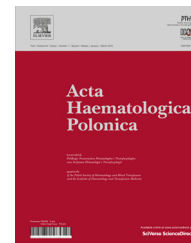




ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/Original research article

Zastosowanie cytometrii przepływowej w badaniach immunohematologicznych krwinek czerwonych

Application of flow cytometry to immunohematological tests of red blood cells

Jadwiga Fabijańska-Mitek*, Anna Stachurska

Zakład Immunohematologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Słowa kluczowe:

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

Keywords:

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

ABSTRACT

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

© 2017 Published by Elsevier Sp. z o.o. on behalf of Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii.

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

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

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

0001-5814/© 2017 Published by Elsevier Sp. z o.o. on behalf of Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii.

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

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

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

Wiadomo, że podczas ciąży i szczególnie podczas porodu pewna ilość krwinek płodowych może dostać się z krążenia dziecka do sąsiadujących w łożysku naczyń krwionośnych matki. Antygeny tych krwinek mogą uodpornić matkę i w kolejnej ciąży doprowadzić do choroby hemolitycznej płodu/novorodka (ChHPN). W zależności od swoistości przeciwciał, ich stężenia, podklas IgG i aktywności makrofagów płodu, hemoliza może mieć różny przebieg, ale często bywa nasilona, a jej skutkiem jest obrzęk płodu, żółtaczką gwałtownie narastająca w pierwszych dobach po porodzie, powiększenie śledziony, wątroby i serca. Bez leczenia, głównie przetaczania krwi w ciąży i po porodzie, może dojść do śmierci płodu lub noworodka. Ze względu na dużą immunogenność antygeny RhD oraz jego obecność u ponad 80% ojców oraz brak u ok. 20% matek, zagrożenie ChHPN w zakresie RhD jest

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

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

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

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

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/5663577>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/5663577>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)