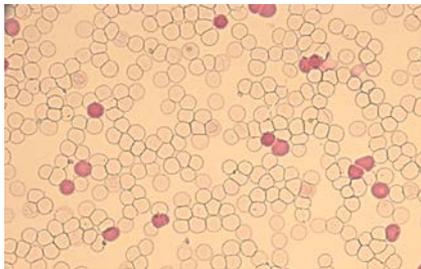




**ADAPTATION SUR LE CELL DYN
SAPPHIRE ABBOTT D'UNE TECHNIQUE
DE COMPTAGE D'HEMATIES FOETALES
RHD POSITIF DANS LE SANG MATERNEL
RHD NEGATIF PAR IMMUNOCYTOMETRIE,
ETUDE COMPARATIVE VERSUS TEST DE
KLEIHAUER**



INTRODUCTION

Une des indications de la quantification d'une HFM :

Adaptation la dose en anti-D chez la femme RHD-:

accouchement

mort foétale

traumatisme abdominal

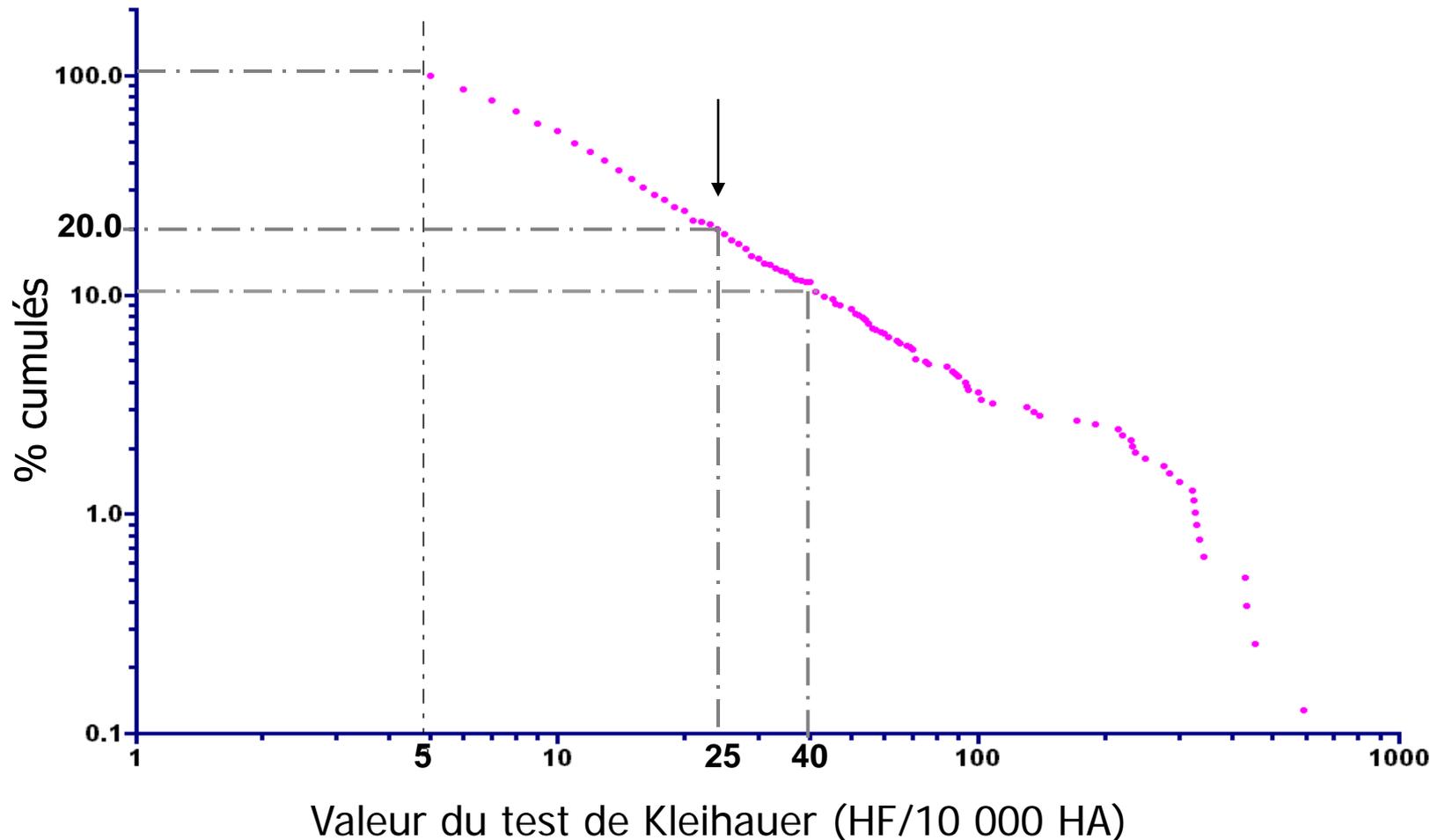
- Pour un efficacité de 100 %, la patiente doit recevoir au moins 20 µg anti-D /ml de sang foetal RHD+**

(exemple : Pour une hémorragie de 50 ml de sang foetal :

1000 µg anti-D sont nécessaires (i.e 50 x 20 µg)

INTRODUCTION

DISTRIBUTION DES HFM > 5/10 000 OBSERVEES CHEZ 3 % DES ACCOUCHEES



INTRODUCTION

- Quantification des HFM par le test de Kleihauer**

Septembre 2005 à Novembre 2006 : 6490 tests réalisés au CNRHP

	<i>Nombre</i>	<i>Fréquence</i>
O HF/ 10 000 HA	4899	76 %
< 1 to 273 HF/10 000 HA	1369	21 %
Cellules ininterprétables*	222	3 %

- Difficultés du test de Kleihauer**

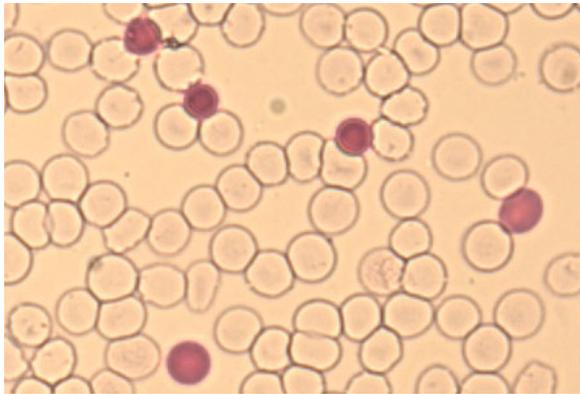
Technique manuelle, non standardisée, nécessitant des techniciens entraînés.

Difficulté de lecture pour différentier les cellules foetales des cellules maternelles avec un contenu important en HbF (faux positifs ou frottis ininterprétables*)

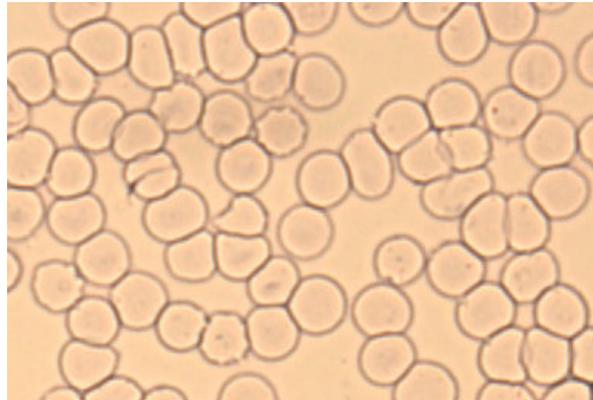
INTRODUCTION

- **DIFFICULTES DU KLEIHAUER**

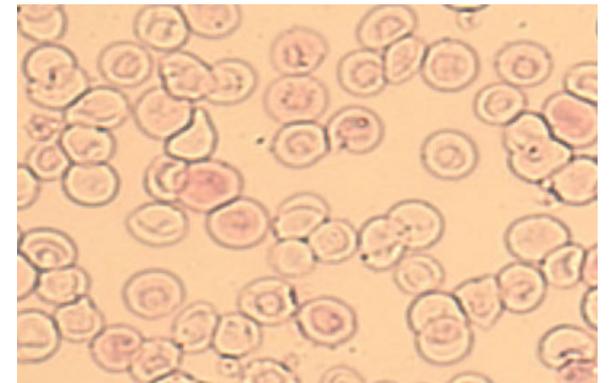
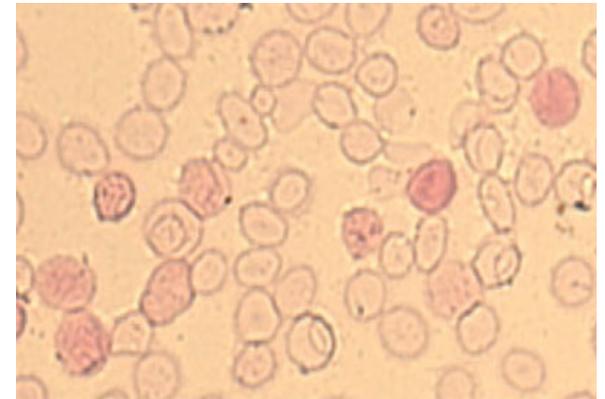
POSITIF



NEGATIF



ININTERPRETABLES



ININTERPRETABLES

BUT DE L'ETUDE

VALIDER UNE ALTERNATIVE SIMPLE POUR QUANTIFIER UNE HFM PAR IMMUNOCYTOMETRIE

- Technique dérivée du Cell-Dyn CD4000 ABBOTT (*Little, 2005*) utilisant un anticorps monoclonal anti-RHD marqué FITC (BRAD3).



- Compteur d'hématologie + Cytofluorimètre 3 couleurs (Laser + banc optique : possibilité d'un marquage 3 couleurs)
- Utilisation du canal de réticulocyte

BUT DE L'ETUDE

- **Corrélation de cette technique adaptée au *Cell Dyn Sapphire* avec le test de Kleihauer avec des échantillons cliniques couvrant toute la gamme d'HFM.**
- **Détermination de la limite inférieure de quantification.**
- **Impact du nombre d'aspirations avec le *Cell Dyn Sapphire***

MATERIEL :

- Analyse comparative de 86 échantillons cliniques de femmes RHD- à l'accouchement (test de Kleihauer : 63 pos, 23 neg)

METHODE :

TEST DE KLEIHAUER

- . lame de sang : fixé à l'alcool (10')
- . Elution acide à 41°C (5')
- . Coloration à la Phloxine (10')
- . Examen microscopique (x25)

CELL-DYN SAPPHIRE

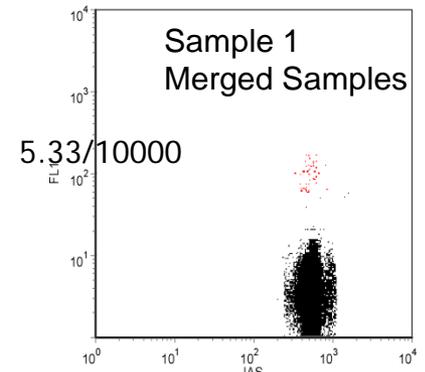
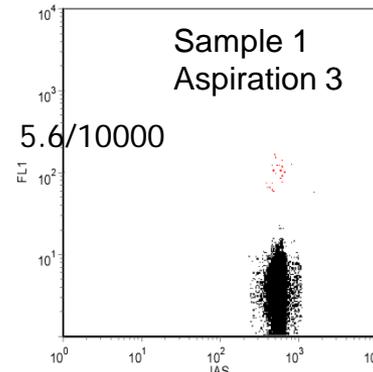
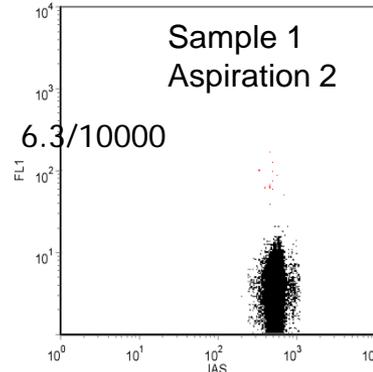
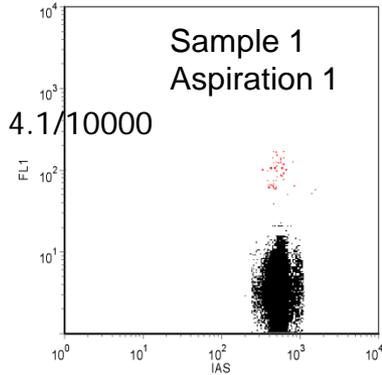
- . Sang total : 50 µl
- . Anti-RHD FITC (BRAD3) : 5 µl
- . Incubation (30' à 37 °C)
- . Addition de 100 µl de diluant sapphire
- . 3 aspirations
- . Utilisation du canal réticulocyte
- . Collection des données
- . Analyse des données : FCS Express

RESULTAT

GRAPHIQUES CELL DYN SAPPHIRE

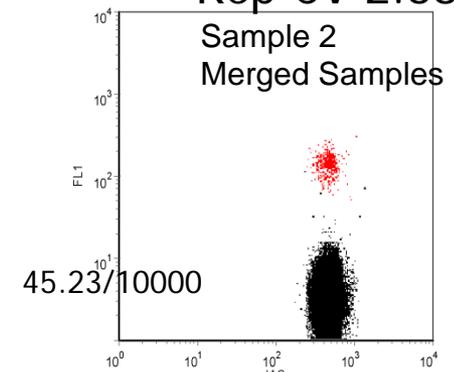
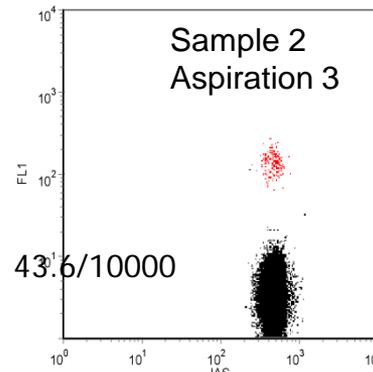
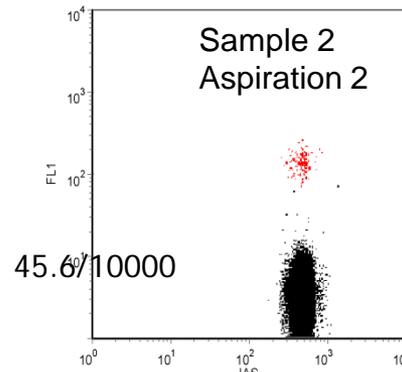
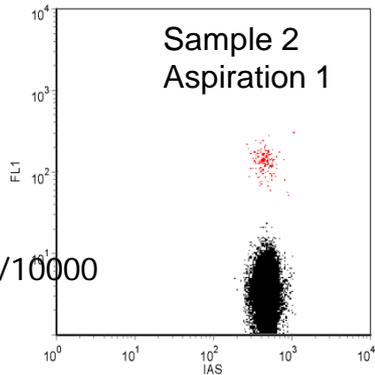
Echantillon 1: 3 HF/10 000 HA

Rep CV 17 %



Echantillon 2: 36 HF/10 000 HA

Rep CV 2.68%

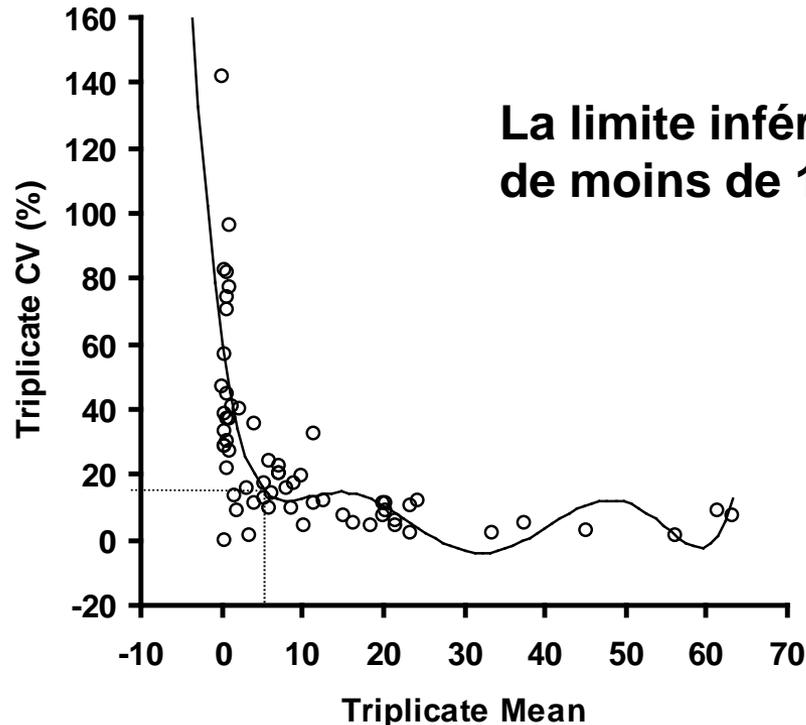


Images

Après analyse par FCS Express

RESULTAT

LIMITE INFÉRIEURE DE QUANTIFICATION



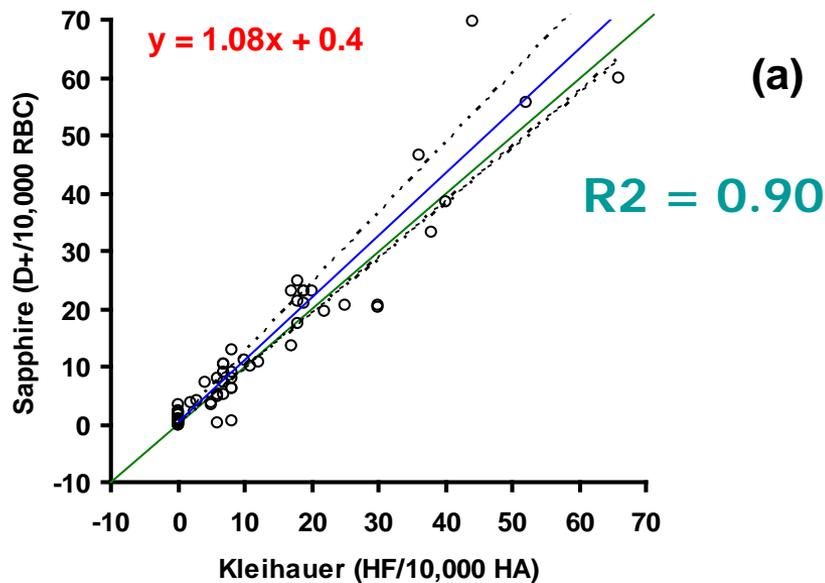
La limite inférieure de quantification pour un CV de moins de 15% a été trouvée à **5 HF/10 000 HA**

Régression polynomiale déterminant la relation entre la moyenne des triplicates et des CV.

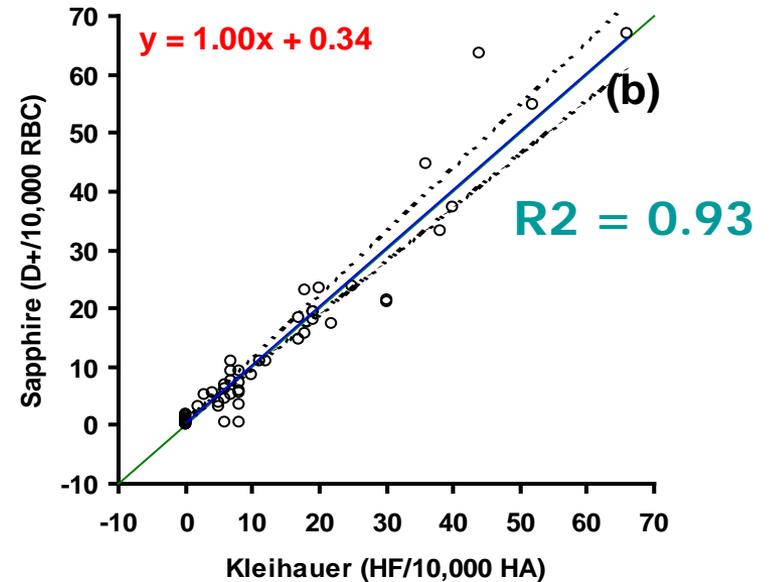
Analyse de 58 échantillons avec un test de Kleihauer entre 0 et 66 HF/10000 HA

RESULTAT CORRELATION

Analyse de 58 échantillons avec un test de Kleihauer entre **0 et 66 HF/10 000 HA**



(a): simple aspiration
avec le **Cell Dyn Sapphire**

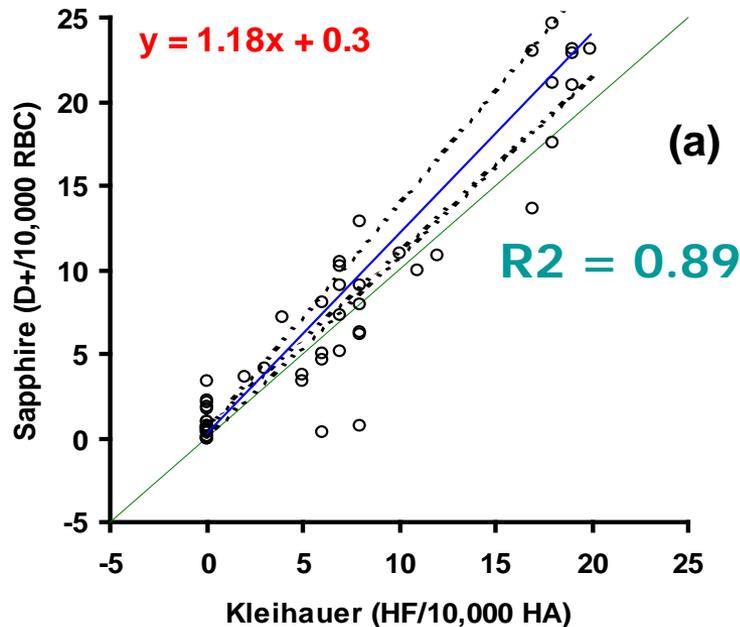


(b): combinaison des 3 aspirations
avec le **Cell Dyn Sapphire**

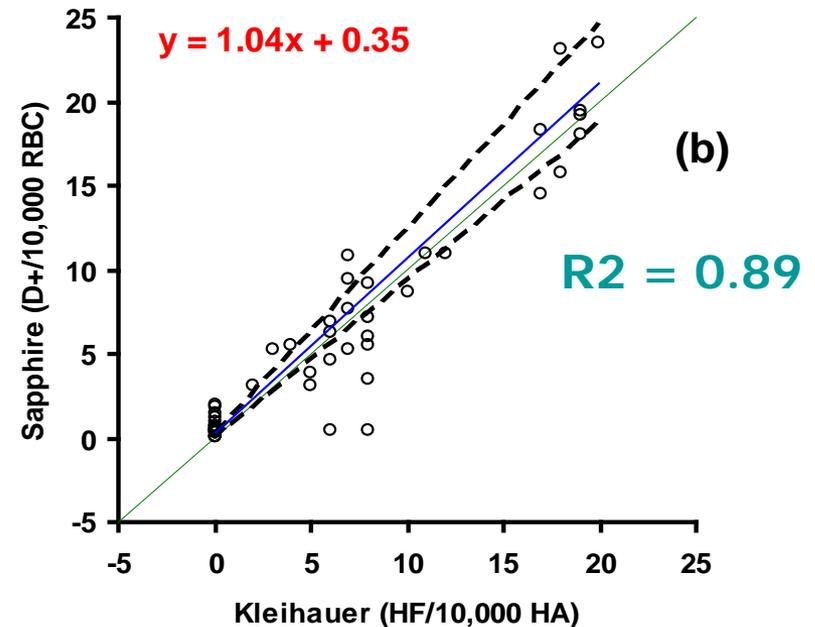
Comparaison Test de Kleihauer et Cell-Dyn Sapphire Analyse de Passing & Bablok

RESULTAT CORRELATION

Analyse de 48 échantillons avec un test de Kleihauer entre **0 et 20 HF/10 000 HA**.



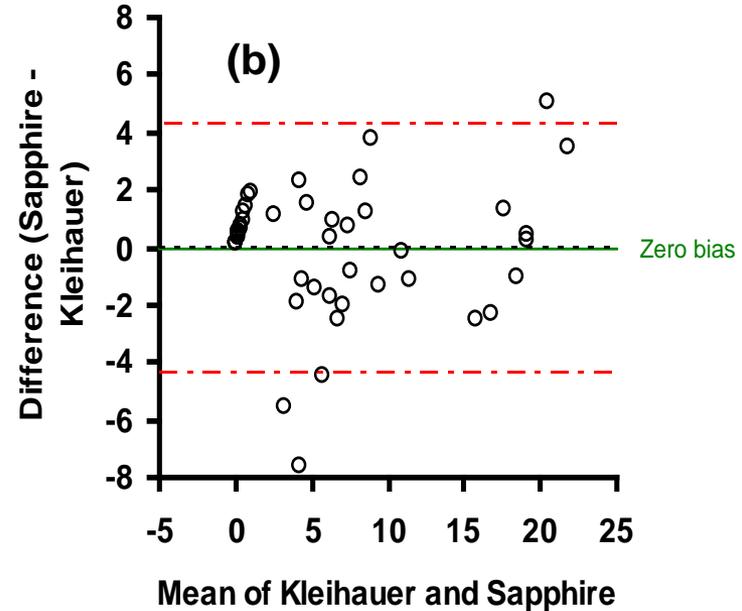
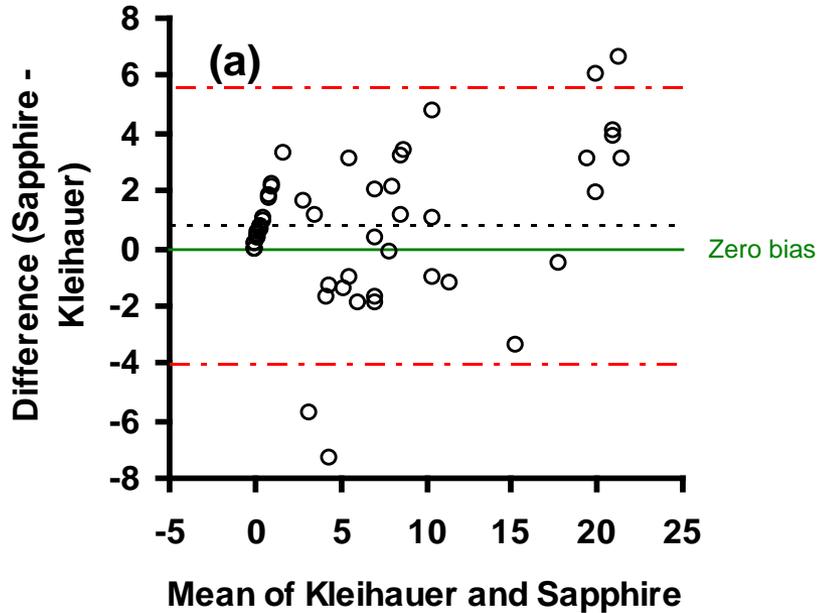
(a): simple aspiration
avec le **Cell Dyn Sapphire**



(b): combinaison des 3 aspirations
avec le **Cell Dyn Sapphire**

Comparaison Test de Kleihauer et Cell-Dyn Sapphire
Analyse de Passing & Bablok

RESULTAT



Analyse d'Altman-Bland (analyse des biais entre le Kleihauer et le *Cell Dyn Sapphire*) pour 48 échantillons avec un test de Kleihauer compris entre 0 and 20 HF/10,000 HA.

(a): analyse d'une simple aspiration avec le *Cell-Dyn Sapphire*. Le biais moyen pour le *Cell Dyn Sapphire* est **+0.76**.

(b): analyse de la combinaison des 3 aspirations avec le *Cell-Dyn Sapphire*. Le Biais moyen pour le *Cell Dyn Sapphire* est **+0.00**.

DISCUSSION

- **RESULTATS sont TRES SATISFAISANTS :**
 - Très bonne corrélation entre le *Cell Dyn Sapphire* et le test de Kleihauer .
 - Sensibilité acceptable: LLQ : 5/10 000
- **Une PRECAUTION:** L'analyse du *Cell Dyn Sapphire* doit inclure les données de 3 aspirations pour les HFM < 10 HF/10 000 HA
- **AVANTAGES DU CELL-DYN SAPPHIRE :**
 - Plus facile, plus rapide, meilleur répétabilité et meilleur reproductibilité que le test de KLEIHAUER pour des laboratoires ne faisant pas ce test manuel quotidiennement en routine. Mieux adapté à l'urgence.
 - Solution pour les résultats ininterprétables
- **INCONVENIENTS :**
 - Indication limitée à l'immunoprophylaxie RHD. Pas utilisable pour les HFM chez toutes les femmes enceintes.
 - Logiciel non intégré dans le *Cell Dyn Sapphire* : nécessité d'un transfert de données
 - ABSENCE de controles de qualité

CONCLUSION



 **Abbott**
Hematology

QUANTIFIER UNE HFM AVEC LE *CELL DYN SAPPHIRE*

- **Technique simple pour des laboratoires d'hématologie ou polyvalent non entraînés à la réalisation du test de Kleihauer pour la quantification d'une HFM dans l'immunoprophylaxie RHD**
- **Spécificité, sensibilité et précision de cette technique en font une très bonne alternative**
- **Quantification d'une HFM possible en quelques minutes à n'importe quel moment pour tout laboratoire possédant un *Cell Dyn Sapphire* fonctionnant 24h/24**