

Možnosti stanovení fetomaternální hemoragie

Possibility to identify fetomaternal haemorrhage

Čes. Gynek.
2010, 75, č. 5
s. 443-446

Studničková M.¹, Lubušský M.¹, Ordeltová M.², Procházka M.¹

¹Porodnicko-gynekologická klinika FN, Olomouc, přednosta doc. MUDr. R. Pilka, Ph.D.

²Oddělení alergologie a klinické imunologie FN, Olomouc, přednosta doc. MUDr. J. Bystroň, CSc.

ABSTRACT

Fetomaternal haemorrhage (FMH) is a status characterised by penetration of fetal blood into the maternal circulation which happens mostly at delivery. FMH may cause erythrocytal alloimmunisation of woman. That is why anti-D immunoglobulin (IgG anti-D) is being administered to RhD negative women after delivery of RhD positive fetus. IgG anti-D is administered to RhD negative women standardly and in much greater quantities than is actually necessary. However, on the other hand, it is not possible to diagnose cases where a greater dose is required. To optimise prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women, it is important to diagnose conditions where fetomaternal haemorrhage (FMH) occurs, precisely define its volume and consequently administer the required dose of IgG anti-D. The ability to reliably detect fetomaternal haemorrhage (FMH) and precisely define its volume would allow better and less expensive prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women. IgG anti-D could thus be administered only in cases that are actually indicated and only in doses necessary for preventing RhD alloimmunization. Accurate quantification of FMH is determined by flow cytometry.

Design: Review.

Setting: Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Alergology and Clinical Immunology, University Hospital Olomouc.

Key words: fetomaternal haemorrhage, flow cytometry, Kleihauer-Betke test, anti-D immunoglobulin, RhD alloimmunisation.

SOUHRN

Fetomaternální hemoragie (FMH) je stav, kdy dochází k průniku krve plodu do mateřské cirkulace, nejčastěji při porodu. FMH může být příčinou erytrocytární aloimunizace matky. RhD negativním ženám je proto po porodu RhD pozitivního plodu preventivně aplikován anti-D imunoglobulin. V současnosti je však podáván paušálně a v mnohem větších dávkách, než je skutečně potřeba. Naopak přibližně u 1 % porodů dochází k excesivní fetomaternální hemoragii, kdy je nutné podat dávku větší. Možnost spolehlivě detekovat FMH a přesně určit její objem umožní provádět prevenci RhD aloimunizace lépe a levněji. Anti-D imunoglobulin by bylo možné podávat jen ve skutečně indikovaných případech a jen v dávce nezbytně nutné pro prevenci RhD aloimunizace. Přesnou kvantifikaci objemu FMH poskytuje analýza průtokovou cytometrií, jako metodu screeningovou lze použít Kleihauerův-Betkeho test.

Typ studie: Souhrnný článek.

Název a sídlo pracoviště: Porodnicko-gynekologická klinika FN Olomouc, Oddělení alergologie a klinické imunologie FN Olomouc.

Klíčová slova: fetomaternální hemoragie, průtoková cytometrie, Kleihauerův-Betkeho test, anti-D imunoglobulin, RhD aloimunizace.

ÚVOD

Fetomaternální hemoragie (FMH) představuje stav, který je způsoben ztrátou integrity normální fyziologické bariéry mezi fetální a mateřskou cirkulací. Pozitivní fetomaternální arterio-venózní tlakový gradient způsobuje, že fetální erytrocyty pronikají do mateřské cirkulace. Nejvýznamnější události, při které k průniku dochází, je porod, a to jak vaginální, tak operační. Dále to jsou události prenatální, mezi něž patří potrat, mimoděložní těhotenství, parciální mola, amniocentéza, odběr choriových klků (CVS), kordocentéza, redukce embryí, abrupce placenty, placenta praevia či jiné krvácení, tupé poranění

břicha nebo obrat zevními hmaty. Některé příčiny však zůstávají i nadále neodhaleny a ke krvácení dochází v podstatě bez prokazatelných vnějších příčin. Podle Augustsona et al. u naprosté většiny porodů (98,5 %) představuje objem FMH méně než 2,5 ml, u více než 90% porodů je to dokonce pod 1 ml. Pouze u 0,4 % je objem FMH větší než 6 ml [1].

Význam stanovení FMH spočívá mimo jiné v určování množství fetálních erytrocytů, které pronikly do oběhu RhD negativní matky po porodu RhD pozitivního plodu. Protože je RhD antigen velmi silným antigenem, k RhD aloimunizaci matky dochází již při průniku 0,1 ml RhD pozitivních fetálních erytrocytů. Fetomaternální hemoragie o objemu 1 ml fetální krve představuje objem

přibližně 0,5 ml fetálních erytrocytů (FMH). V České republice se v rámci prevence RhD aloimunizace podává standardně RhD negativním matkám po porodu RhD pozitivního plodu 250 µg anti-D imunoglobulinu (IgG anti-D) u vaginálních porodů, 500 µg pak u porodů císařským řezem, kleštových porodů, porodů dvojčat nebo po manuální lýze placenty. Dávka anti-D imunoglobulinu 10 µg (50 IU) představuje ochranu proti 1 ml plně fetální krve (což odpovídá 0,5 ml RhD pozitivních erytrocytů) [2]. Jednoduchý přepočít ukazuje tabulka 1.

Tab. 1. FMH a dávka anti-D imunoglobulinu – přepočít

Objem plně fetální krve (ml)	Objem fetálních erytrocytů FMH (ml)	Dávka anti-D imunoglobulinu (µg)
1	0,5	10

Z výše uvedeného vyplývá, že dávka anti-D imunoglobulinu je u naprosté většiny porodů nadbytečná. Naopak u přibližně 1 % porodů však dochází k excesivní FMH, kdy je běžně podávaná dávka IgG anti-D nedostačující. Právě tyto případy je nutné cíleně odhalit a rodičkám tak poskytnout správnou a dostačující prevenci aloimunizace RhD antigenem. Pokud k aloimunizaci RhD negativní ženy dojde, může být RhD pozitivní plod v následujících těhotenstvích ohrožen rozvojem hemolytické nemoci.

MOŽNOSTI STANOVENÍ FMH

V současné době existuje několik možností stanovení FMH: Kleihauerův-Betkeův test, průtoková cytometrie, rosetový test, ELAT (enzyme linked antiglobulin test) a další testy.

1. Kleihauerův-Betkeův test – kyselá eluce

Například v Austrálii byla tato metoda mnoho let využívána jako hlavní metoda ke stanovení FMH. Využívá skutečnosti, že erytrocyty obsahující fetální hemoglobin jsou rezistentní k vymývání kyselinou. Po inkubaci se fetální erytrocyty v mikroskopu jeví jako jasné růžové buňky, zatímco mateřské jsou bledé. Existuje několik modifikací provedení a je možno využít i komerčně vyráběné sety [2].

Kromě využití ke stanovení FMH se metody využívají i k detekci možného krvácení novorozenců po porodu, zejména v případech s podezřením na rektální krvácení, u dospělých pak jako pomůcka k diagnostice některých typů anémie (thalassemia major, srpkovitá anémie) [6].

Mezi přednosti kyselé eluce patří skutečnost, že metoda nevyžaduje závislost na přítomnosti či nepřítomnosti RhD antigenu, vyžaduje jen základní laboratorní vybavení a je relativně levná. Má však naopak mnoho nedostatků, například krok eluce hemoglobinu je citlivý k pH,

teplotě i času a interpretace výsledku je subjektivní, navíc metoda vyžaduje určitou zkušenost laboranta provádějícího odečet. Velkým problémem je také to, že jde o pouhý odhad ve výpočtu výsledku, tedy jen semikvantitativní hodnocení.

Navíc během těhotenství fyziologicky stoupá hladina HbF v mateřských erytrocytech (u přibližně 25 % těhotných žen hladina maternálního HbF stoupá nad horní hranici normy, která je 0,9 % v 8. týdnu gravidity a přetrvává do 32. týdne) a u 1-2 % populace se vyskytuje vrozená perzistence fetálního hemoglobinu [2].

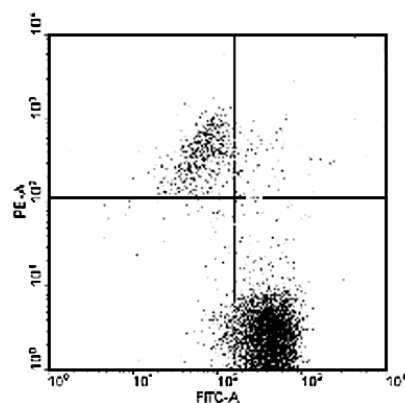
Z výše uvedeného vyplývá, že tuto metodu je pro svou relativní jednoduchost možné použít jako metodu screeningovou, pro přesnější stanovení je však zapotřebí metody přesnější.

Situace v České republice

V současné době na našem trhu existuje několik výrobců soupravy pro stanovení FMH pomocí kyselé eluce. Jde např. o test „Fetální hemoglobin“ nebo „Kleihauer Kit“. Vyrábí se jako soupravy pro 50 či 200 vyšetření.

2. Analýza průtokovou cytometrií

Princip průtokové cytometrie spočívá v kvantifikaci malého počtu buněk přítomných ve velké buněčné populaci. Diferenciace a kvantifikace je dosaženo nejčastěji pomocí fluorescenčně značených protilátek. Jednu z nejpresnějších možností představuje tzv. duální fluorescenční detekce dvou intracelulárních antigenů: hemoglobinu F (HbF) a karbonické anhydrázy (CA). Oba antigeny jsou detekovány ze vzorku periferní krve s EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) [12].



Graf 1. Cytogram, fetální erytrocyty jsou lokalizovány v levém horním kvadrantu

Tab. 2. Rozlišení buněk pomocí průtokové cytometrie

Buňka	Detekce
fetální erytrocyty	jasná exprese HbF, kompletní absence CA
maternální erytrocyty	absence HbF, jasná exprese CA
maternální F-buňky	nízký HbF, jasná exprese CA

Tab. 3. Srovnání průtokové cytometrie a Kleihauerova-Betkeova testu

	Výhody	Nevýhody
Kleihauerův-Betkeův test	<ul style="list-style-type: none"> • bez závislosti na přítomnosti či nepřítomnosti RhD antigenu • vyžaduje jen základní laboratorní vybavení • nízké náklady 	<ul style="list-style-type: none"> • nízká senzitivita metody (citlivost k pH, teplotě a času, subjektivní interpretace vyžadující zkušenost laboranta, který provádí odečet) • nízká specifita metody (stoupající hladina HbF v mateřských erytrocytech během těhotenství, vrozená perzistence fetálního hemoglobinu) • semikvantitativní stanovení (pouhý odhad ve výpočtu výsledku)
Průtoková cytometrie	<ul style="list-style-type: none"> • vysoká senzitivita i specifita • přesné kvantitativní stanovení 	<ul style="list-style-type: none"> • vysoké pořizovací náklady • dostupnost jen ve větších centrech

Tato metoda je tedy založena na kombinaci dvou protilátek. Jedna je namířena proti fetálnímu hemoglobinu, který je obsažen ve fetálních erytrocytech a v malém procentu adultních erytrocytů (tzv. F-buňky). Druhá protilátka je namířena proti karbonické anhydráze, enzymu obsaženému jen v adultních erytrocytech a pozdním stadiu fetálních erytrocytů. Duální barevná průtoková cytometrie tedy umožňuje simultánní stanovení těchto dvou intracelulárních antigenů. Ukázku cytogramu vidíme na obrázku 1 [5].

Vyšetření tudíž umožňuje spolehlivé kvantitativní stanovení množství fetálních erytrocytů proniklých do mateřské cirkulace. Rozlišení jednotlivých buněk uvádí tabulka 2.

K nesporným výhodám metody patří vysoká senzitivita i přesnost, analýza průtokovou cytometrií tudíž poskytuje objektivní kvantitativní výsledek. Minimální objem fetálních erytrocytů detekovatelných průtokovou cytometrií je 0,1 ml, což představuje objem, který je již schopný způsobit RhD aloimunizaci. Bohužel pořizovací náklady jsou stále vysoké a metoda je zatím dostupná jen ve větších centrech.

Srovnání průtokové cytometrie a Kleihauerova-Betkeova testu shrnuje tabulka 3.

Situace v České republice

V České republice se distribuuje jediná diagnostická souprava pro stanovení FMH pomocí průtokové cytometrie, která je nezávislá na RhD pozitivitě či negativitě fetálních erytrocytů. Je to „Fetal Cell Count kit“. Dodává se jako souprava pro 25 vyšetření.

3. Rozetový test

Tato metoda využívá nepřímý antiglobulinový test. Zvýšené senzitivity je dosaženo přidavkem RhD pozitivních „indikátorových“ erytrocytů. Tyto buňky adherují k protilátkám anti-D, které pokrývají minoritní populaci RhD pozitivních fetálních erytrocytů a dohromady vytvářejí rozety či klustery. Výsledek se pak odečítá mikroskopicky [7].

K přednostem metody patří její nízké náklady a relativní jednoduchost, avšak je málo přesná, není zde možnost kvantitativního stanovení a je aplikovatelná jen v případě, že plod je RhD pozitivní a matka RhD negativní. Tato omezení ji předurčují pouze jako metodu screeningovou s možností detekce větších krvácení nad

4 ml fetálních erytrocytů. V USA se jako screeningový test s úspěchem využívá.

4. ELAT (enzyme linked antiglobulin test)

Jde o ELAT test určený ke kvantitativnímu stanovení FMH, který je založený na nepřímém antiglobulinovém testu.

5. Další možnosti

K dalším možnostem patří i stanovení AFP v séru matky, stanovení placentární alkalické fosfatázy, PCR, FISH nebo gelový sloupcový test. Ani jedna z těchto metod však není dostačující k přesnému určení FMH.

DISKUSE

I přes zavedení profylaxe anti-D imunoglobulinem RhD negativním matkám po porodu RhD pozitivního dítěte představuje RhD aloimunizace těhotných žen stále významný problém. I když existuje více příčin způsobujících rozvoj závažné fetální anémie, zůstává aloimunizace matky RhD antigenem i nadále příčinou nejčastější. Je všeobecně známé, že RhD aloimunizace může vést k rozvoji hemolytické nemoci u plodu i novorozence. Plod je ohrožen anémií, v krajních případech může dojít k rozvoji hydrpsu plodu a k jeho následnému úmrtí. Plody ohrožené rozvojem hemolytické anémie je proto nutné sledovat ve specializovaných centrech a v indikovaných případech podat intrauterinní transfuzi nebo těhotenství předčasně ukončit. U novorozence se kromě anémie obáváme i hyperbilirubinémie.

Mnoha případům RhD aloimunizace bychom však mohli zabránit vyšetřením fetomaternální hemoragie u RhD negativních žen při porodu RhD pozitivního plodu. Jak již bylo řečeno, přibližně u 1 % porodů dochází k excesivní FMH, která zůstává neodhalena a tím pádem je i nedostatečně provedena prevence RhD aloimunizace. Na základě přesného vyšetření FMH bychom mohli tyto ženy identifikovat a poskytnout jim dostatečnou profylaxi adekvátním zvýšením dávky anti-D imunoglobulinu.

Naopak naprostá většina RhD negativních žen po porodu RhD-pozitivního dítěte dostává dávku anti-D

Tab. 4. Pokrytí FMH aplikací anti-D imunoglobulinu (objem fetálních erytrocytů proniklých do mateřského krevního oběhu a dávka anti-D imunoglobulinu postačující k prevenci RhD aloimunizace)

Dávka anti-D imunoglobulinu (µg)	Odpovídající množství fetálních erytrocytů FMH (ml)	Odpovídající objem plně fetální krve (ml)
50	2,5	5
125	6,25	12,5
250	12,5	25
500	25	50

imunoglobulinu paušálně vyšší, než skutečně potřebuje. Stanovení FMH průtokovou cytometrií by tak znamenalo aplikaci dávky přesně odpovídající potřebě rodičky, tím pádem i výrazné šetření nákladů. Dávku anti-D imunoglobulinu a odpovídající množství FMH, kterou tato dávka pokryje, uvádí tabulka 4.

ZÁVĚR

I přes provádění profylaxe anti-D imunoglobulinem představuje RhD aloimunizace těhotných žen závažný medicínský i ekonomický problém. Stanovením objemu FMH při porodu RhD pozitivního plodu u RhD negativních žen bychom mohli předejít některým případům RhD aloimunizace. Jednoznačně nejpřesnější metodu představuje stanovení FMH pomocí průtokové cytometrie, aktuální dostupnost tohoto vyšetření je však v České republice omezena. Nejvhodnější screeningovou metodou, kterou lze s úspěchem použít v současnosti i u nás, se jeví Kleihauerův-Betkeův test. K jeho provedení je potřeba jen základní laboratorní vybavení a náklady na jedno vyšetření jsou relativně nízké. Jestliže se pomocí tohoto screeningového testu prokáže excesivní FMH, měl by být vzorek krve rodičky odeslán na vyšší pracoviště k přesnému stanovení objemu FMH.

V České republice existuje několik možností stanovení FMH. Toto vyšetření by mělo být dostupné pro všechny RhD negativní rodičky, které porodí RhD pozitivní plod. Ať už se jedná o screeningové vyšetření pomocí Kleihauerova-Betkeho testu s případným následným dovyšetřením excesivní FMH, či rovnou přesné kvantitativní stanovení pomocí průtokové cytometrie. Zavedení vyšetření FMH u RhD negativních žen po porodu RhD pozitivního plodu by umožnilo snížit paušálně podávanou dávku anti-D imunoglobulinu, a tím i snížit náklady spojené s prováděním prevence RhD aloimunizace. Hlavní přínos však spočívá v odhalení excesivní FMH, která se vyskytuje u přibližně 1 % porodů. V těchto případech není dosud rodičkám podávána potřebná dávka anti-D imunoglobulinu, která by postačovala k zabránění aloimunizace RhD antigénem. Snížením výskytu RhD aloimunizace u těhotných žen bychom mohli výrazně snížit i incidenci hemolytické nemoci plodu a novorozence.

Podpořeno grantem Ministerstva zdravotnictví České republiky IGA NS 10311-3/2009.

LITERATURA

1. Augustson, BM., Fong, EA., Grey, DE., et al. Postpartum anti-D: can we safely reduce the dose? *MJA*, 2006, 184, p. 611–613.
2. Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion Inc. Guidelines for laboratory assesment of fetomaternal haemorrhage, 2002, Australia.
3. Dziegiel, MH., Nielsen, LK., Berkowicz, A. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Curr Opin Hematology*, 2006, 13, p. 490–495.
4. Fernandes, BJ., von Dadelszen, P., Fazal, I., et al. Flow cytometric assessment of feto-maternal hemorrhage; a comparison with Betke-Kleihauer. *Prenatal Diagnosis*, 2007, 27, p. 641–643.
5. Fetal Cell Count Kit, IQ Products, příbalový leták.
6. Fetální hemoglobin, Sigma – Aldrich, příbalový leták.
7. Hadley, A., Soothill, P. Alloimmune disorders of pregnancy: anaemia, thrombocytopenia and neutropenia in the fetus and newborn. Cambridge University Press, 2002.
8. Lubušký, M. Prevence RhD aloimunizace. Evidence Based Medicine a přehled doporučených postupů. *Postgrad Med*, 2010, 12(2), s. 194–198.
9. Moise, Jr, JM. Management of rhesus alloimmunization in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 2008, 112, p. 164–176.
10. Pelikan, DM., Scherjon, SA., Kanhai, HH. The incidence of large fetomaternal hemorrhage and the Kleihauer-Betke test. *Obstet Gynecol*, 2005, 106, p. 642–643.
11. Pelikan, DM., Scherjon, SA., Mesker, WE., et al. Quantification of fetomaternal hemorrhage: A comparative study of the manual and automated microscopic Kleihauer-Betke tests and flow cytometry in clinical symplex. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 191, p. 551–557.
12. Porra, V., Bernard, J., Gueret, P., et al. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method: evaluation of Fetal Cell Count kit. *Transfusion*, 2007, 47, p. 1281–1289.
13. Savithrisowmya, S., Singh, M., Kriplani, A., et al. Assessment of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry and Kleihauer-Betke test in Rh-negative pregnancies. *Gynecol Obstet Incest*, 2008, 65, p. 84–88.
14. Salim, R., Ben-Shlomo, I., Nachum, Z., et al. The incidence of large fetomaternal hemorrhage and the Kleihauer-Betke test. *Obstet Gynecol*, 2005, 105, p. 1039–1044.
15. Smart, E., Armstrong, B. Blackwell Publishing Ltd, Blood group systéme. *ISBT Science Series*, 2008, 3, p. 68–92.

MUDr. Martina Studníčková
Porodnicko-gynekologická klinika
FN Olomouc
I. P. Pavlova 6
775 20 Olomouc