

# DETECTION ET QUANTIFICATION DES HEMORRAGIES FOETO-MATERNELLES PAR IMMUNOMARQUAGE ANTI HbF : UNE ALTERNATIVE AU TEST DE KLEIHAUER

Stéphanie Huguet-Jacquot<sup>1</sup>, Marc Larsen<sup>1</sup>, Bruno Carbonne<sup>1</sup>, Anne Cortey<sup>1</sup>, Agnès Mailloux<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre National de Référence en Hémiologie Périnatale, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

**Objectifs:** Le test de Kleihauer (TKI) est la méthode la plus utilisée pour la détection et la quantification des hémorragies foeto-maternelles (HFM). Il est basé sur la résistance à l'éluion acide de l'hémoglobine F (HbF) contenue dans les globules rouges (Figure 1). Mais, cette technique présente de nombreuses difficultés de réalisation et d'interprétation : technique manuelle, subjectivité de l'observateur, mauvaise précision inter-observateurs et difficultés dues à la présence de globules rouges maternels avec une forte teneur en HbF appelés F-cells.

Comme alternative pour la détection des HFM, nous avons mis au point une technique immunocytométrique basée sur le marquage intracytoplasmique de l'HbF à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-HbF marqués à la FITC (anti-HbF-FITC) après fixation et perméabilisation cellulaire. L'analyse des échantillons a été faite sur un cytomètre de flux (CyFlow SL-4 – Partec) (Figure 2).

## Méthode:

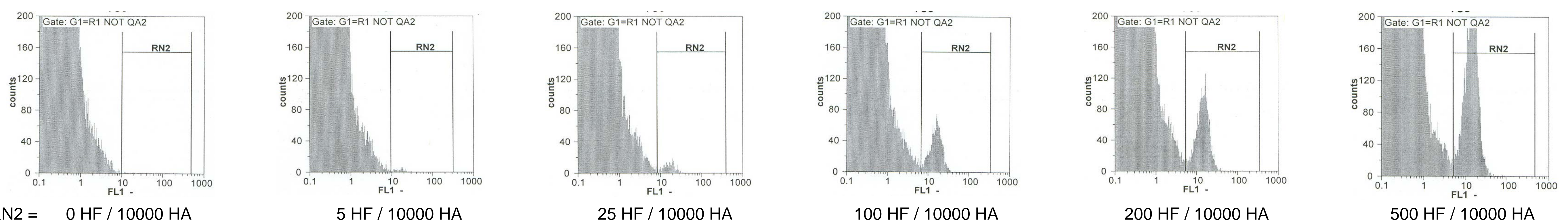
- 10 µl de sang total prélevé sur Citrate ou EDTA dilué au 1/20 dans du PBS.
- + 750 µL 0.05% glutaraldehyde-PBS, incubation pendant 10 min.
- + 1.5 mL de solution de perméabilisation 0.1% Triton-PBS, incubation pendant 10 min. Centrifugation et décantation.
- + 5 µl d'anti-HbF-FITC (Invitrogen), incubation pendant 15 min.
- + 1mL de PBS.
- Analyse sur le CyFlow SL-4.

**1<sup>ère</sup> partie :** Nous avons validé la technique en utilisant différents mélanges artificiels de sang foetal / sang adulte (de 0 hématies foetales (HF)/10000 hématies adultes (HA) à 600 HF/10000 HA). Cinq séries indépendantes ont été réalisées dont 3 analysées 3 fois. Nous avons vérifié les performances analytiques de ce test (répétabilité, reproductibilité) en utilisant le logiciel Prism. Nous avons déterminé la limite de sensibilité de la technique. Nous avons comparé nos résultats avec ceux du TKI et ceux obtenus par une autre technique immunocytométrique utilisant un anticorps monoclonal anti-RhD marqué à la FITC (BRAD3).

**2<sup>ème</sup> partie :** Les performances de ce kit ont été évaluées sur une série de 83 patients : 22 échantillons avec un TKI positif (entre 5 et 538/10000), 12 échantillons avec un TKI entre < 1 et 4/10000, 36 échantillons avec un TKI négatif et 13 échantillons avec des cellules ininterprétables. Les échantillons de patientes rhésus D négatif ont également été analysés avec l'anti-RhD-FITC (BRAD3).

## Résultats:

**1<sup>ère</sup> partie - Mélanges artificiels de sang foetal / sang adulte (0 HF / 10000 HA à 600 HF / 10000 HA) :** Exemples de graphiques



Nous avons remarqué une bonne stabilité de l'intensité du marquage quelque soit le nombre d'HF.

Le coefficient de variation intra-série est proche de 10% pour un TKI entre 5/10000 et 25/10000, proche de 5% entre 50/10000 et 100/10000 et < 2,5% pour des valeurs > 200/10000.

Le coefficient de variation inter-série est proche de 15% pour les valeurs entre 5/10000 et 10/10000 et proche de 10% pour un TKI > 25/10000.

La précision est meilleure pour les résultats de TKI élevés. (Tableau 1)

	0/10000	5/10000	10/10000	25/10000	50/10000	100/10000	200/10000	300/10000	400/10000	500/10000	600/10000
CV Intra-série I	43,30%	17,32%	5,59%	9,73%	7,67%	2,12%	0,97%	1,67%	0,15%	2,50%	0,46%
CV Intra-série II	0,00%	7,53%	18,41%	6,25%	3,22%	3,76%	0,86%	2,49%	1,26%	15,35%	2,64%
CV Intra-série III	21,65%	10,19%	7,07%	7,14%	1,82%	6,11%	2,34%	1,11%	2,38%	0,84%	2,08%
CV Inter-série	54,21%	14,31%	16,54%	6,58%	10,81%	11,16%	7,89%	11,17%	11,65%	6,38%	5,56%

**Tableau 1 :** Coefficients de variation intra-série et coefficients de variation inter-série pour les 5 séries de mélanges artificiels de sang foetal et sang adulte.

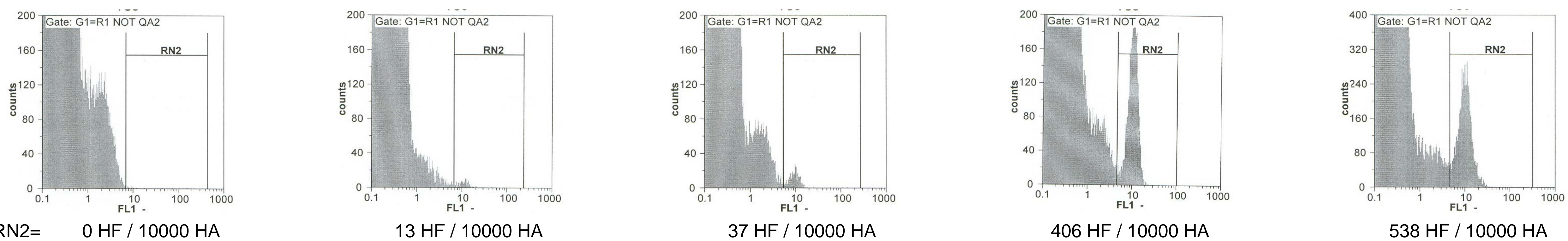
Il n'y a aucune différence significative entre les cinq séries (p<0,05 test t).

La limite de sensibilité de la technique avec un CV de 15% a été trouvée proche de 5 HF / 10000 HA.

Le ratio d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec le TKI (en moyenne, pente 1,04; r<sup>2</sup>=0,96 – Deming) et avec BRAD3 (en moyenne, pente 1,09; r<sup>2</sup>=0,92 – Deming).

## 2<sup>ème</sup> partie - échantillons cliniques :

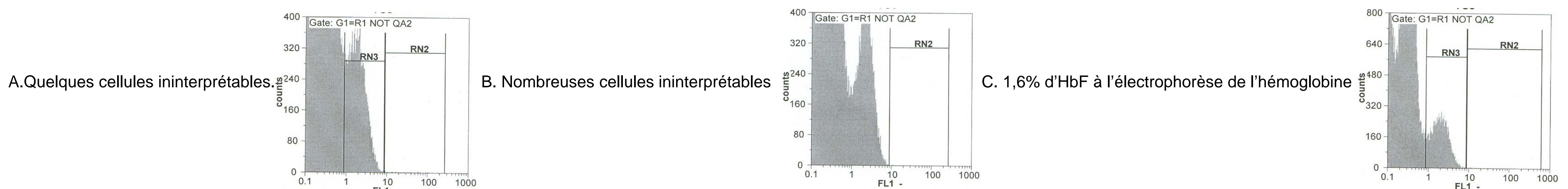
Analyse de 70 échantillons cliniques avec un TKI entre 0 and 538/10000. Exemples de graphiques :



Le pourcentage d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec le TKI pour un TKI > 5 (Pente 1,01 ; r<sup>2</sup>=0,92 - Deming).

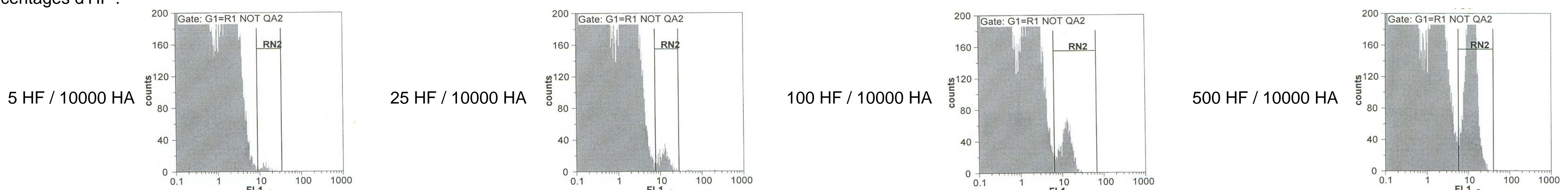
Le pourcentage d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec BRAD3 pour un TKI >5 (Pente 1,16 ; r<sup>2</sup>=0,92 - Deming).

Analyse de 13 échantillons cliniques avec des cellules ininterprétables au TKI. Exemples de graphiques :



Exemples de graphiques permettant de conclure que les cellules ininterprétables sont des F-cells car l'intensité de fluorescence plus faible de ces cellules est stable entre 1 et 10, tandis que les HF se situent au delà de 10.

De plus, afin de savoir si les HF se distinguent des F-cells, nous avons analysé des mélanges artificiels entre l'échantillon C. (1,6% d'HbF) et du sang foetal. On observe 2 pics bien distincts même pour des petits pourcentages d'HF :



## Conclusions:

. Les résultats des mélanges artificiels de sang foetal et de sang adulte montrent une bonne corrélation avec les résultats obtenus par le TKI, même pour les valeurs faibles. Cette tendance est confirmée avec les échantillons de patients.

. Par ailleurs, cette technique permet de conclure sur la nature des cellules ininterprétables car elles se distinguent bien des HF par leur intensité de fluorescence plus faible .

. Au-delà de l'intérêt d'avoir un test automatisé pour la détection des HFM (avantage sur TKI), cette méthode représente une technique rapide de perméabilisation cellulaire (à utiliser en urgence) et sans limitation par le statut RHD des patientes (avantage sur BRAD3).