

**40^{èmes} journées
de
Biologie Praticienne**

**IMMUNO-HEMATOLOGIE CHEZ LA
FEMME ENCEINTE**

**Incompatibilités Foeto-Maternelles
Diagnostic, Suivi, Prévention
Actualités 2005-2006**

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE

DETECTION ET QUANTIFICATION

- **INDICATIONS**

- 1- **Adaptation posologique des Ig anti-D chez la femme RHD négatif enceinte ou accouchée**
- 2- **Diagnostic étiologique d'une anémie fœtale ou néonatale, ou d'une mort fœtale**
- 3- **Dépistage et suivi d'une HFM spontanée ou induite par des gestes obstétricaux (amniocentèse, version par manœuvre externe, ponction sang fœtal), indépendant du groupe rhésus**

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

• 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 des hématies.

• REACTIFS DISPONIBLES POUR LE TEST DE KLEIHAUER

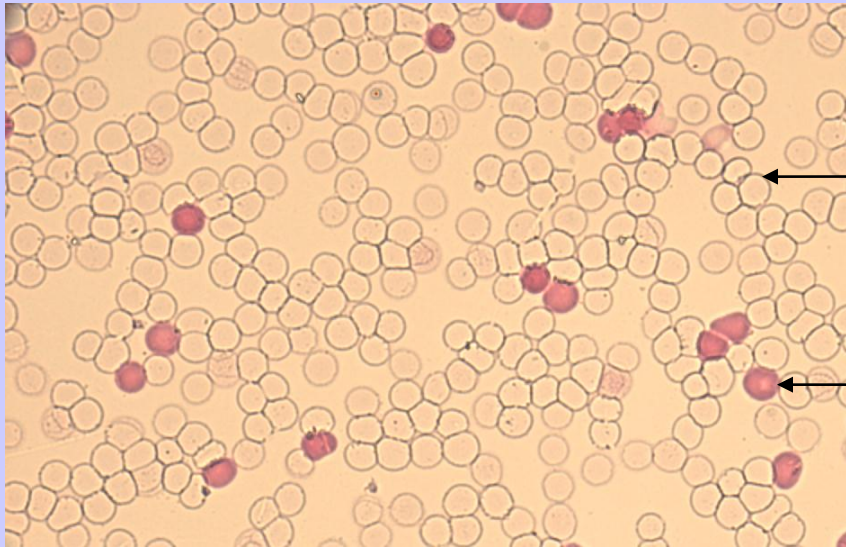
- SureTech Foetal hemoglobin , *Oxytele*

- *Labo Moderne*

- Techniques maisons (exemple : CNRHP)

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- **RESULTAT DU TEST DE KLEIHAUER**



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

Erythrocytes avec Hb fœtale fixant phloxine : rose vif et réfringent

RESULTAT : 500 HF /10 000 HA : soit 250 ml de sang fœtal (gros passage)

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- **INCONVENIENTS DU TEST DE KLEIHAUER (1)**

Technique souvent décriée

- **Technique manuelle, non standardisée, nécessitant un personnel formé et entraîné**
- **Difficulté dans le décompte des cellules (grande variation inter-individuelle)**

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- MISE EN PLACE EXPERIMENTALE D'UN CONTRÔLE DE QUALITE DU TEST DE KLEIHAUER

Simonet et al, 2002

20 laboratoires participants

1 lame colorée (45 HF /10 000 HA)

72 opérateurs

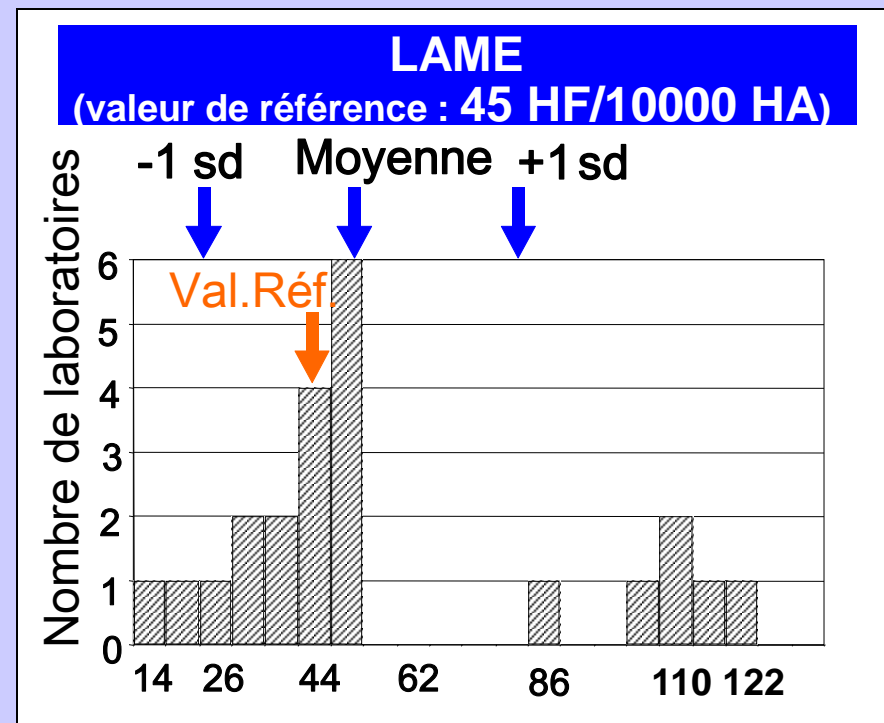
Grande dispersion des résultats :

- Inter-laboratoire 14 → 122

- Inter-opérateur 0 → 140

Difficulté de lecture

Erreur de comptage



HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- **INCONVENIENTS DU TEST DE KLEIHAUER (2)**

Technique souvent décriée

- **Difficultés dans l'interprétation des frottis :**

Problème des hématies maternelles avec un contenu élevé en HbF

***F*cells liés à la grossesse ou hémoglobinopathie**

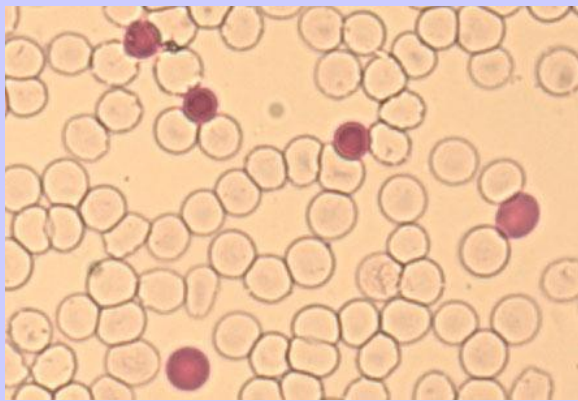
Considérés à tort comme des tests de Kleihauer positifs

⇒ Cellules ininterprétables

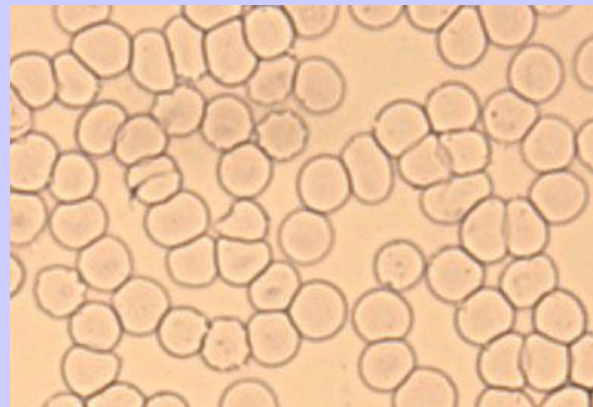
HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- **DIFFICULTES DU KLEIHAUER**

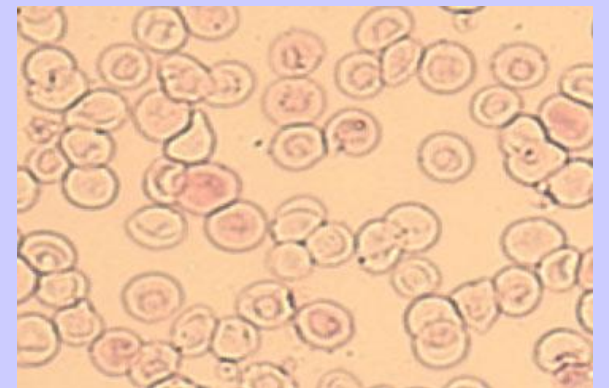
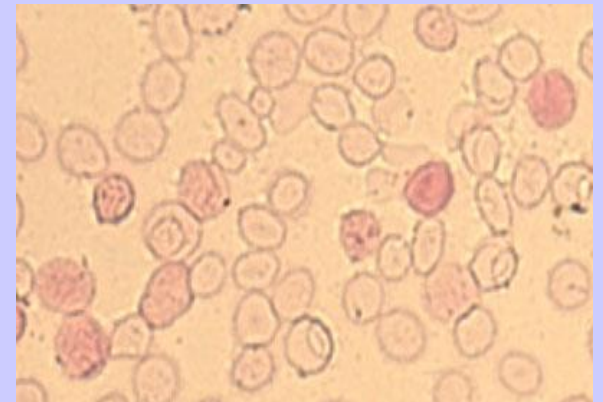
POSITIF



NEGATIF



ININTERPRETABLES




Réaliser un témoin positif et négatif

ININTERPRETABLES

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- FREQUENCE DES RESULTATS ININTERPRETABLES**

Septembre 2005 à Novembre 2006 :
6490 tests de Kleihauer réalisés au CNRHP

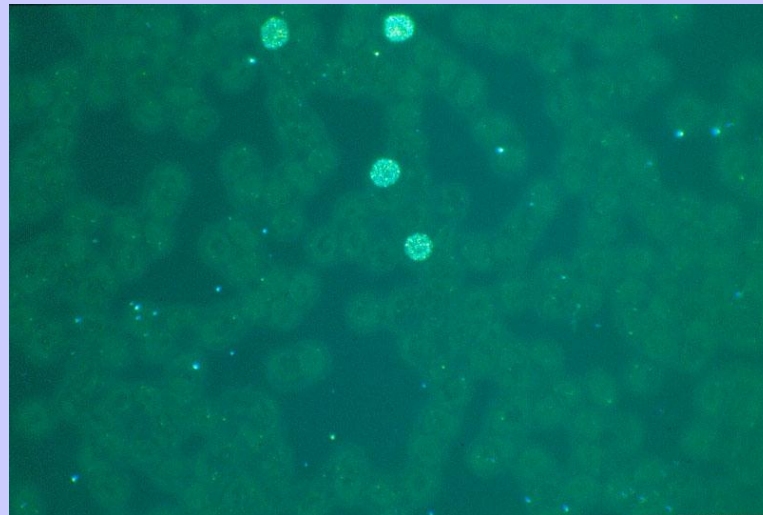
	NOMBRE	FREQUENCE
0 HF /10 000 HA	4899	76 %
< 1 - 273 HF/10 000 HA	1369	21 %
Cellules ininterprétables	222	3 % 

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- **ALTERNATIVE POUR LES KLEIHAUER
ININTERPRETABLES**

Réalisation du test Immuno Gold Silver Staining : IGSS

Détection des globules rouges RHD+, en utilisant un anticorps IgG anti-D et une anti-IgG marquée à l'or colloïdal (GR RHD positif apparaissent brillants en lumière polarisée)



Test long et difficile

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE

DETECTION ET QUANTIFICATION

- **AUTRES TECHNIQUES DE DETECTIONS ET DE QUANTIFICATION DES HFM**
 - **Technique des rosettes (dépistage) → UNIQUEMENT FEMME RHD NEG**
 - **Mesure de la consommation en anti-D : (FMH Screening-test sur gel Diamed) → UNIQUEMENT FEMME RHD NEG**
 - **Techniques de comptage par cytométrie de flux des hématies fœtales immunomarquées :**
 - anti-HbF
 - anti-RHD → **UNIQUEMENT FEMME RHD NEG**
 - anti-HbF et anti-anhydrase carbonique : (Fetal cell Count Kit, distribué par Jacques Boy)

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

- **DETECTION ET QUANTIFICATION DES HFM RHD+ CHEZ LA FEMME RHD NEG PAR IMMUNOCYTOMETRIE**

APPROCHE INTERESSANTE

Utilisation d'un compteur d'hématologie pourvu d'un canal mesurant les réticulocytes par fluorescence

Technique très simple d'Immunomarquage anti-RHD marqué FITC.

Technique validée sur le Cell-Dyn 4000 (*Little et al ,2005, Clin. Lab, Haem.*)

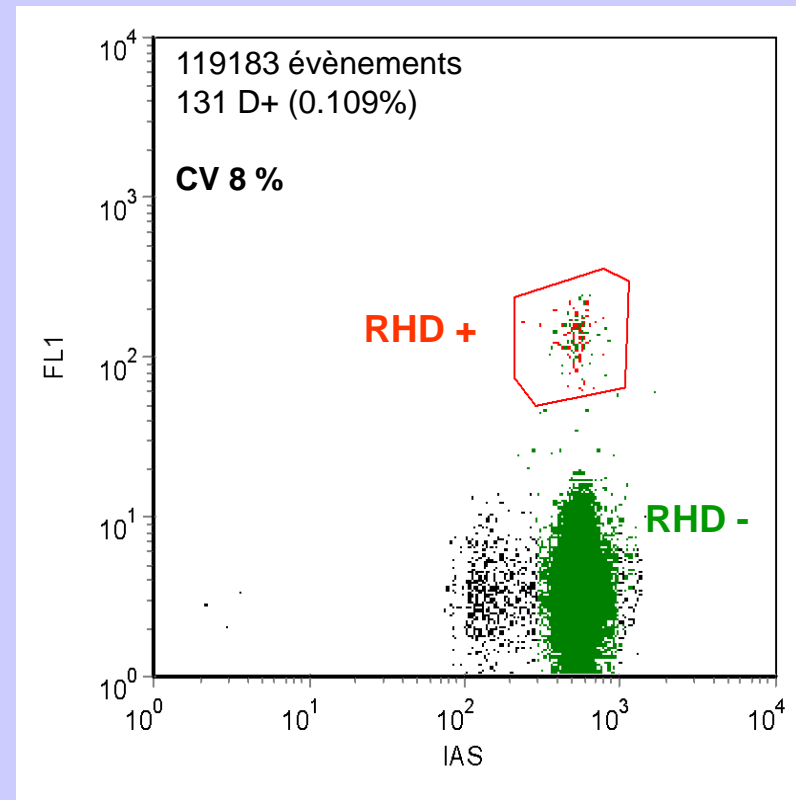
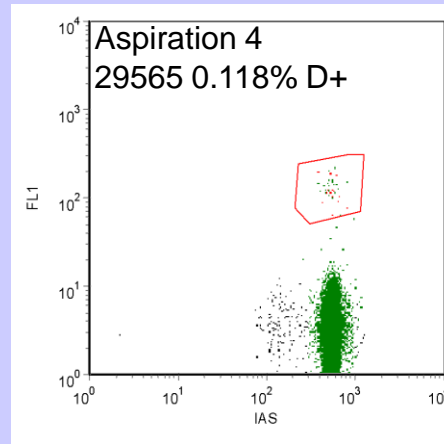
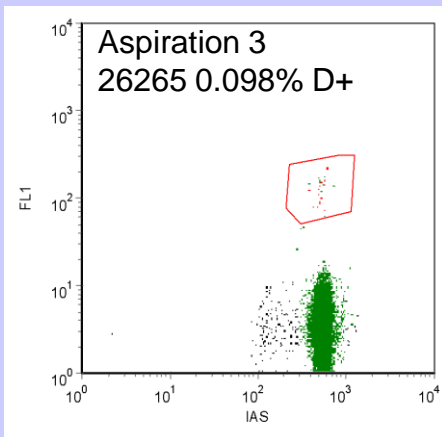
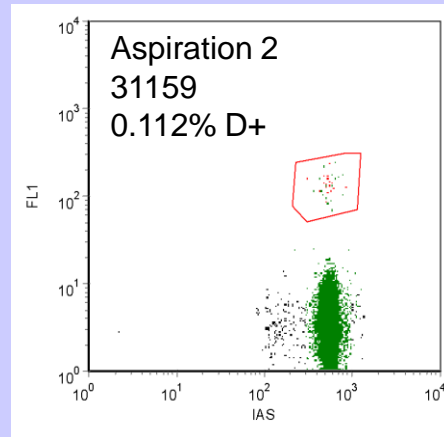
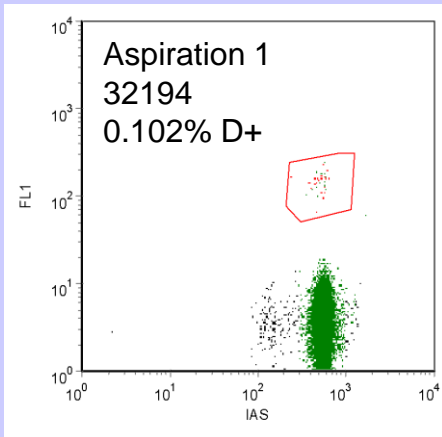
BUT DU TRAVAIL EN COURS

ADAPTATION de la TECHNIQUE sur le CELL-DYN SAPPHIRE ABBOTT

Confirmation de la Validation technique et validation sur des échantillons cliniques positifs

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

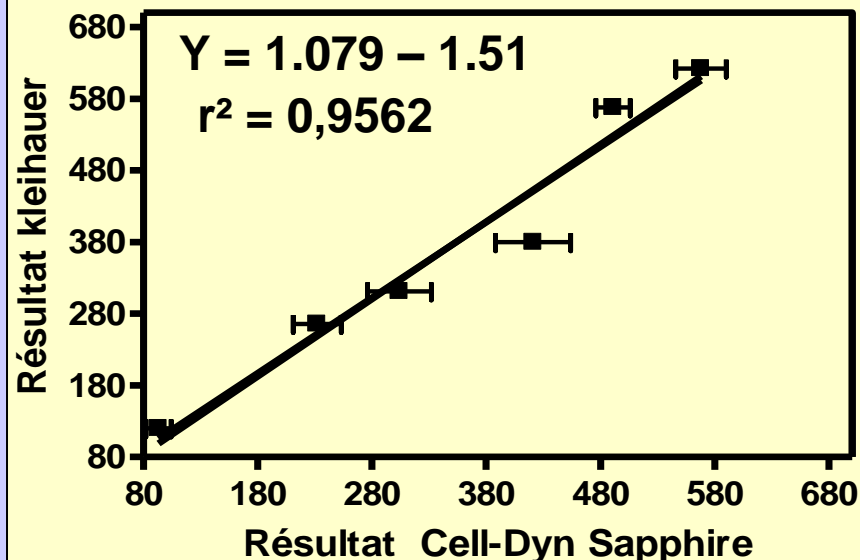
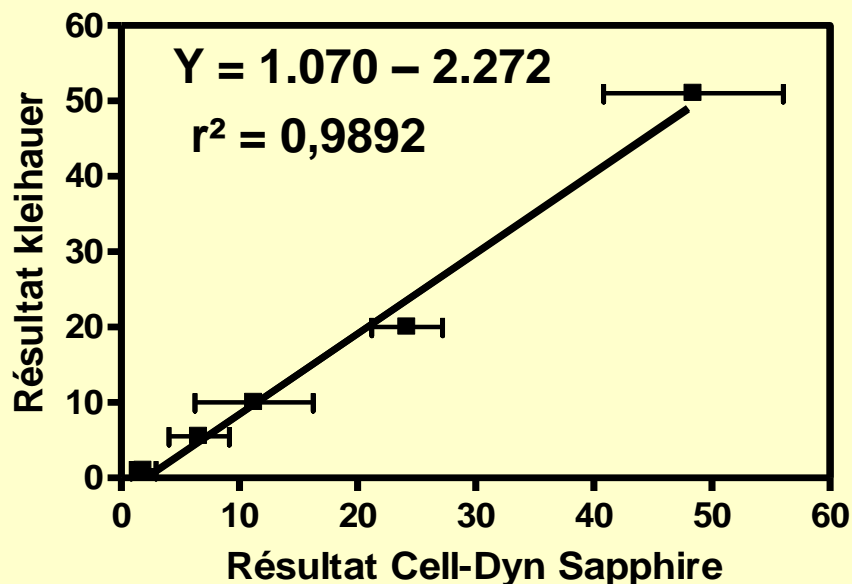
EXEMPLE : Kleihauer à 10 HF/10 000 HA



HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

I- VALIDATION TECHNIQUE (gamme sang RHD- enrichi en hématies fœtales RHD+)

Corrélation Cell-Dyn valeur trouvée / Kleihauer



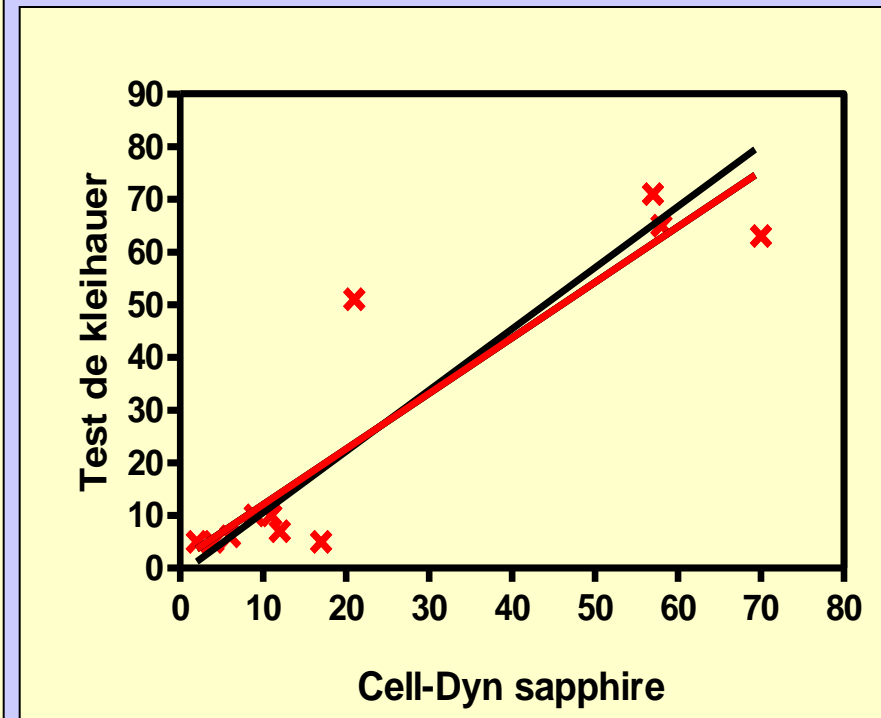
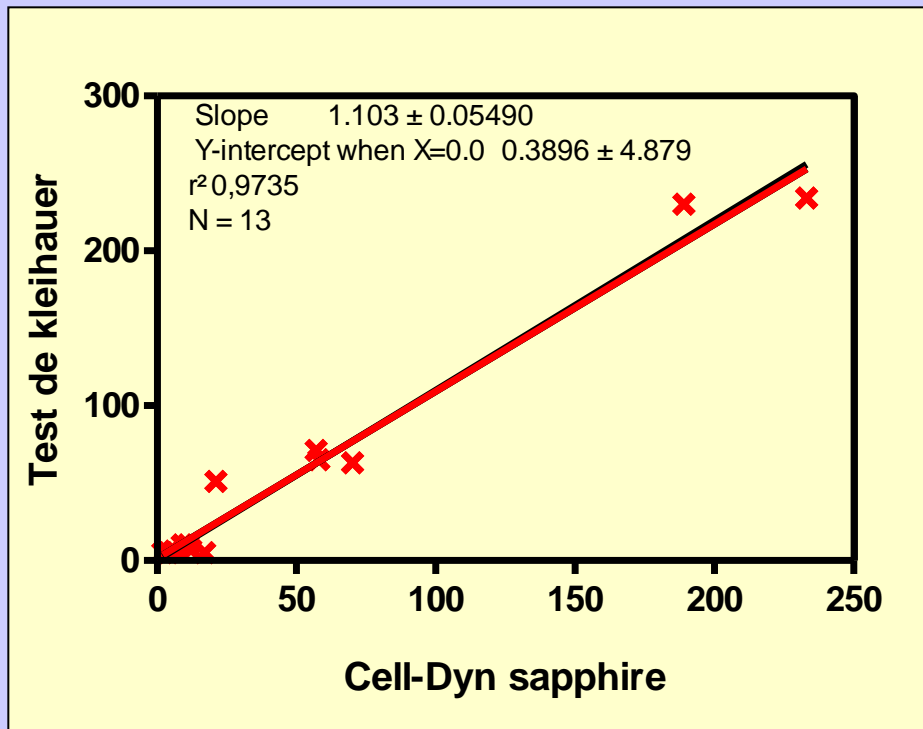
CV = 16 % pour HFM de 24HF/10 000 HA

Brossard , Mailloux CNRHP

Dec.2006

HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE DETECTION ET QUANTIFICATION

II- Corrélation Celldyn Sapphire / Kleihauer sur des échantillons cliniques positifs



HEMORRAGIE FOETOMATERNELLE

DETECTION ET QUANTIFICATION

PERSPECTIVES

Besoin de Contrôles de qualités internes

Nécessité de Contrôles de qualités externes

**Faciliter la formation à la technique de Kleihauer
(réalisation, interprétation et comptage)**

Développer des techniques immunocytométriques