

Optimisation du bilan biologique de prévention Rh

Dr Stéphanie HUGUET-JACQUOT
Service d'hémobiologie fœtale et périnatale

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale
LBM des HU de l'Est Parisien – DMU BioGeMH
Hôpital Saint-Antoine – AP-HP Sorbonne Université – Paris



4^{ème} Journée « Yves Brossard »
d'hémobiologie fœtale et néonatale
Vendredi 24 janvier 2025

PROPHYLAXIE RHESUS

Rôle de l'immunoprophylaxie : injection d'IgRh visant à neutraliser les globules rouges fœtaux RH1 positif circulant chez la mère.

Modalités

- **Prévention ciblée** au cours de la grossesse, uniquement dans les situations à risque d'hémorragie fœto-maternelle.
- **Immunoprophylaxie systématique de la 28ème semaine de grossesse**, couvrir les hémorragies fœto-maternelles du 3ème trimestre parfaitement inapparentes
- **Prévention du post-partum** dans les 72 heures de l'accouchement.

PRODUIT EN France RHOPHYLAC® (CSL Behring)

2 dosages :

200 µg (1000 UI) utilisable en IV et en IM pour la prophylaxie ciblée

300 µg - AMM pour la prophylaxie systématique du 3ème trimestre

Optimisation de ce traitement -> Recours à des examens biologiques associés nécessaires

OUTILS BIOLOGIQUES NECESSAIRES POUR LA PREVENTION

Injection d'IgG anti-RH1 chez la femme enceinte RH1 négatif

	ANTENATALE CIBLEE	ANTENATALE SYSTEMATIQUE	POSTNATALE
TEST DE KLEIHAUER	OUI APRES 15SA	NON	OUI
RAI AVANT INJECTION	OUI	OUI	OUI
GROUPAGE ENFANT	PAS POSSIBLE GENOTYPAGE	PAS POSSIBLE GENOTYPAGE	OUI

ADAPTATION DE POSOLOGIE DES IGRH

TEST DE KLEIHAUER

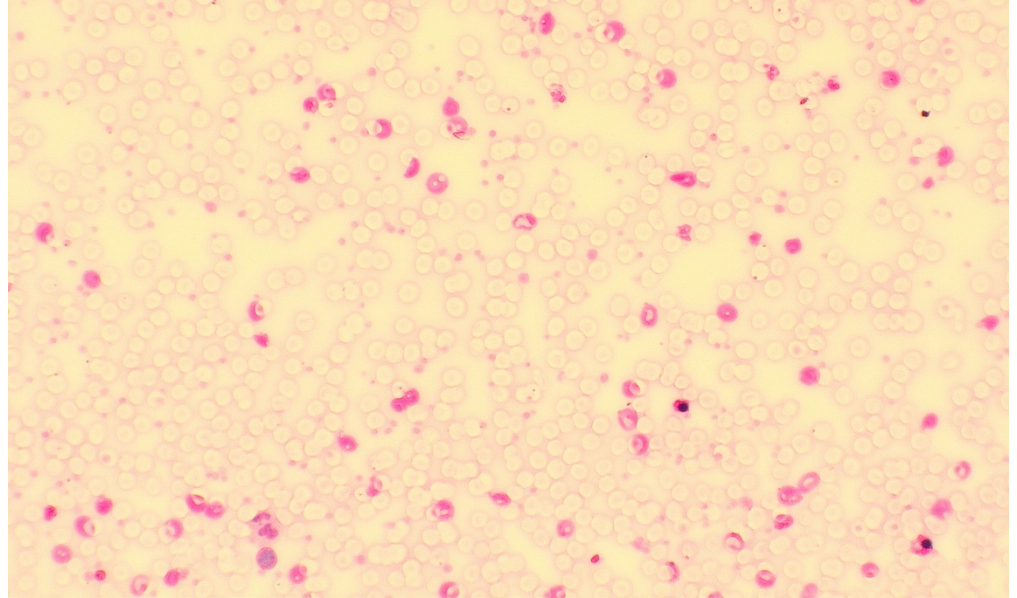
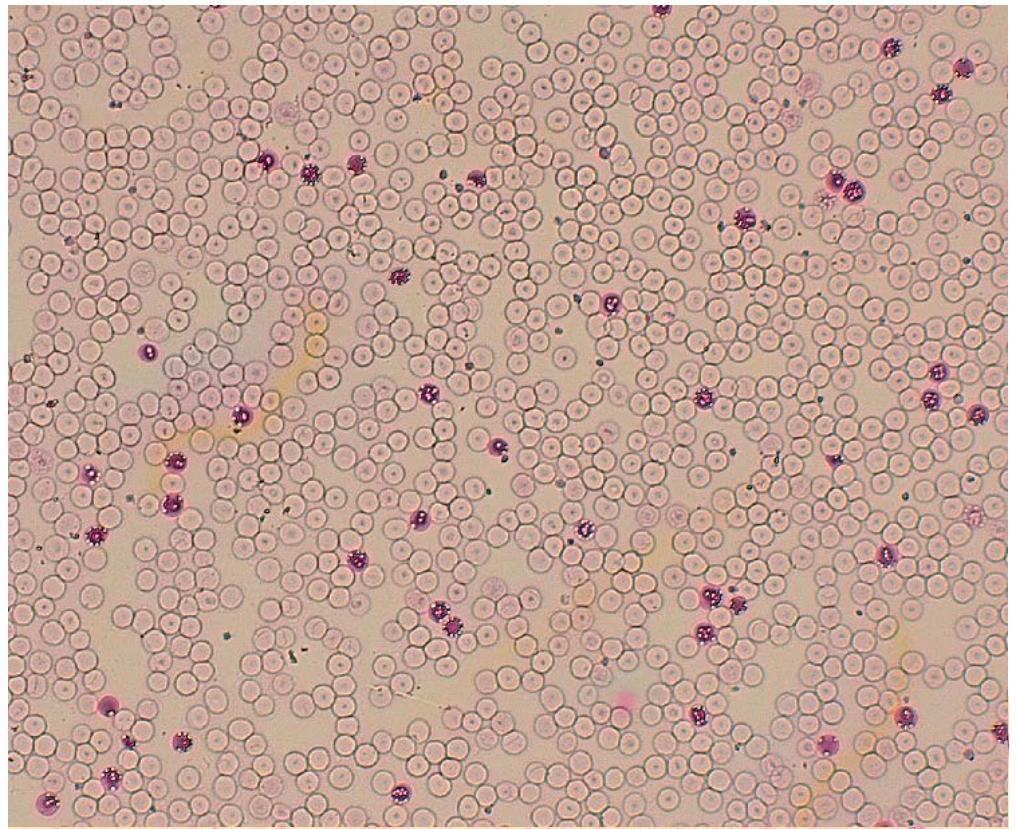
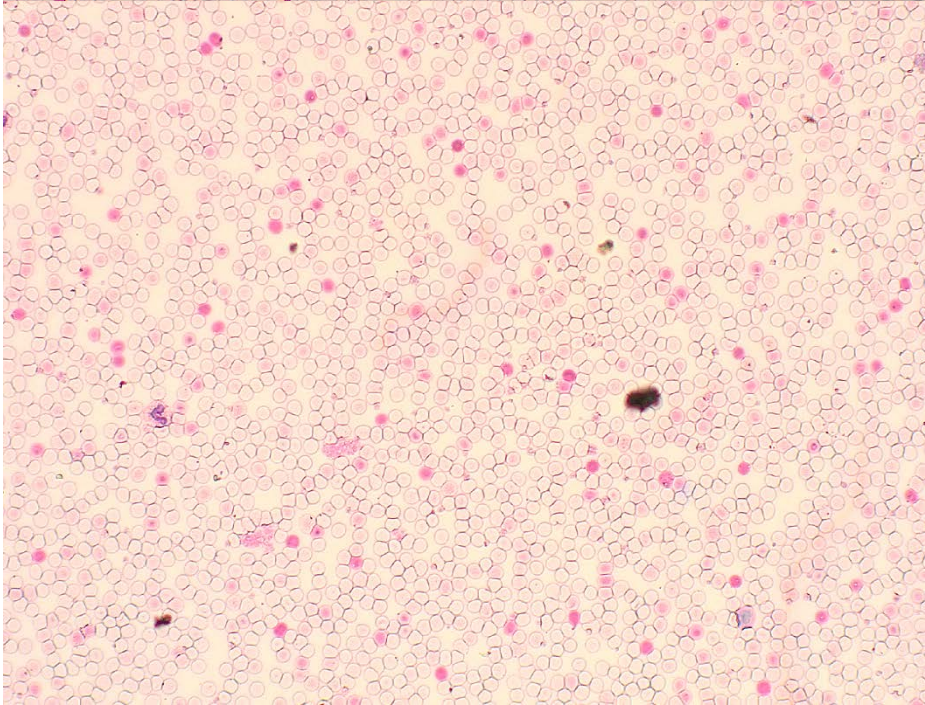
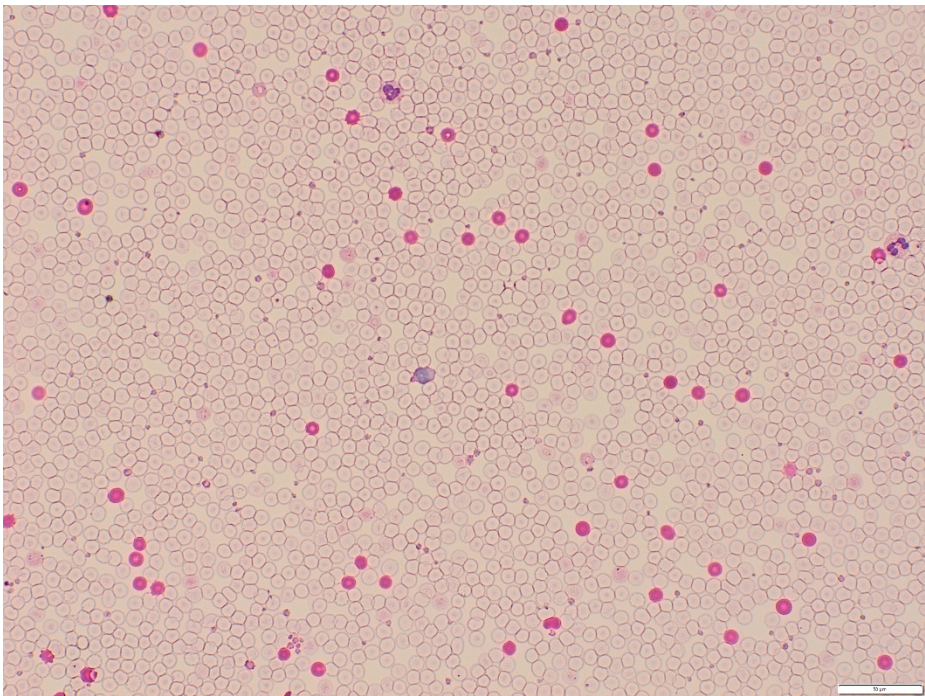
Le dépistage des hémorragies foëto-maternelles :

- **Indications :**

- Dépistage et suivi d'une hémorragie foëto-maternelle quel que soit le statut rhésus de la patiente
- Diagnostic étiologique d'une mort foëtal in utero ou d'une anémie néonatale
- **Adaptation posologique du traitement par Rophylac®**

- **Deux méthodes :**

- Le test de Kleihauer cytochimique sur lame problèmes de reproductibilité et d'interprétation
- Le test de Kleihauer en cytométrie en flux peu adaptée à l'urgence et interprétation délicate



TEST DE KLEIHAUER

Le dépistage des hémorragies foëto-maternelles :

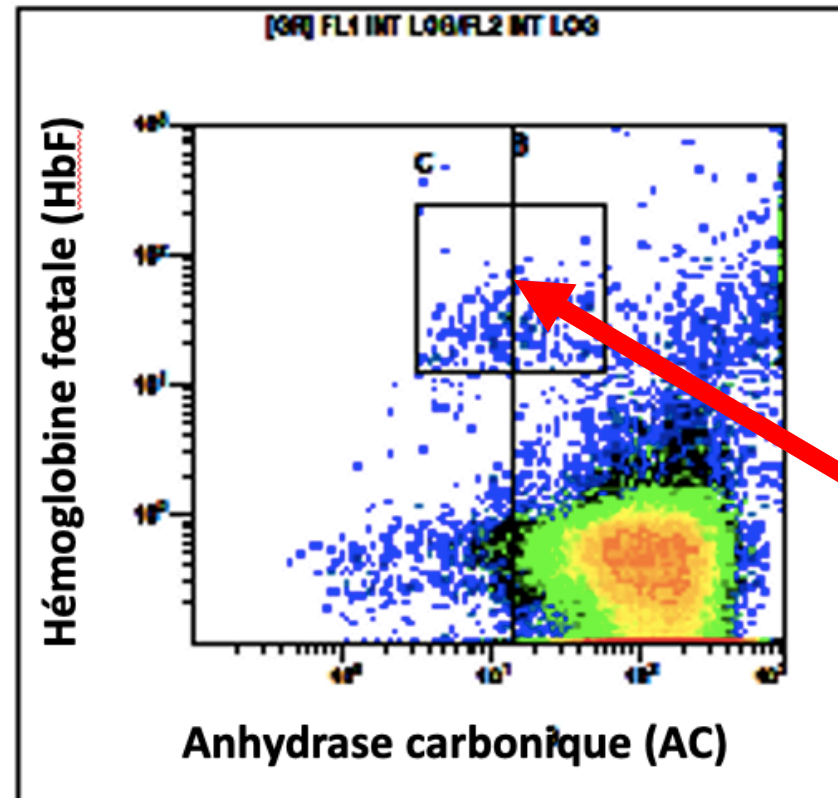
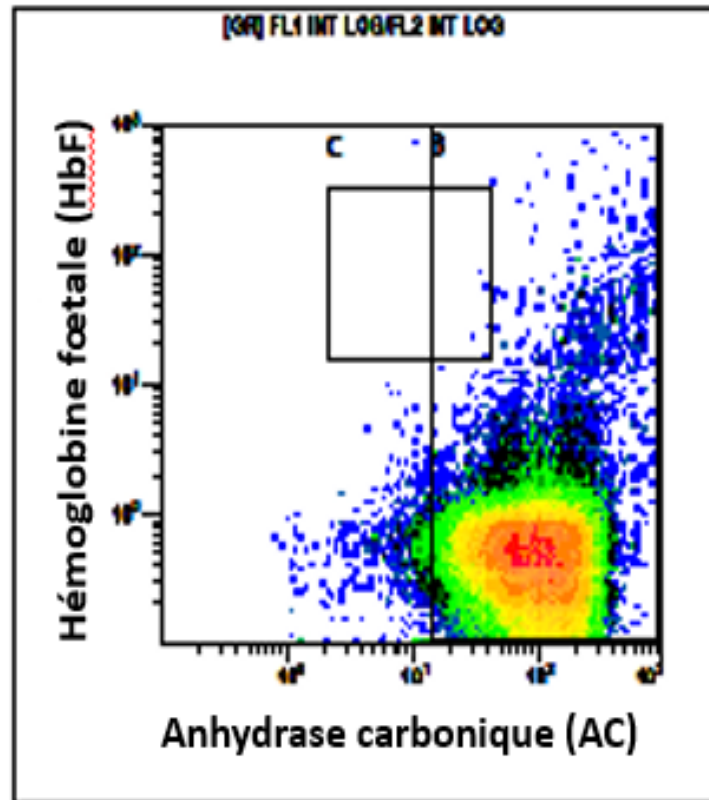
- **Indications :**

- Dépistage et suivi d'une hémorragie foëto-maternelle quel que soit le statut rhésus de la patiente
- Diagnostic étiologique d'une mort foëtal in utero ou d'une anémie néonatale
- **Adaptation posologique du traitement par Rophylac®**

- **Deux méthodes :**

- Le test de Kleihauer cytochimique sur lame problèmes de reproductibilité et d'interprétation
- Le test de Kleihauer en cytométrie en flux peu adaptée à l'urgence et interprétation délicate

Fœtal cell count kit® Marquage HbF / AC



HbF High
AC Low

AUTOMATISATION DU TEST DE KLEIHAUER CYTOCHIMIQUE SUR LAME

Evaluation du K-Matic en 2021 – Jacques Boy®

10 tests de Kleihauer négatifs

7 tests de Kleihauer ininterprétables

12 tests de Kleihauer positifs

Equation	Deming
$Y = 1.075 \cdot X - 2.033$	

Corrélation de Pearson : $r = 0.997$, $p < 0.0001$

Les performances du K-Matic sont similaires à celles du Kleihauer manuel réalisé au CNRHP (accréditation en 2017 portée B)

Qualité des colorations similaire à celle de la technique manuelle réalisée au CNRHP

Avantages : automatisation de la coloration, standardisation, traçabilité, Kit commercialisé (portée A), étaleur de lame V-sampler permettant des frottis plus réguliers et reproductibles

Limites : cadence du K-Matic (5 lames) et la gestion des réactifs (automate fermé) ne nous permettent pas l'utilisation de cet automate en routine au CNRHP



Chaine automatisée du test de Kleihauer – Cellavision

- Chaine automatisée de chez CellaVision, *en cours de développement* :
- **Objectifs de l'étude** :
 - Aide à la mise au point et évaluation d'un nouveau kit de coloration -> **RAL Kleihauer-Betke staining**®
 - Test d'un étaleur pour la réalisation des frottis sanguins -> **RAL SmearBox**®
 - Entrainement et évaluation d'une intelligence artificielle pour la lecture et comptage des frottis -> **CellaVision DC-1**®
 - Evaluation d'un colorateur -> **RAL Stainer**® - Evaluation en février 2025



RAL SmearBox®



≈ RAL Stainer®



CellaVision DC-1®

Chaine automatisée du test de Kleihauer – Cellavision

Evaluation Frottis + coloration

• Réalisation du frottis par la RAL SmearBox®

- **Avantages** : standardisation, absence de contact avec le sang
- **Limites** : tubes différents, un tube à la fois, volume mort important, viscosité du sang / épaisseur du frottis

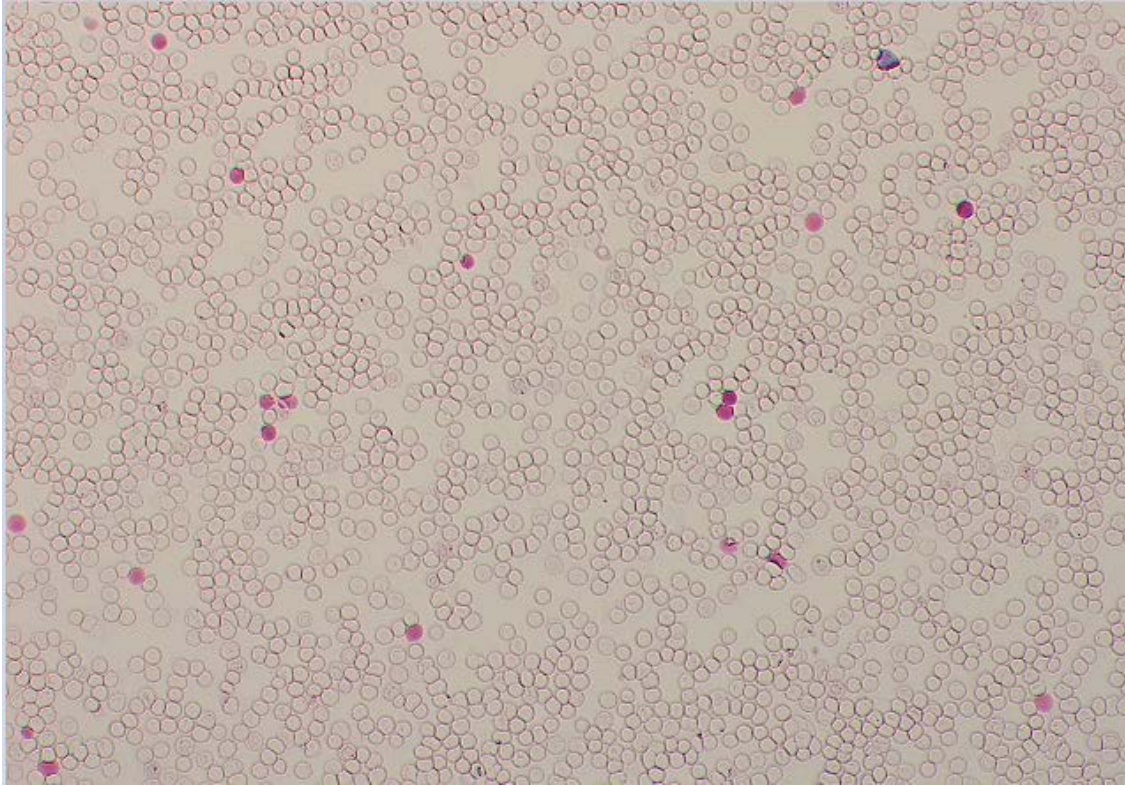
• Coloration avec le Kit RAL Kleihauer-Betke staining (distribué / LaboModerne)

- **Avantages** : plus rapide, pas de bain marie, Kit commercialisé (portée A)
- **Limites** : habitude de lecture différente, attention à la qualité du frottis et à la mise en oeuvre

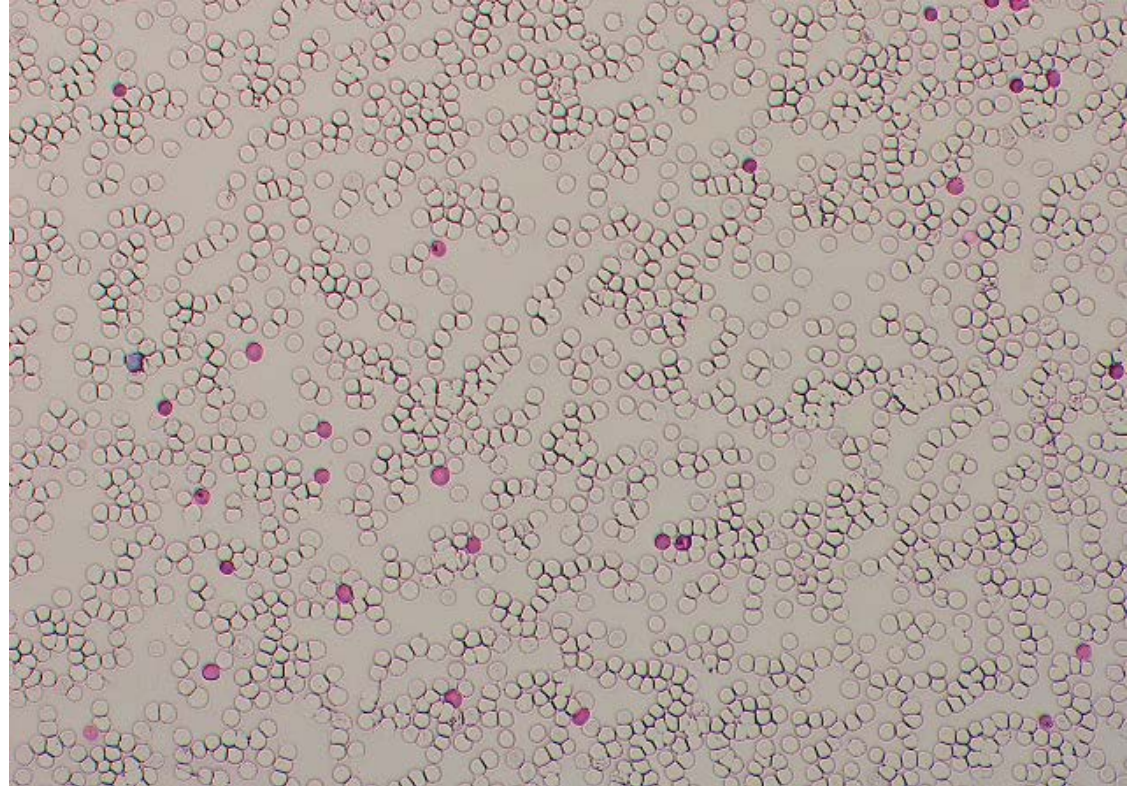
➤ Colorateur à évaluer

Critères d'évaluation de la coloration RAL diagnostic	Comparaison à la coloration « maison » du CNRHP		
	Moins satisfaisant	Identique	Plus satisfaisant
Qualité générale de la lame	1	36	25
Confort de lecture	0	36	26
Propreté	0	62	0
Érythrocytes adultes	0	35	27
Érythrocytes foetaux	0	26	2
F-cells	1	24	0
Leucocytes	0	62	0
Vitesse diagnostic	0	35	27

Coloration CNRHP Réactifs maison

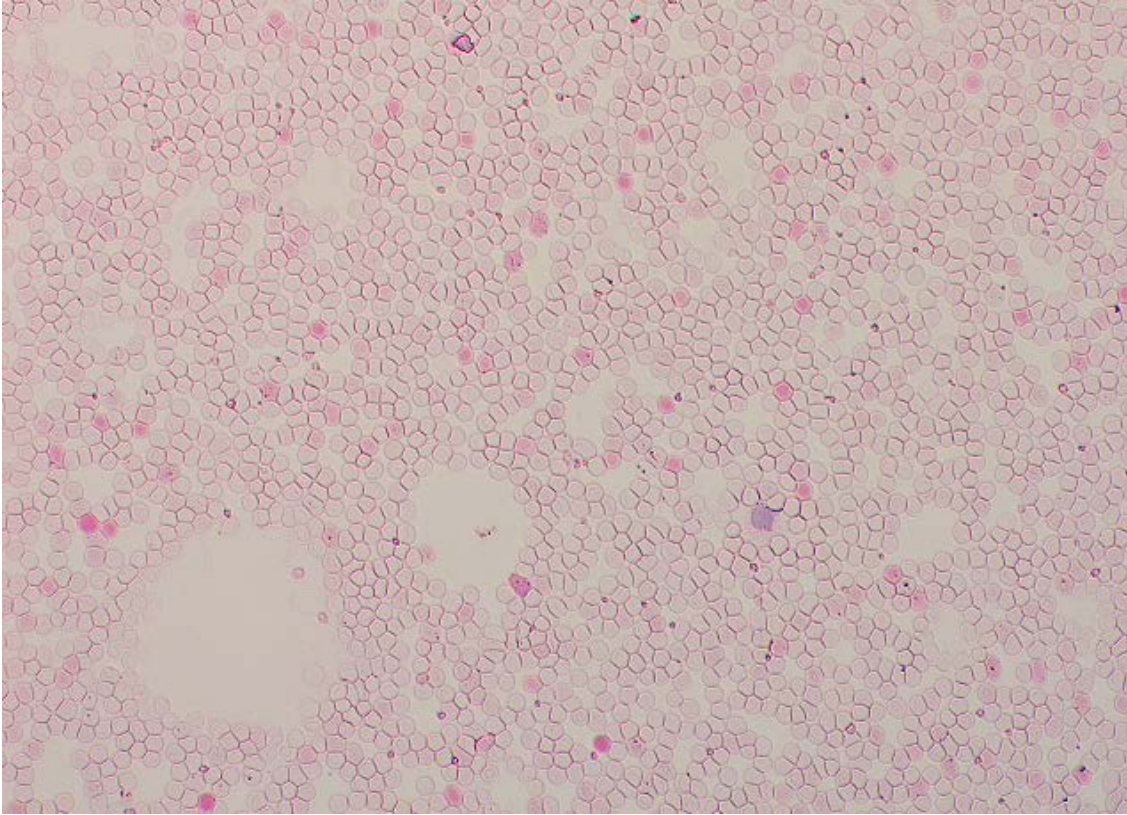


Kit RAL Kleihauer-Betke staining

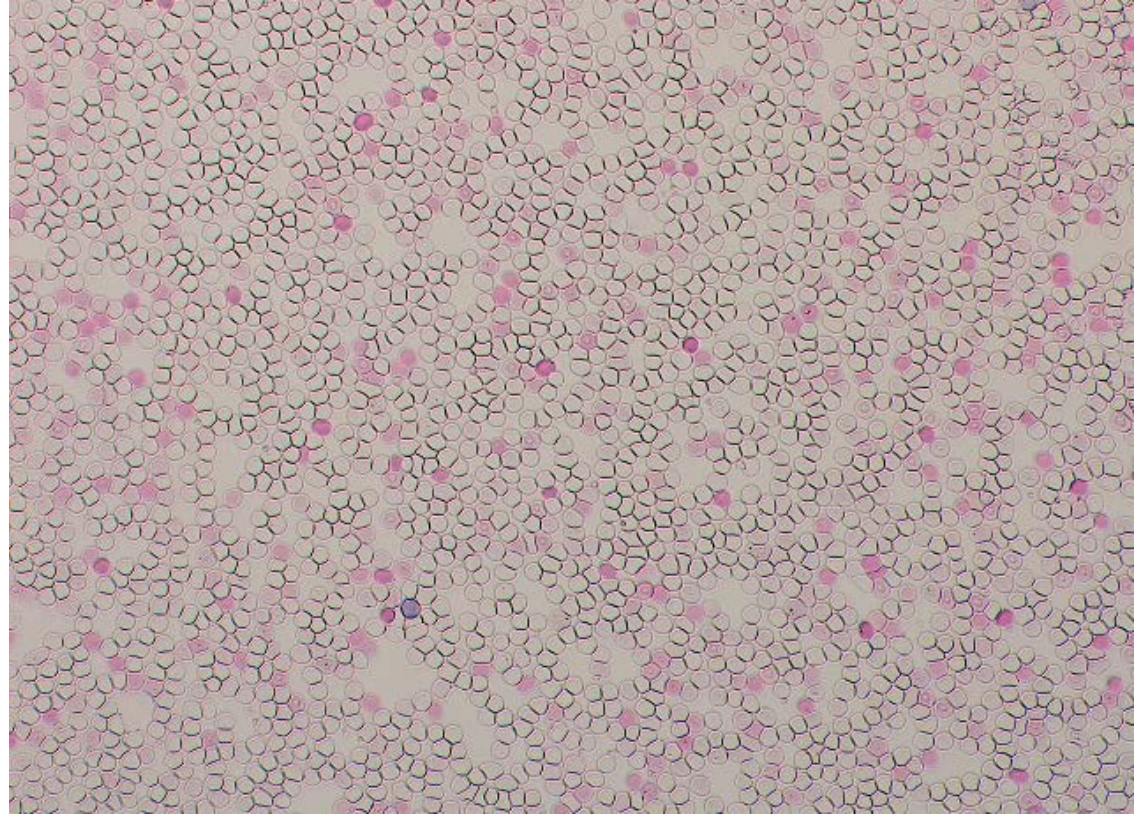


Kleihauer positif

Coloration CNRHP Réactifs maison



Kit RAL Kleihauer-Betke staining

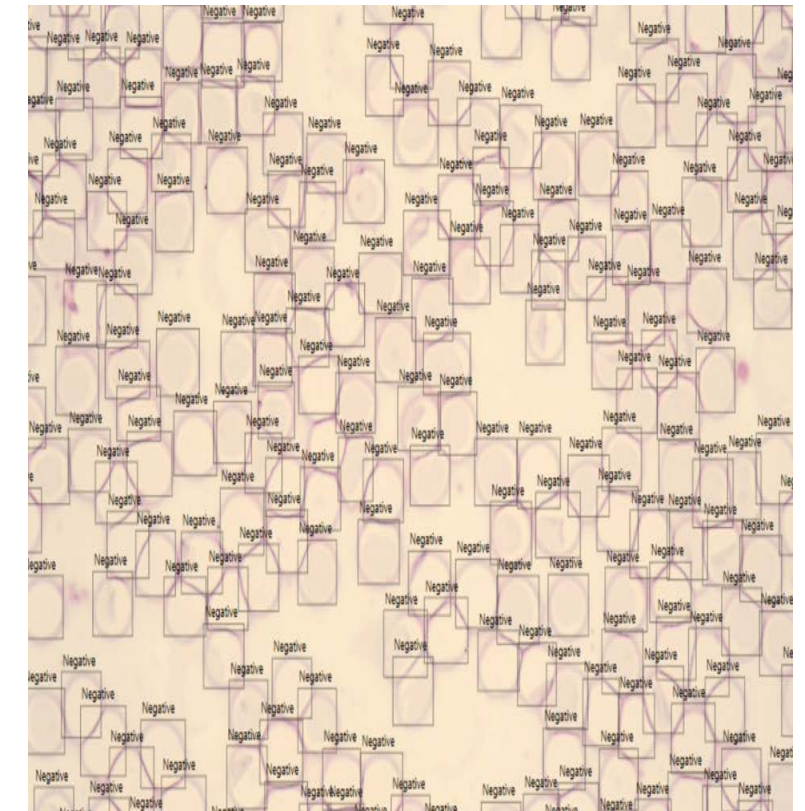
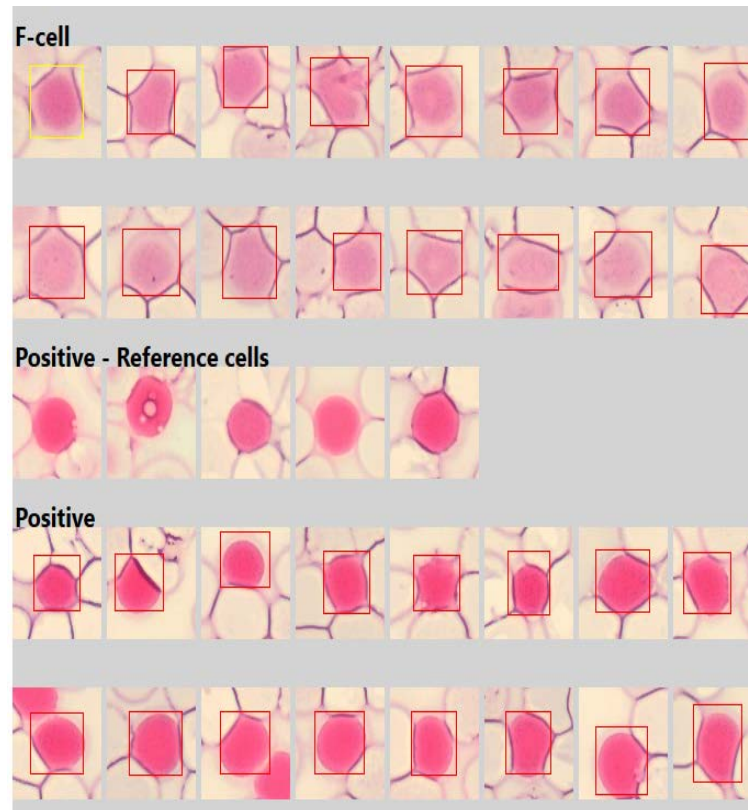
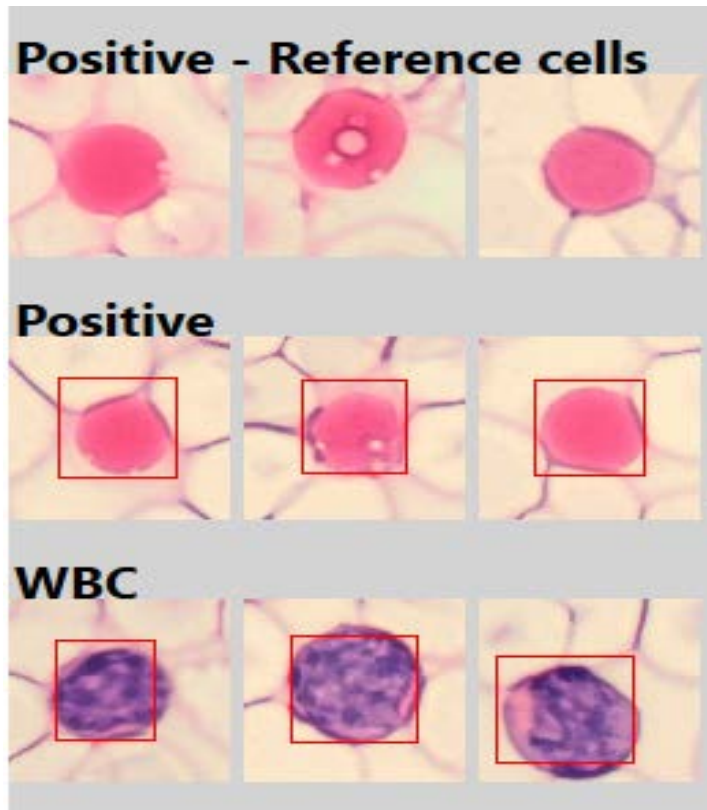


Kleihauer ininterprétable

Chaine automatisée du test de Kleihauer – Cellavision

Entrainement et évaluation d'une intelligence artificielle pour la lecture et comptage des frottis

- **Lecture et analyse de la lame avec le DC-1[®]**
 - Première phase d'entraînement du logiciel



Chaine automatisée du test de Kleihauer – Cellavision

- **Lecture et analyse de la lame avec le DC-1[®]**

- **Avantages** : standardisée, rapide, possibilité de revenir sur les lames
- **Limites** : test de Kleihauer ininterprétable, lecture d'une lame à la fois, reproductibilité et répétabilité à évaluer

- **Résultats et conclusions :**

- **RAL SmearBox[®]** : longueur et épaisseur des frottis conformes pour les tubes EDTA BD[®], en cours d'amélioration pour d'autres types de tubes
- Kit de coloration : conforme et commercialisé par LaboModerne
- **RAL Stainer[®]** : 10-20 lames - Evaluation en février 2025
- **CellaVision DC-1** : entraînement terminé

→ Evaluation des décomptes en comparaison à la cytométrie en flux

→ TGN

NOUVELLE TECHNIQUE DE CMF : PERFIX RED BLOOD CELLS

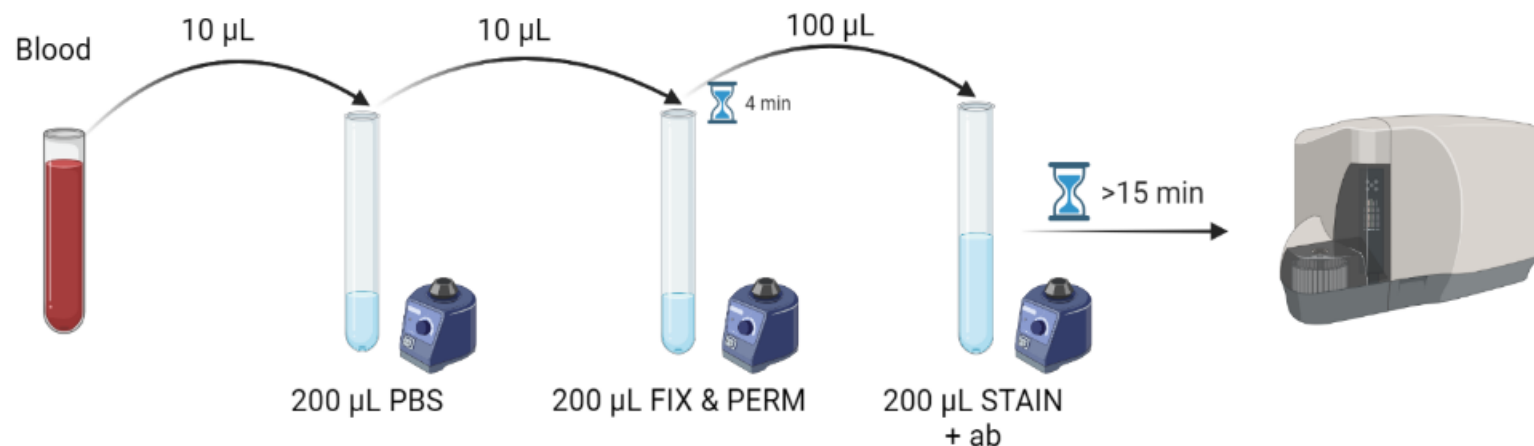
RESEARCH
INVESTIGATION

Nouvelle technique de CMF : trousse Perfix Red Blood Cells

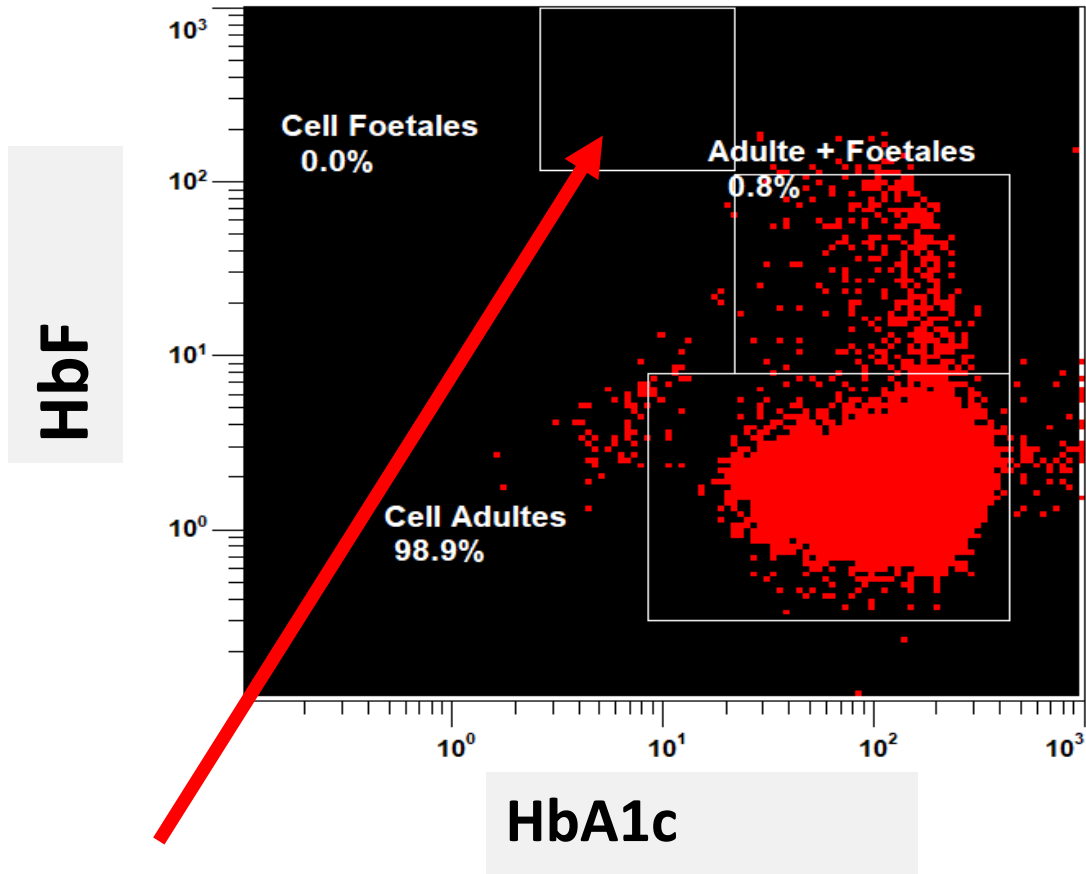
- **Objectifs de l'étude :** test d'une nouvelle trousse de CMF pour le dépistage des hémorragies fœto-maternelles
 - Utilisation en routine à la place du test de Kleihauer sur lame
 - Utilisation au CNRHP pour remplacer la technique de CMF fœtal cells count kit®
- double marquage intracytoplasmique **de l'hémoglobine fœtale (HbF)** et **de l'hémoglobine adulte 1c (HbA1c)**
- **Avantages de cette nouvelle trousse :** rapidité de rendue (technique de fixation, perméabilisation optimisée), facilement réalisable et + flexible,

Nouvelle technique de CMF : trousse Perfix Red Blood Cells

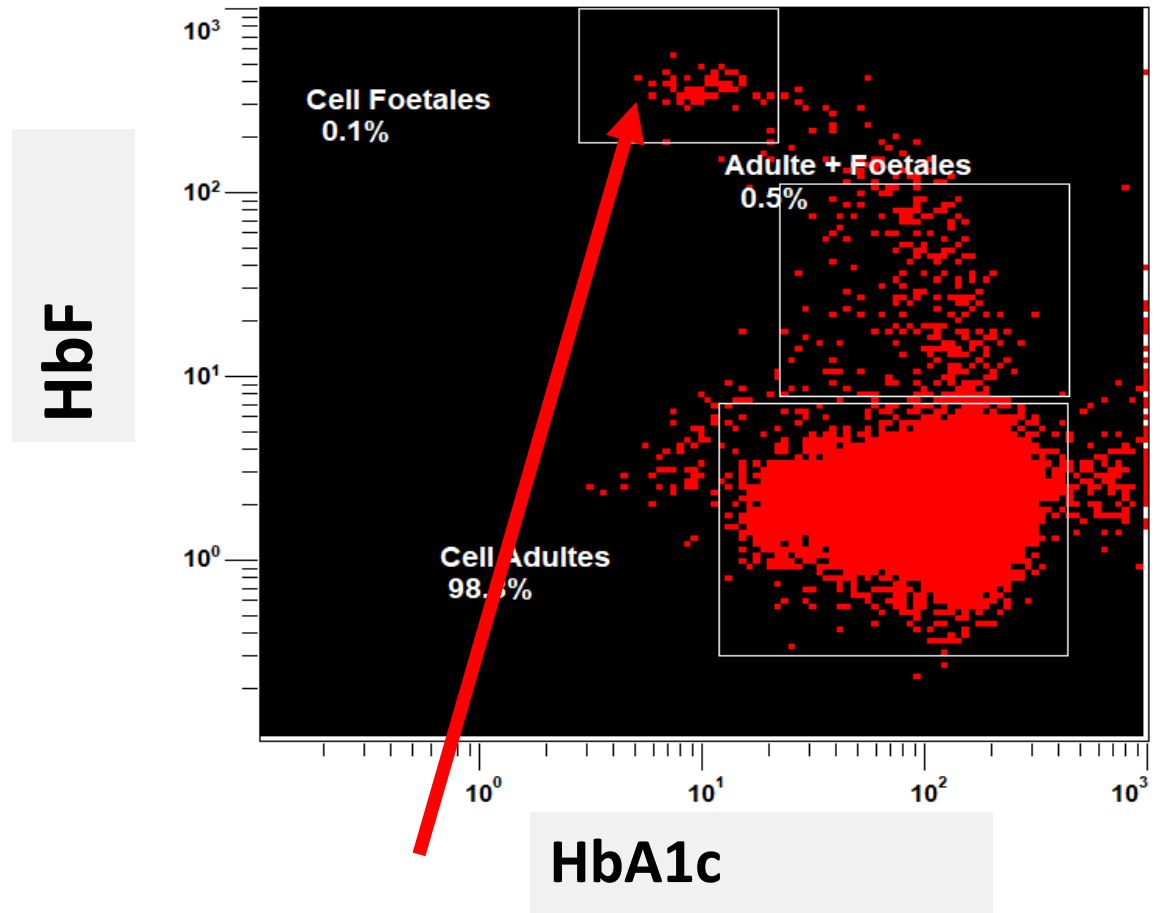
- **Plan expérimental** : évaluation effectuée sur les prélèvements testés en Kleihauer
 - 32 tests de Kleihauer positifs,
 - 26 tests de Kleihauer négatifs,
 - 17 tests de Kleihauer ininterprétables
- Comparaison au test de Kleihauer et à la CMF HbF/AC le cas échéant



RESULTATS



Absence d'hémorragie fœto-maternelle détectable



Présence d'une hémorragie fœto-maternelle détectable

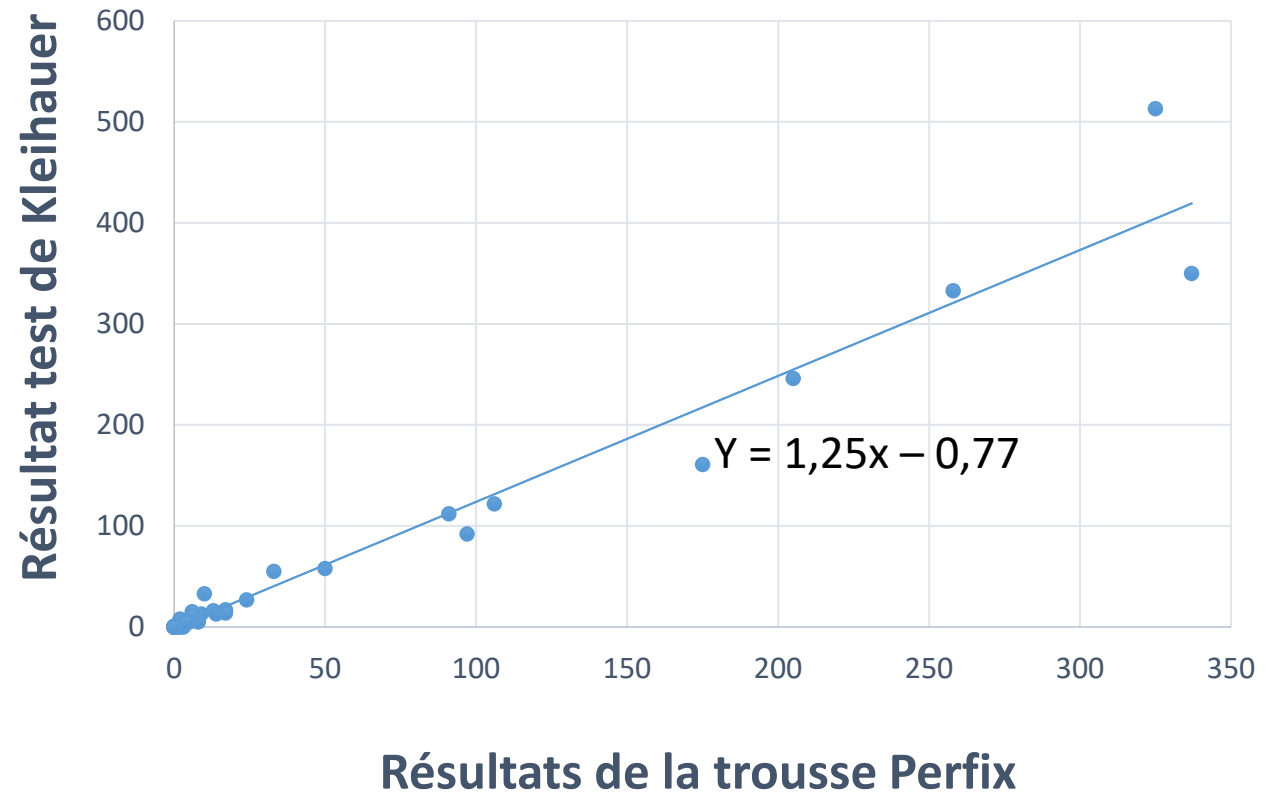
RESULTATS

Tous les tests négatifs sur lame étaient aussi négatifs en CMF avec la trousse Perfix RBC

Les résultats du test de Kleihauer en cytométrie Perfix sont corrélés au test de Kleihauer sur lame

(Corrélation de Pearson : $r = 0.96$, $p < 0.0001$)

Comparaison des résultats entre les tests de Kleihauer sur lame et la trousse Perfix



Nouvelle technique de CMF : trousse Perfix Red Blood Cells

- **Résultats :**

- La trousse Perfix permet le dépistage et la quantification des HFM
 - Avantage d'une technique facile à mettre en œuvre
 - L'interprétation reste difficile en présence de pathologies de l'hémoglobine (commune aux 3 techniques)
-
- Si commercialisation test à effectuer sur un plus grand échantillon afin de tester la reproductibilité et répétabilité du test

CONCLUSION

- **Evolution de la technique du test de Kleihauer nécessaire**
 - pour répondre aux exigences cliniques du délai de rendu (< 6h)
 - Pour améliorer les performances techniques
 - Pour aider à l'interprétation
- **2 articles de recommandations basés sur l'expérience du CNRHP**

Test de Kleihauer : recommandations du Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale

S. HUGUET-JACQUOT, C. TOLY-NDOUR , H. DELABY , J. BEAUD , A. MAILLOUX - Revue de Biologie Médicale - N° 365 - MARS-AVRIL 2022

Test de Kleihauer : recommandations du Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale Partie 2 : Techniques de coloration et de lecture.

S. HUGUET-JACQUOT, C. TOLY-NDOUR , J. BEAUD , I. ANGLARD, A. VASSAULT, M. VAUBOURDOLLE, A. MAILLOUX - Revue de Biologie Médicale – sous presse

- **Nouvelles études à mener très prometteuses :**
 - Evaluation de l'intelligence artificielle en comparaison à la CMF
 - Validation de méthode nécessaire pour ces différentes techniques

Remerciements

DMU BioGeM (Pr R. LEVY)

LBM EST PARISIEN (Dr M. VAUBOURDOLLE)

Service d'hémobiologie fœtale et périnatale – CNRHP (Dr A. MAILLOUX)

Techniciens (V. ZORAYAN)/ réceptionnistes / secrétaires / ingénieurs (V. JALLU) / cadre

**Equipe des Biologistes : Dr J. BABINET, Dr J. BEAUD, Dr S. HUGUET-JACQUOT, Dr F. KHETTAB, Dr E. MAENULEIN, Dr R. PETERMANN ,
Dr C. TOLY-NDOUR, Dr M. COUX**

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, Dr A. POTIER, Dr B. CARPENTIER

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

SF coordinateur : B. LAFON, I. REGNIER