خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۲ تابستان ۹۰ (۱۱۴-۱۰۴)
مقاله پژوهشی

استفاده از روش فلوسایتومتری در تعیین میزان HbF جنینی متعاقب خونریزی جنینی ـ مادری در محیط آزمایشگاهی با دو روش دو رنگی HbF و تک رنگی آنتی‌ژن D

فهیمه خوش‌نقش[۱]، مریم خیراندیش[۲]، محمدرضا دیهیم[۳]

چکیده

سابقه و هدف

فلوسایتومتری روشی مناسب، سریع، دقیق و قابل اعتماد جهت ارزیابی میزان خونریزی‌های جنینی ـ مادری (FMH) می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی میزان FMH با استفاده از شاخص آنتی‌ژنیک RhD وهموگلوبین جنینی(HbF) به روش فلوسایتومتری است.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ۳۴ نمونه خون بند ناف نوزاد Rh مثبت با خون فرد بالغ RhD منفی به صورت‌رقیق‌سازی سریالی در ۶ رقت(۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ درصد) که بیانگر ۹۹/۹ درصد احتمال FMH بود، شبیه‌سازی شد و به روش فلوسایتومتری دو رنگی HbF و کربونیک انهیدراز(CA) وتک رنگی RhD مورد مطالعه قرار گرفت. از آزمون‌های آماری T test ، آنالیز واریانس و رگرسیون جهت تحلیل نتایج استفاده شد.

یافته‌ها

همبستگی قابل قبولی بین نتایج HbF و RhD به روش فلوسایتومتری مشاهده شد(r= ۰/۸۹۷). میزان خونریزی محاسبه شده توسط هر دو پارامترHbF و RhD در مقایسه با مقادیر خونریزی مورد انتظار، نشان داد که آنالیز دو رنگی HbF و CA ازحساسیت بالاتری نسبت به آنالیز تک رنگی RhD در تعیین مقادیر اندک خونریزی برخوردار می‌باشد. نتایج روش RhD با وجود همبستگی بالا(r= ۰/۹۸۴)، در تعیین مقادیر پایین FMH در مقایسه با میزان خونریزی به دست آمده از روش HbF/CA ، افزایش کاذبی را نشان داد ولی توانایی آن درتعیین مقادیر بالاتر خونریزی در مقایسه با HbF/CA قابل توجه بود.

نتیجه‌گیری

استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی‌های اختصاصی در روش فلوسایتومتری، امکان ارزیابی دقیق میزان خونریزی و به تبع آن تعیین دقیق دوز ایمونوگلبولین Rh جهت محافظت مادران از آلو ایمونیزاسیون بر علیه آنتی ژن D را ایجاد می‌کند.

کلمات کلیدی: خونریزی، انتقال خون جنینی ـ مادری، فلوسایتومتری

تاریخ دریافت : ۸۹/ ۵/۳۰
تاریخ پذیرش : ۸۹/۱۲/۲۲

۱ـ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون – مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون – تهران – ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون – مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون – تهران – ایران– صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی ـ مربی مرکز تحقیقات انتقال خون – مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون – تهران – ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

مقدمه

هنگامی که گلبول‌های قرمز جنینی از طریق جریان خون جفت به بدن مادر راه پیدا می‌کنند، از این واقعه به خونریزی جنینی مادری(Fetomaternal- ، FMH Haemorrhage) یاد می‌شود(۱).

خونریزی جنینی – مادری در نتیجه از دست رفتن تمامیت و یکپارچگی سدهای فیزیولوژیکی طبیعی میان گردش خون مادر و جنین ایجاد می‌شود. گرادیان مثبت شریانی – وریدی جنین و مادر سبب می‌شود تا گلبول‌های قرمز جنینی به گردش خون مادر راه پیدا کرده، حالتی شبیه به شیمریسم گذرا در جریان خون مادر ایجاد شود. از علل شناخته شده خونریزی جنینی – مادری می‌توان به زایمان، ضربات به خصوص ناحیه شکمی خانم باردار، ناهنجاری‌های عروقی در جفت و پارگی جفت اشاره کرد(۲). خونریزی جنینی– مادری در بیشتر از ۷۵ درصد حاملگی‌ها معمولاً در سه ماهه سوم حاملگی و بلافاصله پس از زایمان مشاهده می‌شود(۴، ۳).

آنتی‌گلبولین D که به صورت پیشگیرانه به مادران Rh منفی با سابقه تولد نوزاد Rh مثبت تزریق می‌شود، در حداقل دوز تجویزی که از ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی (۱۵۰۰–۵۰۰ IU) در کشورهای مختلف متفاوت است، تنها جهت خنثی‌سازی ۴ تا ۱۲ میلی‌لیتر گلبول قرمز RhD مثبت از جریان خون مادر کفایت می‌کند. ارزیابی دقیق حجم خونریزی در محاسبه و تعیین دوز اضافی احتمالی و تعداد این دوزها کمک شایانی خواهد کرد(۵).

در گذشته تنها راه اندازه‌گیری خونریزی جنینی– مادری، استفاده از روش اسید الوشن بود که در سال ۱۹۵۷ توسط کلیهاور و همکارانش معرفی شد. در این روش؛ اساس اندازه‌گیری میزان خونریزی بر پایه مقاومت هموگلوبین F به شستشو در محلول قلیایی استوار بود(۶).

در سال‌های اخیر با افزایش استفاده از روش‌هایی هم چون فلوسایتومتری و کونژوگه‌های مونوکلونال آنتی‌بادی علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک گلبول‌های قرمز، امکان استفاده از این روش جهت ارزیابی میزان خونریزی جنینی– مادری فراهم شده است.

ارزیابی کمی خونریزی‌های وسیع جنینی– مادری با استفاده از فلوسایتومتری بیانگر این موضوع بوده‌اند که این روش از صحت بالاتری نسبت به روش‌های قدیمی‌تر (اسید الوشن) برخوردار است. این نتیجه در سال ۱۹۹۵ توسط جانسون و همکاران و در سال ۱۹۹۷ توسط لوبنکو و همکاران به چاپ رسید(۸، ۷). در طول ۱۰ سال گذشته، مطالعه‌های متعددی در زمینه استفاده از روش فلوسایتومتری در ارزیابی کمی گلبول‌های قرمز جنینی در گردش خون مادر با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال بر ضد شاخص سطحی گلبول قرمز آنتی‌ژن D (AgD) و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال بر ضد شاخص داخل سلولی هموگلوبین جنینی(HbF) انجام شده است. این تحقیقات بیانگر حساسیت و صحت بالای فلوسایتومتری در تشخیص و تعیین دقیق میزان خونریزی جنینی– مادری بودند(۱۱–۹).

استفاده هم زمان از یک مونوکلونال آنتی‌بادی ضد هموگلوبین جنینی و پلی‌کلونال آنتی‌بادی ضد آنزیم کربونیک انهیدراز(CA) در تعیین دقیق میزان گلبول‌های قرمز جنینی در خون مادر بسیار دقیق خواهد بود. ایزو آنزیم‌های کربونیک انهیدراز که به دو صورت عمده کربونیک انهیدراز نوع ۱ (CA I) و کربونیک انهیدراز نوع ۲ (CA II) در سطح گلبول‌های قرمز وجود دارند، به طور کامل تنها پس از تولد بیان می‌شوند. با استفاده هم زمان Anti-HbF به صورت مونوکلونال و Anti-CA II ، تمایز میان جمعیت سلولی حقیقی گلبول قرمز جنینی از گلبول‌های قرمز حاوی هموگلوبین F در مادر که تحت عنوان F-Cells از آن‌ها نام برده می‌شود امکان‌پذیر شده، این جمعیت را می‌توان از جمعیت سلولی جنینی تفکیک نمود.

هدف از این تحقیق، ارزیابی میزان خونریزی جنینی– مادری با استفاده از رنگ‌آمیزی هم زمان هموگلوبین جنینی و آنزیم کربونیک انهیدراز و مقایسه آن با نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد آنتی‌ژن D بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود و تحقیق بر روی ۳۴ سری نمونه آزمایشگاهی که به صورت رقت‌سازی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

سریالی و در رقت‌های بین ۰/۱۲۵ تا ۱۰ درصد خونریزی جنینی مادری(FMH) شبیه‌سازی شده بودند، انجام گرفت(۱۴-۱۲).

تعیین گروه ABO و RhD نمونه‌ها:

جهت تعیین گروه خونی، کلیه نمونه‌های خون بند ناف، کنترل مثبت و کنترل منفی ۳ مرتبه با نرمال سالین(۷/۴-۷/۲ =pH) شستشو و سوسپانسیون ۳ درصد تهیه شد. سپس به نمونه‌ها در لوله‌های مجزا به نسبت مساوی از سوسپانسیون‌های ۳ درصد و آنتی‌سرم‌های گروه‌های خونی A ، B ، AB و RhD (انتقال خون ایران) افزوده، سانتریفیوژ شد و از نظر ایجاد آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفت.

آماده‌سازی سوسپانسیون‌های گلبول قرمز:

جهت تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز، ۴ میلی‌لیتر از خون کامل بند ناف نوزادان RhD مثبت بر روی ضد انعقاد(اتیلن دی آمید تترا استات) EDTA جمع‌آوری و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. از خون کامل یک فرد بالغ مذکر سالم که هیچ گونه سابقه انتقال خون و یا بیماری زمینه‌ای نداشت و گروه خونی وی O منفی بود، جهت تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز در رقت‌های مختلف آزمایشگاهی استفاده شد.

شمارش گلبول قرمز نمونه‌های خون بند ناف و نمونه مادران با شمارشگر خودکار(سیسمکس- ژاپن) انجام گرفت. جهت تهیه سوسپانسیون گلبول‌های قرمز، از روش رقت‌سازی سریالی خون بند ناف در خون فرد بالغ RhD منفی استفاده شد و رقت‌های ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵ ، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد که به ترتیب بیانگر خونریزی جنینی- مادری به میزان ۲۲۰، ۱۱۰، ۲۲، ۱۱، ۶، ۳ میلی‌لیتر بودند، شبیه‌سازی شد. کلیه سوسپانسیون‌ها قبل از انجام روش فلوسایتومتری به دقت با شمارشگر خودکار سلولی(سیسمکس - ژاپن) شمارش شده تا از صحت تهیه سوسپانسیون‌ها با توجه به میانگین متوسط سلولی(MCV) اطمینان حاصل شود و سپس سه مرتبه در بافر فسفات(PBS) (مرک- آلمان) با pH ۷/۴-۷/۲ شستشو داده شد تا کلیه عوامل مداخله‌گر از محیط خارج شوند.

نمونه کنترل مثبت از فرد بالغ مذکر با گروه خونی O مثبت و نمونه کنترل منفی از فرد بالغ مذکر با گروه خونی O منفی تهیه و در هر نوبت کاری مورد استفاده قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی محتوای هموگلوبینی گلبول قرمز به روش دو رنگی:

رنگ‌آمیزی محتوای هموگلوبینی گلبول قرمز با توجه به دستور عمل کیت Fetal Cell Count (ای کیو پروداکت، هلند) که شامل سه مرحله فیکساسیون، نفوذپذیر کردن گلبول‌های قرمز و مرحله رنگ‌آمیزی بود، برای سوسپانسیون نهایی سلولی به شرح زیر انجام پذیرفت:

۵ میکرولیتر از گلبول قرمز در محلول فرمالدئید به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شد. پس از این مدت، گلبول قرمز در محلول PBS شستشو داده شد و سپس در محلول سدیم دودسیل سولفات(SDS) به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شد و پس از دو مرحله شستشو در بافر فسفات (PBS) ، به صورت سوسپانسیون در آمد.

جهت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنس؛ ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز از هر یک از سوسپانسیون‌ها با ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال موشی کونژوگه با فایکواریترین (PE) (clone NaM16-2F4) بر ضد HbF و ۵۰ میکرولیتر پلی‌کلونال آنتی‌بادی خرگوشی بر ضد آنزیم کربونیک انهیدراز کونژوگه با فلورسئین ایزوتیو سیانات(FITC) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه گردید.

پس از طی شدن زمان انکوباسیون، لوله‌های حاوی گلبول قرمز رنگ‌آمیزی شده در ۵۰۰ میکرولیتر PBS به صورت سوسپانسیون درآمد. کلیه نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتر(پارتک - آلمان) با شمارش ۱۰۰۰۰۰- ۵۰۰۰۰ سلول آنالیز گردید. جهت تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار فلو مکس(Flomax-version ۲/۴ e) استفاده شد.

کنترل منفی، شامل نمونه فرد بالغ RhD منفی که هیچ گونه سابقه هموگلوبینوپاتی نداشته و تزریق خون را نیز تجربه نکرده بود به دست آمد. این نمونه نیز مانند کلیه سوسپانسیون‌های گلبول قرمز در هر نوبت کاری مورد بررسی قرار گرفت. ضمناً کنترل مثبت نیز از فرد O مثبت

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

در هر نوبت کاری مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی حجم خونریزی جنینی- مادری بر اساس رنگ آمیزی دو رنگی گلبول قرمز:

جهت ارزیابی حجم خونریزی FMH از فرمول زیر استفاده شد:

= میزان خونریزی جنینی ـ مادری(میلی‌لیتر)

$$* \text{ ۲۴۰۰} \times \frac{\text{درصد گلبول قرمز جنینی}}{\text{(درصد F-Cell مادری + درصد گلبول قرمز مادری)}}$$

درصد گلبول قرمز جنینی: درصد سلول‌های HbF+/CA-

درصد گلبول قرمز مادری: درصد سلول‌های HbF-/CA+

درصد F-Cell مادری: درصد سلول‌های HbF+/CA+

* ضریب ۲۴۰۰ : از آنجایی که اندازه گلبول قرمز جنینی ۱۲۲٪ اندازه گلبول قرمز مادری می‌باشد و در روش سنتی کلیهاور ـ بتکه تنها ۹۲٪ گلبول قرمز جنینی به طور میانگین قابل شناسایی می‌باشد و حجم گلبول قرمز مادر در زمان زایمان به طور میانگین در حدود ۱۸۰۰ میلی‌لیتر است، بنابراین فاکتور تصحیح در مقدار خونریزی جنینی- مادری به صورت زیر محاسبه می‌شود(۱۵):

۲۴۰۰ ~ ۲۳۸۹ = ۱۸۰۰/۹۲ × ۱۲۲ = فاکتور تصحیح

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنس با استفاده از آنتی D:

جهت رنگ‌آمیزی سوسپانسیون گلبول قرمز از مونوکلونال آنتی‌بادی Anti-D کونژوگه با فایکواریترین (ای‌کیو پروداکت – هلند) که به روش رنگ‌آمیزی مستقیم انجام می‌پذیرفت، استفاده شد. نمونه‌های به دست آمده بر روی ضد انعقاد EDTA ، پس از سه مرحله شستشو در محلول بافر فسفات(PBS) به صورت سوسپانسیون ۱۰٪ گلبول قرمز در PBS تهیه شد. آنتی‌بادی مونوکلونال(Anti-D RPE) نیز به نسبت ۱ به ۱۰ با محلول بافر فسفات حاوی ۰/۱٪ آلبومین سرم گاوی(مرک ـ آلمان) رقیق شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی رقیق شده به ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون ۱۰ درصدی هر رقت افزوده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، نمونه‌ها دو مرتبه با PBS شستشو داده شد و سپس در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات به صورت سوسپانسیون درآمد.

کنترل منفی شامل نمونه فرد بالغ RhD منفی بود که هیچ‌گونه سابقه هموگلوبینوپاتی نداشته و تزریق خون را نیز تجربه نکرده بود. این نمونه نیز مانند کلیه سوسپانسیون‌های گلبول قرمز در هر نوبت کاری مورد بررسی قرار گرفت. ضمناً کنترل مثبت نیز از فرد O مثبت در هر نوبت کاری مورد استفاده قرار گرفت.

کلیه نمونه ها با دستگاه فلوسایتومتر(پارتک – آلمان) با شمارش ۱۰۰۰۰۰ – ۵۰۰۰۰ سلول تجزیه و تحلیل گردید. جهت تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار فلومکس (Flomax-version 2.4 e) استفاده شد.

تعداد و درصد گلبول قرمز حاوی آنتی D یا $Anti\text{-}D^+$ که در پنجره(Gate) مخصوص گلبول قرمز قرار می‌گرفت، شمارش شد. محاسبه‌های حجم خونریزی به وسیله فرمول زیر انجام شد:

= میزان خونریزی جنینی ـ مادری(میلی‌لیتر)

$$\frac{\text{(درصد وقایع در کنترل منفی} - \text{درصد سلول } Anti\text{-}D^+)}{۱۰۰} \times ۱۲۰۰ \times ۱۸۰۰$$

منظور از درصد وقایع در کنترل منفی، Anti-D منفی می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری:

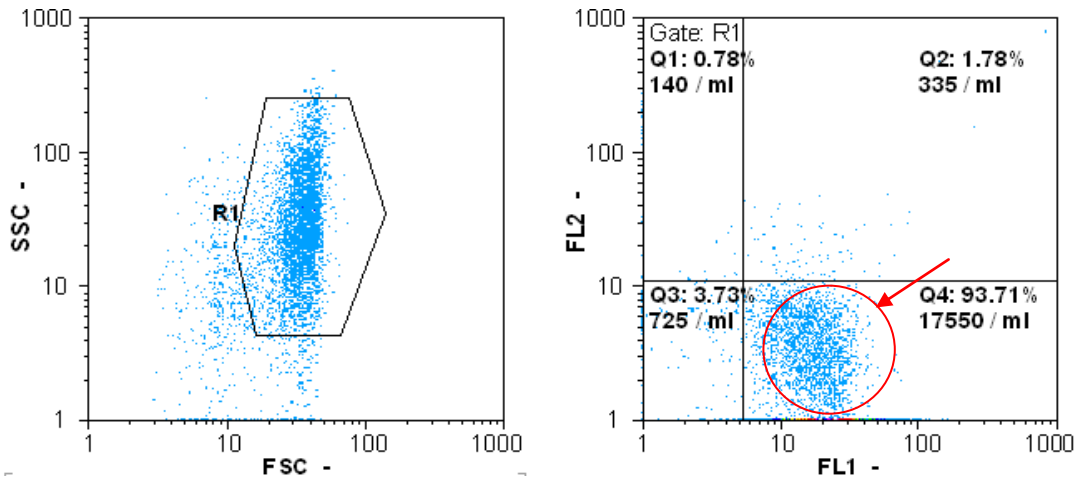
جهت تجزیه و تحلیل آماری از آنالیز رگرسیون(r)، آزمون آماری Student's T-test و آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. آزمون‌های آماری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شدند و نتایج $p<$ ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

روش فلوسایتومتری روش مؤثری در جداسازی جمعیت‌های مختلف سلولی به شمار می‌رود و این خصیصه با افزایش فلوروکروم‌های مختلف، افزایش نیز می‌یابد.

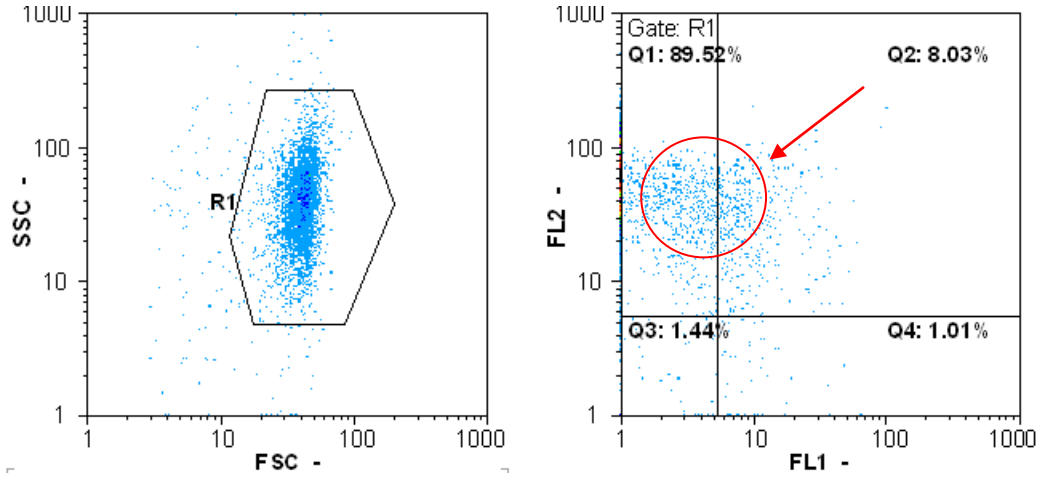
جمعیت گلبول قرمز کنترل منفی که نمونه فرد بالغ می‌باشد از نظر آنتی‌ژن کربونیک انهیدراز(CA) ۹۳/۷٪ ، بیان آنتی‌ژنیک داشته ولی از نظر جمعیت سلولی، F-Cell تنها ۱/۷۸٪ بیان آنتی‌ژنیک داشته است. این در حالی است

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



ب الف

شکل ۱ - الف: پلات نقطه‌ای FL1/FL2 به ترتیب بیانگر فلوروکروم‌های FITC و RPE در نمونه فرد بالغ(کنترل منفی) ب- پلات نقطه‌ای گلبول‌های قرمز انتخاب شده در Gate مربوط به FSC/SSC در نمونه فرد بالغ RhD منفی



ب الف

شکل ۲ ـ الف: پلات نقطه‌ای FL1/FL2 به ترتیب بیانگر فلوروکروم‌های FITC و RPE در نمونه خون بند ناف(کنترل مثبت) ب- پلات نقطه‌ای گلبول‌های قرمز انتخاب شده در Gate مربوط به FSC/SSC در نمونه خون بند ناف

که در نمونه خون بند ناف، ۸۹/۵٪ جمعیت سلولی تنها از نظر آنتی‌ژن Hb-F رنگ‌پذیر بوده‌اند(شکل‌های ۱ و ۲).

پلات نقطه‌ای به دست آمده از فلوسایتومتر، شامل جمعیت‌های مختلف سلولی گلبول قرمز جنینی (CA- ، HBF+)، گلبول F-Cell مادری(CA+ ، HbF+)، سلول‌های بدون رنگ(CA- ، HbF-) و گلبول قرمز بالغ(CA+ ، HbF-) مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز واریانس تک متغیره برای هر پارامتر(HbF) و (RhD) نشان داد که تفاوت معنی‌داری میان نتایج به دست آمده از سوسپانسیون‌های مختلف وجود دارد و این مطلب بیانگر این بود که سوسپانسیون‌ها به نحو مطلوبی تهیه شده بودند. این موضوع توسط اندازه‌گیری حجم متوسط سلولی(MCV) قبل و بعد از تهیه سوسپانسیون‌ها نیز محاسبه شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

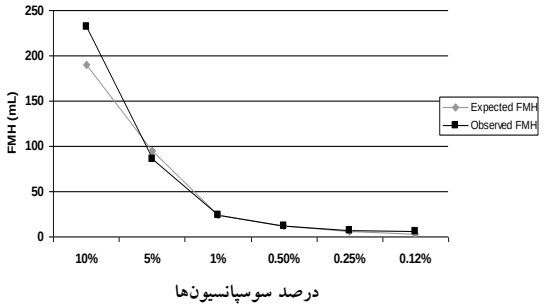
جدول ۱: مقایسه مقادیر به دست آمده با مقادیر مورد انتظار برای محاسبه حجم خونریزی جنینی ـ مادری بر اساس اندازه‌گیری میزان HbF به روش فلوسایتومتری و اندازه‌گیری میزان RhD به روش فلوسایتومتری

درصد سوسپانسیون(٪)	میانگین حجم خونریزی مورد انتظار(میلی‌لیتر) (HbF)	میانگین حجم خونریزی مشاهده شده(میلی‌لیتر) (HbF)	میانگین حجم خونریزی مورد انتظار(میلی‌لیتر) (RhD)	میانگین حجم خونریزی مشاهده شده(میلی‌لیتر) (RhD)
۱۰	۱۹۰	۲۳۲/۵	۱۹۲/۷	۱۹۲
۵	۹۵	۸۶/۴	۹۶/۲	۱۰۱/۲
۱	۲۳/۷	۲۴	۲۴	۳۴
۰/۵۰	۱۱/۸	۱۲	۱۲	۲۰/۶
۰/۲۵	۵/۹	۷/۴	۶	۱۹/۴
۰/۱۲۵	۲/۹	۵/۵۲	۳	۱۴/۴

همبستگی میان نتایج درصد خوانش دو روش رنگ‌آمیزی گلبول قرمز با استفاده از مونوکلونال آنتی‌بادی‌های ضد HbF و RhD مورد بررسی قرار گرفت و نشان داد که این همبستگی معنی‌دار بوده و ضریب همبستگی($p< ۰/۰۵$ ، $r= ۰/۸۹۷$) تعیین شد. مفهوم این همبستگی این بود که تغییرات در درصد هر سوسپانسیون گلبول قرمز در هر دو پارامتر به موازات یکدیگر اتفاق افتاده و این ارتباط معنی‌دار بود.

در بررسی دیگر، با اطلاع از درصد سوسپانسیون‌های تهیه شده در آزمایشگاه و استفاده از فرمول تعیین حجم خونریزی جنینی- مادری(فرمول مولیسون)، امکان تخمین حجم خونریزی(FMH) در نمونه‌ها وجود داشت که این محاسبه انجام شده و به عنوان مقادیر مورد انتظار (Expected value) از هر سوسپانسیون در نظر گرفته شد. پس از انجام رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنس با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال Anti-RhD و Anti-HbF ، درصد گلبول‌های قرمز پس از تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری به دست آمده و این بار حجم خونریزی مشاهده شده(Observed Value) با فرمول محاسبه گشت و با آزمون آماری T-test ، هر دو پارامتر در هر رقت دو به دو مورد ارزیابی قرار گرفت. مقایسه مقادیر به دست آمده با مقادیر مورد انتظار برای محاسبه حجم خونریزی جنینی- مادری بر اساس اندازه‌گیری میزان HbF به روش فلوسایتومتری ارزیابی شد(جدول ۱).

نتایج محاسبه شده از حجم خونریزی جنینی- مادری(FMH) در رقت‌های مختلف سوسپانسیون گلبول قرمز و مقادیر مورد انتظار در پارامتر HbF نشان داد که تفاوت معنی‌داری در حجم خونریزی سوسپانسیون‌های ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵ درصد محاسبه شده از مقادیر مورد انتظار وجود ندارد و تفاوت تنها در سوسپانسیون‌های ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ معنی‌دار می‌باشد. این معنی‌دار بودن در جهت افزایش کاذب مشاهده شده و رنگ‌آمیزی گلبول‌های قرمز با مونوکلونال آنتی‌بادی Anti-HbF تنها در درصدهای ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ حجم خونریزی را بیشتر از مقدار تصور شده نشان می‌دهد(نمودار ۱).



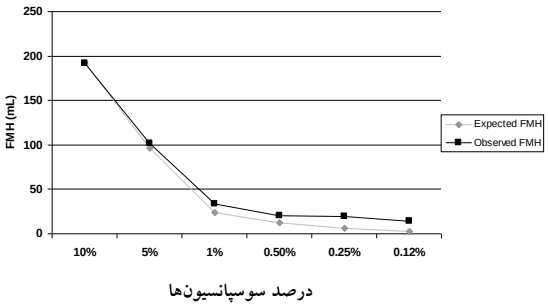
نمودار ۱: مقایسه حجم خونریزی جنینی- مادری محاسبه شده توسط فرمول مولیسون در سوسپانسیون های ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد و حجم خونریزی محاسبه شده پس از آنالیز فلوسایتومتری و رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-HbF .

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

جدول ۲: جدول میانگین و انحراف معیار حجم خونریزی جنینی ـ مادری در رقت‌های مختلف سوسپانسیون بر اساس رنگ‌آمیزی HbF و RhD به روش فلوسایتومتری

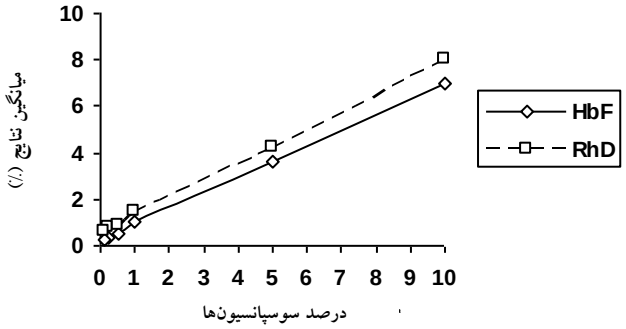
رقت سوسپانسیون‌ها (٪)	($\bar{x}$ ± SD) (HbF)	(p Value) (HbF)	($\bar{x}$ ± SD) (RhD)	(p Value) (RhD)
۱۰	۱۵۳/۰۵ ± ۵۵/۷	۰/۰۵۶	۱۷۶/۱ ± ۲۹/۹	۰/۷۸۲
۵	۷۹/۲ ± ۲۸/۷	۰/۱۸۴	۹۲/۸۵ ± ۱۷/۰۷	۰/۰۰۹
۱	۲۳/۴ ± ۱۹/۱	۰/۰۸۴	۳۱/۳۴ ± ۷/۶	۰/۰۰۱
۰/۵۰	۱۱/۰۵ ± ۸/۲	۰/۱۰۴	۱۸/۹ ± ۵	۰/۰۰۱
۰/۲۵	۶/۹۷ ± ۳/۵۸	۰/۰۰۱	۱۶/۹ ± ۴/۷	۰/۰۰۱
۰/۱۲۵	۴/۴ ± ۲/۴	۰/۰۰۱	۱۳/۲ ± ۴/۸	۰/۰۰۱

میانگین و انحراف معیار حجم خونریزی جنینی ـ مادری در سوسپانسیون‌های مختلف بر اساس رنگ‌آمیزی داخل سلولی HbF به روش فلوسایتومتری محاسبه شد(جدول ۲). نتایج محاسبه شده از حجم خونریزی جنینی- مادری (FMH) در رقت‌های مختلف سوسپانسیون گلبول قرمز و مقادیر مورد انتظار در پارامتر RhD نشان داد که تفاوت معنی‌داری در حجم خونریزی سوسپانسیون‌های ۱۰ و ۵ درصد محاسبه شده از مقادیر مورد انتظار وجود نداشت و بقیه سوسپانسیون‌ها شامل ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد، دارای کمی افزایش کاذب در مقادیر نسبت به مقادیر مورد انتظار بودند($p< ۰/۰۵$)(نمودار ۲).



نمودار ۲: میزان FMH مورد انتظار و میزان FMH به دست آمده از سوسپانسیون‌های مختلف به روش فلوسایتومتری RhD

رگرسیون به دست آمده از حجم خونریزی جنینی- مادری با استفاده از هر دو آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-D و Anti-HbF در حجم‌های خونریزی محاسبه شده درصدهای مختلف سوسپانسیون گلبول قرمز، مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داد که این همبستگی معنی‌دار بوده و ضریب همبستگی در روش رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس گلبول قرمز با آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-HbF (r= ۰/۸۷۴) و آنتی‌بادی مونوکلونال Anti-RhD(r= ۰/۹۹۰) محاسبه شد. مفهوم این همبستگی این بود که تغییرات در نتایج حجم خونریزی محاسبه شده هر درصد از سوسپانسیون گلبول قرمز در هر دو پارامتر به موازات یکدیگر اتفاق افتاده و این ارتباط معنی‌دار می‌باشد.



نمودار ۳: مقایسه میانگین نتایج مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس تک رنگی RhD و دو رنگی HbF در درصدهای مختلف ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۵ و ۱۰ سوسپانسیون گلبول قرمز به روش فلوسایتومتری

آنالیز واریانس جهت بررسی نتایج حجم خونریزی‌های به دست آمده با استفاده از رنگ‌آمیزی تک رنگی RhD و دورنگی HbF انجام شد و مشخص شد که تفاوت معنی‌داری میان نتایج در هر دو پارامتر وجود دارد. نمودار

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

میانگین نتایج درصد سوسپانسیون‌ها نیز بیانگر این موضوع بود که میانگین نتایج دو روش در هیچ یک از رقت‌ها یکدیگر را قطع نمی‌کند و محدوده نرمال هر یک از دو پارامتر HbF و RhD با یکدیگر تفاوت دارد(r= ۰/۸۷۵) (نمودار ۳).

بحث

روشی که در سال‌های اخیر در زمینه اندازه‌گیری حجم خونریزی جنینی- مادری مورد توجه محققین قرار گرفته است، استفاده از روش فلوسایتومتری می‌باشد که در آن مونوکلونال آنتی‌بادی‌های مختلف از جمله Anti-D و Anti-HbF به کار گرفته شده است. از مزایای این روش، حساسیت و سرعت بالا در آنالیز تعداد زیادی سلول می‌باشد که در روش‌های قبلی وجود نداشته است(۱۹-۱۶). روش رنگ‌آمیزی دو رنگی(Dual) که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، امکان اندازه‌گیری دقیق گلبول‌های حاوی HbF جنین از F-Cell های مادر را فراهم آورده و در مقایسه با رنگ‌آمیزی تک رنگی RhD ، توانایی بالاتری در تشخیص مقادیر کم خونریزی دارد.

بر طبق نتایج به دست آمده از درصد خوانش HbF در سوسپانسیون گلبول قرمز که به روش رنگ‌آمیزی داخل سلولی دورنگی انجام گرفت، همبستگی معنی‌داری بین رقت‌های ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد سوسپانسیون گلبول قرمز مشاهده شد که بیانگر خطی بودن آنالیز و دقت آن بود(p< ۰/۰۵ ، r= ۰/۸۷۴).

پورا و همکارانش نیز که از سوسپانسیون گلبول قرمز به روش سریالی(۰/۰۱ تا ۵ درصد) برای اندازه‌گیری HbF و از رنگ‌آمیزی داخل سلولی دو رنگی استفاده کرده بودند، خطی بودن نتایج و همبستگی میان رقت‌های مختلف را تایید نمودند(p< ۰/۰۵ ، r= ۰/۹۵). این نتایج مشابه نتایج به دست آمده از مطالعه فوق بود(۲۰).

در بررسی دیگری که در این مطالعه انجام شد، مشخص گردید که میزان HbF به روش رنگ‌آمیزی دو رنگی در رقت‌های ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد سوسپانسیون گلبول قرمز، افزایش کاذبی در مقایسه با نتایج مورد انتظار داشته که بیانگر عدم دقت این روش در اندازه‌گیری HbF در رقت‌های فوق می‌باشد. در مطالعه‌ای نیز که پلیکان و همکارانش انجام دادند، اعلام نمودند که روش فلوسایتومتری در تشخیص مقادیر HbF در رقت‌های کمتر از ۰/۰۱ درصد گلبول قرمز جنینی از دقت کافی برخوردار نمی‌باشد(۲۱).

این در حالی است که پورا و همکارانش در میزان HbF با رقت‌های(۰/۱-۰/۰۲) درصد سوسپانسیون گلبول قرمز نسبت به مقادیر مورد انتظار، تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند(۲۰). به نظر می‌رسد یکی از دلایلی که باعث افزایش کاذب در میزان HbF در رقت‌های پایین (۰/۱۲۵-۰/۲۵) شده است، قرارگیری درصد ناچیزی از F-Cell های مادری در محدوده گلبول‌های قرمز با محتوای بالای HbF و در پنجره قرارگیری گلبول‌های قرمز جنین باشد. گزارشی که توسط نلسون و همکارانش انجام شد، نشان‌دهنده این بود که حدود ۰/۲۰ تا ۰/۱۶ درصد از F-Cell ها می‌توانند در محدوده گلبول‌های قرمز با محتوای بالای HbF و در واقع در جایگاه گلبول‌های قرمز جنینی قرار گیرند(۲۲).

بررسی دیگری که در این مطالعه انجام شد، اندازه‌گیری آنتی‌ژن سطحی RhD بود که در رقت‌های مختلف سوسپانسیون گلبول قرمز(۱۰، ۵، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱۲۵ درصد) به روش رنگ‌آمیزی سطح سلولی تک‌رنگی انجام گرفت. بر طبق این نتایج با وجود همبستگی معنی‌داری که بین رقت‌های مختلف در خوانش RhD وجود داشت(p< ۰/۰۵ ، r= ۰/۹۹۰)، نتایج به دست آمده فقط در رقت ۱۰ درصد با نتیجه مورد انتظار هم‌خوانی داشت و در رقت‌های دیگر، افزایش معنی‌داری در مقایسه با نتایج مورد انتظار دیده می‌شد. یکی از دلایل احتمالی عدم دقت در روش فلوسایتومتری با استفاده از رنگ‌آمیزی با RhD در رقت‌های زیر ۱۰ درصد به نظر می‌رسد پایین بودن حساسیت روش تک رنگی نسبت به روش رنگ‌آمیزی دو رنگی در بررسی RhD باشد. این در حالی است که در مطالعه‌ای کومپل و همکارانش در بررسی RhD به روش دو رنگی با استفاده از آنتی گلیکوفورین A، توانستند حساسیت روش را در خوانش RhD در رقت‌های کمتر از ۱۰ درصد نیز افزایش دهند(۲۳).

در مطالعه دیگری که اوخن باین و همکارانش انجام دادند، با استفاده از روش فلوسایتومتری و آنتی‌بادی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

Anti-RhD توانستند حضور گلبول‌های قرمز +D را در سوسپانسون ۱-۰ درصد تشخیص دهند که این نتیجه بر خلاف نتیجه به دست آمده از مطالعه کنژونی بود(۲۴).

بر طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه، نشان داده شد که رنگ‌آمیزی دورنگی ایمونوفلورسانس HbF و کربونیک انهیدراز توانست با دقت قابل توجهی در اندازه‌گیری نمونه‌های آزمایشگاهی در محدوده میان ۰/۵ تا ۱۰ درصد گلبول قرمز، حجم خونریزی را تعیین کند که این نتیجه با نتایج تحقیق‌های سال‌های اخیر مطابقت داشت(۲۵،۲۶). این در حالی است که رنگ‌آمیزی سطحی سلول با استفاده از آنتی‌بادی Anti-RhD نسبت به رنگ‌آمیزی دو رنگی HbF در بررسی حجم خونریزی از دقت کمتری برخوردار بود و به نظر می‌رسد که استفاده از روش دو رنگی HbF به عنوان یک روش کارآمد می‌تواند در تعیین حجم خونریزی جنینی- مادری مطرح باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر مانند مطالعه‌های قبلی که در سال ۲۰۰۱ توسط دیویس و همکارانش و در سال ۲۰۰۷ توسط پورا و همکارانش انجام پذیرفت، استفاده از رنگ‌آمیزی دو رنگی HbF به روش فلوسایتومتری در تعیین حجم خونریزی جنینی- مادری را پیشنهاد می‌کند که علت این امر بالا بودن صحت این روش است و اگر چه ورود گلبول‌های قرمز جنینی در سه ماهه اول حاملگی نیز احتمال دارد اما وقوع آن به طور خاصی در زمان زایمان افزایش می‌یابد(۲۷، ۲۰).

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این تحقیق که نتیجه پایان‌نامه مصوب مرکز تحقیقات انتقال خون است توسط این مرکز تامین شده است. بدین وسیله از زحمات آقای دکتر احمد قره‌باغیان رئیس مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون، همکاران بخش زنان بیمارستان میلاد تهران و همکارانی که در این طرح صمیمانه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References :

1- TV Vengelen, ED Brecher, SH Butch. ABBB Technical manual. 13th ed. American Association of blood Banks; 1999. p.495-512.
2- Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors,time of occurrence and clinical effects.Transfusion 1990; 30(4): 344-57.
3- Ramasethu J, Luban LC. Alloimmune hemolytic disease of the newborn. In: kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Parchal J, Seligsohn U. Williams hematology. 7 ed. New York: Mc Graw Hill; 2006. p. 751-755.
4- B.M.Kumple: on the mechanism of tolerance to the Rh D antigen mediated by passive anti-D (Rh D prophylaxis). Immunol lett 2002; 82(1-2): 67-73.
5- Letsky EA, de Silva M. Preventing Rh immunisation. BMJ 1994; 309(6949): 213-4.
6- Kleihauer E, Braun H, Betke k. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear.klin wochenschr 1957; 35(12): 637-8.
7- Johnson PR,Tait RC, Austin EB, Shwe KH, Lee D. Flow cytometery in diagnosis and management of large fetomaternal haemorrhage. J Clin Pathol 1995; 48(11): 1005-8.
8- Lubenko A, Collier R, Williams M, Hindmarch D, Wilson S, Pluck J. Quantitating fetomaternal haemorrhage of D+ red cells using an FITC-conjugated IgG monoclonal anti-D by flow cytometry: a case report. Immunohematology 1997; 13(1): 1214.
9- Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. Transfusion 1998; 38(8): 749-56.
10- 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(11): 1005-8.
11- Lloyd-Evans P, Kumpel BM, Bromelow I, Austin E, Taylor E. Use of a directly conjugated monoclonal anti-D (BRAD-3) for quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. Transfusion 1996; 36(5): 432-7.
12- Tashian RE. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. Bioessays 1989; 10(6): 186-92.
13- Brady HJ, Edwards M, Linch DC, Knott L, Barlow JH, Butterworth PH. Expression of the human carbonic anhydrase I gene is activated late in fetal erythroid development and regulated by stage - specific trans-acting factors. Br J Haematol 1990; 76(1): 135-42.
14- Aliakbar S, Brown PR. Measurement of human erythrocyte CAI and CAII in adult, newborn, and fetal blood. Clin Biochem 1996; 29(2): 157-64.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

15- Scientific Subcommittee of the Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion Inc.Guidelines for laboratory assessment of fetomaternal haemorrhage. 1st ed. Sydney: Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion Inc; 2002.
16- Nance SJ, Nelson JM, Arndt PA, Lam HC, Garratty G. Quantification of fetal-maternal haemorrhage by flow cytometry.A simple and accurate method. Am J Clin Pathol 1989; 91(3): 288-92.
17- Gomez-Arbones X, Pinacho A, Oritz P, Macia J, Gallart M, Araguas C, *et al.* Quantification of fetomaternal haemorrhage.An analysis of two cytometric techniques and a semiquantitative gel agglutination test. Clin Lab Haematol 2002; 24(1): 47-53.
18- Duguid JK, Bromilow IM. Laboratory measurement of fetomaternal haemorrhage and its clinical relevance. Transfus Med Rev1999; 13(1):43-8.
19- Duguid JK, Bromilow IM, Eggington J. Kleihauer testing and flow cytometry.A comparative study for assessment of feto-maternal haemorrhage. Haematology 1996; 1: 79-83.
20- Porra V, Bernaud J, Gueret P, Bricca P, Rigal D, Follea G, *et al*. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method: evaluation of the fetal cell count kit. Transfusion 2007; 47(7): 1281-9.
21- Pelikan DM, Scherjon SA, Mesker WE, de Groot-swing GM, Brouwer-Mandema GG, Tanke HJ, *et al.* Quantification of fetomaternal hemorrhage: a comparative study of the manual and automated microscopic Kleihauer-Betke tests and flow cytometry in clinical samples. Am J Obstet Gynecol 2004; 191(2): 551-7.
22- Nelson M, Popp H , Horky K, Forsyth C, Gibson J. development of a flow cyrtometric test for the detection of D-positive fetal cells after fetomaternal haemorrhage and a survey of the prevalence in D-negative women. Immunohematology 1994; 10(2): 55-9.
23- Kumple BM. Labeling D+ RBCs for flow cytometric quantification of fetomaternal hemorrhage after RBCs have been coated with anti-D. Transfusion 2001; 41(8): 1059-63.
24- Ochsenbein-Imhof N, Ochsenbein AF, Seifert B, Huch A, Huch R, Zimmerman R. Quantification of fetomaternal hemorrhage by flurescence microscopy is equivalent to flow cytometry.Transfusion 2002; 42(7): 947-953.
25- Janssen WC, Hoffmann JJ. Evaluation of flow cytometric enumeration of foetal erythrocytes in maternal blood. Clin Lab Haematol 2002; 24(2): 89-92.
26- Greiss MA, Armstrong-Isher SS, Perera WS, Brown PM, Urbaniak SJ. Semiautomated data analysis of flow cytometric estimation of fetomaternal hemorrhage in D-women. Transfusion 2002; 42(8): 1067-78.
27- Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cell in fetomaternal haemorrhage using a fetal haemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. Transfusion 1998; 38(8): 749-56.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

Original Article

Quantification of fetomaternal hemorrhage: a compariative study of the HbF dual staining and RhD single staining by flow cytometry

Khoshnaghsh F.[1], Kheirandish M.[1], Deyhim MR[1].

[1]Blood Transfusion Research Center,High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

The quantification of fetal cells in the maternal circulation is an important goal to determine the amount of anti-D for prevention of active immunization of a D-negative mother giving birth to a D-positive baby. The aim of this study was to evaluate two flowcytometric staining technics for determination of fetal erythrocytes in maternal blood and to recognize the best.

Materials and Methods

In this experimental study, 34 adult D-negative blood samples were spiked with six serial dilutions of D-positive cord blood (0.125, 0.25, 0.5, 1, 5 and 10%) which was representative of 99.9% of the clinical fetomaternal hemorrhage (FMH); they were stained for flow cytometric analysis. The Fetal Cell Count Kit was used for HbF dual staining and monoclonal anti-D for RhD single staining.

Results

A comparison between RhD and HbF percentages and FMH volume in spiking samples was performed. A significant correlation between two different parameters in flowcytometric percentages was observed (anti-HbF versus anti-D, r= 0.897, $p<0.05$). FMH volume was calculated and a significant correlation between expected and observed FMHs in RhD and HbF was obtained ($p<0.05$, r=0.984, r=0.874). The anti-HbF flowcytometric dual staining allowed better distinction between fetal RBCs (HbF+,CA-), F cells (HbF+,CA+), and adult RBCs (HbF-,CA+). Although Rh-D showed better correlation, but higher values with the RhD in suspensions lower than 10% were noted.

Conclusions

Data showed that anti-HbF labeling is significantly much more accurate than RhD labeling. Quantification of FMH using these two techniques described allows precise dosage of RhD immunoglobulin for protection against anti-D allo-immunization.

Key words: Hemorrhage**,** Fetomaternal Transfusion, Flow Cytometry
Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8(2): 104-114

Received: 21 Aug 2010
Accepted: 13 Mar 2011

Correspondence: Kheirandish M., PhD of Immunology. Blood Transfusion Research Center,High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599
E-mail: *kheira_m2001@yahoo.co.uk*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]