

· 临床检验研究论著 ·

影响 Kleihauer-Betke 实验结果的实验因素分析*

杨树法, 翟燕红, 王文娟

(首都医科大学附属北京妇产医院北京妇幼保健院新生儿疾病筛查实验室, 北京 100026)

摘要:目的 分析 Kleihauer-Betke(K-B)实验的影响因素,以更好地诊断胎母输血综合征。方法 分析不同因素对 K-B 实验的影响,确定最佳实验条件。以脐带血和静脉血的混合血为检测样本,计算 K-B 实验的回收率;以优化的 K-B 实验检测 200 例未孕妇女以及 100 例疑似胎母输血综合征妇女,建立待产妇胎儿红细胞含量的参考值范围。结果 在 37 ℃脱色 8 min、伊红染色 60 s 时,胎儿红细胞和成人红细胞积分光密度的比值最大为 10.13±1.17,镜下胎儿红细胞染色呈强粉红色,折光性强,脐带血含量与 K-B 实验结果的相关系数 $r=0.999$,回收率为 84.75%~96.55%。待产妇胎儿红细胞含量参考值范围为小于 0.68%。结论 通过设立阳性对照、阴性对照以及回收率实验建立稳定的 K-B 实验,能够对胎母输血综合征作出正确诊断。

关键词:胎母输血综合征; Kleihauer-Betke 实验; 胎儿红细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)02-0138-02

The analysis of experimental factors affecting the results of Kleihauer-Betke test*

Yang Shufa, Zhai Yanhong, Wang Wenjuan

(Department of Neonatal Disease Screening Laboratory, Capital Medical University Affiliated

Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Beijing 100026, China)

Abstract: Objective To analyze the factors affecting Kleihauer-Betke(K-B) test to get better diagnostic results of fetomaternal hemorrhage. **Methods** Different factors to K-B test were analyzed to get better experimental procedure. The recovery of K-B test were calculated by testing mixture of adult vein blood and cord blood. 200 unpregnant women and 100 suspicious fetomaternal hemorrhage pregnant women were analyzed by optimized K-B test in order to set up reference range of fetal red blood cells. **Results** The elution condition stayed 37 ℃ lasting 8 min and the hematoxylin eosin staining condition stayed 37 ℃ lasting 60 s in order to get the biggest ratio of integrated optical density(IOD) which was 10.13±1.17. Fetal red blood cells were heavily stained pink and strongly dioptrical in contrast to adult red blood cells under the light microscope. The correlation coefficient of cord blood content and the K-B test result was 0.999 and the recovery was 84.75%—96.55%. The reference range of fetal red blood cells in the expectant mothers was lower than 0.68%. **Conclusion** Stable K-B test could be established through setting up positive control, negative control and recovery experiment, which could diagnose fetomaternal hemorrhage correctly.

Key words: fetomaternal hemorrhage; Kleihauer-Betke test; fetal red blood cells

胎母输血综合征(FMH)以胎儿血液通过受损的胎盘进入母体为特征,症状多为非特异性^[1],实验室准确检测母血中胎儿红细胞成为临床早期诊断和治疗的基础。Kleihauer-Betke(K-B)实验是最常用的实验室诊断方法^[2];但目前国内开展该实验的医院少,相关报道也不多。鉴于此,本研究以新生儿血涂片作为阳性对照,分析不同实验条件对 K-B 实验结果的影响;并通过回收率实验验证 K-B 实验的准确性,以期更好地应用于临床,避免发生 FMH。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2011 年 4~10 月本院妇产科患者作为研究对象;对照组入选标准:(1)尿液 HCG 阴性;(2)血红蛋白浓度高于 100 g/L;(3)红细胞形态正常;(4)年龄 25~35 岁;实验组入选标准^[3]:(1)胎心监护出现正弦样曲线;(2)超声检查发现胎儿水肿,除外胎儿宫内感染、珠蛋白生成障碍性贫血及染色体异常;(3)红细胞形态正常;(4)年龄 25~35 岁。入选 200 例未孕患者作为对照组,100 例疑似 FMH 患者为实验组。取同血型的脐带血和对照组未孕女性静脉血各 1 份,用 SYS-

MEX XT-1800i 血液分析仪计数其红细胞,然后用生理盐水调节至两者红细胞浓度一致。将脐带血与未孕女性静脉血混合,配制成脐带血百分比含量分别为 10%、8%、6%、4%、2%、1%、0.5%的混合血样品。

1.2 仪器与试剂 80%乙醇(分析纯,北京化工厂),1 mol/L 枸橼酸(分析纯,北京化工厂),0.2 mol/L 磷酸氢二钠(分析纯,北京化工厂),1%伊红染液(北京化工厂)。酸性洗脱缓冲液[pH(3.3±0.2)]配制:将 12.3 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠与 37.7 mL 0.1 mol/L 枸橼酸混匀。Olympus DP26 数码显微镜。

1.3 方法

1.3.1 血涂片的制备 实验组和对照组的血液均以抗凝静脉血(1.5~2.2 mg/mL EDTA-K₂ 抗凝)或末梢血作为血液来源,按照常规方法推制血涂片。

1.3.2 K-B 实验 传统实验方法参见《全国临床检验操作规程》中血红蛋白 F 酸洗脱实验^[4]。在分析其影响因素后对其进行改进:(1)将制备好的血涂片自然干燥 10 min 以上;(2)

* 基金项目:首都医科大学附属北京妇产医院科研基金资助项目(201102)。作者简介:杨树法,男,主管检验师,主要从事孕产妇及新生儿疾病的诊断研究。

80%乙醇固定 5 min,水洗待干;(3)将固定后的血膜在 37 ℃ 的酸性缓冲液(0.049 mol/L 磷酸氢二钠,0.075 mol/L 枸橼酸, pH3.3)中洗脱 8 min,冲洗干燥;(4)在伊红染液中染色 60 s。水洗待干后,计数 1 000 个红细胞中胎儿红细胞的百分含量,作为胎儿红细胞染色结果。

1.3.3 K-B 实验影响因素分析 以脐带血含量为 5% 的混合血液为检测样本,每种条件染色 20 张血涂片,洗脱温度为 37、20、10 ℃,洗脱时间为 10、8、5、3 min,伊红染色时间为 30、60、90、120、150、180 s 条件下进行 K-B 实验染色。染色结束后,在相同的曝光条件下,采集图像。用 Image-Pro-Plus 6.0 软件对获取的图像进行积分光密度(IOD)分析,计算胎儿红细胞和成人红细胞的 IOD 值;用胎儿红细胞 IOD 除以成人红细胞 IOD 计算 IOD 比值。然后计算每种条件下 20 张血涂片的 IOD 比值均值。以该比值的均值来评价染色效果:比值越大,表明更有效区分胎儿红细胞和成人红细胞;在分析实验影响因素的基础上分析获得最佳实验条件。

1.3.4 回收率实验 在 1.3.3 确定的最佳实验条件下,以含不同浓度脐带血的静脉血(10%、8%、6%、4%、2%、1%、0.5%、0%)为检测样本,每份混合血以及不含脐带血的静脉血制备 5 张血涂片,计算胎儿红细胞百分含量;以静脉血(脐带血含量为 0%)的胎儿红细胞的百分含量作为基础百分率,计算回收率:回收率(%)=(测定百分率-基础百分率)/加样百分率×100。

1.3.5 实验组和对照组样品处理 在 1.3.3 确定的最佳实验条件下检测对照组和实验组患者样品,计算胎儿红细胞百分含量。

1.4 统计学处理 实验结果用 SPSS15.0 统计学软件进行统计学处理。K-B 实验影响因素的分析采用方差分析以及 *t* 检验,回收率实验的分析采用直线相关分析,以 $\bar{x} \pm 2.56s$ 计算 95% 参考值范围。

2 结 果

2.1 K-B 实验中洗脱温度、时间对染色结果的影响 染色后胎儿红细胞和成人红细胞 IOD 比值见表 1。在 37 ℃ 8 min 条件下胎儿红细胞和成人红细胞 IOD 比值最大($P < 0.01$)。

表 1 洗脱条件对 K-B 实验的影响

编号	洗脱温度 (℃)	洗脱时间 (min)	样本数 (n)	IOD 比值 ($\bar{x} \pm s$) *
1	37	10	20	8.15 ± 1.07
2	37	8	20	10.13 ± 1.17
3	37	5	20	7.18 ± 0.68
4	37	3	20	4.06 ± 0.39
5	20	10	20	9.25 ± 0.92
6	20	8	20	5.46 ± 0.47
7	20	5	20	4.26 ± 0.33
8	20	3	20	3.75 ± 0.26
9	10	10	20	6.64 ± 0.89
10	10	8	20	4.21 ± 0.24
11	10	5	20	3.13 ± 0.66
12	10	3	20	2.16 ± 0.36

2.2 K-B 实验中伊红染色时间对染色结果的影响 将洗脱条件定为 37 ℃ 8 min,染色 30、60、90、120、150 s IOD 比值分别为 4.12 ± 0.37、10.15 ± 0.87、11.21 ± 0.86、8.23 ± 0.72、6.21 ± 1.10、7.15 ± 0.50,在染色 60、90 s 时可获得最佳染色结果,二者间 IOD 比值差异不具有统计学意义($P > 0.05$),但与其他染色时间 IOD 比值比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 回收率实验 洗脱条件为 37 ℃ 8 min,伊红染色 60 s,胎儿红细胞被染成粉红色,折光性强,成人红细胞则呈无色空染状态,折光性差。脐带血与成人静脉血的混合血标本检测结果见表 2,脐带血含量与 K-B 实验结果的相关系数 $r = 0.999$,95% 置信区间为 0.997~1.000,回收率为 84.75%~96.55%。

表 2 K-B 实验回收率实验结果

脐带血含量 (%)	胎儿红细胞百分 含量(%, $\bar{x} \pm s$)	CV (%)	回收率 (%)
0	0	—	—
0.5	0.45 ± 0.09	20.12	89.35
1	0.87 ± 0.14	16.53	87.43
2	1.73 ± 0.31	17.67	86.68
4	3.39 ± 0.52	15.34	84.75
6	5.56 ± 0.81	14.56	92.73
8	7.58 ± 0.90	11.86	94.69
10	9.66 ± 1.02	10.54	96.55

—:无数据。

2.4 实验组和对照组 K-B 实验检测结果 K-B 实验检测 200 例对照组患者中仅有 6 例患者偶见有深染的胎儿红细胞,故未计算其胎儿红细胞比值以及 95% 参考值范围。实验组 100 例患者中,胎儿红细胞占红细胞总数的比值的均值为 0.32%,标准差为 0.14%,取单侧尾部面积,利用公式 $\bar{x} \pm 2.56s$ 计算得到实验组参考值范围为小于 0.68%。最终临床确诊 3 例 FMH 患者,K-B 实验检测结果为 3%、11%、2.6%;低于参考值范围的实验组孕妇无确诊 FMH 患者。

3 讨 论

FMH 以胎儿血液通过受损的胎盘进入母体为特征^[5-6],症状多为非特异性,晚期表现为三联征:胎动减少或消失;胎心监护提示典型的正弦曲线图形,胎心基线变异减少,晚期减速;B 超检查提示胎儿水肿,胎儿生长受限、死胎。新生儿出生后表现为皮肤苍白^[7]、肌张力减低、低 Apgar 评分、贫血,输血治疗可矫正临床表现。实验室检测母血中胎儿红细胞的含量是对该病确诊的直接证据。

K-B 实验具有需要仪器少、适合夜班以及休息日的优点,成为目前主要的检测方法^[1,8]。同时该实验具有手工操作多、对操作者经验要求高、缺少质量控制系统等缺点^[9-10],因此如何提高实验稳定性及结果准确性,成为实际工作中亟待解决的问题。

K-B 实验的洗脱条件(洗脱时间和洗脱温度)和染色条件是重要影响因素。随着洗脱温度升高,酸性洗脱液的洗脱力度增强,获得最佳实验结果的洗脱时间缩短。在某一温度条件下,随洗脱时间延长,IOD 比值表现为先增大后减小。以 37 ℃ 洗脱条件为例,开始时 HbA 洗脱速度远高于 HbF 洗脱速度,随着洗脱时间延长成人红细胞着色强度降低(下转第 142 页)

葡萄球菌的耐药情况严重,青霉素 G、红霉素、克林霉素、复方新诺明、头孢类抗生素的耐药率均超过 60.00%,提示这些药物已不适合经验性治疗表皮葡萄球菌败血症;表皮葡萄球菌对利奈唑胺、替考拉宁、万古霉素较敏感,耐药率均在 5.00%以下,可作为治疗表皮葡萄球菌败血症的首选药物。近年来,肠球菌的耐药性愈来愈严重,表现为耐青霉素、高水平耐氨基糖苷类抗生素及耐万古霉素,各地报道的耐万古霉素肠球菌感染有增加的趋势^[5-6]。本研究中虽然未发现耐万古霉素的革兰阳性菌,但是检出 2 株对替考拉宁耐药的菌株。这应该引起临床医生的注意,严格控制糖肽类抗生素的使用,避免万古霉素的滥用,防止耐药菌株的出现。

本研究中检出真菌 18 株,占致病菌的 9.05%。近年来真菌感染的比例明显升高,这与广谱抗生素、免疫抑制剂、激素的长期使用及患者自身的免疫状况有关。临床医生应该对真菌感染引起足够重视,注意预防院内真菌感染,及时检测真菌感染,严格控制抗生素的使用。本文中检出真菌以马尔尼菲青霉菌和近平滑念珠菌为主,与国内其他文献报道的以白色念珠菌感染为主不同^[7-8],这可能与地域差异和标本送检量有关。7 株马尔尼菲青霉菌均来自艾滋病患者血标本,提示临床应重视艾滋病患者真菌感染情况。

综上所述,通过对本院 2010 年 11 月至 2012 年 3 月血培养病原菌分布及耐药性的统计分析,可以看出血培养标本检出病原菌种类多、分布广且耐药情况严重。这提示临床医生应重视血培养,根据药敏试验结果合理使用抗菌药物,减少不合理

的经验性用药,防止抗菌药物滥用及耐药菌株的产生。另外,医院应该对血培养病原菌的分布和耐药性做好统计工作,帮助临床医生及时掌握病原菌的耐药状况,指导抗菌药物的合理使用。

参考文献

- [1] 张红霞,杨芒庄. 1 860 例血培养结果及药敏分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(4):452-453.
- [2] 韩福祿,王文艳,庞莉. 血培养常见病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):630-631.
- [3] CLSI. M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2010:1-160.
- [4] 徐雅萍,罗燕萍,周光,等. 凝固酶阴性葡萄球菌所致血行感染的相关研究[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(2):224-226.
- [5] 王进,梁军,肖永红. 2008 年 Mohnarín 血流感染病原菌构成及耐药性[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(16):2399-2404.
- [6] 徐宁,李丰良. 血培养病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):627-629.
- [7] 张淑青,王贺永,李宏芬,等. 血培养标本中病原菌的分布及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(7):1472-1474.
- [8] 刘彩林,孙自镛,朱旭慧,等. 2001~2010 年血培养病原菌变迁及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(3):624-626.

(收稿日期:2012-08-08)

(上接第 139 页)

值高于胎儿红细胞降低值,表现为 IOD 比值增大,到 8 min 时达到最大;此后,HbA 已经被完全洗脱而 HbF 继续被洗脱,成人红细胞着色强度不再降低,而胎儿红细胞着色继续降低,表现为 IOD 比值减小。笔者在对室温(20℃)以及低温(10℃)条件下其他洗脱时间的研究结果未在本文中讲述。伊红染色时间过短导致胎儿红细胞着色浅,染色时间过长导致背景干扰高,这些均会导致 IOD 比值下降;在染色 60 s 和 90 s 时,可以获得最佳染色效果。综合考虑后,笔者将洗脱条件定为 37℃ 8 min,伊红染色时间定为 60 s。

在以混合血液为研究对象的回收率实验中,脐带血含量与 K-B 实验结果的相关系数 $r=0.999$,95%置信区间为 0.997~1.000,回收率为 84.75%~96.55%,表明本研究建立的 K-B 实验方法获得了高稳定性和准确性,可以准确检出静脉血中的胎儿红细胞。实验组和对照组 K-B 实验检测结果对比以及临床反馈确诊病例的相关情况也从临床实践的角度验证实验结果的准确性。

综上所述,K-B 实验易出现操作不规范、结果不准确的情况。在开展该实验过程中,应以脐带血为阳性对照,未孕女性静脉血为阴性对照;在优化洗脱条件、染色条件后,可以通过回收率实验验证实验结果的准确性。在对临床患者检测中,应结合孕妇胎儿红细胞参考值范围及其他临床症状对患者作出正确诊断,避免发生 FMH。

参考文献

- [1] Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal hemorrhage[J]. Obstet Gy-

necol, 2010, 115(5):1039-1051.

- [2] Adeniji AO, Mabayoje VO, Raji AA, et al. Feto-maternal haemorrhage in parturients: incidence and its determinants[J]. J Obstet Gynaecol, 2008, 28(1):60-63.
- [3] 王欣,张为远. 胎母输血综合征 7 例分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(7):546-548.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社, 2006:184-185.
- [5] 赵友萍,黄醒华. 胎母输血综合征对围产儿影响的研究进展[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(8):632-634.
- [6] 刘玉昆,王蕴慧,王振花,等. 胎母输血综合征的诊治(附三例报告)[J]. 中华围产医学杂志, 2008, 11(5):357-358.
- [7] 沈红玲. 胎母输血综合征 4 例[J]. 实用妇产科杂志, 2010, 26(12):938-939.
- [8] Porra V, Beraud J, Gueret P, et al. Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method: evaluation of the Fetal Cell Count kit[J]. Transfusion, 2007, 47(7):1281-1289.
- [9] Agarwal P, Sekhar Das S, Gupta R, et al. Quantification of fetomaternal hemorrhage: selection of techniques for a resource-poor setting[J]. Gynecol Obstet Invest, 2011, 71(1):47-52.
- [10] Uriel M, Subirá D, Plaza J, et al. Identification of fetomaternal haemorrhage around labour using flow cytometry immunophenotyping[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2010, 151(1):20-25.

(收稿日期:2012-07-08)