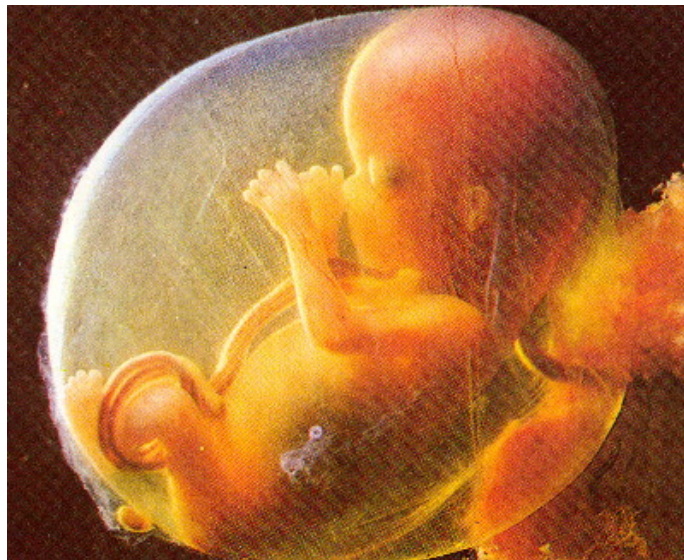


L'EVOLUZIONE DELLA TECNICA DI KLEIHAUER-BETKE PER IL CONTEGGIO DEGLI ERITROCITI FETALI: CONFRONTO CON LA CITOMETRIA A FLUSSO, FATTIBILITÀ, PRATICABILITÀ



LAVORO DI DIPLOMA 2010

Redatto da: Valentina Corda
Scuola Superiore Medico Tecnica, Locarno
Svolto presso: Ospedale S. Giovanni di Bellinzona e Laboratorio di Ematologia
Morfologica di Bellinzona

Responsabili: Dr. Christian Castelli e Dott.ssa Roberta Bordone

Immagine di copertina tratta dal sito internet e consultato nel mese di aprile 2010:
http://www.google.ch/imgres?imgurl=http://associazioni.comune.firenze.it/centroaiutovita/feto.JPG&imgrefurl=http://associazioni.comune.firenze.it/centroaiutovita/come.html&usg=__vkKenTEvrepffXkHjoxlkDfxN8=&h=326&w=400&sz=81&hl=it&start=1&itbs=1&tbnid=rOro1a6y5l8N0M:&tbnh=101&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Dfeto%26hl%3Dit%26sa%3DG%26gbv%3D2%26tbs%3Disch:1

RIASSUNTO

Introduzione: l'emorragia feto materna (EFM) è il passaggio degli eritrociti fetali dal feto nella circolazione sanguigna materna. Questa situazione si può manifestare durante la gravidanza a seguito di traumi addominali, oppure durante l'esame dei villi coriali, quando vengono fatte delle manovre ostetriche al neonato. Tuttavia è soprattutto durante il parto naturale che c'è un travaso importante di sangue fetale nella circolazione materna. Se la madre è Rhesus negativa e il feto è Rhesus positivo, essa può sviluppare un'alloimmunizzazione contro l'antigene D, presente sulla membrana degli eritrociti fetali, durante la prima gravidanza. Nel caso di una seconda gravidanza le immunoglobuline IgG prodotte dalla madre passano la placenta e vanno a distruggere gli eritrociti fetali D positivi. È importante somministrare alla madre un'immunoprofilassi anti-D prima che essa sviluppi l'alloimmunizzazione. Al ginecologo serve quindi sapere il volume di sangue fetale passato alla madre per poterle dare un'immunoprofilassi adeguata. Un'importante analisi consiste nel conteggio degli eritrociti fetali tramite una colorazione citochimica secondo Kleihauer-Betke (KBT) in uso attualmente presso i laboratori di routine degli Ospedali dell'Ente Cantonale. Tuttavia questa metodica è poco riproducibile, sensibile e specifica. Una nuova tecnica più sensibile e riproducibile è la citometria a flusso. L'obiettivo è quindi mettere a punto questa nuova metodica e valutare la sua praticabilità, fattibilità e confrontare alcuni risultati ottenuti con entrambe le metodiche. Si valuterà se questa nuova metodica potrà sostituire la colorazione.

Materiali e metodi: per l'analisi in citofluorimetria verrà utilizzato un citometro a flusso FACSCanto II (Beckton Dickinson), il Kit fetal Cell Count (IQ Products) ed i controlli commerciali FETALtrol (IQ Products). Per l'analisi con la vecchia metodica sarà utilizzata la colorazione per i vetrini ed un microscopio ottico (Zeiss, Germany) per il conteggio degli eritrociti.

Risultati: La metodica citofluorimetrica è riproducibile. Tuttavia un campione di sangue non è stabile fino al giorno successivo e ci sono dei falsi aumenti per gli eritrociti fetali. Ci sarebbe una sovrastima rispetto alla realtà.

Conclusioni: La citofluorimetria non sostituirà la vecchia metodica KBT in quanto più costosa, i campioni non sono stabili, disponibilità limitata.

ABSTRACT

Introduction : It is known that fetal maternal hemorrhage during pregnancy is the passage of fetal red blood cells into the blood circulation of the mother. This situation can occur naturally in a minor way and is asymptomatic. Other situations that can lead to hemorrhage are trauma during pregnancy, examination of the chorionic villi but it occurs especially during natural childbirth. If the mother is Rhesus negative and fetus Rhesus positive, the mother can develop the alloimmunization against the antigen D present on the membrane of fetus erythrocytes. The immunoglobuline IgG anti-D produced by the mother can, in a second pregnancy, pass through placenta and destroy the fetus' erythrocytes. It is important for the gynecologist to know the volume of fetal erythrocytes that's have entered the mother's blood stream in order to receive an appropriate prophylaxis anti-D. An important analysis is the count of fetal red blood cell, in the mother's blood stream, with staining second Kleihauer-Betke (KBT). However this method is poorly reproducible. A new technique for counting fetus erythrocytes is flow cytometry, which is more reproducible and sensitive than KBT staining. The objective of this study is to develop a new flow cytometry method and make some comparisons of results obtained by the two methods.

Materials and Methods : for the analysis in flow cytometry, the cytometer FACSCanto II (Beckton Dickinson), the Fetal Cell Count Kit (IQ Products) and the commercial controls FETALtrol (IQ Products) will be used. The old method will be used for coloring the slides and a microscope for counting erythrocytes.

Results : The flow cytometry method is reproducible. However a blood sample isn't stable until the next day and there are false increases in the fetal erythrocytes. There would be an overestimation compared to reality.

Conclusions : The method in flow cytometry will not replace the old method KBT as more expensive, the samples are not stable and for a limited availability. With this preliminary study was intended to pave the way for a possible upgrade technological KBT still valid for clinicians to evaluate the control of anti-D prophylaxis.