nobenega ali pa izjemoma zelo majhen signal v območju, kjer se v citogramu praviloma nahajajo plodovi eritrociti. Žal temu ni bilo tako, zato smo pripravili negativne kontrole še s krvjo RhD⁻ krvodajalca. Analizirali smo vzorec polne krvi odvzete v antikoagulant EDTA, pri čemer smo izbrali le moške RhD⁻ darovalce, izvedli vzporedne meritve in dobili naslednje rezultate: 0,04; 0,01; 0,04; 0,03; 0,02 in 0,03. Povprečna vrednost šestih meritev negativnih kontrol je bila 0,03, kar je bistveno manj kot v primeru kontrolnih suspenzij, pripravljenih iz krvi RhD⁻ nosečnic.

Pri našem delu se je pojavila tudi težava s prenizkimi vrednostmi v primeru visokih deležev plodovih eritrocitov (Preglednica II). Ta fenomen lahko razložimo z uporabo popkovnične krvi, odvzete ob porodu. Plodovi eritrociti namreč začno dozorevati, kar pomeni, da pride

do preklopa fetalne oblike hemoglobina (HbF) v odraslo (HbA) že nekaj tednov pred rojstvom otroka, zato je možno, da je signal za fetalni hemoglobin v takem vzorcu nižji od pričakovanega, saj nekateri otrokovi eritrociti vsebujejo že njegovo odraslo obliko (5).

4.2. Klinični primeri

Vzorci kliničnih primerov smo uporabili za primerjavo treh analiznih metod, testa Kleihauer-Betke (KBT), metode na pretočnem citometru, pri kateri uporabljamo monoklonsko protitelo anti-RhD, ter metodo na pretočnem citometru, pri kateri sočasno uporabljamo monoklonsko protitelo anti-HbF in poliklonsko protitelo anti-CA. Primerjava je bila izvedena zgolj informativo, z namenom, da bi pokazali reletivno enakovrednost analiznih metod. Rezultate testa Kleihauer-Betke smo dobili iz laboratorija, ki ga izvaja, preostale pa smo pridobili sami z meritvami. Rezultati so prikazani v Preglednici VII.

Preglednica VII: Vrednosti volumnov fetomaternalne krvavitve določene v vzorcih kliničnih primerov z metodami KBT, anti-RhD in anti-HbF/anti-CA. Vzorca 4 in 5 pripadata isti preiskovanki, a sta bila odvzeta v različnih časovnih obdobjih (takoj po porodu in en teden po njem). Nekaj rezultatov pridobiti z metodo anti-RhD nismo mogli.

Pacientka	Metode		
	anti-HbF/anti-CA [mL]	anti-RhD [mL]	KBT [mL]
1	0	0	0
2	4	0,5	12
3	9	9	14
4	286	/	320
5	194	/	141
6	5,5	2	< 30
7	3	2	5,4
8	1,5	0	7,7
9	0	/	0
10	2,05	/	0
11	38,5	43,5	40
12	29	/	34

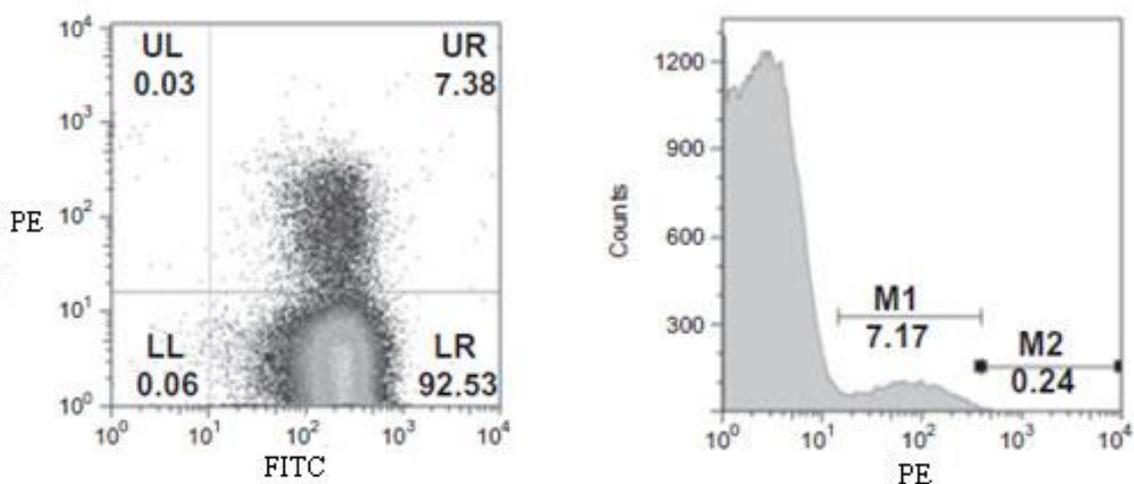
13	1	/	3,8
14	1	/	2,1
15	3	0	5
16	55	51,75	60
17	0,5	/	1,4
18	4,5	/	3,5

Rezultati, ki smo jih dobili z meritvami vzorca 4, so nas zelo presenetili, saj je v tem primeru očitno šlo za zelo obsežno fetomaternalno krvavitev. Njen obseg je bil 320 mL, ugotovljenim s testom Kleihauer-Betke, oziroma 286 mL, določeno z metodo anti-HbF/anti-CA. Z metodo s protitelesi anti-RhD nismo uspeli pridobiti ustreznih rezultatov, saj so z genetsko analizo dokazali prisotnost šibkega antigena RhD pri novorojenčku. Ta krvavitev je bila tako obsežna, da otrok ob akutni krvavitvi ne bi preživel. Novorojenček ima namreč 85 mL krvi na kilogram telesne teže, pri nedonošenčkih pa je ta volumen nekoliko večji (17). S pomočjo literature smo prišli do ugotovitve, da je šlo v tem primeru najverjetneje za kronično krvavitev, otrok pa si je nato ob ustreznem ukrepanju in transfuzijah opomogel. Po podatkih, pridobljenih na kliniki, je bil sicer anemičen, vendar ne tako izrazito, kot bi sklepali glede na rezultate testiranja na prisotnost fetomaternalne krvavitve. Kljub temu je bil skoraj dva tedna v bolnišnični oskrbi. Pridobili smo tudi podatke, da se količina plodovih eritrocitov v materini krvi v 14 dneh prepolovi, vendar pa so preostali lahko prisotni še 80 dni. Hitrost odstranjevanja plodovih eritrocitov pa je odvisna od skladnosti v krvnih skupinah AB0 in RhD, injiciranja zaščitnega odmerka imunoglobulinov anti-RhD in od časa, ko plodovi eritrociti vstopijo v materin krvni obtok (5). Po 12 dneh smo dobili še en vzorec materine krvi in v njem dokazali izrazito zmanjšanje volumna fetomaternalne krvavitve (194 mL določenih z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA in 141 mL določenih s testom Kleihauer-Betke).

V nekaterih vzorcih nismo mogli določiti deleža plodovih eritrocitov in volumna fetomaternalne krvavitve z metodo s protitelesi anti-RhD. V teh primerih je šlo bodisi za RhD⁻ matere, ki so nosile RhD⁻ otroka, v nekaterih primerih pa so bili prisotni šibki antigeni RhD, zaradi katerih nismo uspeli pridobiti ustreznih rezultatov. Prisotnost tovrstnih antigenov smo dokazali z genetskimi preiskavami. Za vse te vzorce pa se je kot zelo uporabna izkazala metoda s protitelesi anti-HbF/anti-CA, ki omogoča tudi natančnejše

določanje obsega fetomaternalne krvavitve kot test Kleihauer-Betke. Poleg tega ima ta metoda še druge prednosti.

Ena od teh je β -talasemija, ki je avtosomna recesivna dedna bolezen, pri kateri je zmanjšana ali odsotna sinteza β verig hemoglobina, prisotni pa so nekateri abnormalni hemoglobini. Med njimi je lahko tudi hemoglobin F. Zato lahko dobimo pri analizi takšnega vzorca na prisotnost fetomaternalne krvavitve s testom Kleihauer-Betke, lažno pozitiven rezultat. Kadar za testiranje uporabimo metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, lahko celice F praviloma dobro ločimo od plodovih eritrocitov. V citogramu bolnikov z β -talasemijo imamo celice F prisotne v zgornjem desnem kvadrantu citograma (Slika 11). V kolikor pa analiziramo citogram intenzitete fluorescirajoče svetlobe, pa opazimo manjšo intenziteto le-te pri F celicah kot pri plodovih eritrocitih (Slika 11). Vzrok za to je manjša vsebnost HbF v F celicah kot v plodovih eritrocitih (9). β -talasemija nam sicer lahko povzroča nekaj preglavic, saj v citogramih ne moremo čisto natančno postaviti mej in posledično morda ne ločimo najbolje med plodovimi eritrociti in celicami F. Morda smo tudi v naših primerih obravnavali kakšno izmed nosečnic ali otročnic z β -talasemijo. Kakorkoli že, se z uporabo pretočne citometrije s protitelesi anti-HbF/anti-CA hkrati z ugotovljenim obsegom fetomaternalne krvavitve ponuja tudi možnost diagnostike in odkrivanje β -talasemije.



Slika 11: Citograma pri pacientu z β -talasemijo. Na levem citogramu so celice F prisotne v zgornjem desnem kvadrantu (UR). Na desnem citogramu prikazuje območje M1 prisotnost celic F, ki kažejo bistveno manjšo intenziteto fluorescirajoče svetlobe kot plodovi eritrociti (M2) (9).

T-test

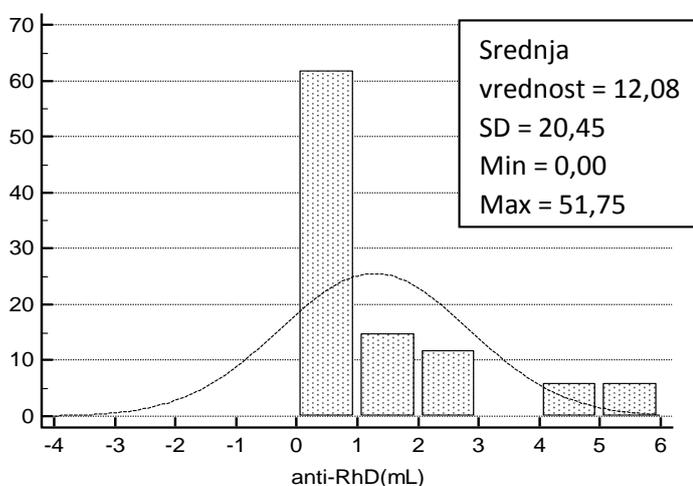
Rezultate analiz kliničnih vzorcev smo primerjali med seboj s parnim dvostranskim T-testom in na ta način preverjali enakost aritmetičnih sredin. Postavili smo ničelno in alternativno hipotezo:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 \rightarrow$ metodi sta enaki – z obema izmerimo enake vrednosti;

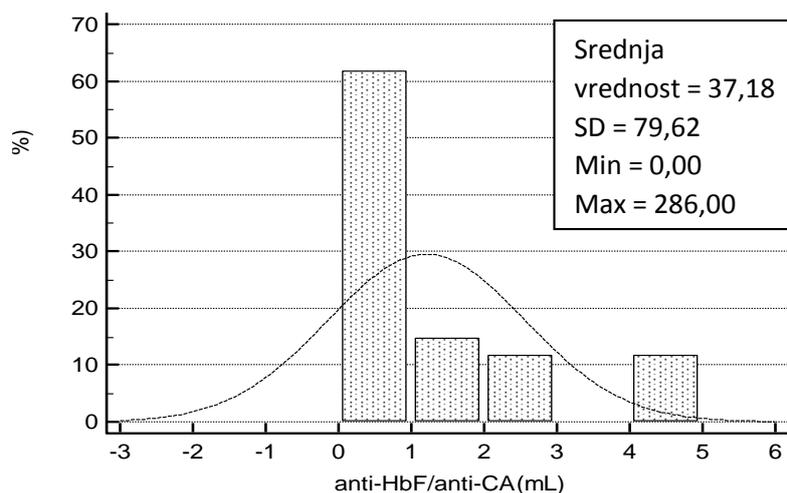
$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \rightarrow$ metodi nista enaki – z obema ne izmerimo enakih vrednosti.

V statistično analizo primerjave rezultatov dobljenih s testom Kleihauer-Betke in z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA smo lahko vključili 34 izmerjenih vrednosti, v primeru primerjave rezultatov dobljenih s testom Kleihauer-Betke in z metodo s protitelesi anti-RhD 16 in pri primerjavi metode s protitelesi anti-HbF/anti-CA in tiste s protitelesi anti-RhD 18. Rezultati parnega T-testa med primerjanimi metodami so prikazani v Preglednici VIII.

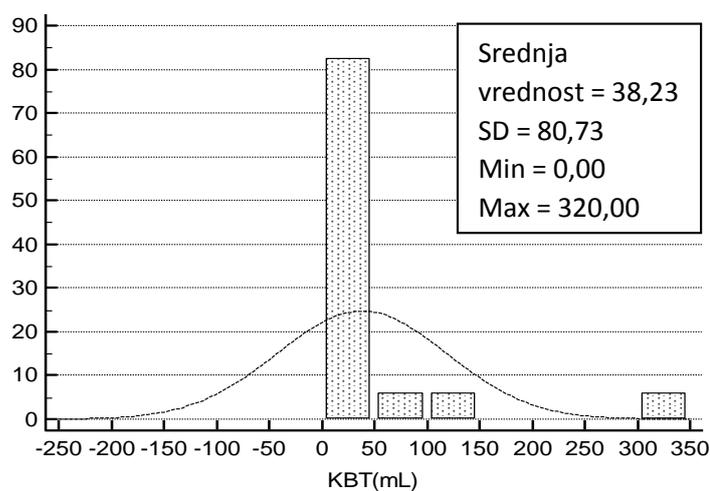
Najprej smo s Shapiro-Wilkovim testom preverili ali se vrednosti meritev porazdeljujejo normalno. Ugotovili smo, da se meritve z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA ne porazdeljujejo normalno, saj smo dobili vrednost p manjšo od 0,05 ($p < 0,0001$). Enak rezultat smo dobili tudi pri metodi s protitelesi anti-RhD in KBT ($p < 0,0001$). Kot smo že omenili, je bil tak rezultat povsem pričakovan, saj so bili vsi rezultati naših meritev večji od 0, ker negativnih vrednosti ne moremo izmeriti. Grafična predstavitev Shapiro-Wilkovega testa v grafih 9, 10 in 11, prikazuje simulirane normalne porazdelitve meritev



Graf 9: Oblika porazdelitve meritev kliničnih primerov pacientk z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA.



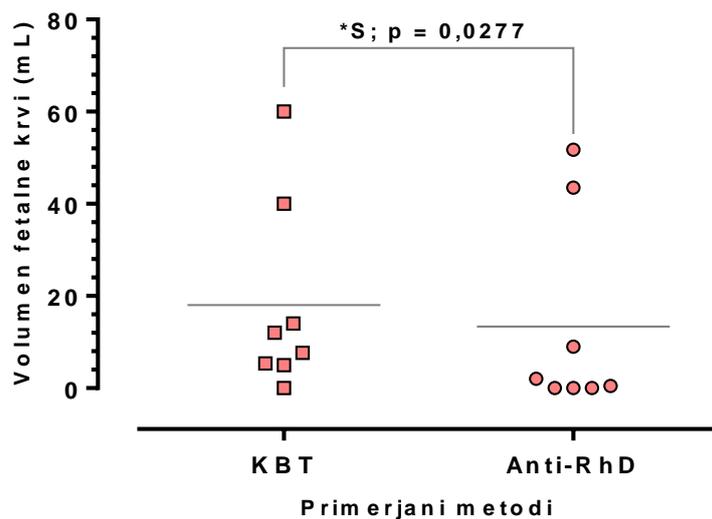
Graf 10: Oblika porazdelitve meritev kliničnih primerov pacientk z metodo s protitelesi anti-RhD.



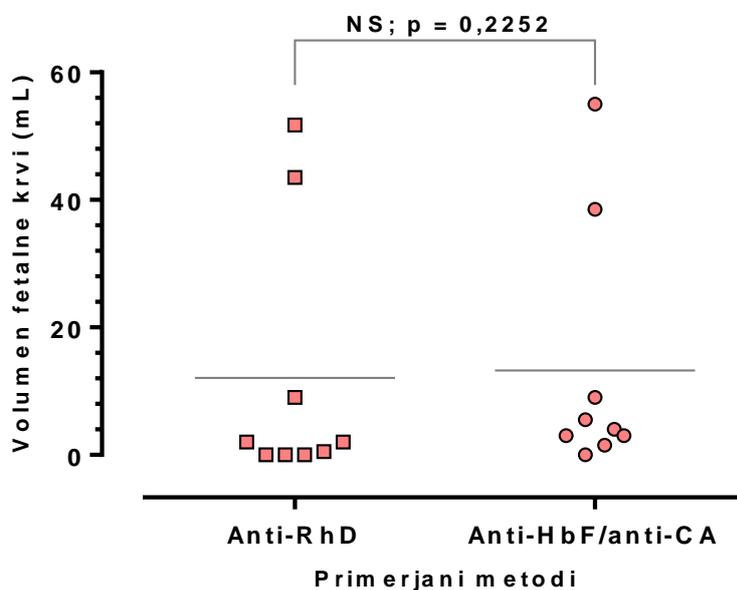
Graf 11: Oblika porazdelitve meritev kliničnih primerov pacientk z metodo KBT.

Preglednica VIII: Rezultati parnega dvostranskega T-testa za primerjavo analizne metode KBT z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, KBT z metodo s protitelesi anti-RhD in metod s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD.

Parni dvostranski T-test	KBT in anti-HbF/anti-CA	KBT in anti-RhD	anti-HbF/anti-CA in anti-RhD
P vrednost	0,79	0,03	0,26
Statistično značilna razlika? (P < 0.05)	Ne	Da	Ne



Graf 13: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-RhD in KBT.



Graf 14: Grafični prikaz statistične analize rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk s parnim dvostranskim T-testom za primerjani metodi s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD.

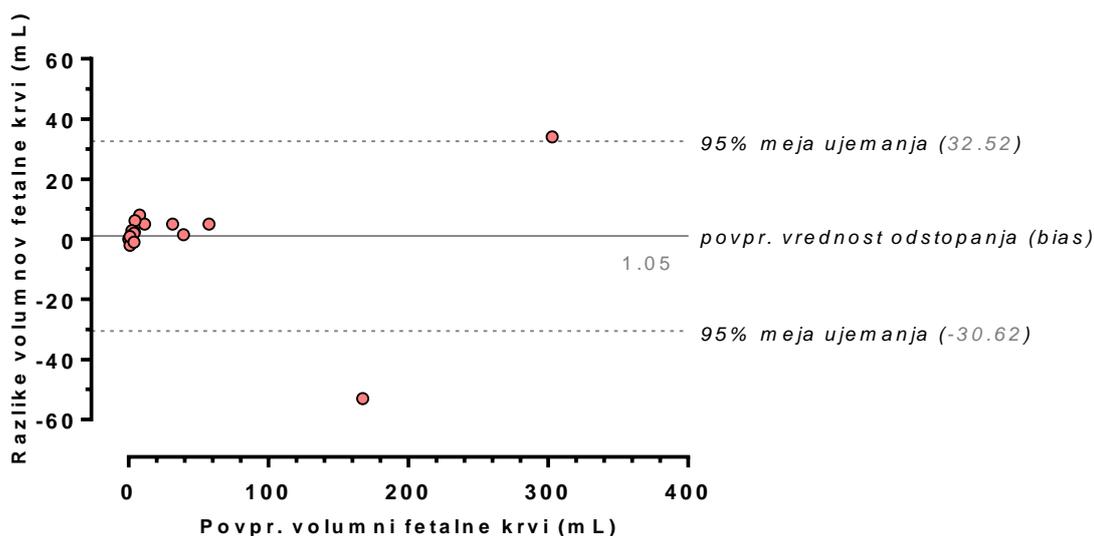
Bland-Altmanov test

Za primerjavo rezultatov kliničnih vzorcev pacientk, ki smo jih izvedli z različnimi analiznimi metodami smo uporabili tudi Bland-Altmanov test. Vrednosti statistične analize so prikazane v Preglednici IX.

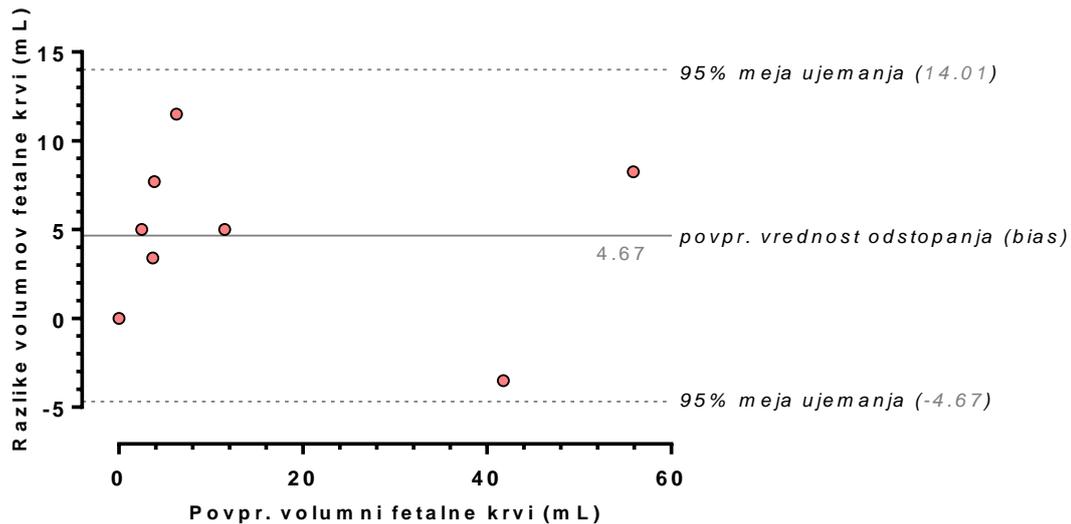
Preglednica IX: Bland-Altmanov test - povprečne vrednosti odstopanja (bias) med primerjanimi razlikami meritev ter spodnja in zgornja meja 95 % intervala ujemanja za analizi metode KBT in s protitelesi anti-HbF/anti-CA, KBT in metodo s protitelesi anti-RhD ter metodama s protitelesoma anti-HbF/anti-CA in anti-RhD pri meritvah kliničnih vzorcev pacientk.

Bland-Altmanov test	KBT in anti-HbF/anti-CA	KBT in anti-RhD	anti-HbF/anti-CA in anti-RhD
Povprečna vrednost odstopanja (bias)	1,05	4,67	-1,19
SD biasa	16,11	4,77	2,72
95 % interval ujemanja	od -30,52 do 32,62	od -4,67 do 14,01	od -6,54 do 4,15

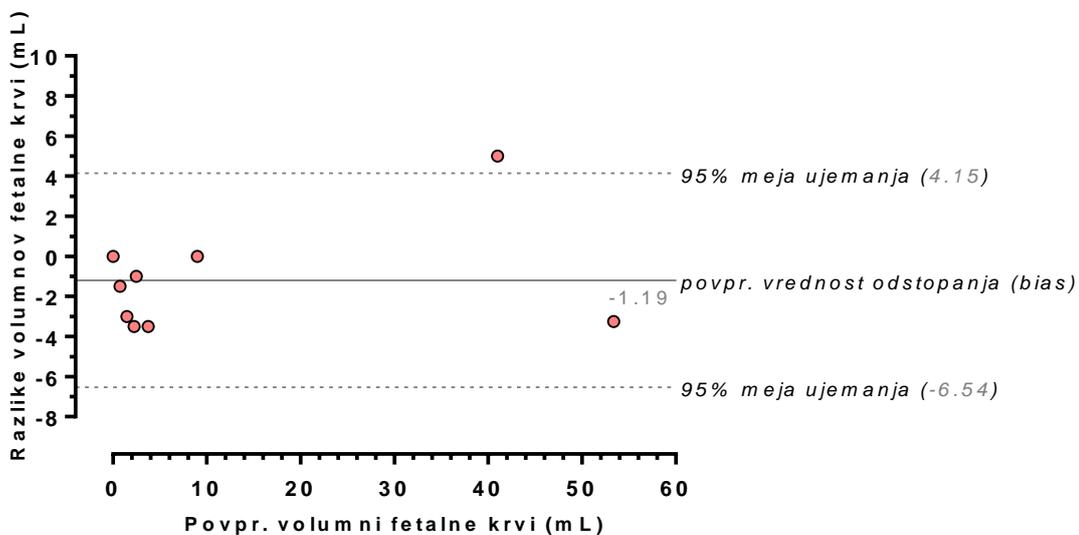
Statistična analiza je pokazala, da so vse izračunane povprečne vrednosti odstopanja (biasov) višje kot v primeru meritev umeritvenih suspenzij. Razlog za to je najverjetneje v majhnemu številu primerjanih vrednosti meritev, ki smo jih lahko statistično analizirali. Vidimo tudi, da je bilo največje sipanje rezultatov pri primerjavi testa Kleihauer-Betke in metode s protitelesi anti-RhD. Rezultati so grafično prikazani na Grafih 10, 11 in 12.



Graf 15: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in s protitelesi anti-HbF/anti-CA.



Graf 16: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in s protitelesi anti-RhD.



Graf 17: Bland-Altmanov graf s prikazanimi statistično obdelanimi rezultati primerjanih meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama s protitelesi anti-RhD in protitelesi anti-HbF/anti-CA.

Vidimo, da je prišlo do večjih odstopanj, razlik pri večjih povprečnih volumnih fetomaternalne krvavitve. Možen razlog za odstopanje pri primerjavah obeh metod, ki temeljita na pretočni citometriji s testom Kleihauer-Betke, je, da je KBT mnogo manj natančen od primerjanih. Poleg tega pa ima za statistične analize neugoden način podajanja rezultatov, ki pravzaprav predstavljajo zelo različne ocene. V Grafu 10 pa vidimo tudi dobro ujemanje med razlikami, izračunanimi z rezultati KBT, in metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, saj vidimo posamezne vrednosti razlik pri majhnih povprečnih volumnih plodove krvi

blizu vrednosti 0, poleg tega pa je tudi interval ujemanja simetričen, čeprav je razmeroma širok.

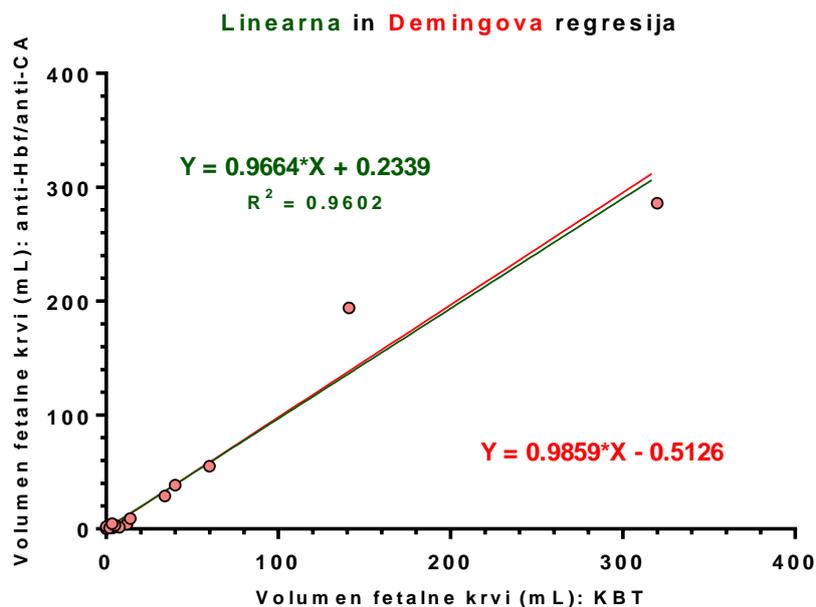
Pearsonov koeficient korelacije, linearna in Demingova regresija

Stopnjo povezanosti med primerjanimi spremenljivkami smo ocenili tudi s Pearsonovim koeficientom korelacije, linearno in Demingovo regresijo. Rezultati statističnih analiz so prikazani v Preglednici X.

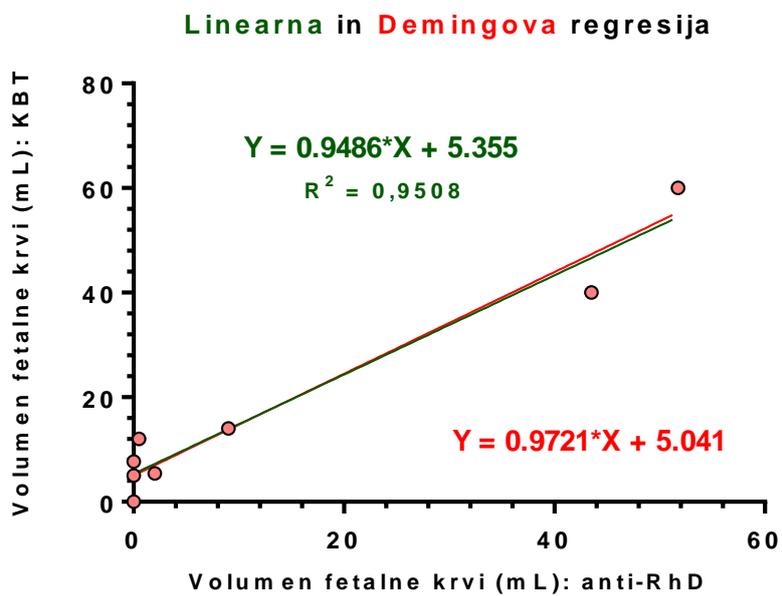
Preglednica X: Vrednosti Pearsonovih koeficientov korelacije, enačba premic določenih z linearno regresijo, vrednosti koeficientov determinacije R^2 ter enačbe premic izračunane z Demingovo regresijo, za primerjane pare analiznih metod KBT in anti-HbF/anti-CA, KBT in anti-RhD ter anti-HbF/anti-CA in anti-RhD, ki smo jih uporabili za meritve kliničnih vzorcev pacientk.

Korelacija Linearna regresija Demingova regresija	KBT in anti-HbF/anti-CA	KBT in anti-RhD	anti-HbF/anti-CA in anti-RhD
Pearsonov koeficient korelacije - r	0,98	0,97	0,99
Enačba premice Linearna regresija	$Y = 0,97 * X + 0,23$	$Y = 0,95 * X + 5,35$	$Y = 0,95 * X + 1,80$
R^2	0,96	0,95	0,98
Enačba premice Demingova regresija	$Y = 0,99 * X - 0,51$	$Y = 0,97 * X + 5,04$	$Y = 0,96 * X + 1,71$

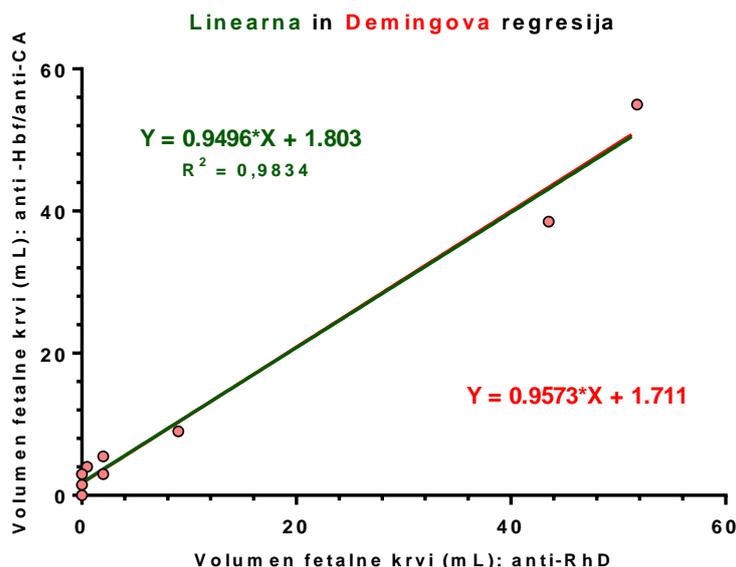
Pri vseh primerjanih parih analiznih metod vidimo dobro korelacijo med rezultati, vendar pa nam ti statistični podatki pravzaprav povedo še najmanj, saj so precej nenatančni, glede na majhno število analiziranih rezultatov. Rezultati so grafično prikazani na Grafih 13, 14 in 15.



Graf 18: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vsebnostjo R² za analizo rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in anti-HbF/anti-CA.



Graf 19: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vsebnostjo R² za analizo rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama KBT in anti-RhD.



Graf 20: Grafični prikaz linearne in Demingove regresije s pripadajočima enačbama premice in vsebnostjo R^2 za analizo rezultatov meritev kliničnih vzorcev pacientk z metodama anti-RhD in anti-HbF/anti-CA.

4.3. Primerjava rezultatov umeritvenih kontrolnih suspenzij in dejanskih vrednosti

Ob pregledu rezultatov meritev umeritvenih kontrolnih suspenzij nismo bili preveč zadovoljni z njimi, saj je izgledalo, da precej odstopajo od pričakovanih vrednosti. Zato smo s statističnimi testi preverili statistično značilnost odstopanja izmerjenih od pričakovanih vrednosti za obe primerjani metodi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA. Pri analizi metodi anti-HbF/anti-CA smo za statistično obravnavo izbrali zgolj rezultate meritev kontrolnih serij iz serij 3-7, saj smo predhodno dokazali, da Alsverjeva ohranitvena raztopina moti rezultate meritev. Ponovno smo izvedli parni dvostranski T-test, rezultati le-tega so predstavljeni v Preglednici XI.

Preglednica XI: Rezultati parnega dvostranskega T-testa primerjave rezultatov z analiznima metodama s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD z dejanskimi vrednostmi deležev plodovih eritrocitov v umeritvenih kontrolnih suspenzijah.

Parni dvostranski T-test	anti-HbF/anti-CA	anti-RhD
P vrednost	0,36	0,51
Statistično značilna razlika? ($P < 0.05$)	Ne	Ne

Dvostranski test, vrednost t in df = stopnje prostosti	t=0,93 df=33	t=0,65 df=47
Število primerjanih parov meritev	34	48

Ugotovimo lahko, da ni statistično značilnih razlik med rezultatom meritev kontrolnih vzorcev z metodama s protitelesi anti-HbF/anti-CA in protitelesi anti-RhD z dejanskimi vrednostmi. Zato pri obeh metodah ničelne hipoteze nismo zavrgli, s čimer smo privzeli hipotezo, da z njima dobimo enake vrednosti. Tudi z Bland-Altmanovim testom smo potrdili dobro ujemanje med rezultati izmerjenimi z obema metodama v primerjavi z znanimi vrednostmi umeritvenih kontrolnih suspenzij, kar predstavlja preglednica XII.

Preglednica XII: Bland-Altmanov test - povprečne vrednosti odstopanj (biasov) med primerjanimi razlikami meritev ter spodnje in zgornje meje 95 % intervalov ujemanja za metodi anti-RhD in anti-HbF/anti-CA, glede na znane vrednostmi umeritvenih kontrolnih suspenzij.

Bland-Altmanov test	anti-HbF/anti-CA	anti-RhD
Povprečna vrednost odstopanja (bias)	0,04	0,03
SD biasa	0,25	0,30
95 % interval ujemanja	Od -0,46 do 0,53	Od -0,56 do 0,61

Statistično smo torej dokazali, da dobimo z metodo s protitelesi anti-HbF/antiCA primerljive oz. enake rezultate kot pri KBT in metodi s protitelesom anti-RhD. Kljub temu pa nismo bili popolnoma zadovoljni z rezultati, ki smo jih dobili z uporabo kompleta Fetall Cell Count®, saj so bila pri določenih analiziranih vzorcih odstopanja 10-20 odstotna, predvsem pa naši citogrami niso bili popolnoma primerljivi s proizvajalčevimi. Zato smo navezali stik s proizvajalcem kompleta IQ Products. Poslali smo jim rezultate naših analiz vključno s citogrami. Potem, ko so jih pregledali, so nam skušali pomagati pri iskanju možnih vzrokov za odstopanja in rešitvah zanje. Kot prvi možni razlog so navedli možnost, da nismo delali v skladu z navodili, ki so priložena h kompletu, kar pa seveda ni držalo. Fiksiranje, permeabilizacijo ter označevanje celic smo izvajali popolnoma v skladu z navodili. Kot drugi možni vzrok pa so izpostavljali kompenzacijo in nastavitve pretočnega citometra, vendar pa

smo tudi to opravljali povsem v skladu z navodili. Proizvajalec je nato sporočil, da se lahko pojavijo celo do 50 % odstopanje izmerjenih vrednosti od teoretične, ki jih vsebujejo pripravljene celične suspenzije, še posebej pri nizkih koncentracijah plodovih eritrocitov. Kot smo že omenili, nismo nikoli opazili odstopanj, ki bi bila večja od 10-20 % od pričakovanih vrednosti, to pa je znotraj meja, ki jih je predvideval proizvajalec.

Edini korak, ki smo ga pri pripravi naših umeritvenih kontrolnih celičnih suspenzij izvedli različno od predpisanega v navodilih kompleta, je bilo večkratno spiranje eritrocitov. Ker smo želeli ugotoviti, ali to vpliva na rezultate analize, smo pripravili dve negativni kontroli. Uporabili smo kri krvodajalca. Prvi del vzorca smo štirikrat sprali s fiziološko raztopino, drugega pa nismo spirali. V obeh primerih smo izmerili enak rezultat, in sicer 0,01 %. Kot pozitivno kontrolo smo nato uporabili 5-% deleža plodovih eritrocitov v suspenziji odraslih eritrocitov. Izmerili smo 5,74 % in s tem dodatna spiranja celic izključili kot možni vzrok za pojav odstopanja.

4.4. Zunanje kontrole UK NEQAS

V času izvajanja analiz v okviru magistrske naloge je bil laboratorij vključen tudi v zunanjo kontrolo kakovosti, in sicer z metodama na pretočne citometrije s protitelesi anti-RhD in test Kleihauer-Betke. Vzorce, ki smo jih prejeli v analizo od organizatorja zunanjih kontrol, smo analizirali tudi z novo metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA. Nato smo kontaktirali UK NEQAS, saj nas je zanimalo, ali so vzorci zunanjih kontrol primerni tudi za našo analizo metodo. Odgovorili so nam, da so kontrole pripravljene iz RhD⁺ plodovih eritrocitov in RhD⁻ odraslih eritrocitov in zato primerne za vse analizne metode. Trenutno v UK NEQAS izvajajo ločeno statistično analizo rezultatov sodelujočih laboratorijev, ki uporabljajo bodisi test Kleihauer-Betke in tiste, v katerih rutinsko izvajajo meritve z metodo na pretočnem citometru s protitelesi anti-RhD. Za zdaj še nimajo veliko sodelujočih laboratorijev, ki bi uporabljali metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, se pa zavedajo naraščajočega števila izvajalcev, ki začenjajo uporabljati to metodo in s tem tudi potrebe po ustrezni zunanji kontroli njene kakovosti.

V vzorcu zunanja kontrola UK NEQAS smo torej analizirali z našo novo metodo in rezultate primerjali s tistimi iz poročila. Obe kontroli sta bili znotraj referenčnega intervala. Rezultat

meritve prve kontrole je bil 2,85 mL plodove krvi, referenčni interval UK NEQUAS pa 2,6 do 3,1 mL, torej je bil naš rezultat znotraj pričakovanih vrednosti. V drugem kontrolnem vzorcu smo izmerili 23,06 mL plodove krvi in tudi v tem primeru je bil naš rezultat znotraj pričakovanega intervala, ki je bil med 22,7 in 25,8 mL.

4.5. Primerjava med metodami

Vsaka od uporabljenih metod ima svoje dobre in slabe lastnosti. Tudi sami smo jih spoznali kar nekaj. Test Kleihauer-Betke je presejalni test, ki ga opravimo vsem RhD⁻ nosečnicam oz. porodnicam, pa tudi vsem tistim, pri katerih sumimo na fetomaternalno krvavitev. Test ima dobro občutljivost, vendar je zelo subjektiven, saj njihovi različni izvajalci lahko različno odčitajo rezultat. Ta je močno odvisen tudi od števila pregledanih vidnih polj v mikroskopu. V nekaterih števnih poljih namreč lahko najdemo več, v drugih pa manj plodovih eritrocitov. Prav tako smo pri KBT omejeni s številom števnih polj, s tem pa s številom celic, ki jih pregledamo. Vendar pa je ta test poceni in enostaven za izvedbo, zato je tudi primeren za uporabo v rutini.

Metoda na pretočnem citometru z uporabo protiteles anti-RhD je zelo robustna. Izvajamo jo, kadar dobimo pozitiven rezultat na fetomaternalno krvavitev s KBT. Njena pomanjkljivost je ta, da jo lahko uporabljamo le, ko imamo RhD⁻ mater z RhD⁺ plodom. Problem predstavljajo tudi šibki antigeni RhD, pri katerih ne dobimo zanesljivih rezultatov. Kritičen dejavnik analiznih metod s protitelesi je tudi njihova nespecifična vezava. Zato se pri metodi s protitelesi anti-RhD sicer nismo srečali, zaradi česar sklepamo, da gre za zelo robustno metodo. Ta postopek je tudi brez občutljivih korakov celične permeabilizacije, saj se analizirani antigen nahaja na površini eritrocitov. Kontrolne suspenzije eritrocitov, ki jih merimo sočasno z analizo vzorca preiskovanke, si lahko pripravimo enkrat mesečno. Pri vseh metodah s pretočno citometrijo so lahko problematična tudi fluorescenčna barvila, s katerimi so konjugirana detekcijska protitelesa. Zaščititi jih moramo pred svetlobo, da lahko izmerimo realno fluorescenco in ne lažno znižane. Pretočna citometrija nam omogoča zanesljivo analizo velikega števila celic v razmeroma kratkem času. Na ta način pregledamo dosti več kot s testom Kleihauer-Betke, poleg tega pa je za izdajo končnega rezultata pomembnejši tisti, dobljen s pretočnim citometrom.

Naša na novo vpeljana metoda prav tako izkorišča prednosti pretočne citometrije pri čemer uporablja dve protitelesi, in sicer anti-HbF in anti-CA. S to kombinacijo protiteles lažje zaznamo zgolj plodove eritrocite in jih učinkovito ločimo od celic F, ki so lahko prisotne pri odraslih. Žal pa smo ugotovili, da metoda ni preveč robustna, saj nanjo vpliva kar nekaj dejavnikov. Za zdaj še nismo uspeli dokazati, kateri koraki v pripravi in analizi vzorcev so tisti, ki nam onemogočajo, da bi dobili natančnejše rezultate. Vseeno pa se je izkazalo, da z metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA dobimo rezultate, za katere lahko z ustrežno statistično verjetnostjo trdimo, da so enaki tistim, ki jih izmerimo z uporabo protiteles anti-RhD. To smo uspeli dokazati tako pri meritvah umeritvenih kontrolnih suspenzij kot tudi kliničnih vzorcev. Analitik, ki opravlja meritve na pretočnem citometru, mora biti večč analize in biti sposoben po potrebi prilagajati parametre meritev in meje zajema, tako da zagotovi nedvoumno analizo populacije plodovih eritrocitov. Pri tem so lahko problematične nespecifične vezave protiteles in permeabilizacija eritrocitov, zato moramo slednjo zelo natančno časovno omejiti, da ne pride do sprememb antigenov in s tem do slabše vezave detekcijskih protiteles. Kot pri vseh fluorescirajočih protitelesih je tudi v tem primeru kritična njihova stabilnost, zato se moramo izogibati njihovem neposrednem izpostavljanju svetlobi oz. ga minimalizirati. Proizvajalec analiznega kompleta posebej ne predvideva uporabe kontrolnih vzorcev, vendar menimo, da jih je smiselno narediti. Negativno kontrolo predstavlja kri odraslega darovalca, ki ni noseč (najbolje moškega). Z njeno analizo pa se izognemo šumom ozadja. S pozitivnimi kontrolami, ki jih pripravimo z mešanjem krvi odrasle nenoseče osebe in znanim deležem popkovnične krvi, pa zagotovimo linearnost meritve in s tem lažji izračun obsega fetomaternalne krvavitve. Nova metoda zahteva tudi kar nekaj nastavitvev in prilagajanj pretočnega citometra pred samo rutinsko uporabo, kasneje pa za analizo uporabljamo optimalno predpripravljene predloge za analizo. S to metodo lahko analiziramo prav vse nosečnice, ne glede na njihov RhD status in RhD status ploda.

Po vzpostavitvi oz. vpeljavi nove metode smo pripravili tudi osnutek standardnega operacijskega postopka (SOP), tako da se jo lahko prične uporabljati v rutini. Uporabna bi bila predvsem v primerih, ko vzorca ne moremo analizirati z metodo, ki uporablja protitelesa anti-RhD, ali ko dobimo velika odstopanja med rezultati testa Kleihauer-Betke in pretočno citometrijo s protitelesi anti-RhD. Metoda s protitelesi anti-HbF/anti-CA se je torej izkazala kot zelo uporabna dopolnilna metoda, zlasti v primeru, ko se srečamo z vzorci, ki jih s protitelesi anti-RhD ne moremo ustrezno analizirati. Žal pa metoda s protitelesi anti-

HbF/anti-CA za zdaj še ni optimizirana do te mere, da bi bila dovolj robustna za vsakodnevno uporabo, poleg tega pa njeno rutinsko izvajanje omejuje razmeroma visoka cena.

Vsaka na novo vpeljana metoda predstavlja izziv in odpira številna vprašanja; npr. kako jo vpeljati v rutino, ali je res boljša od dosedanjih metod in kaj vse njena vpeljava prinese s seboj. Podrobnejše statistične analize, vrednotenja in primerjave nam dajo osnovni odgovor ali je metoda primerna. Dejstvo pa je, da za vsako novo analizno metodo, ki jo vpeljujemo v rutinsko uporabo, potrebujemo določen čas, da se naučimo izvajati čim bolj kvalitetne in zanesljive analize. Pretočna citometrija, ki je tudi naša nova analizna metoda, je vse pogosteje uporabljena in ponuja možnost številnih raznovrstnih analiz. Za njihovo kakovostno izvajanje pa je nujno potrebno tudi ustrezno usposobljeno osebje, ki suvereno obvlada delo s pretočnim citometrom.

5. Sklep

V okviru našega dela smo vpeljali in ovrednotili novo analizno metodo na pretočnem citometru, pri kateri uporabljamo protitelesi anti-HbF/anti-CA. Primerjali smo jo z v laboratoriju že obstoječima metodama, testom Kleihauer-Betke (KBT) in z metodo, ki prav tako temelji na pretočni citometriji, uporablja pa protitelesa anti-RhD. Ob tem smo skušali ugotoviti tudi, kakšne so njene omejitve in prednosti pred ustaljenimi metodami.

Pripravili smo sedem serij kontrolnih mešanic suspenzij plodovih RhD⁺ in odraslih RhD⁻ eritrocitov in jih analizirali z obema metodama, ki temeljita na pretočni citometriji. S statistično analizo smo ugotovili, da z njima dobimo enake rezultate, ki so zanesljivi in primerni za diagnostiko. Metoda, ki uporablja protitelesa anti-RhD, se je izkazala kot robustnejša, ima pa omejitve, saj je uporabna samo pri RhD⁻ materah, ki nosijo RhD⁺ plod.

Analizirali smo tudi klinične vzorce nosečnic in otročnic. Pri teh smo statistično analizirali in primerjali rezultate dobljene s testom Kleihauer-Betke, metodo na pretočnem citometru z uporabo protiteles anti-RhD in protiteles anti-HbF/anti-CA. Ugotovili smo močno povezanost med rezultati testa Kleihauer-Betke in metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, ter dokazali, da z njima dobimo zelo primerljive rezultate. Primerjali smo tudi rezultate, izmerjene z metodama z uporabo protiteles anti-RhD in s kombinacijo protiteles anti-HbF in anti-CA. Tudi v tem primeru smo dokazali močno povezanost, primerljivost in zanesljivost vrednosti. Ugotovili smo torej, da se lahko na rezultate, dobljene s preizkušano novo metodo, zanesemo, saj so ti primerljivi s tistimi izmerjenimi s trenutno uporabljenima metodama (test Kleihauer-Betke in pretočna citometrija s protitelesi anti-RhD).

Kombinirana uporaba protiteles anti-HbF/anti-CA predstavlja novejši analizni pristop. Trenutno obstaja manj študij, ki bi vrednotile analizno metodo s protitelesi anti-HbF/anti-CA, kot drug, vendar pa še vedno potekajo mnoge študije, v katerih metodo preizkušajo in iščejo najboljše možne statistične analize za primerjavo med rezultati, pridobljenimi z različnimi analiznimi metodami. Vsekakor pa postaja pretočna citometrija z uporabo kombinacije protiteles anti-HbF/anti-CA vedno pogosteje uporabljena analizna metoda za odkrivanje in vrednotenje obsega fetomaternalne krvavitve v laboratorijih po svetu.

Metoda z uporabo detekcijskih protiteles anti-HbF/anti-CA se je izkazala za uporabno predvsem kot dopolnilna metoda za primere pacientk, pri katerih dobimo s testom Kleihauer-Betke pozitiven rezultat, natančnejše količine krvavitve pa ne moremo določiti s pretočno citometrijo z uporabo protiteles anti-RhD. Glede na naše ugotovitve lahko trdimo, da obstaja velika možnost, da bo nekoč to edina uporabljena metoda za določanje obsega fetomaternalne krvavitve.

6. Literatura

1. Štiblar Martinčič D, Cör A, Cvetko E, Marš T: Anatomija, histologija in fiziologija, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2007: 95-99
2. Baker N P, Louise C K: Obstetrics by Ten Teachers, 19th edition, Holder, London, 2011: 104-108
3. 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, *Transfusion Medicine*, 2013; 23: 175-186
4. Wylie JB, D'Alton EM; Fetomaternal Hemorrhage, *The American College of Obstetricians and Gynecologists*, 2010, 115: 1039-1051
5. Pelikan DMV: On fetomaternal hemorrhage, Proefschrift, Universiteit Leiden, Leiden, 2006: 8-109
6. Sebring ES, Polesky HF: Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence and clinical effects, *Transfusion*, 1990; 30: 344-357
7. Bresjanac M, Rupnik M: Patofiziologija s temelji fiziologije, tretja izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2002: 9-10, 163-165
8. Boyer R: Temelji biokemije, second edition, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 112-118
9. Porra V, Bernaud J, Gueret P, Bricca P, Rigal D, Follea G, Blanchard D: 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: 1281-1289
10. Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN: Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults, *Science*, 1975; 18: 361-362
11. Hall EJ, Guyton CA: *Textbook of Medical Physiology*, twelfth edition, Elsevier saunders, Jackson, 2011: 286-287, 413-420, 447, 502-504
12. Reid ME, Mohands N: Red blood cell blood group antigens: structure and function, *Semin Hematol*, 2004; 41: 93-117
13. Kumar P, Clark M: *Clinical medicine*, sixth edition, Elsevier saunders, Edinburgh, 2005: 421-423, 451-452, 458-459, 712-715
14. Ali Akbar S, Brown PR: Measurement of humane erythrocyte CAI and CAII in adult, newborn and fetal blood, *Clin Biochem*, 1996; 29: 157-164

15. De Vos N: Critically Appraised Topic: Fetal Cell Count by Flow Cytometry, UZ Leuven, <http://www.uzleuven.be/laboratoriumgeneeskunde/opleiding/cat-bibliotheek>; 15.10.2013
16. Domazet-Fink J, Pestevšek M, Novak-Antolič Ž: Fetomaternalna krvavitev – diferencialna diagnostika ob prikazu primera, Zdrav vestn, 2002; 71: 425-8
17. Železnik K, Dovč-Drnovšek T, Rožman P, Bričl I: Preventiva in diagnostika hemolitične bolezni ploda in novorojenčka, Zdrav vestn 2012; 81: 312-321
18. Bričl I: Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka; 5. podiplomski seminar Zdravljenje s krvjo, zdravljenje novorojenčkov in otrok, Portorož, Slovenija, 12.-14. december 2002, 67-70
19. Lubusky M, Simetka O, Studnickova M, Prochazka M, Ordeltova M, Vomackova K: Fetomaternal hemorrhage in normal vaginal delivery and in delivery by cesarean section, Transfusion. 2012; 52(9): 1977-82
20. Kim AY, Makar SR: Detection of fetomaternal hemorrhage, American Journal of Hematology, 2011; 87: 417-423
21. <http://statlab.tumblr.com/post/6612015909/the-rosette-test-screen-for-fetal-maternal>, 20.9.2013
22. Wong L, Hunsberger BC, Bruce Bagwell C, Davis BH: Automated quantitation of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry for HbF-containing fetal red blood cells using probability state modeling, International Journal of Laboratory Hematology, 2013; 35: 548-554
23. Scholz C, Kachler A, Herman C, Weissenbacher T, Toth B, Freise K, Kainer F: Flowcytometric assesement of fetomaternal hemorrhage during external cephalic version at term, Journal Perinatal Medicine, 2009; 37: 334-337
24. Rahman M.: Introduction to Flow Cytometry, AbD Serotec, A Bio-Rad Company; <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html>, 3.4.2013
25. Flow cytometry guide, Abcam; http://docs.abcam.com/pdf/protocols/Introduction_to_flow_cytometry_May_10.pdf, 3.4.2013
26. <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/index.jsp>, 3.4.2013
27. http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/4Intro_Flow/player.html, 3.4.2013

28. IQ Products: Fetal Cell Count kit, navodila za uporabo, http://www.iqproducts.nl/products/perinatal/fetal-cell-count-kit/item/download/104_d49675fbb7a926287450cc7174736414; 5.12.2012
29. SOP-D.E-22, Standardni operativni postopek: Priprava kontrolnih suspenzij eritrocitov z različnimi deleži RhD-pozitivnih in RhD-negativnih eritrocitov in vzorcev krvi preiskovank, 2011, 1-6, <http://documentm.ztm.si/portal>, 9.1.2013
30. SOP-D.E-23, Standardni operacijski postopek: Priprava krvi za meritev na pretočnem citometru – določitev deleža RhD pozitivnih eritrocitov (BRAD-3-FITC), 2011, 1-4, <http://documentm.ztm.si/portal>, 9.1.2013
31. http://en.wikipedia.org/wiki/Alsever's_solution, 5.7.2013
32. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/cdg/literature/IFU_187809.pdf, 5.7.2013
33. Motulsky H: Intuitive Biostatistics, Oxford University Press, Oxford, 1995; 113-117, 155-164, 245-229
34. Bricl I, Ogrizek-Pelkič K, Vogler A: Hemolitična bolezen ploda in novorojenčka (HBPN) – prikaz primera, Zdrav vest, 2003; 72: 671-3
35. https://www.bdbiosciences.com/services/training/itf_launch.jsp, 3.4.2013
36. Kennedy GA, Shaw R, Just S, Bryson G, Battistutta F, Rowell J, Williams B: Quantification of feto-maternal haemorrhage (FMH) by flow cytometry: anti-fetal haemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with anti-D, Transfusion Medicine, 2003; 13: 25-33
37. http://en.wikipedia.org/wiki/Kleihauer%E2%80%93Betke_test, 10.3.2013
38. Chambers E, Davies L, Evans S, Birchall J, Kumpel B: 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, Transfusion Medicine, 2012; 22: 199-204
39. Bayliss KM, Kuck BD, Johnson ST, Fuger JT, McFadden PW, Mikulski D, Gottschall JL: Detecting fetomaternal hemorrhage: comparison of five methods, Transfusion, 1991; 31: 303-307
40. Johnson PR, Tait RC, Austin EB, Shwe KH, Lee D: Flow cytometry in diagnosis and management of large fetomaternal haemorrhage, J Clin Pathol, 1995; 48: 1005-1008
41. Chen JC, Davis BH, Wood B, Warzynski MJ: Multicenter clinical experience with flow cytometric method for fetomaternal hemorrhage detection, Clinical Cytometry, 2002; 50: 285-290