

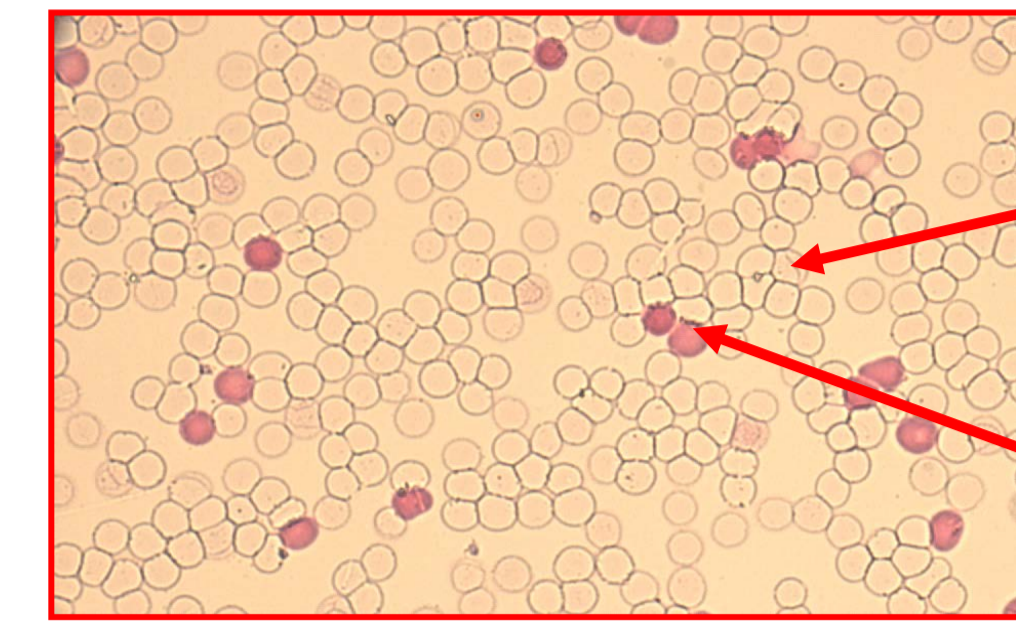
Evaluation du kit FMH Rapid Screen d'Immucor® pour la détection d'une hémorragie fœto-maternelle

Agathe Maillon¹, Agnès Mailloux¹, Cécile Toly-Ndour¹, Anne Cortey², Stéphanie Huguet-Jacquot¹

¹ UF Biologique du Centre National de Référence en Hémiobiologie Périnatale (CNRHP)
Pôle Biologie Médicale et Pathologie – Hôpital St Antoine - GH HUEP - APHP - Paris

² UF Clinique du Centre National de Référence en Hémiobiologie Périnatale (CNRHP) - service de médecine fœtale
Pôle Périnatalité – Hôpital Trousseau - GH HUEP - APHP - Paris

Objectifs: L'adaptation posologique de la prophylaxie Rhésus du post-partum est basée sur la quantification d'une hémorragie fœto-maternelle (HFM) par le test de Kleihauer (TKH) Figure 1, technique souvent décriée. Afin d'éviter le recours systématique à ce test quantitatif, nous avons évalué le kit FMH Rapid Screen d'Immucor®, basé sur la détection des hématies RH :1 dans le sang maternel RH : -1 par la technique des rosettes immunes. Selon le fabricant, ce test permettrait de détecter une HFM correspondant à un TKH ≥ 60 hématies fœtales (HF)/10000 hématies adultes (HA) couverte par une dose de 300 μ g d'IgRh (respect des recommandations de l'American Association of Blood Banks AABB pour la prévention rhésus du postpartum). Le but de l'étude est d'évaluer si ce kit est compatible avec les pratiques et les recommandations françaises du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) préconisant l'injection en post-partum d'une dose de 200 μ g qui couvre une HFM allant jusqu'à 24HF/10000HA.



HA ayant perdu leur hémoglobine (Hb) = formes sphériques fantomatiques, incolores.
HF ayant conservé leur Hb qui a fixé la phloxine : rose vif et réfringentes

Figure 1 : Test de Kleihauer (cas d'une HFM massive)

Méthode:

FMH Rapid Screen :

Figure 2

- 1 1 goutte de suspension à 2-4% de sang total maternel.
+ 1 goutte de réactif anti-RH:1 (IgM).
- 2 Incubation pendant 5 min à température ambiante,
- 3 4 lavages avec du PBS. Centrifuger et décanter
+ 1 goutte d'hématies indicatrices (faible suspension d'hématies RH:1) .
- 4 Centrifuger (15s à 3400rpm),
- 5 Remettre les cellules en suspension
- 6 Lecture au microscope entre lame et lamelle, objectif x100, de 5 champs

Interprétation des résultats : test positif si ≥ 5 agglutinats d'hématies sur 5 champs,
test négatif si ≤ 4 agglutinats sur 5 champs

Figure 3

L'évaluation du kit s'est faite en plusieurs phases :

1ère Phase : Recherche d'une relation entre le nombre d'agglutinats observés et le résultat du TKH permettant ainsi d'utiliser ce kit avec les recommandations française en diminuant éventuellement la limite de positivité du test (diminution du nombre d'agglutinats). Pour cela nous avons utilisé une gamme de mélanges artificiels calibrés de sang fœtal / sang adulte (N=237, 7 points de gamme, de 0 hématies fœtales (HF)/10000 hématies adultes (HA) à 400 HF/10000 HA). Plusieurs séries indépendantes ont été réalisées afin de faire des tests de répétabilité (3 séries) et de reproductibilité (4 séries). La quantité d'hématies fœtales de chaque suspension a également été mesurée par un TKH et par cytométrie en flux (Cell-Dyn Sapphire, Abbott Diagnostics) (technique immunocytométrique basée sur le marquage de l'antigène RH1 à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-RH1 marqués à la FITC). Détermination de la sensibilité et de la spécificité du test.

2ème phase : Evaluation du nombre minimum d'hématies fœtales pour 10000 hématies adultes détectées à partir de 5 agglutinats sur 5 champs grâce à différents mélanges calibrés artificiels de sang fœtal / sang adulte (10 points de gamme de 0 HF/10000 HA à 25 HF/10000 HA). Détermination de la sensibilité et de la spécificité du test selon ces nouveaux critères.

3ème phase : Evaluation de la performance du kit sur 20 patients ayant un TKH ≤ 0 HF/10000HA, sur 35 patientes avec un TKH >1 HF/10000HA (1 à 169HF/10000HA). Et vérification de l'impact d'un affaiblissement du phénotype RH1 ou d'un variant RH1 sur les résultats du kit.

Résultats:

1ère phase - Mélanges artificiels : Utilisation de 2 gammes de mélanges artificiels calibrés de 0 à 400HF/10000HA

Test positif : ≥ 5 agglutinats d'hématies sur 5 champs, correspondant à un TKH > 60 HF/10000HA

TKH = 0HF/10000HA	CV intra-série	TKH = 60HF/10000HA	CV intra-série	TKH = 100HF/10000HA	CV intra-série	TKH = 400HF/10000HA	CV intra-série
	150% N=9		20% N=9		24% N=9		18% N=9
	m=0,33		m=59		m=93		m=88
	CV inter-série		CV inter-série		CV inter-série		CV inter-série
	172% N=4		50% N=4		38% N=4		70% N=4
	m=0,71 (m moyenne)		m=55		m=89		m=92

Pour chaque point de gamme hors 0HF/10000HA, les CV intra-série vont de 18% à 32% et les CV inter-série vont de 38% à 70%. Etant donnée les CV importants, il est très difficile d'établir une corrélation entre le nombre d'agglutinats et le résultat du TKH. Ce test n'est pas un test quantitatif. Cependant on note que le seuil de positivité annoncé comme ≥ 5 agglutinats d'hématies sur 5 champs est atteint bien en deçà des 60HF/10000HA.

Evaluation de la **sensibilité** et de la **spécificité** du test selon les critères de positivité annoncés par le fabricant : 5 agglutinats d'hématies sur 5 champs, correspondant à un TKH > 60 HF/10000HA

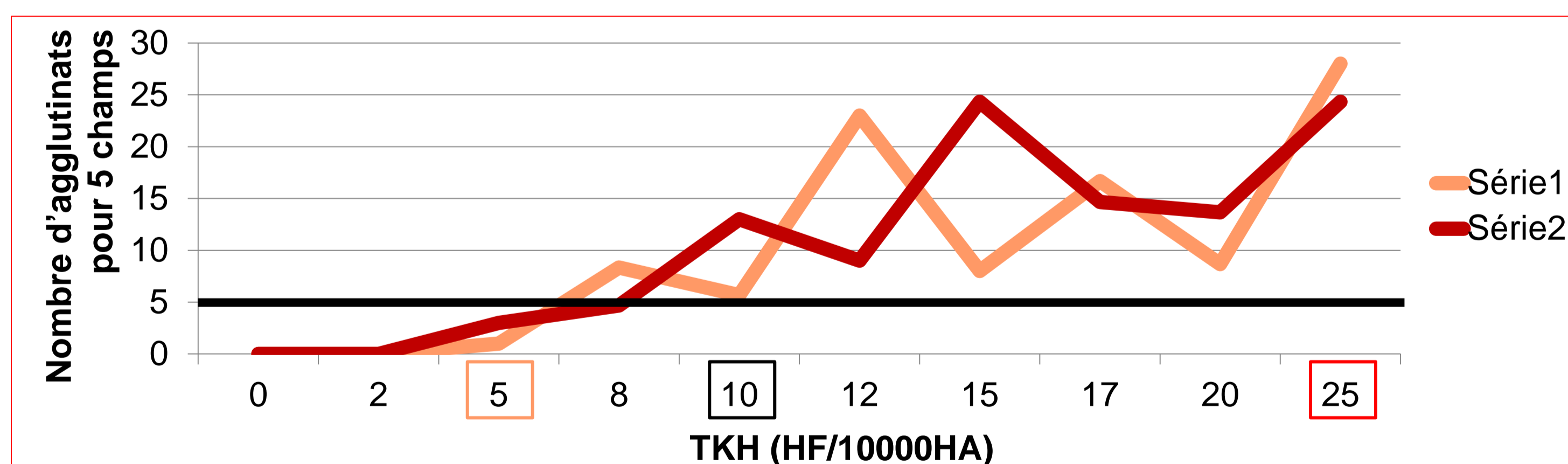
		Test de Kleihauer (HF/10000HA)	
		>60	<60
FMH RapidScreen	Positif	101	78
	Négatif	1*	57

Sensibilité = 99% Spécificité = 42%

Test positif pour des valeurs inférieures à 60 HF/10000HA

* TKH à 70HF/10000HA trouvé positif après contrôles (probable erreur de lecture)

2ème phase - Mélanges artificiels : Evaluation du nombre minimum d'hématies fœtales pour 10000 hématies adultes détectées à partir de 5 agglutinats sur 5 champs, Utilisation de 2 gammes de mélanges artificiels calibrés de 0 à 25HF/10000HA :



- 5 agglutinats sur 5 champs détectés à partir de 10HF/10000HA
- Limite de détection des agglutinats d'hématies : 5 HF/10000HA
- FMH Rapid Screen bien positif pour un TKH=25HF/10000HA (seuil à partir duquel une adaptation posologique des IgRh est nécessaire selon les recommandations françaises).

Evaluation de la **sensibilité** et de la **spécificité** du test selon ces nouveaux critères appliqués aux 237 échantillons de la partie 1.

		Test de Kleihauer (HF/10000HA)	
		>10	<10
FMH RapidScreen	Positif	180	0
	Négatif	3*	54

Sensibilité = 98 % Spécificité = 100%

* TKH à 12HF/10000HA recontrôlés positifs

3ème phase - échantillons cliniques :

- 20 patientes avec TKH=0HF/10000HA : FMH Rapid Screen négatifs pour tous avec un nombre d'agglutinats < 5 (maximum 2 agglutinats sur 5 champs)
- Analyse de 35 échantillons cliniques de patientes avec un TKH ≥ 1 HF/10000HA : Tous les TKH ≥ 10 HF/10000HA (9 patientes) sont positifs avec le kit FMH Rapid Screen
- Il semble comme indiqué par le fabricant, que de faux négatifs peuvent être observés si les cellules fœtales sont de phénotype RH1 affaibli ou partiel (1 mélange artificiel à partir d'une patiente D partiel de type DAR)

Conclusion:

- Le FMH Rapid Screen est un test simple, rapide et sensible.
- C'est un test de dépistage qualitatif qui a toute sa place en 1ère intention chez la patiente RH:-1 à l'accouchement. Tout résultat positif doit obligatoirement faire l'objet en seconde intention d'une quantification des hématies fœtales par un TKH ou un test en cytométrie en flux.
- En effet, étant donnée que le seuil de positivité annoncée par le fabricant (5 agglutinats sur 5 champs) permet de détecter une HFM d'au moins 10HF/10000HA soit 5mL de sang fœtal, ce kit est tout à fait compatible avec les pratiques et les recommandations française pour lesquelles une adaptation posologique de la prophylaxie rhésus à l'accouchement est nécessaire à partir de 25HF/10000HA.