

In- house preparation of modified Kleihauer-Betke test reagents for estimation of fetomaternal hemorrhage

Dr. Suzanne Alshemali*
Dr. Maram Bilal**
Mariam Mouna***

(Received 4 / 3 / 2024. Accepted 23 / 4 / 2024)

□ ABSTRACT □

Fetomaternal hemorrhage (FMH) refers to the entry of fetal blood into maternal circulation before or during delivery. In addition to its role in diagnosing idiopathic neonatal anemia, estimation of FMH is essential in the passive prophylaxis programs of hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) by the appropriate administration of RhDIg to RhD negative women following delivery of D positive babies, or after exposure to a sensitizing event during pregnancy. The Kleihauer-Betke test (KBT) is still considered one of the most important tests in the detection of fetal red blood cells within the maternal circulation. KBT principle is based on the characteristic resistance of fetal hemoglobin (HbF) to acid elution, in contrast to adult hemoglobin (HbA). In this study, we aimed to prepare in-house reagents needed in the KBT to use them in the detection of fetal hemoglobin and the estimation of FMH, thus alleviating the need to import the highly expensive kits.

The modified Kleihauer-Betke method according to Clayton 1963 was adopted in our study, and the required reagents were prepared according to the method depicted in the American Association of Blood Banks (AABB) Technical Manual. Negative controls and different dilutions of positive controls were prepared to test, the efficiency of our locally prepared reagents. Our experiments were carried out at the Central Haematology Laboratory in Tishreen University Hospital. PH measurements of the reagents were performed at regular intervals throughout a storage period of 60 days, along with their efficiency in HbF detection and estimation, and both were shown to be constant. KBT using local reagents showed good accuracy in detecting fetal cells with a little tendency to overestimate FMH. According to our results, we can consider this study as a starting point for the use of this reagent in the investigation of unexplained neonatal anemia, and in conducting larger studies of FMH determination in women, thus helping to improve and standardize RhDIg administration.

Key words: Fetomaternal hemorrhage, Kleihauer-Betke test (KBT), Anti-D IgG, Buffer.



Copyright :Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Professor, Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Tishreen University, Latakia-Syria.

**Professor, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Latakia-Syria.

***Postgraduate Student, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Latakia-Syria.

تحضير كواشف اختبار Kleihauer-Betke المعدل محلياً لتقدير النزف الجنيني الوالدي

د. سوزان الشمالي*

د. مرام بلال**

مريم منى***

(تاريخ الإيداع 4 / 3 / 2024. قبل للنشر في 23 / 4 / 2024)

□ ملخص □

يشير النزف الجنيني الوالدي (Fetomaternal hemorrhage (FMH إلى دخول دم الجنين إلى الدورة الدموية الأمومية قبل أو أثناء الولادة. بالإضافة لدورها في تشخيص فقر الدم الوليدي مجهول السبب، فإن تقدير كمية FMH تعتبر أساسية في بروتوكولات الوقاية المنفصلة من الداء الانحلالي عند الوليد/الجنين (HDFN) عبر الإعطاء المناسب للغلوبولين الوقائي RhDIg لكل سيدة سلبية المستضد D عقب ولادتها لطفل إيجابي D، أو تعرضها خلال الحمل لحدث تحسيسي معروف بإحداثه FMH. ما زال اختبار (Kleihauer-Betke test) KBT من أهم الفحوص المستخدمة للكشف عن الكريات الجنينية في دوران الأم، ويعتمد على مبدأ مقاومة الكريات الحاوية على الخضاب الجنيني HbF للشطف بالحمض مقارنة مع الخضاب البالغ HbA. نهدف في هذه الدراسة إلى تحضير الكواشف الخاصة باختبار KBT محلياً "in house" بغرض استخدامها في كشف الخضاب الجنيني، وفي تقدير النزف الجنيني الوالدي دون اللجوء إلى استيراد العتيدة من الخارج بأسعار مكلفة للغاية.

تم اعتماد طريقة Kleihauer-Betke المعدلة حسب Clayton التي قدمت عام 1963، وقمنا بتحضير الكواشف المطلوبة حسب وصفة الدليل التقني لاتحاد مصارف الدم الأميركية (AABB Technical Manual). تم تحضير شواهد سلبية وتمديدات مختلفة من الشواهد الإيجابية، من أجل اختبار فعالية الكواشف المحضرة محلياً، وذلك في مخبر (مختبر) الدمويات المركزي في مشفى (مستشفى) تشرين الجامعي. كما تم إجراء قياس درجة الحموضة للكواشف ورصد تغيراتها خلال فترة خزن (60 يوم)، مع اختبار فعالية الكشف عن الخضاب الجنيني. كانت درجة حموضة الوقاء ثابتة طوال فترة إجراء الدراسة، وفعالية الكاشف ممتازة في كشف الكريات الجنينية. أبدى اختبار KBT باستخدام الكواشف المحلية دقة جيدة في كشف الكريات الجنينية مع ميل إلى المبالغة قليلاً في تقدير FMH. وفقاً للنتائج التي توصلنا إليها، يمكننا اعتبار هذه الدراسة نقطة بدء لاستخدام هذا الكاشف في تقصي فقر الدم الوليدي غير المفسر، وفي إجراء دراسات أوسع لتقدير FMH لدى السيدات والتدبير الأمثل لإعطاء RhDIg بالجرعات المناسبة.

الكلمات المفتاحية: النزف الجنيني-الوالدي، اختبار Kleihauer-Betke، الغلوبولين المناعي مضاد D، وقاء.

حقوق النشر © CC BY-NC-SA 04: مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص



* مدرسة- قسم الطب المخبري-كلية الطب البشري-جامعة تشرين-اللاذقية-سورية

**مدرسة-قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة-كلية الصيدلة-جامعة تشرين-اللاذقية-سورية

***طالبة ماجستير-قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة-كلية الصيدلة-جامعة تشرين-اللاذقية سورية

مقدمة:

يعتبر اختبار Kleihauer-Betke test (KBT) أو اختبار الشطف الحمضي Acid-elution test من أهم الفحوص المستخدمة منذ عدة عقود للكشف العياني عن وجود الخضاب الجنيني HbF ضمن خضابات أخرى اعتماداً على مقاومة HbF للحمض. وقد أصبح هذا الاختبار مباشرةً الاختبار الأساسي لكشف وجود كريات حمر عائدة للجنين (أي حاوية بشكل رئيسي على الخضاب F) ضمن دوران الأم، أو ما تم التعرف على تسميته بالنزف الجنيني-الوالدي. تم اعتماد KBT بشكل أساسي لتقييم النزف الجنيني الوالدي (Fetomaternal hemorrhage (FMH)، وهي حالة يسمح فيها الخلل في حاجز المشيمة للدم الجنيني بالدخول إلى الدورة الدموية للأم [1]. تشير الدراسات إلى أنه من المحتمل أن تدخل كميات صغيرة من كريات الجنين إلى دوران الأم بشكل طبيعي خلال فترة الحمل، لتبلغ قمتها عند الولادة، وعادة يكون ذلك حتى بغياب عوامل خطر مؤهبة ودون عواقب سيئة سواء للأم أو الجنين. أما الكميات الكبيرة من FMH، فغالباً ما يذهب لها حدوث عوامل خطر مختلفة مثل الرضوض (trauma) على البطن، الإجراءات الغازية قبل الولادة (مثل بزل السلى)، التداخلات التوليدية (مثل التحويل الرأسي الخارجي، الإزالة اليدوية للمشيمة)، أو الولادة القيصرية [2-4].

تم وصف اختبار KBT عام 1957 من قبل Kleihauer و Braun و Betke، اعتماداً على مبدأ المقاومة النسبية للكريات الحمراء الجنينية الحاوية على الخضاب الجنيني F للشطف الحمضي مقارنة بالخضاب البالغ A [5]. فعندما يتم غمر لطاخة دم محيطي مأخوذ من الأم في وقاء حمضي سيتم شطف الخضاب (HbA elution) من الكريات الحمراء البالغة فيما يكون HbF في الكريات الحمراء الجنينية مقاوماً للشطف بالحمض. يتم لاحقاً تلوين الشريحة فتظهر الكريات الحمر الجنينية تحت المجهر الضوئي بلون وردي غامق، فيما تبدو كريات الأم شاحبة وتدعى بالكريات الشبحية (Ghost cells).

تم اقتراح طريقة معدلة من اختبار KB بواسطة Clayton الذي وجد أن احتواء الوقاء على حمض السيتريك والفوسفات عند درجة حموضة 3.2 قد أدى إلى الكشف الأمثل عن كميات FMH الصغيرة (حتى 0.5 مل). وقد تم اعتماد هذه الطريقة المعدلة على نطاق واسع [6].

لاحقاً، تم تطوير تقنية مقايسة الخلايا بالجريان (Flow cytometry\FCM) في كشف الخضاب الجنيني وتقدير كميته [5]، واعتبر FCM أكثر الطرق حساسية ودقة لكشف النزف الجنيني الوالدي [7]، إلا أنها تعتبر تقنية معقدة وتحتاج أجهزة وكواشف باهظة الثمن، وليست في متناول جميع الهيئات الصحية، خاصة في البلدان النامية.

إن تقدير كمية FMH تعتبر أساسية في الوقاية المنفصلة من الداء الانحلالي عند الوليد/الجنين Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) عبر إعطاء RhDIg لكل سيدة سلبية المستضد D عقب ولادتها لطفل إيجابي D، أو تعرضها خلال الحمل لحدث تحسيس (sensitizing) معروف بإحداثه FMH كالجراحات والرضوض البطنية، النزف التتاسلي الكبير، الإجهاض وغيرها.

كما يساعد تقدير FMH في تشخيص فقر الدم الجنيني غير المفسر وتدبيره [8]، بالإضافة إلى أهمية هذا الاختبار في تقييم حالة الجنين عقب الرضوض أثناء الحمل (صدمة على البطن، حوادث السير) [9].

بحسب اتحاد مصارف الدم الأميركية (AABB) American Association of Blood Banks يعتمد حساب الجرعة الوقائية من RhDIg على الخطوات التالية: [10]

1. تحديد النسبة المئوية لخلايا الدم الحمراء الجنينية في دوران الأم باستخدام إحدى الطرق الكمية (مثل اختبار KBT)
 2. حساب كمية FMH.
 3. حساب الجرعة المناسبة من الغلوبولين المناعي RhD.
 4. تقريب الجرعة المحسوبة إلى أقرب عدد صحيح، وإضافة جرعة لتأمين هامش وقاية جيد.
- من خلال هذه الخطوات يتم الربط بين FMH وجرعة anti-D اللازمة. اعتمد ذلك بشكل رئيسي على بيانات من الدراسات التي أجريت على رجال سلبين المستضد Rh D وغير ممنعين سابقاً في المملكة المتحدة وكندا في منتصف الستينات وتمنيهم بدم إيجابي المستضد D. أثبتت تلك التجارب السريرية أن إعطاء 300 مكغ من RhDIg خلال 72 ساعة من حقن الكريات الحمر RHD⁺ سيمنع تشكل أصداد خفيفة anti-D، إذ يقوم الغلوبولين الوقائي بطهاية الكريات الغريبة لتتم بلعمتها قبل التعرف عليها من الجهاز المناعي وحدوث التمنيع الخيفي. أعقت هذه الدراسات الأولية تجارب سريرية تطبيقية على النساء غير الممنعات اللاتي تلقين جرعة عالية من الغلوبولين المناعي الوقائي anti-D خلال 72 ساعة من ولادة مولود إيجابي D، ولم تشكل لديهن أصداد D [11].

أهمية البحث وأهدافه

يعد تحديد النزف الجنيني الوالدي عاملاً مهماً في ضبط جرعة RhDIg الواجب إعطاؤها منعاً لحدوث HDN. ويعد اختبار Kleihauer-Betke الاختبار الذهبي لتقدير FMH في أغلب البلدان. يتم إجراء 96% من الاختبارات الكمية لكريات الدم الحمراء الجنينية في الولايات المتحدة باستخدام واحدة من العتيدات المسوقة تجارياً لاختبار KB. و95% من المختبرات المشاركة في اختبار كفاءة CAP 2009 للكشف عن كريات الدم الحمراء للجنين استخدمت اختبار KB لتقدير كمية FMH [5، 12].

على الرغم من أهمية هذا الاختبار في حساب الجرعة الدقيقة من RhDIg إلا أنه غير مطبق في سوريا وذلك بسبب التكلفة المرتفعة العتيدات (kits) المتوفرة تجارياً إضافة إلى عدم المعرفة نسبياً بأهميته. البروتوكول المتبع بشكل روتيني هو أن يتم إعطاء جميع السيدات الحوامل سلبات RhD جرعة 1500 وحدة دولية (300 ميكروغرام) من RhDIg، وهذا يكفي للوقاية إلى ما يصل إلى 12 مل من كريات الدم الحمراء الجنينية، إلا أن النسب المرتفعة من حالات التمنيع وتشكل أصداد anti-D وفشل الوقاية لدى السيدات سلبات المستضد RhD تسلط الضوء على أهمية وضع هذا الاختبار في التطبيق كطريقة غير مكلفة لتقدير النزف الجنيني الوالدي، والتقدير الأمثل لجرعة الغلوبولين الوقائي اللازمة.

قمنا بإجراء هذه الدراسة -الأولى من نوعها- بهدف تحضير كواشف محضرة محلياً in-house للوقاء الخاص باختبار KB بغرض استخدامه في كشف الخضاب الجنيني، واستخدامه كاختبار مساعد في تشخيص فقر الدم الوليدي، وفي تقدير النزف الجنيني -الوالدي في دراسات لاحقة.

الدراسة العملية:

1- تحضير الكواشف In-house reagents

تم اعتماد البروتوكول من الكتيب التقني لاتحاد الجمعيات الأميركية لمصارف الدم AABB technical Manual [13]

1. المحلول الخزين A (Stock solution A): تم تحضير محلول من حمض الستريك بتركيز 0.1 M، وذلك بحل 21 غرام من C₆H₈O₇.H₂O بالقليل من الماء المقطر ثم إكمال الحجم إلى 1 ليتر بإضافة الماء المقطر. تم حفظ هذا المحلول في درجة 1-4 ° في البراد.
2. المحلول الخزين B (Stock solution B): تم تحضير محلول من فوسفات ثنائية الصوديوم بتركيز 0.2M، وذلك بحل 35.5 غرام من Na₂HPO₄.2H₂O بالقليل من الماء المقطر ثم إكمال الحجم إلى 1 ليتر بإضافة الماء المقطر. يحفظ هذا المحلول في درجة 1-4 مئوية في البراد.
3. وقاء McIlvaine: (pH=3.2): تم إضافة 75 مل من stock solution A إلى 21 مل من stock solution B. حُضِر هذا المزيج للحصول على الوقاء مباشرة قبل كل اختبار على العينات المدروسة مع التأكد من درجة pH باستخدام مقياس الحموضة (PH.Mv.Cond.TDS/ Taiwan) pH meter.
4. Erythrosin B: تم استخدام الأيوزين المائي (Riedel-dehaen. AG/ Germany).
5. Hematoxylin: تم استخدام الهيماتوكسيلين (Quimica Clinical Aplicada, SA/ Spain).
6. 80% ethyl alcohol: تم استخدام الكحول الإيثيلي بتركيز 80%.
7. شاهد سلبي negative control: تم تحضيره من عينات الدم المحيطي المجموعة على مانع التخثر EDTA لذكور بالغين أصحاء طبيعياً نتائج الرحلان الكهربائي و انعدم فيها الخضاب الجنيني (HbF%=0).
8. شاهد إيجابي positive control: تم تحضير شاهد إيجابي الخضاب الجنيني بتركيز يقارب 10% بدمج تسعة أحجام من دم ذكر بالغ مجموع على EDTA (كما ذكر أعلاه) مع حجم واحد دم من الحبل السري لوليد (HbF%=90) مجموع على EDTA ومتوافق الزمرة ABO.

2-طريقة إجراء الاختبار:

1. تحضير الوقاء الحمضي pH = 3.2، والتحقق من درجة الحموضة.
2. تحضير عينات شاهد إيجابي وسلبي كما ورد في الأعلى.
3. تمديد عينة الدم وذلك بمزج حجم من الشاهد مع حجم مكافئ له من المصل الفيزيولوجي NaCl (0.9%).
4. تحضير شرائح أفلام دم رقيقة وتركها لتجف بالهواء.
5. تثبيت العينة بغمر فلم الدم بالإيتانول 80% لمدة 5 دقائق.
6. غسل الشرائح بالماء المقطر.
7. غمر الشرائح في الوقاء الحمضي لمدة 11 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، أو لمدة 5 دقائق في الدرجة 37°م.
8. غسل الأفلام بالماء المقطر.
9. غمر الأفلام بالأيوزين لمدة 5 دقائق.
10. غسل الأفلام بالماء المقطر.
11. غمر الأفلام بالهيماتوكسيلين لمدة 5 دقائق.
12. غسل الأفلام بالماء الجاري لمدة دقيقة واحدة وتركها لتجف قبل القراءة.

3-فحص الأفلام الملونة.

-في البداية يتم فحص عينات الشاهد الإيجابي والسلبي للتأكد من التوزع الجيد للكريات، وتلونها بشكل مناسب. ثم يتم فحص المركز والذيل في أفلام العينات تحت التكبير 10x للعدسة الجسمية و 10x للعدسة العينية (low power field). في حال كان التلون والتوزع جيد يتم الانتقال للفحص تحت التكبير 40x للعدسة الجسمية

و10x للعدسة العينة (high power field). عند هذا التكبير، يتم عد 2000 كرية وتقدير النسبة المئوية للكريات الجنينية فيها.

4- حساب كمية FMH

لحساب كمية FMH، تم استخدام صيغة Mollison 1972 [5]:

$$\frac{\text{عدد الكريات الجنينية}}{\text{عدد الكريات الأم}} \times 1800 \times \frac{122}{100} \times \frac{100}{92}$$

$$\text{FMH (ml)} =$$

حيث: 1800: حجم الكريات الحمر الوالدية مقدراً بالمليتر.

122: الكريات الحمراء الجنينية أكبر بنسبة 22% من كريات الأم.

92: يتم تلوين 92% من الكريات الحمراء الجنينية فقط.

ويمكن تبسيط هذه المعادلة إلى:

$$\frac{\text{عدد الكريات الجنينية}}{\text{عدد كريات الأم}} \times 2400$$

$$\text{FMH(ml)} =$$

5- العينات:

تم تحضير عينات صناعية من خلال إضافة كميات متفاوتة من دم الحبل السري لمواليد في قسم التوليد في مستشفى تشرين الجامعي تم تأكيد نسبة الخضاب الجنيني فيها عبر قياس نسب الخضابات فيها بتقنية HPLC (ADAMS A1C HA-8180T) في المختبر المركزي في مستشفى تشرين، وكانت نسب HbF فيها تقارب 90% إلى عينات دم مأخوذة من ذكور أصحاء، بالغين، طبيعيين حيث كانت لديهم نسب الخضاب الجنيني تساوي الصفر، وذلك بتمديدات مختلفة للحصول على تراكيز نهائية (1%، 2%، 5%، 10%، 50%).

6- الاختبارات المجرى على الوقاء:

بعد القيام بتحضير المحلولين A و B (كما ذكر سابقاً) قمنا بتحضير الوقاء، واختباره من خلال قياس درجة الحموضة (pH)، واختبار قدرته على كشف الكريات الجنينية.

أجريت هذه الاختبارات عدة مرات وذلك في الأيام 0، 7، 14، 30، 45، 60 من تحضير المحلولين A و B.

أولاً: قياس درجة الحموضة:

تم قياس pH التمديدات بواسطة جهاز PH meter (PH.Mv.Cond.TDS/ Taiwan) عن طريق وضع قطب الهيدروجين في الماء المقطر حتى يعطي القيمة 7 ثم وضع القطب في المادة الحافظة وقراءة النتيجة بعدها.

ثانياً: كشف الكريات الجنينية:

قمنا باختبار فعالية الوقاء في كشف الكريات الجنينية من خلال تحضير أفلام دموية رقيقة وثبيتها، ثم تطبيق الوقاء لمدة 11 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، وفحص الشرائح بعد التلوين تحت المجهر على التكبير 40x.

النتائج والمناقشة

النتائج:

1- قياس درجة الحموضة:

يظهر الجدول (1) درجات الحموضة للوقاء المحضر خلال فترة الدراسة، وكانت تغيرات درجة الحموضة طفيفة وغير هامة إحصائياً ($P > 0.05$).

الجدول (1): درجة الحموضة للوقاء المحضر

الزمن	درجة الحموضة
اليوم 0	3.2
اليوم السابع	3.18
اليوم الرابع عشر	3.17
اليوم الثلاثون	3.15
اليوم الخامس والأربعون	3.14
اليوم الستون	3.12

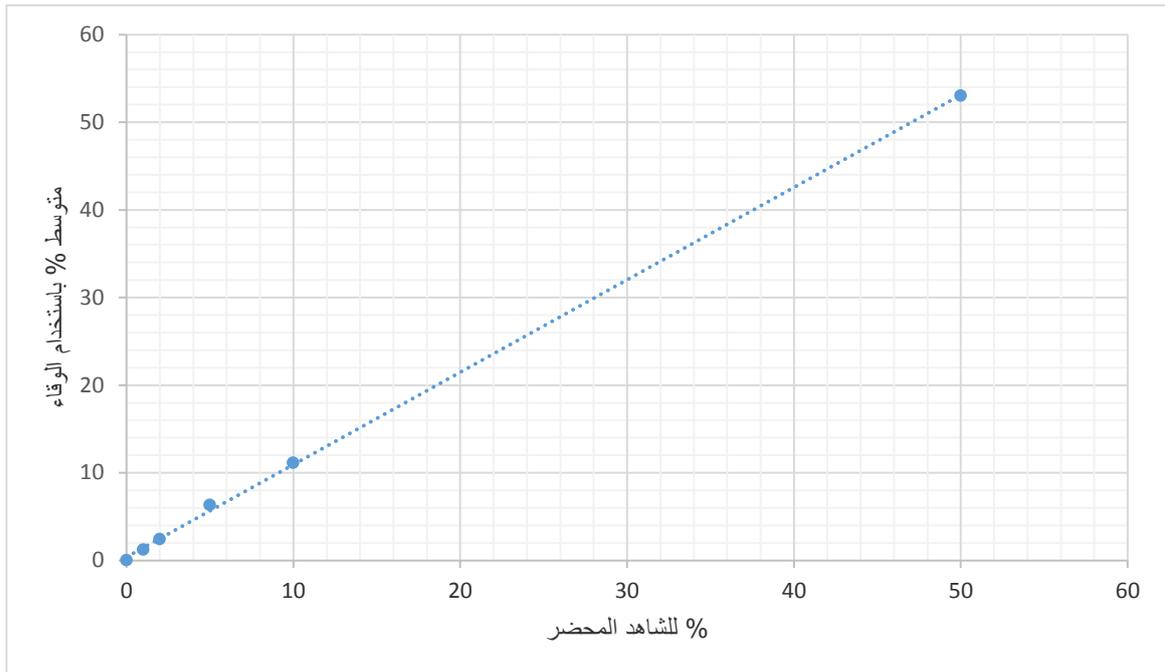
2- كشف الكريات الجنينية:

يظهر الجدول رقم (2) متوسط النسبة المئوية للكريات الجنينية المقاسة باستخدام الوقاء المحضر In-house:

الجدول رقم (2): نتائج التمديدات المحضرة للكريات الحمراء الجنينية في الكريات الحمراء للبالغ باستخدام الوقاء المحضر in-house

نتيجة اختبار KB	النسبة المئوية للكريات الجنينية في العينات المحضرة مخبرياً
Mean \pm SD	
53 \pm 1.3	50
11.1 \pm 0.5	10
6.3 \pm 0.7	5
2.4 \pm 0.3	2
1.2 \pm 0.07	1
0	0

من خلال دراسة علاقة الارتباط بين النسبة المئوية للتراكيز المحضرة من الشواهد الإيجابية والسلبية ومتوسط النسبة المئوية للتراكيز المقاسة باستخدام الوقاء في الأيام (0، 7، 14، 30، 45، 60) باستخدام معامل بيرسون Pearson، لوحظ وجود ارتباط إيجابي قوي هام إحصائياً ($P=0.00$ ، $r=0.99$) كما هو موضح في الشكل التالي:



الشكل رقم (1): الارتباط بين النسبة المئوية المحضرة والنسبة المئوية المقاسة باستخدام الوقاء.

المناقشة:

يعد الكشف الدقيق والقياس الكمي لكريات الدم الحمراء الجنينية في الدورة الدموية الأمومية ضرورياً للوقاية من التمنيع الخيفي بتنافر RhD في السيدات سلبيات المستضد D الذي يحدث بسبب FMH [14]. في حالة عدم توافق D قد تسبب الخلايا الجنينية إيجابية المستضد D تحسيس الأم سلبية D وإنتاج anti-D لاحقاً. قد تكون هذه الأضداد صامتة سريرياً أو قد تؤدي إلى عواقب وخيمة مثل انحلال الدم أو فقر الدم الجنيني أو الاستسقاء الجنيني أو حتى الوفاة في حالات الحمل الحالية و/أو المستقبلية. يعد قياس حجم FMH بعد الولادة أو الإجهاض أو أي حدث تحسيسي خطوة أساسية لتقدير الجرعة الكافية من RhDIg لدى السيدات سلبيات ال RhD [15]. بالإضافة إلى استخدام اختبار FMH في طب النساء والتوليد للتحري عن وجود نزيف خفي مرتبط بأحداث وحالات توليدية مختلفة. لقد ثبت أن الغلوبولين المناعي RhDIg المتوفر تجارياً، وهو عبارة عن غلوبولين مناعي بشري مأخوذ من بلازما المتبرعين الذين لديهم عيار مرتفع من أضداد D، فعال في تقليل التحسيس تجاه المستضد D والداء الانحلالي اللاحق عند الوليد (HDN) [5].

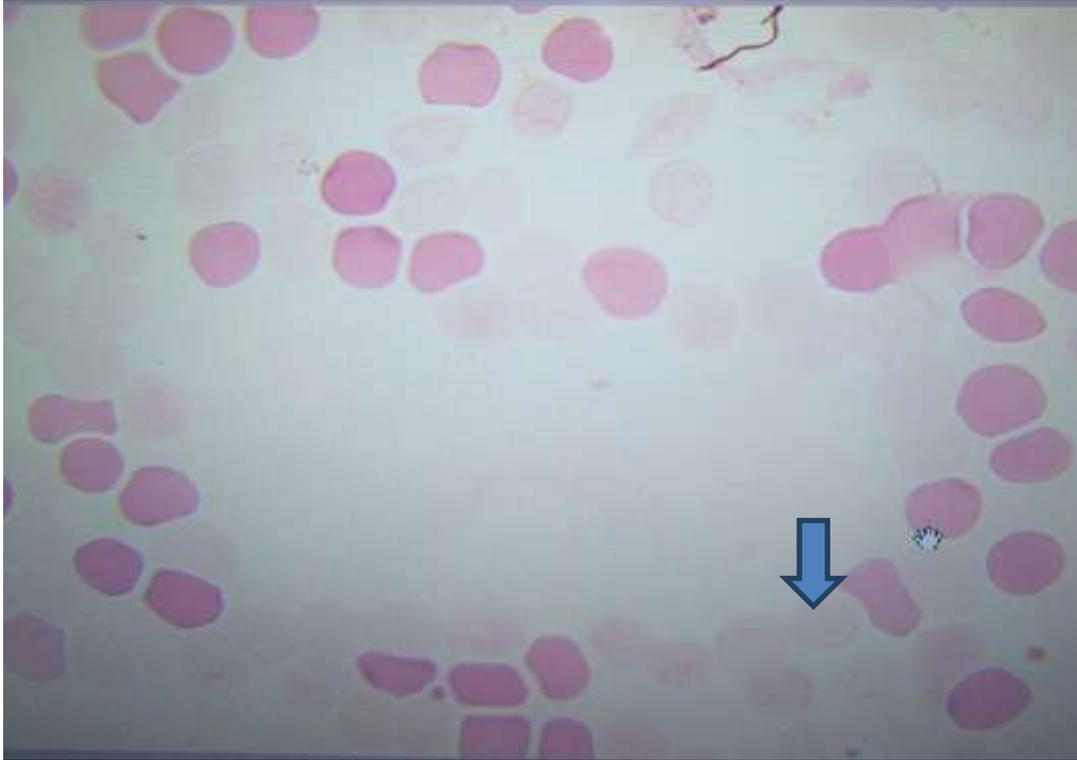
انطلاقاً من التعليمات الواردة في AABB technical manual قمنا بتحضير الوقاء الخاص باختبار KBT، وفق البروتوكول الموصوف في الفقرة 1 أعلاه.

تم تقدير النسبة المئوية للكريات الجنينية في عينات الشاهد الإيجابي وخلصنا إلى أن الوقاء المحضر محلياً أبدى كفاءة عالية لتقدير FMH في التراكيز المختلفة المحضرة مع ميل قليل للمبالغة في تقدير الكريات الجنينية. ويظهر الشكل رقم (1) صوراً مجهرية للعينات بعد التلوين. وكان هذا موافقاً للعديد من الدراسات التي وجدت مبالغة في تقدير FMH عبر اختبار KBT [16] [17].

درجة حموضة الوقاء كانت ثابتة طول فترة الحفظ، والتغيرات الطفيفة عليها لم تؤثر على فعالية الوقاء في تقدير عدد الكريات الجنينية.

يتمتع اختبار KBT بالعديد من المزايا فهو يتطلب أجهزة مخبرية عادية ولا يتطلب تكاليف كبيرة فمن الممكن تطبيقه في المختبرات في سوريا، تتمثل عيوبه الرئيسية في كونه شاقاً في الأداء (يتطلب تعداد ما لا يقل عن 2000 كرية حمراء)، اختلاف تفسير نتائج الاختبار بناء على جودة التلوين، والاختلافات بين المراقبين وبين المختبرات عند العد اليدوي للكريات الجنينية مجهرياً، أي أنه يفتقر إلى التوحيد القياسي والدقة، بالإضافة إلى الاختلافات بين المراقبين والمستشفيات في تفسير النتائج، وصعوبة التقدير المرتبطة بزيادة الخضاب الجنيني F، فعند الأشخاص البالغين العاديين نسبة HbF تتراوح من 0.5% حتى 7%، وتحتوي بعض الكريات الحمراء كلا الخضابين F و A [18]، وتكون أعمق من خلايا الدم الحمراء (الشبحية)، ولكنها أخف تلويناً بكثير من خلايا الجنين المحتوية على الخضاب F، والحالات المرضية المترافقة مع زيادة الخضاب الجنيني (الثبات الوراثي للخضاب F، فقر الدم المنجلي، التلاسيميا بيتا، فقر الدم اللاتنسجي، وبعض الأمراض الأخرى المرتبطة بعسر تكون الكريات الحمر)، وازدياد عدد الكريات الجنينية F خلال الحمل [12، 19].

بذلك يمكننا الانطلاق من نتائج هذه الدراسة لتكون حجر الأساس لدراسات أكبر لتقدير FMH لدى السيدات سلبيات D بعد الولادة أو الإجهاض، وتحديد عوامل الخطورة المرتبطة به في مجتمعنا، وتقدير الجرعة الدقيقة من RhDIg الواجب إعطائها، الأمر الذي من شأنه تقليل نسبة التمنيع الخيفي للمستضد D، بالإضافة إلى إمكانية استخدامه كاختبار مساعد في تشخيص فقر الدم الوليدي.



الشكل رقم (1): اختبار Kleihauer-Betke الإيجابي: الهيموغلوبين الجنيني (HbF) في كريات الدم الحمراء مقاوم للشطف الحمضي. الكريات التي تحتوي على HbF تتصبغ باللون الوردي مع الأيوزين، في حين أن الكريات التي لا تحتوي على HbF (مشار إليها بسهم) تظهر كأشباح عديمة اللون.

Reference

- .1 Troia, L., et al., *The recurrence risk of fetomaternal hemorrhage*. Fetal Diagnosis and Therapy, 2019. **45**(1): p. 1-12.
- .2 Place, J.C. and L.R. Plano, *A case report of decreased fetal movement during fetomaternal hemorrhage*. Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing, 2015. **44**(6): p. 737-742.
- .3 Ambreen, A., et al., *PLACENTA ACCRETA: MATERNAL OUTCOME AFTER CONSERVATIVE MANAGEMENT IN A WOMAN DESIRING FERTILITY*. The Professional Medical Journal, 2018. **25**(02): p. 335-339.
- .4 Meleti, D., et al., *Evaluation of passage of fetal erythrocytes into maternal circulation after invasive obstetric procedures*. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research, 2013. **39**(9): p. 1374-1382.
- .5 Kim, Y.A. and R.S. Makar, *Detection of fetomaternal hemorrhage*. American journal of hematology, 2012. **87**(4): p. 417-423.
- .6 Clayton Jr, E.M., E.B. Foster, and E.P. Clayton, *New stain for fetal erythrocytes in peripheral blood smears*. Obstetrics & Gynecology, 1970. **35**(4): p. 642-645.
- .7 Gielezyska, A., et al., *Quantitative fetomaternal hemorrhage assessment with the use of five laboratory tests*. International journal of laboratory hematology, 2016. **38**(4): p. 419-425.
- .8 Bataille, P., L. Petit, and N. Winer, *Performance of the Kleihauer Betke test in the prediction of neonatal anemia*. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 2022. **35**(19): p. 3670-3676.
- .9 Pelikan, D.M., et al., *Improvement of the Kleihauer-Betke test by automated detection of fetal erythrocytes in maternal blood*. Cytometry Part B: Clinical Cytometry :The Journal of the International Society for Analytical Cytology, 2003. **54**(1): p. 1-9.
- .10 Sandler, S.G. and J.L. Gottschall, *Postpartum Rh immunoprophylaxis*. Obstetrics & Gynecology, 2012. **120**(6): p. 1428-1438.
- .11 Bowman, J., *Thirty-five years of Rh prophylaxis*. Transfusion, 2003. **43**(12): p. 1661-1666.
- .12 Karafin, M.S., et al., *Use of fetal hemoglobin quantitation for Rh-positive pregnant females: a national survey and review of the literature*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 2019. **143**(12) : (p. 1539-1544.
- .13 AABB, *Technical Manual 15th Edition*. 2005.
- .14 Pelikan, D.M., et al., *Quantification of fetomaternal hemorrhage: a comparative study of the manual and automated microscopic Kleihauer-Betke tests and flow cytometry in clinical samples*. American journal of obstetrics and gynecology, 2004. **191**(2): p. 551-557.
- .15 Tiblad, E., et al., *Targeted routine antenatal anti-D prophylaxis in the prevention of RhD immunisation-outcome of a new antenatal screening and prevention program*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70984.
- .16 Urgessa, F., et al., *Assessment of fetomaternal hemorrhage among rhesus D negative pregnant mothers using the kleihauer-betke test (KBT) and flow cytometry (FCM) in Addis Ababa, Ethiopia*. BMC Pregnancy and Childbirth, 2014. **14** : (1) p. 1-7.
- .17 Mollison, P., *Clinical Problems: Quantitation of Transplacental Haemorrhage*. British Medical Journal, 1972. **3**(5817): p. 31.
- .18 Kumpel, B., et al., *Quantitation of fetomaternal haemorrhage and F cells in unusual maternal blood samples by flow cytometry using anti-D and anti-HbF*. Transfusion Medicine, 2013. **23**(3): p. 175-186.
- .19 Zhang, Z., et al., *Evaluation of machine learning-driven automated Kleihauer-Betke counting: A method comparison study*. International Journal of Laboratory Hematology, 2021. **43**(3): p. 372-377.

