

Apport de la cytométrie en flux dans la détection des hémorragies foeto-maternelles

Dr Stéphanie HUGUET-JACQUOT

Unité fonctionnelle d'expertise en Immuno-Hémobiologie Périnatale

DMU BioGeM (Pr R Lévy) - LBM Est Parisien (Dr M. Vaubourdolle)

Site Saint-Antoine

TEST DE KLEIHAUER : DETECTION ET QUANTIFICATION D'UNE HEMORRAGIE FOETO-MATERNELLE (HFM)

Passage de sang foetal dans la circulation maternelle durant la grossesse ou à l'accouchement.

- Formes mineures → Risque d'alloimmunisation maternelle
- Formes sévères → Anémie foétale + alloimmunisation maternelle.

INDICATIONS DU TEST DE KLEIHAUER

- | | | |
|---|---|---------------------------|
| 1- Diagnostic étiologique d'une anémie foétale ou néonatale, ou d'une mort foétale | } | Urgence
relative
6h |
| 2- Dépistage et suivi d'une HFM spontanée ou induite par des traumatismes ou des gestes obstétricaux indépendant du groupe rhésus | | |
| 3- Adaptation posologique des IgRh (prophylaxie rhésus) chez la femme RH:-1 enceinte ou accouchée | } | Non urgent
72h |

TEST DE KLEIHAUER : TEST DE REFERENCE

Kleihauer et al , 1957 Test cytochimique sur frottis sanguin fixé à l'éthanol

- Elimination sélective de l'hémoglobine adulte sous l'action d'une solution tampon pH acide, tout en préservant le contenu en hémoglobine foétale (HbF) des hématies.

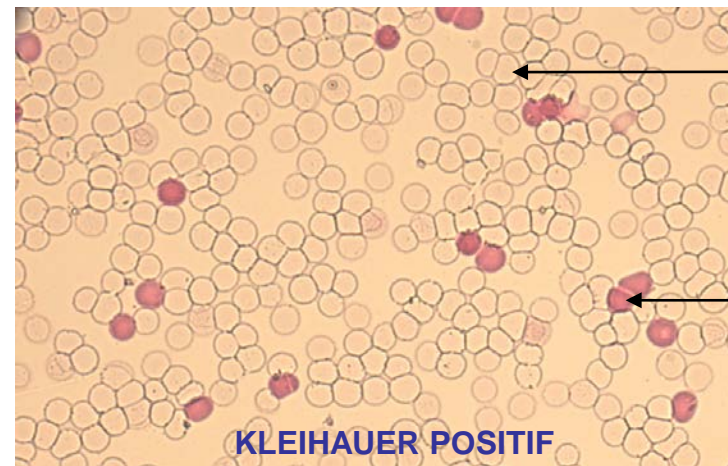
INCONVENIENTS

Technique souvent décrite

- 👉 Technique manuelle, non standardisée, nécessitant un personnel formé et entraîné
- 👉 Difficulté dans le décompte des cellules (grande variation inter-opérateur)
- 👉 Difficultés dans l'interprétation des frottis :

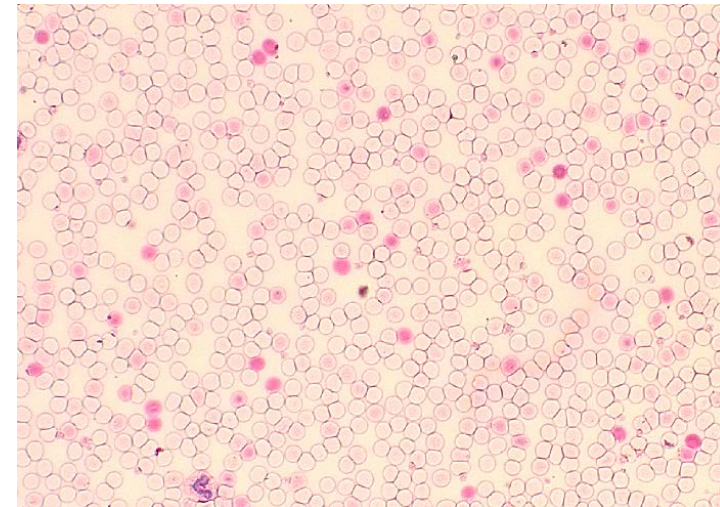
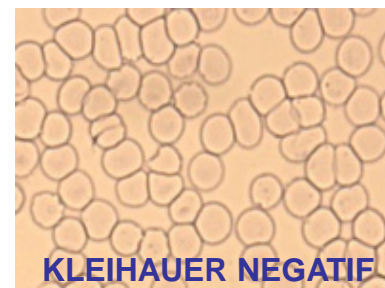
Problème des hématies maternelles avec un contenu élevé en HbF .

Fcells liés à la grossesse ou hémoglobinopathie considérés à tort comme des tests de Kleihauer positifs ⇒ Cellules ininterprétables



Erythrocytes adultes ayant perdu Hb = formes cellulaires fantomatiques, sphériques, incolores

Erythrocytes avec Hb foétale fixant phloxine : rose vif et réfringent



KLEIHAUER avec de très nombreuses cellules ininterprétables ou F-cells caractérisées par un dégradé dans la coloration rose des hématies

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE

DETECTION ET QUANTIFICATION

- Alternative au test de Kleihauer lame :

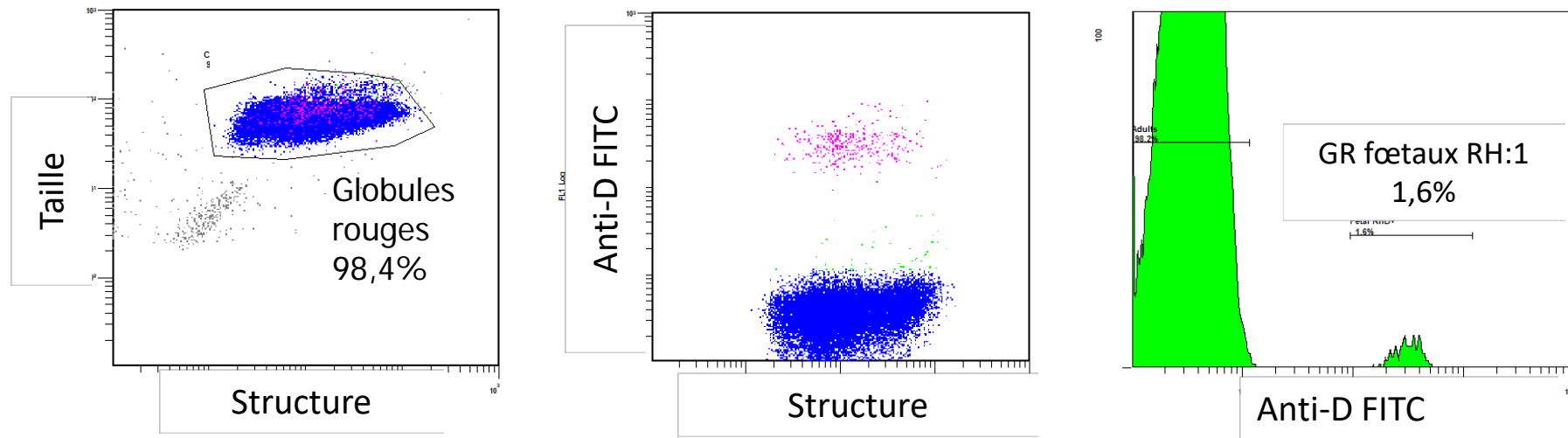
CYTOMETRIE EN FLUX

Etude des événements rares

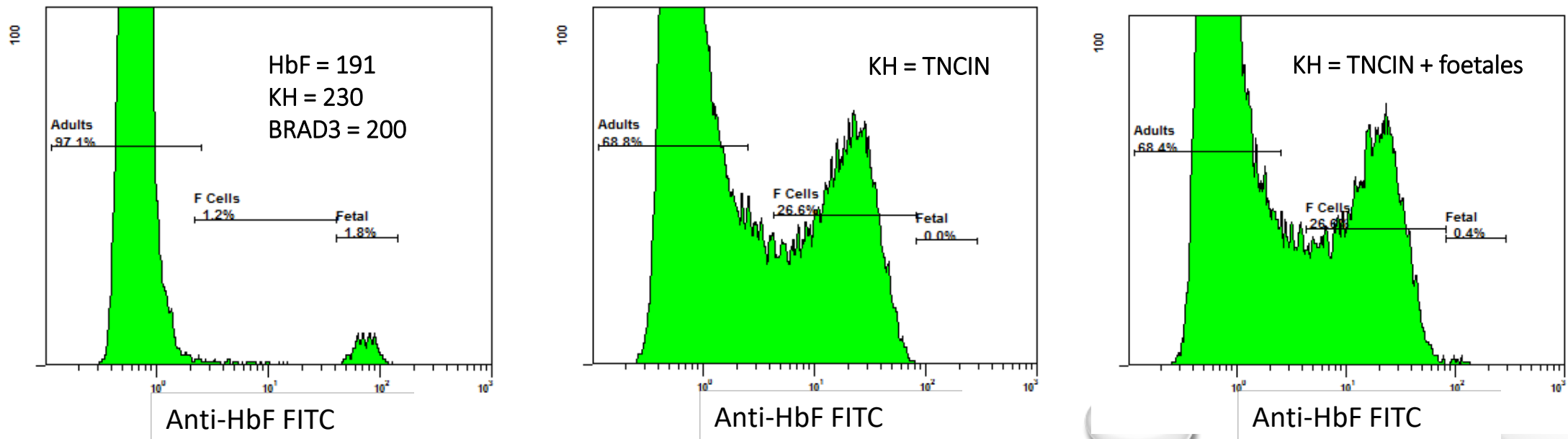
- Détection des hématies fœtales RH1 positif chez la patiente RH1 négatif =
Marquage de l'antigène RH1 ➔ Prévention rhésus
- Détection des hématies fœtales dans la circulation maternelle quelque soit son statut RH1 = **Marquage intra-cytoplasmique de l'HbF**
 - **FMH QuikQuant Kit HbF**
 - **Fetal cell Count Kit HbF et AC**



MARQUAGE DE L'ANTIGENE RH1 (BRAD3)



FMH QuikQuant™ - HbF seul





Fetal Cell Count Kit™

HbF + Anhydrase carbonique

Hématies foetales HbF+AC-

F-cells

HbF+AC+

KH : 250HF/10000

(F1)[Cells] NbCIN-4 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC

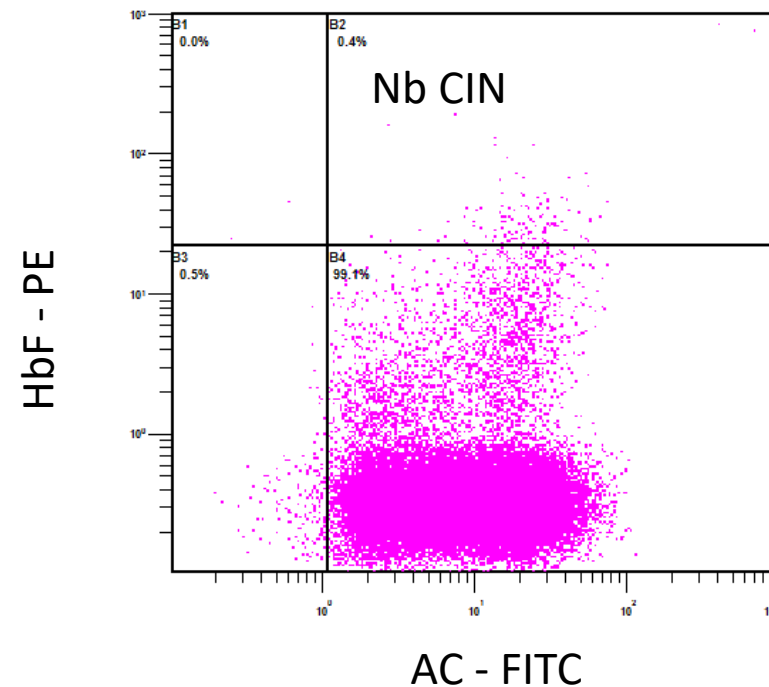
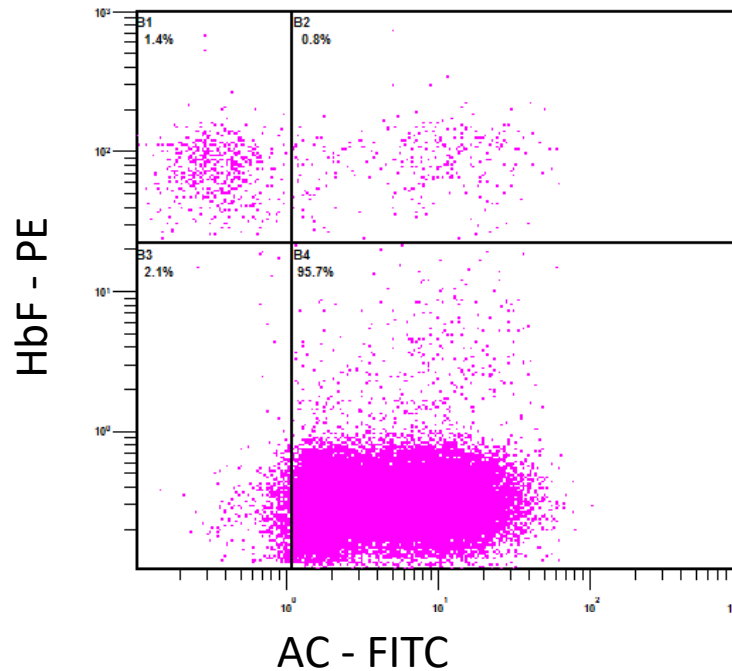


ILLUSTRATION PAR 2 CAS CLINIQUES

**AIDE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX
DANS LE CADRE DE LA PROPHYLAXIE RHESUS
CHEZ LA FEMME ENCEINTE RH1 PARTIEL**

**TEST DE KLEIHAUER PAR CYTOMETRIE EN FLUX
UNE AIDE PRECIEUSE POUR LA DETECTION D'UNE
HEMORRAGIE FOETO-MATERNELLE
DANS UN CONTEXTE DE PATHOLOGIE DE L'HEMOGLOBINE**

AIDE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE CADRE DE LA PROPHYLAXIE RHESUS CHEZ LA FEMME ENCEINTE RH1 PARTIEL

CONTEXTE : LA PROPHYLAXIE RHESUS

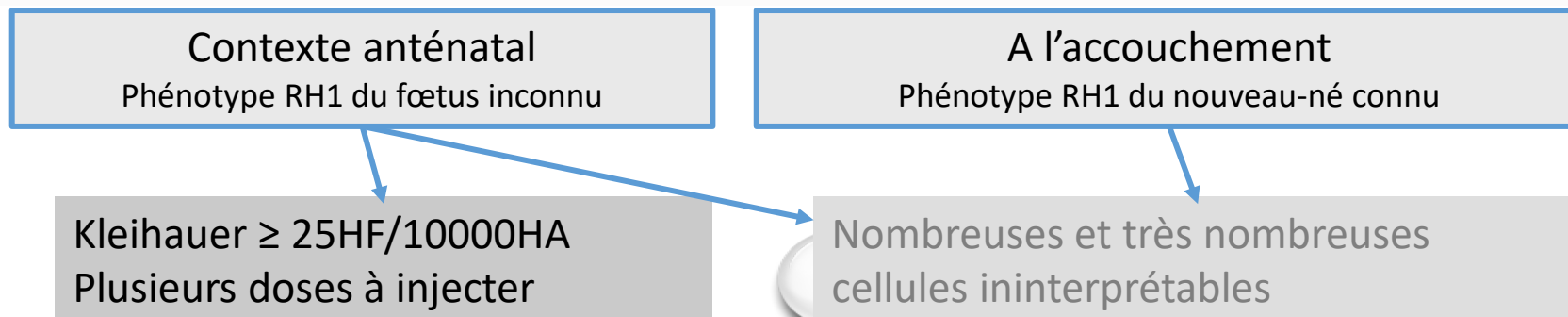
La prophylaxie rhésus est basée sur l'injection d'IgRh

- ☛ Neutraliser les GR fœtaux RH1 positif circulant chez la mère RH1 négatif

Posologie à adapter en f° du nombre d'hématies fœtales RH1 positif circulant dans le sang maternel =

Test de Kleihauer (KH)

Au CNRHP : Utilisation du marquage anti-D(RH1)-BRAD3-FITC en cytométrie en flux en complément du KH en cas de cellules ininterprétables (F-cells) ou en cas de KH positif afin de connaître le statut RH1 du fœtus et la nécessité ou non de traiter par IgRh :



AIDE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE CADRE DE LA PROPHYLAXIE RHESUS CHEZ LA FEMME ENCEINTE RH1 PARTIEL

PROBLEMATIQUE DE LA PATIENTE RH1 PARTIEL

Patiente candidate à la prophylaxie rhésus

Nécessité d'injecter plus de doses que nécessaire

(neutralisation des IgRh par les propres globules rouges de la mère)

☛ BRAD3 permet-il la distinguer GR fœtaux RH1 positif / GR adultes RH1 affaibli?

CAS DE MME ZEN

Cas de Mme ZEN

Antigène RH1 faible de type 4.0 ou 4.3 associé à un risque d'alloimmunisation anti-RH1

DDG : 25/07/2019 – Terme 34SA

Kleihauer pour diminution des mouvements actifs fœtaux

7/3 : 80HF/10000HA \approx 40ml de sang fœtal

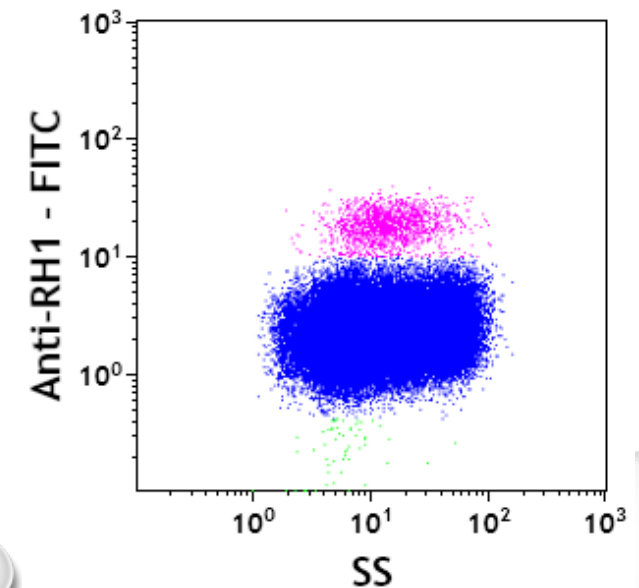
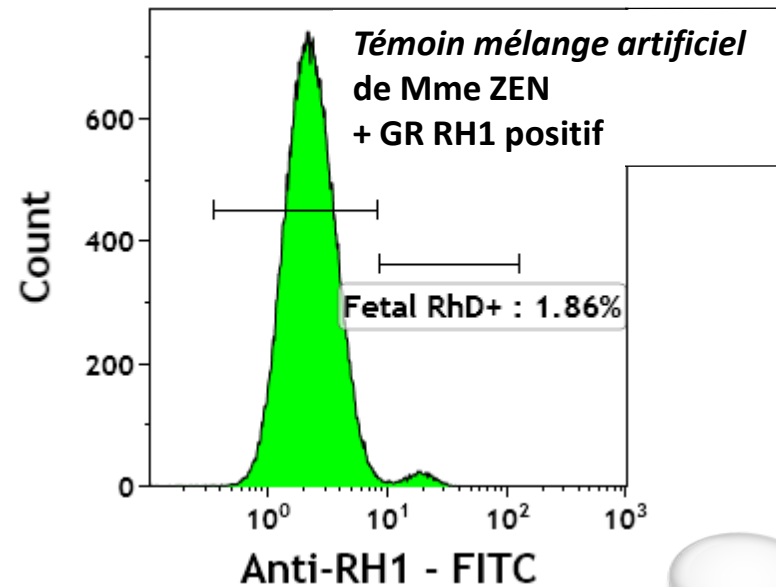
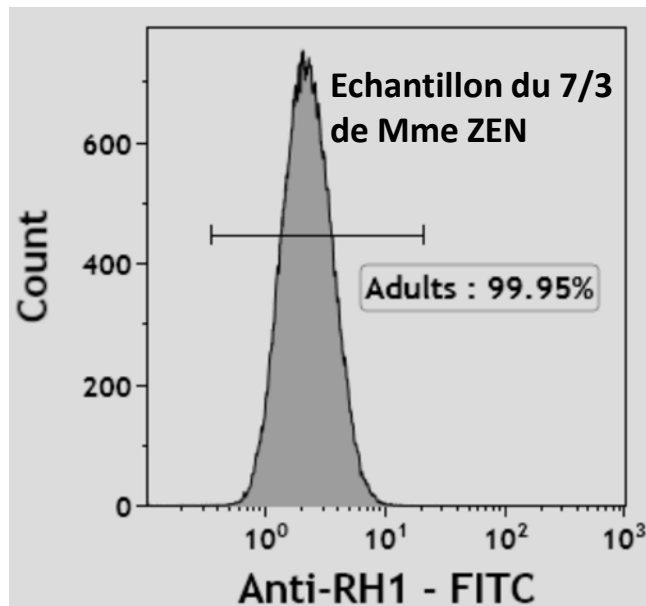
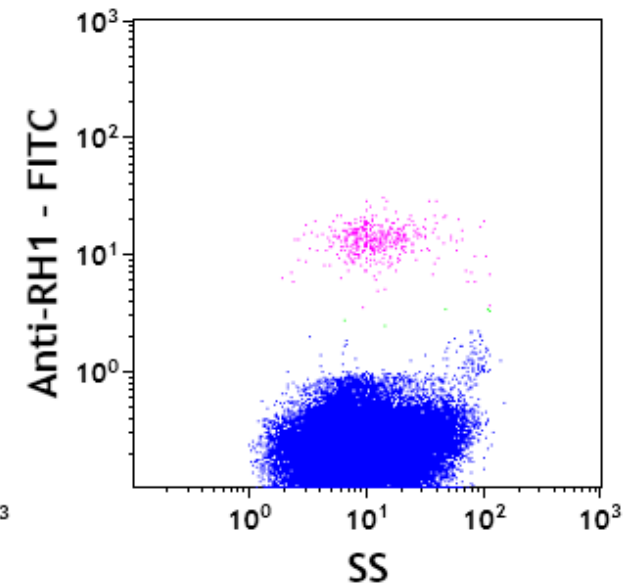
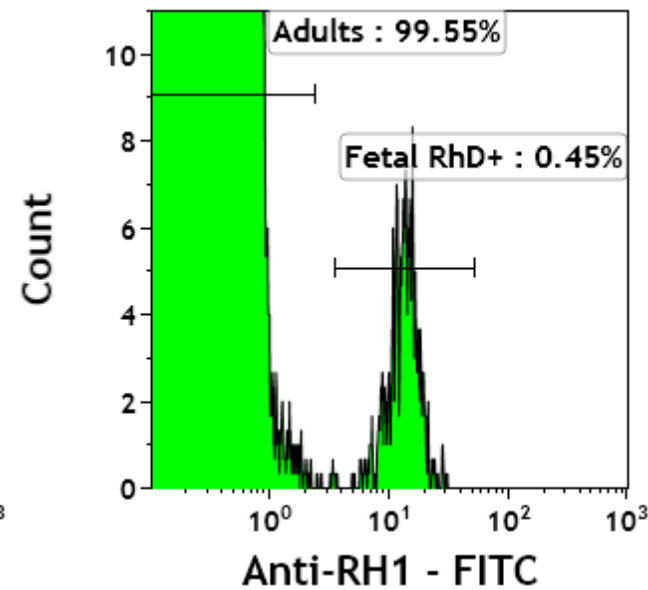
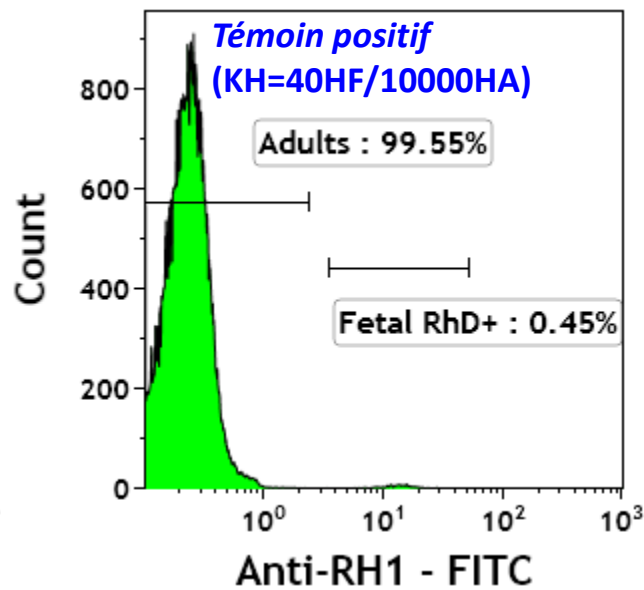
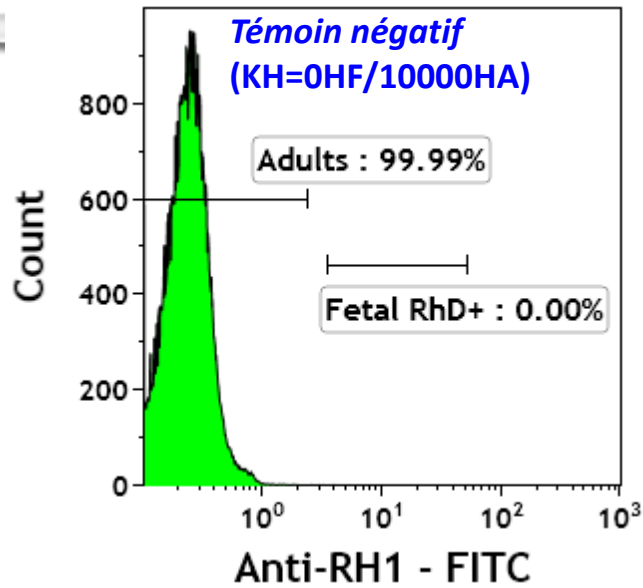
 8/3 : Injection de 3 doses d'IgRh 200 μ g

9/3 : KH de contrôle H24 : 54HF/10000HA \approx 27ml de sang fœtal

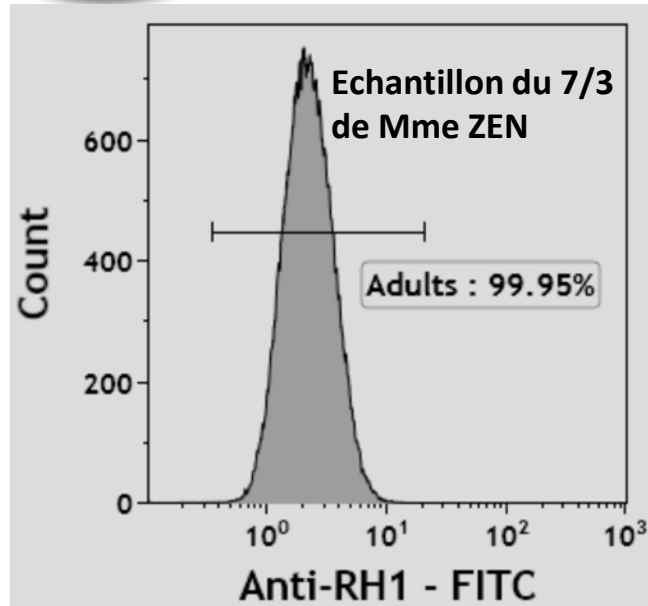
 10/3 : Réinjection de 2 doses d'IgRh 200 μ g

11/3 : KH de contrôle H24 : 46HF/10000HA \approx 23ml de sang fœtal

APPORT de LA CMF



INTERPRETATION



Absence de population RH1 positif dans le sang de Mme ZEN
Foetus probablement RH1 positif faible hérité de sa mère
Absence de risque d'alloimmunisation anti-RH1
Ajout de doses d'IgRh complémentaires inutile

➤ **Accouchement le 09/04/2020**

KH : 0HF/10000HA

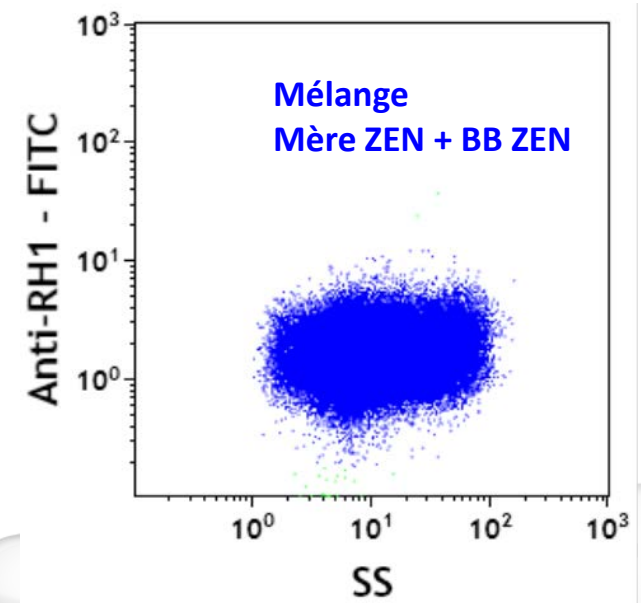
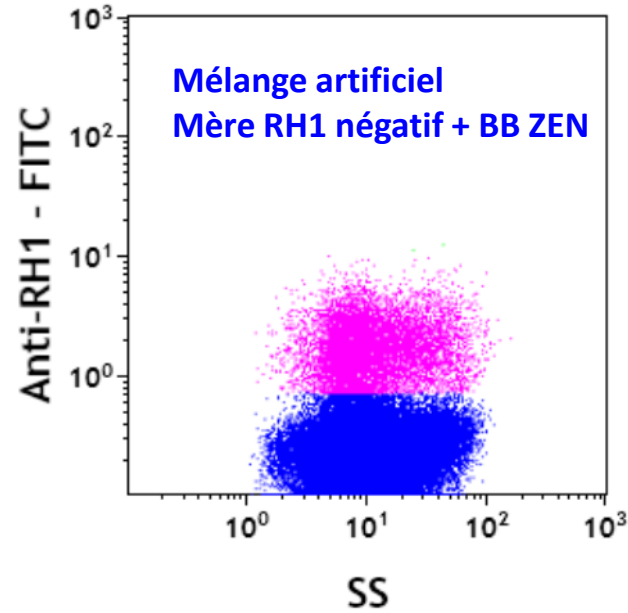
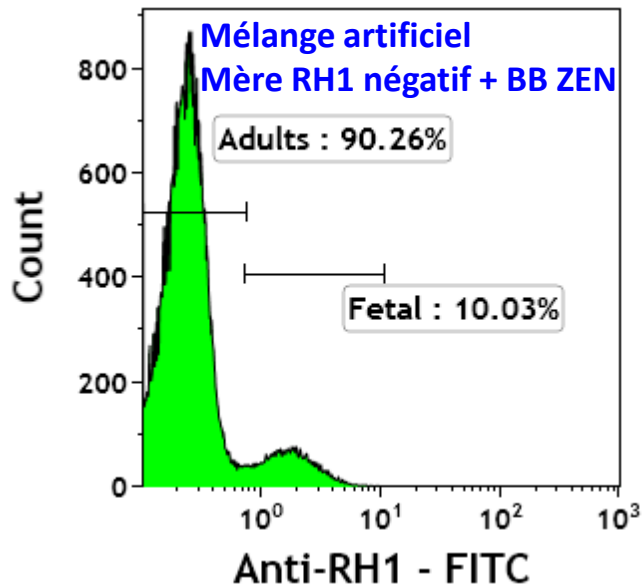
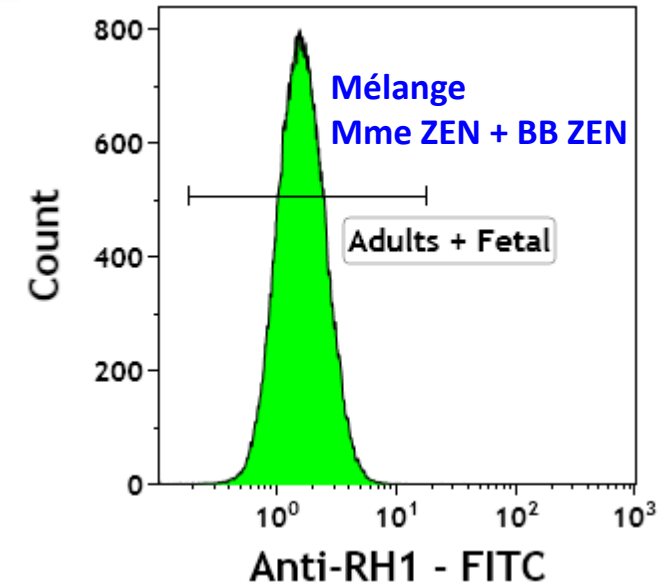
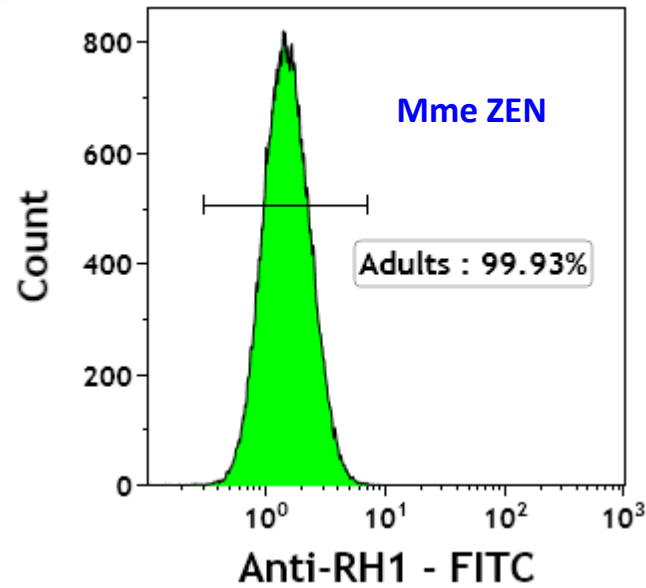
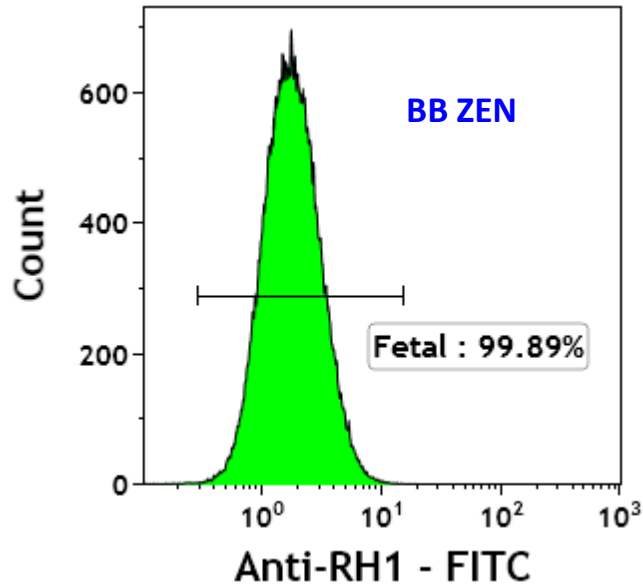
IAI : Absence d'anti-RH1 immun confirmé sur un prélèvement du 30/10/20

Apparition d'un anti-JK2 et d'un anti-KEL1

Enfant de phénotype RH1 affaibli ayant le même profil de réactivité que chez sa mère.

Patiente non retraitée à l'accouchement

CONFIRMATION PAR LA CMF



AIDE DE LA CYTOMETRIE EN FLUX DANS LE CADRE DE LA PROPHYLAXIE RHESUS CHEZ LA FEMME ENCEINTE RH1 PARTIEL

Le marquage anti-RH1-BRAD3 en cytométrie en flux a donc tout son intérêt chez la patiente RH1 partiel en complément du Kleihauer dans le cadre de la prophylaxie rhésus.

Applicable également en cas de cellules ininterprétables

Intérêt d'autant plus important que chez ces patientes le génotypage *RHD* fœtal sur échantillon de sang maternel est ininterprétable.

Cette technique sera à évaluer avec d'autres types de variant RH1.

TEST DE KLEIHAUER PAR CYTOMETRIE EN FLUX UNE AIDE PRECIEUSE POUR LA DETECTION D'UNE HEMORRAGIE FOETO-MATERNELLE DANS UN CONTEXTE DE PATHOLOGIE DE L'HEMOGLOBINE

CONTEXTE :

Limite du test cytochimique sur frottis sanguin fixé à l'éthanol en présence d'une pathologie de l'hémoglobine chez la mère.

Orientation par l'aspect sur lame

Technique complémentaire de cytométrie en flux associant marquage de l'hémoglobine fœtale (HbF marqueur des cellules fœtales et des cellules adultes contenant de l'HbF ou F-cells) et de l'anhydrase carbonique (AC marqueur des cellules adultes) permet de conclure sur la présence d'une HFM comme l'illustre le cas de Mme SAI.

Au CNRHP : Utilisation du marquage anti-HbF-PE/anti-AC-FITC en cytométrie en flux en complément du KH en cas de nombreuses et très nombreuses cellules ininterprétables (F-cells) >3 hématies rose foncé par champs (>25HF/10000HA).

Cas de Mme SAI

DDG : 28/07/2020 - Terme 25SA+1

KLEIHAUER pour diminution des mouvements actifs fœtaux

Aspect homogène de la coloration rose des hématies faisant suspecter une HFM importante : 632HF/10000HA \approx 316ml de sang fœtal

O RH:-1,2,-3,4,5 RAI : nég

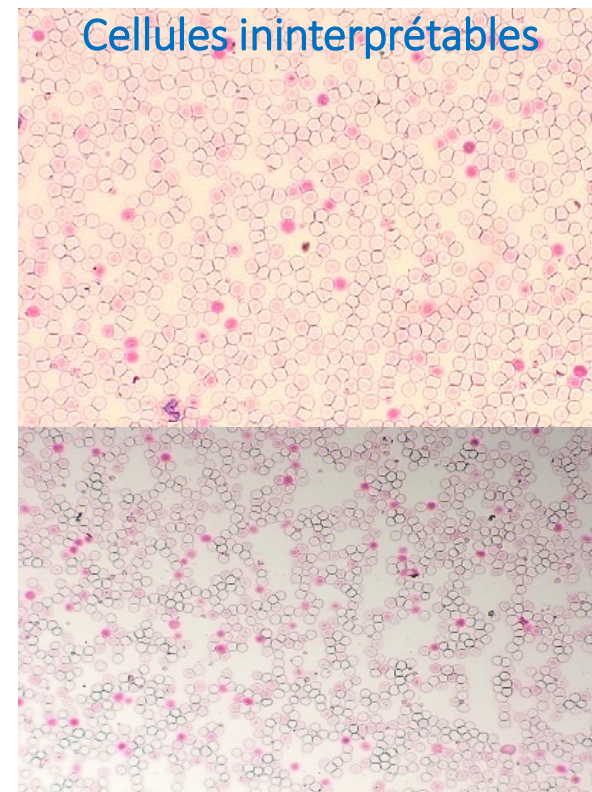
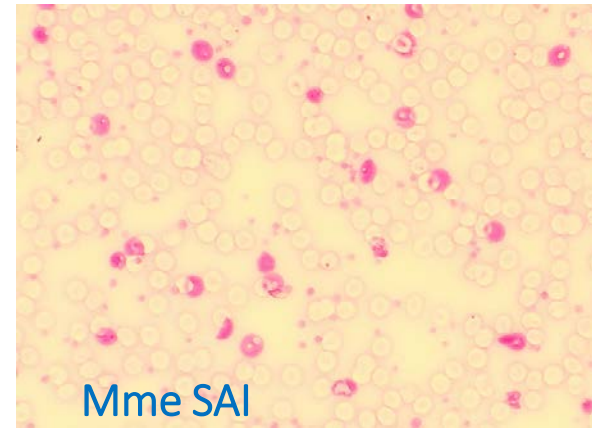
Génotypage *RHD* fœtal ininterprétable en raison de la présence d'un variant silencieux (C)cde^s chez la mère

Exon 10 + précoce d'origine maternel / Exon 7 négatif / Exon 5 négatif

β Thalassémie homozygote 7/1/21 : HbF : 6,1% (N<1%)

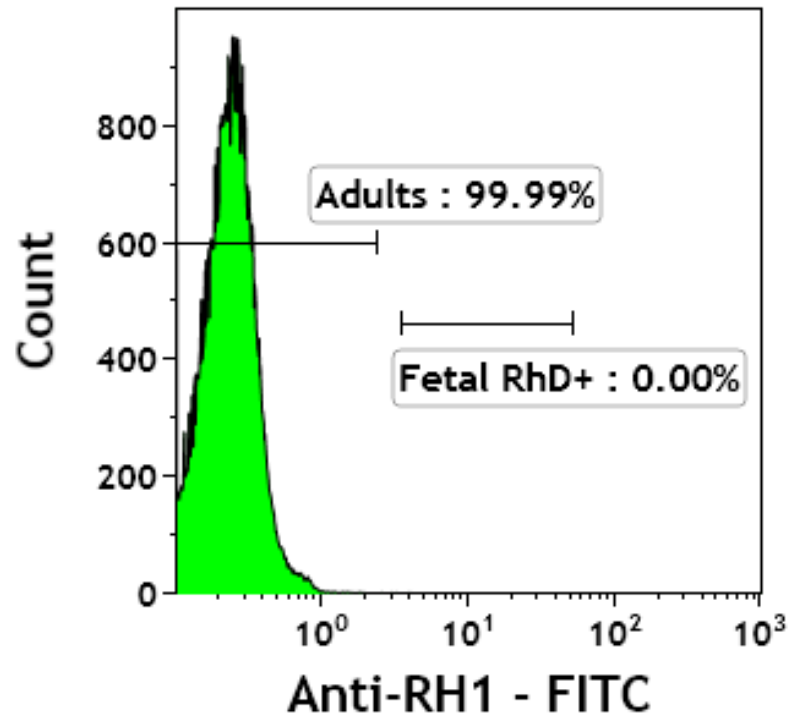
Discordance clinico-biologique : Etant donné le terme de la grossesse, la masse sanguine du fœtus ne devrait pas dépasser 100ml. Une perte d'environ 316ml de sang fœtal est beaucoup trop importante. De plus le fœtus ne montre aucun signe d'anémie fœtale sévère à l'échographie.

☛ Aide de la cytométrie en flux afin d'expliquer cette discordance et de déterminer la nature de ces hématies (fœtales / adultes?)

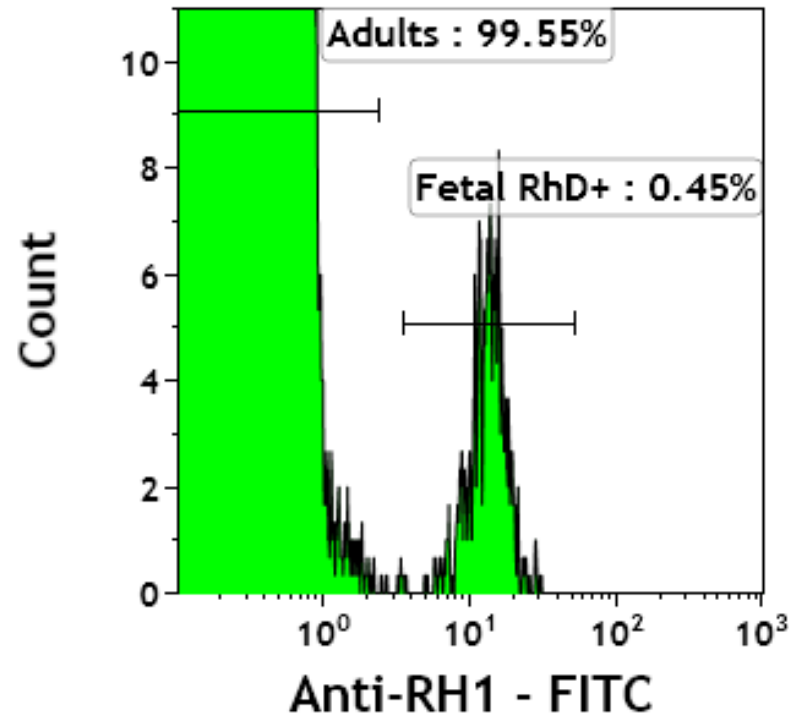


APPORT de LA CMF

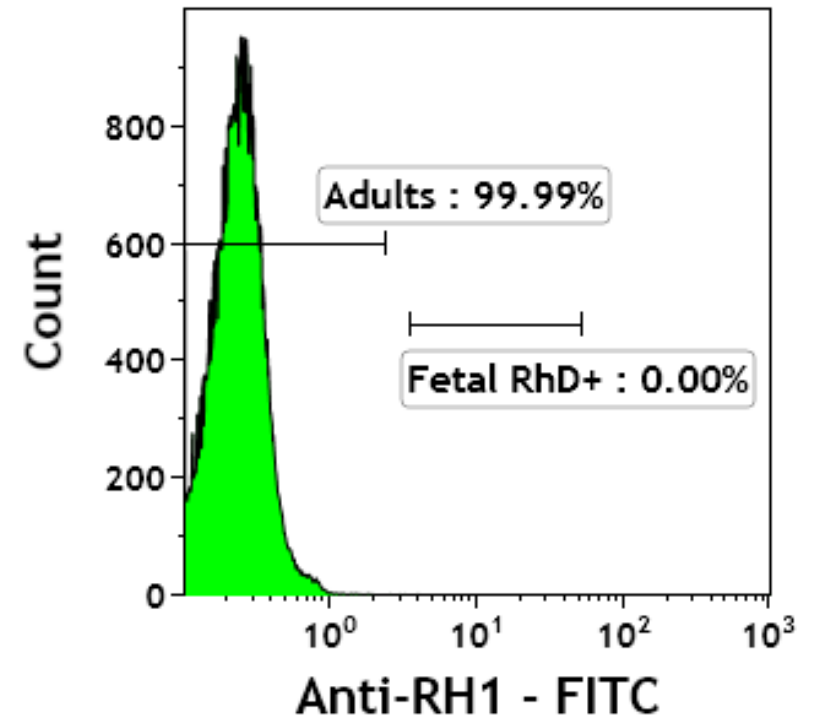
Marquage ANTI-D(RH1)-BRAD3-FITC



Témoin négatif (KH=0HF/ 10000HA)

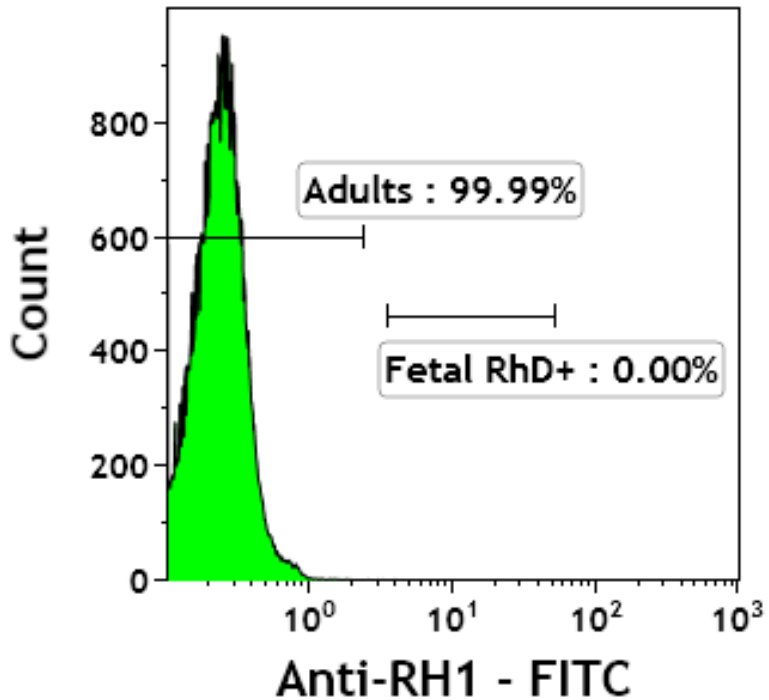


Témoin positif (KH=45HF/10000HA)



Mme SAI

INTERPRETATION



Marquage anti-D(RH1)-BRAD3-FITC négatif

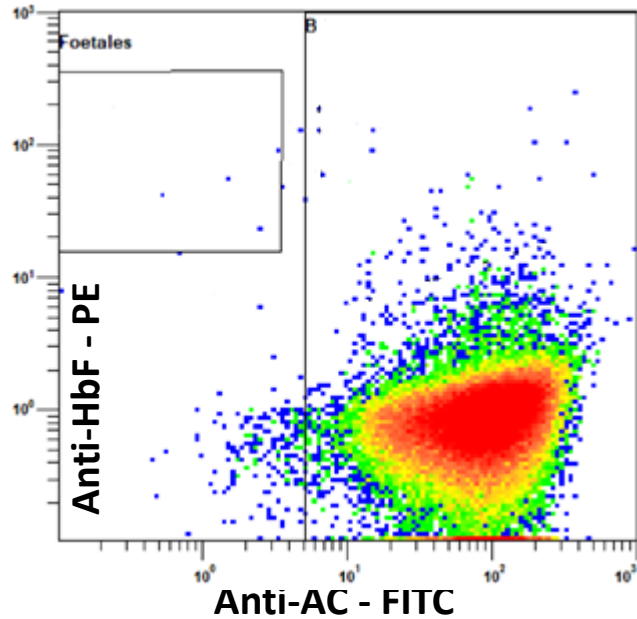
= Absence d'hématies fœtales RH1 positif

➡ Soit : Kleihauer lame positif dû à la présence d'hématies fœtales RH1 négatif non détectées par l'anti-D(RH1)-BRAD3, cohérent avec le résultat du génotypage RHD fœtal, mais discordant avec la clinique.

➡ Soit : Absence d'hématie fœtale et Kleihauer lame faussement positif dû à la présence de Fcells (HbF=6,1%)

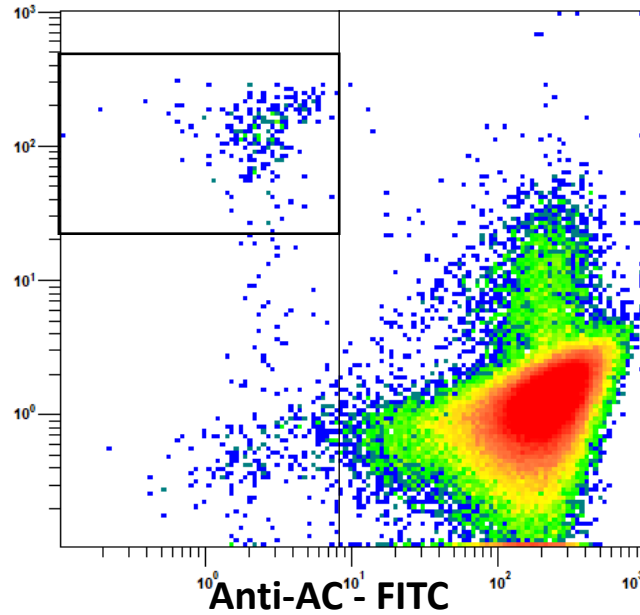
Nécessité d'une 2^{ème} technique complémentaire en CMF
marquage HbF/AC

APPORT de LA CMF Marquage HbF-PE/AC-FITC



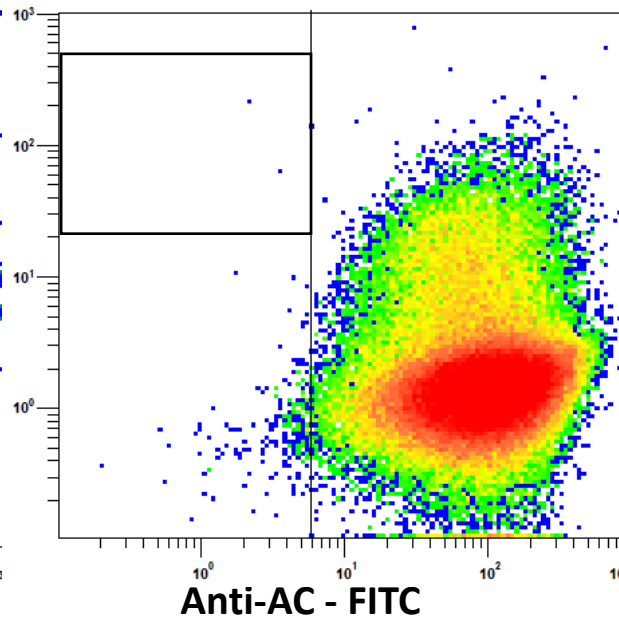
Témoin négatif (KH=0HF/10000HA)

1 seule population
d'hématies adultes AC+HbF-



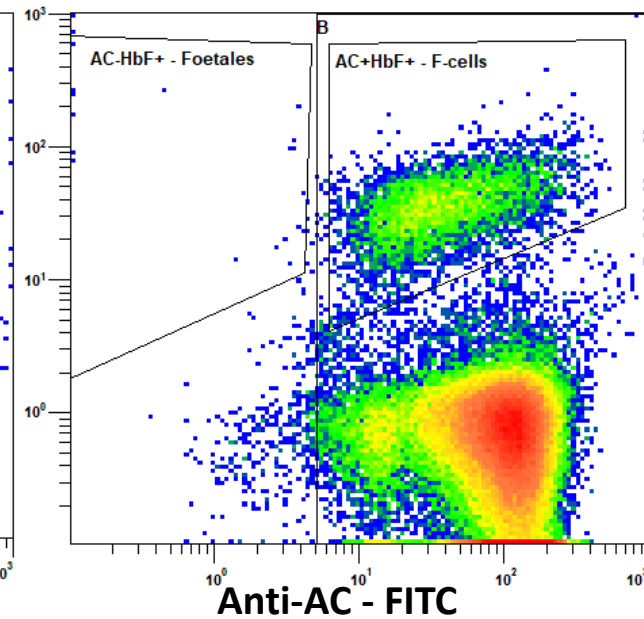
Témoin positif (KH=22HF/10000HA)

Hématies fœtales majoritairement
collées à l'axe des abscisse + qq
hématies fœtales commençant à
acquérir l'AC



*Aspect classique de Kleihauer avec
de très nombreuses cellules
ininterprétables.*

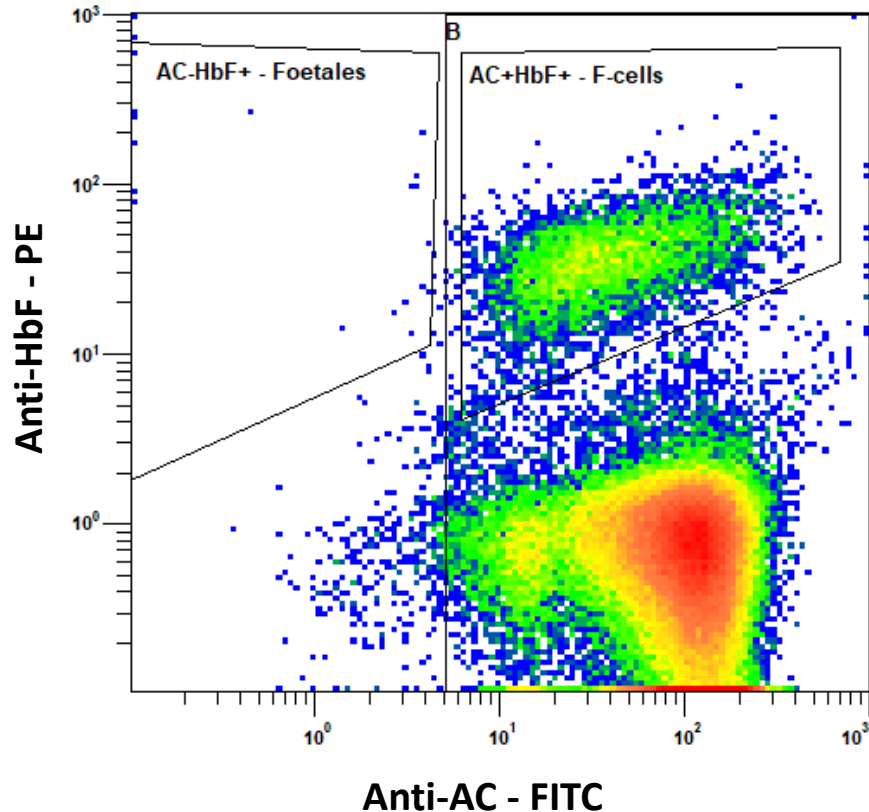
*Hématies adultes AC+HbF- à partir
desquels se détache un continuum
d'hématies adultes contenant +/-
de l'HbF*



Mme SAI

*2 populations distinctes
mais AC+ donc adultes*

INTERPRETATION



Présence de 2 populations distinctes

Une population **AC+HbF-** correspondant aux hématies adultes

Une population **AC+HbF+** correspondant aux hématies adultes contenant de l'HbF ou F-cells

Absence de population **AC-HbF+** correspondant aux hématies foetales – Absence d'hémorragie fœto-maternelle.

Le Kleihauer lame est donc un faux positif dû aux F-cells

Accouchement le 24/3/21 d'un enfant RH1 négatif

QUANTIFICATION des HFM en CMF

Bonne alternative au KH mais peu adaptée à l'urgence

Meilleure répétabilité et reproductibilité que le KH (limite de sensibilité à 5HF/10000HA)

Evite les problèmes d'interprétation (attention au marquage de l'HbF seul)

Marquage anti-D : technique simple et rapide

utilisation limitée à la prophylaxie Rh chez la patiente RH1 négatif et partiel

- ▶ Nombreuses et très nombreuses cellules ininterprétables
- ▶ Passage >24HF/10000HA en anténatal (phénotype RH1 fœtal inconnu)
- ▶ Accouchement de jumeaux avec bébés RhD+/RhD- et passage

Marquage HbF : technique lourde (fixation/perméabilisation)

utilisable pour toutes les indications.

- ▶ Nombreuses et très nombreuses cellules ininterprétables

Remerciements

DMU BioGeM (Pr R. LEVY)

LBM EST PARISIEN (Dr M. VAUBOURDOLLE)

UF de biologie du CNRHP

Techniciens / réceptionnistes / secrétaires / ingénieurs /cadre

Equipe des biologistes : Dr C. TOLY-NDOUR, Dr S. HUGUET-JACQUOT, Dr H. DELABY, Dr F. KHETTAB, Dr N. BOUTARFA, Dr R. MESSINE, Dr J. BEAUD, Dr J. BABINET, Dr R. PETERMANN

LBU Saint-Antoine : techniciens et biologistes

DMU ORYGINE (Pr J-M. JOUANNIC)

UF clinique du CNRHP (Pr J-M. JOUANNIC)

Permanence médicale du CNRHP

Infirmières

Pédiatres : Dr M-G. GUILLEMIN, Dr N. ABED, Dr J. WIRTH

Obstétriciens : Dr P. MAURICE, Dr L. GUILBAUD, Dr F. DHOMBRES, Dr L. FRANCHINARD

SF coordinateur : B. LAFON

Et sans jamais oublier...

Dr Yves BROSSARD

Dr Anne CORTEY

Dr Emeline MAISONNEUVE