

# PRACE POGLĄDOWE

Adv Clin Exp Med 2006, 15, 2, 345–353  
ISSN 1230-025X

AGNIESZKA SAPA

## The Usefulness of Contemporary Laboratory Medicine in Fetal Lung Maturity Assessment

### Przydatność współczesnej diagnostyki laboratoryjnej w ocenie dojrzałości płuc płodu

Katedra i Zakład Analityki Medycznej AM we Wrocławiu

#### Streszczenie

Przedwczesny poród może być obarczony ryzykiem wystąpienia u noworodka następstw klinicznych związanych z niedojrzałością układu oddechowego. Prawidłowe określenie dojrzałości płuc jest niezwykle cenną informacją dla klinicystów. Dynamiczny rozwój diagnostyki dojrzałości płuc płodu sprawił, że obecnie jest dostępnych wiele testów, pozwalających na ocenę stanu płodu jeszcze przed porodem. Nie wszystkie badania można jednak zalecić. Niniejsza praca ma na celu omówienie współczesnych metod diagnostycznych z uwzględnieniem ich przydatności klinicznej oraz czynników przedanalizacyjnych. Przedstawiono między innymi wyznaczanie stosunku lecytyna/sfingomielina, określanie poziomu fosfatydyloglicerolu, metody wykorzystujące fizyczne właściwości płynu owodniowego, w tym polaryzację fluorescencji oraz określanie liczby ciał lamelarnych. Pomimo wielu wad, wyznaczanie stosunku lecytyna/sfingomielina wciąż jest metodą referencyjną. Laboratoria zajmujące się diagnostyką prenatalną powinny rozważyć oferowanie szybkich i niedrogich testów, takich jak: określanie liczby ciał lamelarnych za pomocą analizatorów hematologicznych oraz wyznaczanie stosunku surfaktant/albumina komercyjnym testem FLM II firmy Abbott (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 2, 345–353).

**Słowa kluczowe:** dojrzałość płuc płodu, zespół niewydolności oddechowej noworodków, płyn owodniowy.

#### Abstract

A preterm delivery may bring a risk of complications to the infant because of the immaturity of the respiratory system. The correct prediction of lung maturity is a very precious information for a clinician. Dynamic development of the fetal lung maturity testing brought a lot of tests that allow to evaluate the statement of the fetus before a delivery. These tests do not have an equal value. The aim of the study is to present contemporary diagnostic methods, taking into consideration their clinical usefulness and preanalytical factors. Among others there are the lecithin/sphingomyelin ratio, phosphatidylglycerol, methods based on physical properties of the amniotic fluid including the fluorescence polarization and the lamellar body count. The L/S ratio, despite many disadvantages, is still a reference method. Laboratories that perform perinatal diagnostics should consider offering quick and cheap tests, such as the lamellar body count which is carried out by hematology blood analyzers or the surfactant/albumin ratio with a commercial FLM II assay (Abbott) (*Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 2, 345–353).

**Key words:** fetal lung maturity, respiratory distress syndrome, amniotic fluid.

Zespół niewydolności oddechowej noworodków (RDS – *respiratory distress syndrome*), zwany czasem chorobą błon szklistych (HMD – *hyaline membrane disease*) wciąż jest poważnym zagrożeniem życia noworodków, zwłaszcza urodzonych przedwcześnie, o małej i bardzo małej masie urodzeniowej. Istnienie surfaktantu płucnego odkryto w 1956 r., a w 1959 r. wykazano, że nie ma go w płucach noworodków, które zmarły z powodu HMD [1].

Już w latach 60. XX w. wielu badaczy interesowało się możliwością badania dojrzałości płodu. Wynikiem tego było opracowanie wielu metod, takich jak: oznaczanie kreatyniny, test zmętnienia czy test komórek pomarańczowych. Na tym wczesnym etapie rozwoju diagnostyki prenatalnej ogromną rolę odegrali polscy badacze. Prof. Janusz Woytoń już w 1963 r. opublikował pracę dotyczącą przydatności oznaczania kreatyniny w płynie

owodniowym jako metody określania dojrzałości płodu. Opracował on także test zmętnienia, który był jednym z pionierskich sposobów sprawdzania dojrzałości [2]. Rozwój metod laboratoryjnych, wykorzystujących składniki chemiczne i właściwości fizyczne surfaktantu, służących przewidywaniu wystąpienia RDS u noworodków, rozpoczęli Gluck i Kulovich, którzy w 1971 r. opublikowali wyniki badań dowodzące, że wyznaczenie stosunku lecytyna/sfingomielina w płynie owodniowym ma dużą wartość predykcyjną w określaniu dojrzałości płuc płodu [3]. Od tego czasu przeprowadzono wiele badań analizujących skład surfaktantu. Okazało się, że zawiera on wiele różnorodnych komponent fosfolipidowych, lipidowych i białkowych. Dokładna rola niektórych z nich dotychczas nie jest poznana. Nie ulega jednak wątpliwości, że swoje unikatowe właściwości zawdzięcza surfaktant właśnie tej złożoności składu. Jest wytwarzany przez pneumocyty II typu i magazynowany w postaci ciał lamelarnych. Najważniejszym biologicznym zadaniem surfaktantu jest obniżanie napięcia powierzchniowego przez tworzenie stabilnego filmu na powierzchni pęcherzyków płucnych [1].

Prawidłowa ocena stanu płodu ma ogromne znaczenie kliniczne, gdyż pozwala na podjęcie decyzji dotyczących dalszego postępowania. Jest to szczególnie ważne w przypadku ciężarnych chorych na cukrzycę, nadciśnienie i w innych stanach patologicznych, zagrożonych porodem przedwczesnym lub opóźniających dojrzewanie wewnątrzmaciczne.

Do diagnostyki dojrzałości płuc płodu próbowano wykorzystać bardzo wiele wskaźników, nie wszystkie jednak okazały się przydatne z uwagi na ich słabą wartość predykcyjną lub skomplikowaną procedurę oznaczania. W tabeli 1. omówiono definicje kryteriów służących do oceny poszczególnych testów.

## Wyznaczanie stosunku lecytyna/sfingomielina

Pierwszą metodą opracowaną przez Glucka i Kulovicha [3] było wyznaczenie stosunku lecytyna/sfingomielina (L/S) w płynie owodniowym, fosfolipidów surfaktantu płucnego przez rozdzielenie ich za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC – *thin-layer chromatography*). Oryginalna procedura bywa stosowana do dzisiaj, choć opracowano jej liczne modyfikacje. Systemy TLC mogą być jedno- i dwuwymiarowe. Opisano także metodę wysoko rozdzielczej radialnej chromatografii cienkowarstwowej, za pomocą której można jednocześnie rozdzielać wiele fosfolipidów, m.in. lecytynę, sfingomielinę, fosfatydyloglicerol, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloetanolaminę [4]. Wszystkie odmiany TLC wymagają izolacji fosfolipidów przez zastosowanie co najmniej jednego, a często wszystkich z następujących etapów: wirowanie próbki płynu owodniowego, ekstrakcja lipidów mieszaniną chloroform–metanol–woda, precypitacja zimnym acetonem, odparowywanie rozpuszczalnika i rekonstrukcja. Następnie rozdziela się fosfolipidy na płytce pokrytej żelem krzemionkowym (faza stała); fazą rozwijającą chromatogram jest mieszanina rozpuszczalników. Rozdzielone składniki można uwidocznic, barwiąc płytkę na obecność fosforu, zwęglając kwasem siarkowym i ogrzewając do 280°C lub innymi sposobami. Powstałe plamki ocenia się i porównuje z rozdzielanymi jednocześnie standardami densytometrycznie za pomocą skanera, przez elucję poszczególnych fosfolipidów z płytki i oznaczenie fosforu w eluacie lub planimetrycznie przez pomiar wielkości plamek. Kolejnym etapem jest wyliczenie stosunku L/S, ewentualnie podanie procentowej zawartości składników fosfolipidowych,

**Tabela 1.** Definicje kryteriów służących do oceny klinicznej użyteczności testów [39]

**Table 1.** Definitions for predictive value of the tests analysis [39]

Definicje (Definitions)	
Wynik pozytywny (Positive result)	RDS
Wynik negatywny (Negative result)	brak RDS
Wynik prawdziwie pozytywny (True-positive TP)	wynik świadczy o niedojrzałości, występuje RDS
Wynik prawdziwie negatywny (True-negative TN)	wynik świadczy o dojrzałości, nie występuje RDS
Wynik fałszywie pozytywny (False-positive FP)	wynik świadczy o niedojrzałości, nie występuje RDS
Wynik fałszywie negatywny (False-negative FN)	wynik świadczy o dojrzałości, występuje RDS
Czułość (Sensitivity)	proporcja noworodków z RDS, u których wynik testu wskazywał na niedojrzałość
TP/TP + FN	proporcja noworodków z RDS, u których wynik testu wskazywał dojrzałość
Swoistość (Specificity)	proporcja przypadków, w których wynik testu „niedojrzały” prawidłowo wskazał RDS
TN/TN + FP	proporcja przypadków, w których wynik testu „dojrzały” prawidłowo wskazał brak RDS
Pozytywna wartość predykcyjna (Positive predictive value PPV) TP/TP + FP	
Negatywna wartość predykcyjna (Negative predictive value NPV) TN/TN + FN	

w tym fosfatydyloglicerolu. Przyjęto, że wynik  $L/S > 2$  świadczy o dojrzałości, wynik  $L/S < 1,5$  o niedojrzałości, wyniki natomiast między 2 a 1,5 są pośrednie [5]. Istnieją pewne rozbieżności w interpretacji wyników, zależne od wskaźników metody, to natomiast skutkuje zróżnicowaną oceną przydatności klinicznej testu.

Metoda chromatografii cienkowarstwowej wciąż jest uważana przez niektórych za „złoty standard” [6, 7], w zasadzie wszystkie nowo wdrażane metody ocenia się pod względem ich korelacji z  $L/S$ . Ma ona jednak liczne wady, które sprawiają, że ciągle poszukuje się alternatywnej metody uzyskiwania wiarygodnych informacji na temat stanu płuc płodu [8]. TLC jest niezwykle pracochłonna (4–5 godz.), do jej wykonania i prawidłowej interpretacji wyników jest potrzebna duża biegłość i doświadczenie. Ashwood [6] zaleca, aby laboratoria otrzymujące do badań mniej niż 15 próbek płynu owodniowego tygodniowo w ogóle zrezygnowały z tej metody. Charakteryzuje się ona małą precyzją, wewnątrzseryjny współczynnik zmienności (CV) według różnych źródeł wynosi od 18 do nawet 27% [5, 6]. Istnieją problemy ze standaryzacją metody i oceny wyników. Duży wpływ ponadto na wynik badania (z wyjątkiem odsetka fosfatydyloglicerolu – %PG) ma kontaminacja próbki krwią i smółką, oraz, w przypadku próbek uzyskiwanych z pochwy – wydzieliną pochwową. Stosunek  $L/S$  nie jest miarodajny u kobiet ciężarnych z niewyrównaną cukrzycą.

Bardziej czułą i powtarzalną metodą służącą do oceny składników fosfolipidowych jest wysoko sprawna chromatografia cieczowa (HPLC – *high-performance liquid chromatography*) [9, 10]. Wyniki uzyskiwane tą metodą są bardziej precyzyjne (CV około 3%), łatwiejsze w ocenie, mniej subiektywne. Nie jest to jednak metoda dostępna rutynowo, podstawowym ograniczeniem w jej zastosowaniu jest kosztowność niezbędnej aparatury i konieczność specjalistycznego przeszkolenia pracowników. Jest również czasochłonna, choć w mniejszym stopniu niż TLC oraz wymaga wstępnego oczyszczenia próbki.

## Ocena zawartości fosfatydyloglicerolu

Dobrym wskaźnikiem predykcyjnym dojrzałości płuc jest fosfatydyloglicerol (PG – *phosphatidylglycerol*). Jest bardzo niewielkim, ale niezmiernie ważnym odsetkiem frakcji fosfolipidowej surfaktantu. Pojawia się w płynie owodniowym pod koniec ciąży, jego obecność świadczy o dojrzałości płuc. Jednak niewykrzyście fosfatydyloglicerolu za pomocą testów jakości-

wych czy półilościowych nie świadczy jednoznacznie o niedojrzałości płuc. Jest to wskaźnik najmniej podatny na interferencję krwi oraz wydzieliny pochwowej [11–15]. Według niektórych autorów jest najlepszym wskaźnikiem predykcyjnym wystąpienia RDS u ciężarnych chorych na cukrzycę [14–15].

% PG może być oznaczany chromatograficznie równoległe ze stosunkiem  $L/S$ , ale ze względu na omawiane wcześniej niedogodności tego testu opracowano inne metody. Jedną z ciekawszych, choć obecnie niestosowaną metodą jest enzymatyczne oznaczanie fosfatydyloglicerolu [14, 15], wykorzystujące złożone układy enzymów. Opisa- no wersję zautomatyzowaną do oznaczania wszystkich ważniejszych fosfolipidów [15, 16]. Metody enzymatyczne dają jednoznaczne ilościowe wyniki, wykonanie zabiera mniej czasu, a powtarzalność jest lepsza w porównaniu z metodą chromatografii cienkowarstwowej, są również bardziej czułe. Charakteryzują się ponadto liniowością w całym zakresie stężeń spodziewanych w płynie owodniowym. Brakuje jednak badań, które wskazują na przydatność kliniczną tych testów i prawidłowe przewidywanie dojrzałości płuc noworodka.

AmnioStat-FLM firmy Irvine Scientific jest niezwykle prostym i szybkim testem aglutynacji szkiełkowej, służy do półilościowej oceny fosfatydyloglicerolu w próbce płynu owodniowego [6, 11–13]. Zasadą metody jest reakcja PG ze skierowanymi przeciwko niemu króliczymi przeciwciałami. Przeprowadza się jednocześnie aglutynację z dwoma standardami o różnych stężeniach oraz wykonuje kontrolę negatywną. Wynik odczytuje się, porównując wygląd próby badanej ze standardami i ujemną próbką kontrolną. Otrzymuje się wynik ujemny, słabo dodatni lub dodatni. Ten jakościowy charakter wyniku jest wadą testu. Można jedynie pośrednio wnioskować o stężeniu PG w próbce dzięki zastosowaniu standardów o dwóch granicznych stężeniach: niska pozytywna kontrola zawiera PG w stężeniu 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , wysoka pozytywna kontrola – w ilości 2  $\mu\text{g/ml}$ . Wartości te ustalono na takich poziomach na podstawie badań, które wykazały, że stężenie PG  $> 2 \mu\text{g/ml}$  świadczy o pełnej dojrzałości płuc. Wartości między 0,5 a 2  $\mu\text{g/ml}$  świadczą o nieukończonym procesie dojrzewania płuc. Test sprawdza się najlepiej w populacji o małym ryzyku, z uwagi na jego małą wartość predykcyjną w przewidywaniu niedojrzałości. Może być stosowany z powodzeniem jako wiarygodne badanie przesiewowe lub w serii innych badań. Wadą jest stosunkowo wysoki koszt oznaczenia i konieczność sprowadzania testu ze Stanów Zjednoczonych w suchym lodzie. Główną zaletą natomiast jest niewielki wpływ zanieczyszczenia krwią na wyniki uzyskane tą metodą [6, 12, 13].

## Metody oparte na badaniu fizycznych właściwości płynu owodniowego

Najprostszym testem, jaki można przeprowadzić, niewymagającym specjalistycznej aparatury, jest tzw. test spieniania (*shake test*) lub test stabilności piany, w którym uzyskuje się indeks stabilności piany (FSI – *foam stability index*). Obydwa testy polegają na wytrząsaniu próbki płynu owodniowego z etanolem. W teście „spieniania” wykonuje się wiele rozcieńczeń płynu owodniowego, które następnie wytrząsa się z równymi objętościami 95% etanolu. Zalecane końcowe stężenie etanolu wynosi 47,5%. Takie stężenie warunkuje wyeliminowanie pozostałych składników płynu owodniowego, mogących interferować w badaniu. FSI uzyskuje się przez zmieszanie różnych objętości etanolu ze stałą objętością płynu owodniowego. Indeks jest definiowany jako największa objętość etanolu, która pozwala na utrzymanie stabilnego pierścienia pęcherzyków na powierzchni. Próbką odniesienia w obu testach jest czysty płyn owodniowy. Metoda jest półilościowa, dobrze jednak koreluje z L/S. Wartość FSI równa 0,48 jest porównywalna z L/S równym 2. Bezwzględny wymaganym jest używanie bardzo czystego szkła i sprzętu laboratoryjnego, najlepiej jednorazowego użytku [5].

Test stabilności mikropęcherzyków (SMT – *stable microbubble test*), opisany przez Pattle et al. [17], wykorzystuje również zdolność surfaktantu do obniżania napięcia powierzchniowego. Badanie to polega na wytworzeniu pęcherzyków powietrza w próbce płynu owodniowego, a następnie na obserwacji kropli płynu w 10-krotnym powiększeniu mikroskopu świetlnego. Liczy się liczba pęcherzyków, którą podaje się na mm<sup>2</sup>. Jeżeli wynik testu wynosi poniżej 2 pęcherzyków/mm<sup>2</sup>, to płuca uważa się za niedojrzałe [17, 18]. Test jest niezwykle prosty w wykonaniu oraz bardzo tani. Z uwagi na stosunkowo małą wartość predykcyjną nie powinien być jedynym wykonywanym badaniem, może stanowić co najwyżej badanie przesiewowe w laboratoriach dysponujących skromnymi środkami finansowymi.

## Polaryzacja fluorescencji

Po raz pierwszy metodę tę oraz jej potencjalne zastosowanie w ocenie dojrzałości płuc płodu opisano w 1976 r. [19]. Do próbki płynu owodniowego dodaje się znaną ilość hydrofobowej substancji o właściwościach fluorescencyjnych. Miesza się ona z lipidami obecnymi w próbce, a szybkość rotacji zależy od mikrolepkości płynu. Im więcej znajduje się w nim surfaktantu, tym bardziej obni-

ża on napięcie powierzchniowe, dając w rezultacie niższy stopień polaryzacji promieniowania fluorescencyjnego [5, 19, 20]. Można zastosować różne barwniki fluorescencyjne; pierwszym zastosowanym fluoroforem był 1,6-dwufenylo-1,3,5-heksatrien (DPH). Obecnie najczęściej używa się znakowanej fluorescencyjnie fosfatydylocholiny.

Test ten można przeprowadzić manualnie za pomocą polarymetru fluorescencyjnego lub metodą zautomatyzowaną. Firma Abbott jest producentem analizatora TDx, który ma możliwość wykonania takiego pomiaru; obecnie jest dostępna już druga generacja gotowych testów tej firmy, opartych na wyznaczeniu stosunku surfaktant/albumina – FLM II. Odniesienie pomiaru polaryzacji fluorescencji do ilości albuminy jest uzasadnione tym, że ilość albuminy w płynie owodniowym jest wartością względnie stałą. Otrzymuje się wyniki w miligramach surfaktantu na gram albuminy, a nie, jak w manualnych metodach, w jednostkach polaryzacji.

Metoda ma wiele zalet, przede wszystkim jest zautomatyzowana, ilościowa, łatwa do standaryzacji i kalibracji, gdyż firma oferuje gotowy zestaw kalibratorów i prób kontrolnych. Charakteryzuje się bardzo dobrą precyzją – CV < 5% [6, 20] oraz dokładnością. Całą procedurę oznaczania, włącznie z wymaganym przez producenta filtrowaniem próbki, można przeprowadzić w ciągu około 30 min. Najważniejszą cechą jest jednak bardzo dobra korelacja wyników z ryzykiem wystąpienia RDS oraz z innymi metodami o udowodnionej dużej wartości predykcyjnej. Ukazało się dotychczas wiele prac dotyczących badania wiarygodności klinicznej testu FLM II [19, 21–28]. Z prac tych jednoznacznie wynika, że może on być stosowany jako wiarygodna metoda oceny dojrzałości płuc płodu, zarówno u ciężarnych o małym, jak i dużym ryzyku, w tym u kobiet chorych na cukrzycę [27].

Istnieją pewne rozbieżności odnośnie do ustalenia wartości odcinającej. Producent testu zaleca stosowanie wartości 55 mg/g w testach drugiej generacji. W testach pierwszej generacji było to 70 mg/g, z tym że badania udowodniły, że wartość tę można obniżyć, zwiększając swoistość bez utraty czułości diagnostycznej. Fantz et al. [24] ustalili, że może to być wartość 45 mg/g. Najważniejszą wadą metody jest podatność na interferencje ze strony krwi oraz smółki [21, 29]. Wyniki „dojrzałe” uzyskane w próbkach z widoczną domieszką krwi należy traktować z dużą ostrożnością, gdyż każde  $0,1 \times 10^{12}/l$  erytrocytów podwyższa wynik o 5,8 mg/g. Dopuszczalne jest zanieczyszczenie krwinkami do  $0,03 \times 10^{12}/l$  [29]. Obecność bilirubiny natomiast nie wykazuje istotnego wpływu na wyniki uzyskane tą metodą [30].

## Liczba ciał lamelarnych

Ciała lamelarne to blaszkowate struktury, zbudowane z koncentrycznie ułożonych warstw fosfolipidów. Są wydzielane przez pneumocyty II typu i stanowią zapasową formę surfaktantu. W miarę rozwoju płodu zwiększa się ich liczba w płynie owodniowym. Dzięki podobieństwu rozmiarów do małych płytek krwi (średnica 1–5  $\mu\text{m}$ ) ciała lamelarne mogą być liczone w „płytkowych” kanałach analizatorów hematologicznych [8, 31–37]. Wartości referencyjne dla liczby ciał lamelarnych (LBC – *lamellar body count*) każde laboratorium wykonujące to badanie musi ustalić samodzielnie, w zależności od zastosowanego analizatora oraz procedury. Rozbieżności między poszczególnymi analizatorami są duże i wynikają z ich odmiennej konstrukcji. Niektóre z nich do liczenia komórek używają techniki impedancyjnej, inne optycznej, jedno- lub dwuwymiarowej, jeszcze inne kombinacji obu technik [33]. Różnią się ponadto szerokością szczeliny, przez którą przechodzą zliczane elementy.

Neerhof et al. [34] ustalili, że w celu uzyskania mniejszej rozbieżności między laboratoriami powinno się przestrzegać tych samych warunków przygotowania próbki płynu do badania. Należy zrezygnować z wirowania, podczas którego traci się część ciał lamelarnych, różną w zależności od ustawionych parametrów. Autorzy sugerują stosowanie wartości LBC > 50 000/ $\mu\text{l}$  do określania dojrzałości i LBC < 15 000/ $\mu\text{l}$  do określania niedojrzałości. W przedziale między 15 a 50 000/ $\mu\text{l}$  mieszczą się wyniki pośrednie, w przypadku których trudno jest wnioskować o dojrzałości i zaleca się wykonanie innych badań, najlepiej pełnego profilu fosfolipidowego. W nowszych publikacjach wartości te są niższe, odpowiednio około 30 000/ $\mu\text{l}$  i 10 000/ $\mu\text{l}$ . Pomimo tych różnic oraz interferencji ze strony erytrocytów i smółki, warto wdrożyć LBC jako bardzo dobry test przesiewowy, gdyż jest to metoda bardzo tania, szybka i przede wszystkim dostępna w każdym rutynowym laboratorium, mającym analizator hematologiczny [6, 32–37].

## Pomiar $A_{650}$ i metoda RIMAD

Metodą pośrednio związaną z ciałami lamelarnymi jest pomiar absorbancji próbki płynu owodniowego przy długości fali 650 nm. Absorbancja jest spowodowana rozproszeniem światła przez ciała lamelarne i pozytywnie koreluje z dojrzałością płuc płodu. W tej prostej metodzie występują jednak dość spore interferencje, które wynikają z obecności takich chromogenów, jak: bilirubina,

hemoglobina, methemoglobina, które również absorbują światło w zakresie widzialnym.

Metoda została zmodyfikowana przez Dubina [38], następnie oceniona w badaniach klinicznych [39]. Modyfikacja polegała na zastosowaniu konwencjonalnego spektrofotometru dwukanałowego i jednoczesnego pomiaru absorbancji dwóch próbek tego samego płynu owodniowego po dodaniu do jednej z nich glicerolu, a do drugiej – takiej samej objętości wody destylowanej. Wykorzystuje się to, że współczynnik refrakcji ciał lamelarnych jest bardziej zbliżony do glicerolu niż do wody, tym samym eliminuje się wpływ większości substancji interferujących i uzyskuje lepszą korelację między poziomem absorbancji a liczbą ciał lamelarnych [38, 39]. Metoda RIMAD (*refractive index-matched anomalous diffraction*) w badaniach klinicznych okazała się niezwykle użytecznym narzędziem do oceny dojrzałości płuc, porównywalnym z TDx-FLM II i dobrze korelującym z L/S. Ustalono także wartość odcinającą dla prób dojrzałych na poziomie 0,040 [39].

Test ten może być z powodzeniem stosowany do diagnostyki dojrzałości płodu; jest szybki, tani i bardzo prosty. Ze względu na niedostateczne udokumentowanie wartości diagnostycznej testu jest jednak konieczne wykonanie prospektywnych badań klinicznych przed wprowadzeniem go do rutynowej diagnostyki.

## Pobieranie i przechowywanie materiału do badań

Najbardziej pożądanym materiałem do badania dojrzałości płuc jest płyn owodniowy pobrany metodą amniocentezy. Do przeprowadzenia większości testów niewskazana jest próbka płynu zebranego w pochwie w wyniku pęknięcia błon płodowych. Taki płyn jest zanieczyszczony wydzieloną pochwową, bakteriami i śluzem, które mogą znacznie zmieniać wyniki oznaczeń. Metodą najmniej podatną na taką kontaminację jest określanie zawartości fosfatydyloglicerolu za pomocą testu szkiełkowego AmnioStat-FLM. Pobrany płyn nie powinien zawierać krwi i smółki, ponieważ interferują one niemal we wszystkich testach.

Próbkę płynu należy pobrać do czystej suchej probówki i niezwłocznie po pobraniu umieścić w naczyniu z lodem w celu spowolnienia enzymatycznej degradacji fosfolipidów. Badanie należy wykonać jak najszybciej, jeśli jednak nie ma takiej możliwości, próbka może być przechowywana. Sposób i czas przechowywania zależy od tego, jaki test ma być wykonany. W przypadku metody TDx FLM II przechowywanie jest możliwe do 16 godz. w temperaturze pokojowej i do 24 godz.

w temperaturze +4°C. Nie zaleca się natomiast mrożenia próbek [29]. Jeśli planuje się określenie liczby ciał lamelarnych, istnieje możliwość przechowywania w +4°C nawet do 10 dni [33]. Do testu AmnioStat-FLM, zgodnie z zaleceniami produ-

centa, są wymagane próbki świeże, przechowywanie nie może być dłuższe niż 4 godz. w 2–8°C. W celu dłuższego przechowywania próbki można zamrozić, ale należy wziąć pod uwagę to, że w wyniku mrożenia i rozmrażania obniża się za-

**Tabela 2.** Porównanie cech wybranych metod z uwzględnieniem wartości odcinającej dla wyników „dojrzałych”

**Table 2.** The comparison of chosen methods including the cut off value for “mature” results

Metoda (Method)	Źródło (Reference)	Liczba pacjentów (Number of patients)	Wartość odcinająca („Cut off” value)	Czułość (Sensitivity) %	Swoistość (Specificity) %	PPV %	NPV %
L/S (TLC)	10	47	2/1	63	97	83	92
L/S (TLC)	10	47	3/1	100	79	50	100
PG (TLC)	10	45	„obecny”	100	68	37	100
PG (TLC)	10	45	„obecny” lub „śląd”	100	74	41	100
PG (AmnioStat)	10	49	„obecny”	100	63	35	100
PG (AmnioStat)	10	49	„obecny” lub „śląd”	100	68	39	100
Shake test	10	44	„dojrzały”	100	62	33	100
Shake test	10	44	„dojrzały” lub „pośredni”	100	76	44	100
TDx FLM II	24	185	55 mg/g	100	72	24	100
TDx FLM II	24	185	45 mg/g	100	84	36	100
TDx FLM II	40	86	30 mg/g	100	93,6	61,5	100
FSI	40	86	48% (0,48)	100	65,4	22,9	100
L/S (TLC)	40	86	2/1	100	51,3	17,4	100
PG (TLC)	40	86	„obecny”	100	7,7	10,5	100
PG (AmnioStat)	40	86	„obecny”	100	33,3	13,3	100
RIMAD	40	86	0,040	100	96,2	72,2	100
RIMAD	40	86	0,035	87,5	98,7	87,5	98,7
LBC (Coulter MAXM)	7	123	41500/μl	90,5	87,7	79,2	94,7
LBC (Coulter Gen-S)	7	123	32000/μl	90,5	85,2	76	94,5
LBC (ADVIA 120)	36	88	35400/μl	100	67,6	36,8	100
SMT	18	55	2/mm <sup>2</sup>	76,5	84,2	68,4	88,9

L/S (TLC) – stosunek lecytyna/sfingomielina, metoda chromatografii cienkowarstwowej.

PG (TLC) – fosfatydyloglicerol, metoda chromatografii cienkowarstwowej.

PG (AmnioStat) – fosfatydyloglicerol, metoda aglutynacji szkiełkowej AmnioStat (Irvine Scientific).

TDx FLM II – test FLM drugiej generacji (Abbott).

FSI – indeks stabilności piany.

RIMAD – pomiar absorpcji z uwzględnieniem współczynnika refrakcji ciał lamelarnych.

LBC – liczba ciał lamelarnych.

SMT – test stabilności mikropęcherzyków.

NPV – ujemna wartość predykcyjna.

PPV – dodatnia wartość predykcyjna.

L/S (TLC) – lecithin/sphingomyelin ratio, thin-layer chromatography method.

PG (TLC) – phosphatidylglycerol, thin-layer chromatography method.

PG (AmnioStat) – phosphatidylglycerol, AmnioStat test.

TDx FLM II – FLM II test (Abbott).

FSI – foam stability index.

RIMAD – refractive index-matched anomalous diffraction.

LBC – lamellar body count.

SMT – stable microbubble test.

NPV – negative predictive value.

PPV – positive predictive value.

wartość fosfatydyloglicerolu, gdyż może nastąpić jego precypitacja. Metoda RIMAD nie jest tak wymagająca; próbki można przechowywać do 10 dni w +4°C, a zamrożone w -20°C lub w -70°C nawet przez kilka miesięcy [38, 39].

Niezależnie od czasu i sposobu przechowywania próbek należy pamiętać o bardzo dokładnym wymieszaniu ich przed badaniem. Ciała lamelarne mają gęstość większą od wody i podczas przechowywania opadają na dno probówki. Nie poleca się mieszania przez wstrząsanie, gdyż może prowadzić do powstawania piany. Najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie rolkowego mieszańca hematologicznego [6].

Istnieją zróżnicowane opinie dotyczące wirowania próbek przed przeprowadzeniem badań. W zasadzie powinno się unikać wirowania, gdyż nawet niewielka siła odśrodkowa powoduje straty ciał lamelarnych, a tym samym fosfolipidów. Etap wirowania pozwala jednak na pozbycie się części zanieczyszczeń, takich jak: erytrocyty, śluz, skrzepy czy rozpadłe komórki, a poza tym jest niezbędny w metodach, takich jak chromatografia cienkowarstwowa, oraz w przypadku silnej kontaminacji. Wirowanie ma największy wpływ na wyniki uzyskane metodą TDx FLM II oraz na liczbę ciał lamelarnych, nie wpływa natomiast na stosunek lecytyna/sfingomielina. Jeśli jednak rutynowo wiruje się wszystkie próbki, jest konieczna standaryzacja tego etapu przez stosowanie za każdym razem takiej samej siły odśrodkowej i wirowanie w +4°C [6, 34].

## Podsumowanie

Intensywny rozwój diagnostyki dojrzałości płuc płodu zaowocował dużą różnorodnością metod o różnej wartości klinicznej. Niektóre z nich, jak np. spektroskopia w podczerwieni czy spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego, nie zostały omówione ze względu na brak możliwości zastosowania ich w rutynowej diagnostyce.

W tabeli 2. przedstawiono dane dotyczące poszczególnych metod uzyskane z piśmiennictwa. Laboratoria, które zajmują się diagnostyką dojrzałości płuc lub planują wprowadzenie takich testów powinny rozważyć nie tylko wymagania techniczne i cenę, ale także ich użyteczność kliniczną.

Spośród metod przedstawionych w pracy szczególnie godne polecenia wydaje się określanie liczby ciał lamelarnych za pomocą analizatorów hematologicznych. Test ten można zastosować z powodzeniem w każdym laboratorium jako samodzielne badanie lub jako element kaskady testów, oczywiście po przeprowadzeniu badań, mających na celu ustalenie wartości odcinających dla danego typu analizatora. TDx-FLM II to również bardzo dobra metoda, droższa niż LBC, ale znacznie lepiej sprawdzająca się w populacji o dużym ryzyku. Metodą referencyjną wciąż pozostaje wyznaczanie stosunku L/S za pomocą chromatografii cienkowarstwowej lub wysoko rozdzielczej chromatografii cieczowej.

Wadą większości testów jest to, że wprowadzają one dychotomiczny podział wyników na „dojrzałe” i „niedojrzałe”, pomijając tym samym naturalną ciągłość procesu dojrzewania. Są ponadto o wiele lepszymi wskaźnikami dojrzałości płuc (duża czułość) aniżeli ryzyka wystąpienia RDS (mała swoistość). Badanie dojrzałości ma szczególną wartość między 34. a 36. tygodniem ciąży. Powyżej 37. tygodnia ryzyko wystąpienia RDS jest bowiem znikome, przed 32.–33. tygodniem ciąży natomiast istnieje ogromne ryzyko wystąpienia komplikacji z powodu niedojrzałości płuc. Obecnie testom stawia się inne wymagania, nie tyle mają one rozróżnić płody dojrzałe od niedojrzałych, ile powinny pozwalać na prognozowanie ciężkości RDS. Dzięki wprowadzeniu do leczenia sztucznego surfaktantu oraz profilaktyki RDS za pomocą steroidoterapii prenatalnej z jednej strony zmniejszyła się liczba wykonywanych badań, z drugiej strony zaś badanie dojrzałości płuc umożliwia na podawanie stosunkowo drogiego surfaktantu jedynie w uzasadnionych przypadkach.

## Piśmiennictwo

- [1] **Clements JA, Avery ME:** Lung surfactant and neonatal respiratory distress syndrome. *Am J R Crit Care Med* 1998, 157, 59–66.
- [2] **Woytoń J:** Fizjopatologia płynu owodniowego. PZWL, Warszawa 1981, 206–221.
- [3] **Gluck L, Kulovich MV, Borer RC Jr, Brenner PH, Anderson GG, Spellacy WN:** Diagnosis of the respiratory distress syndrome by amniocentesis. *Am J Obstet Gynecol* 1971, 109, 440–445.
- [4] **Mackenzie JR, Truesdale M:** Radial „high-performance” thin-layer chromatography used to assess fetal lung maturity. *Clin Chem* 1990, 36, 728–731.
- [5] **Russell PT, Naito HK:** Lipids. In: *Clinical chemistry – theory, analysis, and correlation*. Eds.: Kaplan LA, Pesce AJ, The C.V. Mosby Company, St. Louis 1989, 2<sup>nd</sup> ed., 968–1004.
- [6] **Ashwood ER:** Standards of laboratory practise: evaluation of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1997, 43, 211–214.
- [7] **Kaplan LA:** Introduction and summary: 1996 NACB standard of laboratory practise. *Clin Chem* 1997, 43, 202–204.

- [8] **Ross GE, Bever FN, Uddin Z, Hockman EM, Herman BA:** Decreased laboratory testing for lecithin-to-sphingomyelin ratio and phosphatidylglycerol after fetal lung maturity assessment from lamellar body count in amniotic fluid. *J Am Osteopath Assoc* 2002, 102, 423–428.
- [9] **Sax SM, Moore JJ, Oley A, Amenta JS, Silverman JA:** Liquid-chromatographic estimation of saturated phospholipid palmitate in amniotic fluid compared with a thin-layer chromatographic method for acetone-precipitated lecithin. *Clin Chem* 1982, 28, 2264–2268.
- [10] **Briand RL, Harold S, Blass KG:** High-performance liquid chromatographic determination of the lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid. *J Chromatogr* 1981, 223, 277–284.
- [11] **Lockitch G, Wittmann BK, Mura SM, Hawkley LC:** Evaluation of the Amniostat-FLM Assay for assessment of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1984, 30, 1233–1237.
- [12] **Lewis DF, Towers CV, Major CA, Asrat T, Nageotte MP, Freeman RK, Garite TJ:** Use of Amniostat-FLM in detecting the presence of phosphatidylglycerol in vaginal pool samples in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 169, 573–576.
- [13] **Towers CV, Garite TJ:** Evaluation of the new Amniostat-FLM test for the detection of phosphatidylglycerol in contaminated fluids. *Am J Obstet Gynecol* 1989, 160, 298–303.
- [14] **Jones GW, Ashwood ER:** Enzymatic measurement of phosphatidylglycerol in amniotic fluid. *Clin Chem* 1994, 40, 518–525.
- [15] **Bradley CA, Salhany KE, Entman SS, Aleshire SL, Parl FF:** Automated enzymatic measurement of lecithin, sphingomyelin and phosphatidylglycerol in amniotic fluid. *Clin Chem* 1987, 33, 81–86.
- [16] **McGowan MW, Artiss JD, Zak B:** Enzymatic colorimetry of lecithin and sphingomyelin in aqueous solution. *Clin Chem* 1983, 29, 1513–1517.
- [17] **Pattle RE, Kratzing CC, Parkinson CE, Graves L, Robertson RD, Robards GJ, Currie JO, Parsons JH, Sutherland PD:** Maturity of fetal lungs tested by production of stable microbubbles in amniotic fluid. *Br J Obstet Gynaecol* 1979, 86, 615–622.
- [18] **Kumazawa K, Hiramatsu Y, Masuyama H, Mizutani Y, Nakata T, Kudo T:** Prediction markers for respiratory distress syndrome: Evaluation of the Stable Microbubble Test, Surfactant Protein-A and Hepatocyte Growth Factor levels in amniotic fluid. *Acta Med Okayama* 2003, 57, 25–32.
- [19] **Shinitzky M, Goldfisher A, Bruck A, Goldman B, Stern E, Barkai G, Mashiach S, Serr DM:** A new method for assessment of fetal lung maturity. *Br J Obstet Gynaecol* 1976, 83, 838–844.
- [20] **Talt JF, Franklin RW, Simpson JB, Ashwood ER:** Improved Fluorescence Polarization Assay for use in evaluating fetal lung maturity. I. Development of the assay procedure. *Clin Chem* 1986, 32, 248–254.
- [21] **Foerder CA, Talt JF, Franklin RW, Ashwood ER:** Improved Fluorescence Polarization Assay for use in evaluating fetal lung maturity. II. Analytical evaluation and comparison with the lecithin/sphingomyelin ratio. *Clin Chem* 1986, 32, 255–259.
- [22] **Ashwood ER, Talt JF, Foerder CA, Franklin RW, Benedetti TJ:** Improved Fluorescence Polarization Assay for use in evaluating fetal lung maturity. III. Retrospective clinical evaluation and comparison with the lecithin/sphingomyelin ratio. *Clin Chem* 1986, 32, 260–264.
- [23] **Bender TM, Stone LR, Amenta JS:** Diagnostic power of lecithin/sphingomyelin ratio and fluorescence polarization assays for respiratory distress syndrome compared by Relative Operating Characteristic curves. *Clin Chem* 1994, 40, 541–545.
- [24] **Fantz CR, Powell C, Karon B, Parvin CA, Hankins K, Dayal M, Sadovsky Y, Johari V, Apple FS, Gronowski AM:** Assessment of the Diagnostic Accuracy of the TDx-FLM II to predict fetal lung maturity. *Clin Chem* 2002, 48, 761–765.
- [25] **Bonebrake RG, Towers CV, Rumney PJ, Reimbold P:** Is fluorescence polarization reliable and cost efficient in a fetal lung maturity cascade? *Am J Obstet Gynecol* 1997, 177, 835–841.
- [26] **Kesselman EJ, Figueora R, Garry D, Maulik D:** The usefulness of the TDx/TDxFLx fetal lung maturity II assay in the initial evaluation of fetal lung maturity. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 188, 1220–1222.
- [27] **Livingston EG, Herbert WN, Hage ML, Chapman JF, Stubbs TM:** Use of the TDx-FLM assay in evaluating fetal lung maturity in an insulin-dependent diabetic population. The Diabetes and Fetal Maturity Study Group. *Obstet Gynecol* 1995, 86, 826–829.
- [28] **Kaplan LA, Chapman JF, Bock JL, Santa Maria E, Clejan S, Huddleston DJ, Reed RG, Bernstein LH, Gillen-Goldstein J:** Prediction of respiratory distress syndrome using the Abbott FLM-II amniotic fluid assay. *Clin Chim Acta* 2002, 326, 61–68.
- [29] **Grenache DG, Parvin CA, Gronowski AM:** Preanalytical factors that influence the Abbott TDx Fetal Lung Maturity II assay. *Clin Chem* 2003, 49, 935–939.
- [30] **Cariappa R, Parvin CA, Gronowski AM:** Bilirubin in amniotic fluid does not interfere with the Abbott TDx FLM II assay. *Clin Chem* 2003, 49, 986–987.
- [31] **Dubin SB:** Characterization of amniotic fluid lamellar bodies by resistive-pulse counting: relationship to measures of fetal lung maturity. *Clin Chem* 1989, 35, 612–618.
- [32] **Ashwood ER, Palmer SE, Taylor JS, Pingree SS:** Lamellar body counts for rapid fetal lung maturity testing. *Obstet Gynecol* 1993, 81, 619–624.
- [33] **Szallasi A, Gronowski AM, Eby CS:** Lamellar body count in amniotic fluid: a comparative study of four different hematology analyzers. *Clin Chem* 2003, 49, 994–997.
- [34] **Neerhof MG, Dohnal JC, Ashwood ER, Lee IS, Anceschi MM:** Lamellar body counts: a consensus on protocol. *Obstet Gynecol* 2001, 97, 318–320.



- [35] **DeRoche ME, Ingardia CJ, Guerette PJ, Wu AH, LaSala CA, Mandavilli SR:** The use of lamellar body counts to predict fetal lung maturity in pregnancies complicated by diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 187, 908–912.
- [36] **Chapman JF, Ashwood ER, Feld R, Wu AH:** Evaluation of two-dimensional cytometric lamellar body counts on the ADVIA 120 hematology system for estimation of fetal lung maturation. *Clin Chim Acta* 2004, 340, 85–92.
- [37] **Dalence CR, Bowie LJ, Dohnal JC, Farrell EE, Neerhof MG:** Amniotic fluid lamellar body count: a rapid and reliable fetal lung maturity test. *Obstet Gynecol* 1995, 86, 235–239.
- [38] **Dubin SB:** Determination of lamellar body size, number density, and concentration by differential light scattering from amniotic fluid: physical significance of  $A_{650}$ . *Clin Chem* 1988, 34, 938–943.
- [39] **Rohlfs EM, Chaing SH, Chapman JF:** Analytical and clinical evaluation of refractive index-matched anomalous diffraction (RIMAD) for assessment of fetal lung maturation. *Clin Chem* 1996, 42, 1861–1868.

### Adres do korespondencji:

Agnieszka Sapa  
Katedra i Zakład Analityki Medycznej  
ul. Pasteura 2  
50-367 Wrocław  
e-mail: sapaag@ak.am.wroc.pl  
tel.: +48 071 784 12 08

Conflict of interest: None declared

Praca wpłynęła do Redakcji: 24.05.2005 r.

Po recenzji: 8.09.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 8.09.2005 r.

Received: 24.05.2005

Revised: 8.09.2005

Accepted: 8.09.2005