

EVALUATION DU KIT FMH QUIKQUANT (TRILLIUM) DANS LA DETECTION ET LA QUANTIFICATION DES HEMORRAGIES FOETO-MATERNELLES : UNE ALTERNATIVE AU TEST DE KLEIHAUER SUR AUTOMATE D'HEMATOLOGIE, LE CELL-DYN SAPPHIRE (ABBOTT DIAGNOSTICS)

Stéphanie Huguet-Jacquot¹, Johannes Hoffmann², Marc Larsen¹, Bruno Carbonne¹, Anne Cortey¹, Agnès Mailloux¹

¹ Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, Hôpital Saint Antoine, Paris, France

² Abbott Diagnostics Division, Wiesbaden-Delkenheim, Allemagne

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 utilisé le kit FMH QuikQuant (Trillium), 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 a été faite sur l'automate d'hématologie, le Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics) (Figure 2).

Méthode: FMH QuikQuant (Trillium diagnostics) :

- 50 µl de sang total prélevé sur Citrate ou EDTA + 1 mL 0.05% glutaraldehyde-PBS, incubation pendant 10 min.
- + 2 mL de solution de perméabilisation Trillium intra-Cell™, incubation pendant 10 min, Centrifugation et décantation.
- + 50 µl de réactif QuikQuant (anti-HbF-FITC), incubation pendant 15 min.
- Analyse sur le Cell-Dyn Sapphire en mode RBC Flow. Analyse des fichiers avec le logiciel, FCS Express.

1ère partie : Nous avons validé la technique en utilisant différents mélanges artificiels de sang foetal / sang adulte (de 0 hématoïdes foetales (HF)/10000 hématoïdes adultes (HA) à 600 HF/10000 HA). Cinq séries indépendantes ont été réalisées et chaque série analysée 3 fois. L'interprétation des graphiques a été faite par deux observateurs indépendants et les résultats moyennés. 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).

2ème partie : Les performances de ce kit ont été évaluées sur une série de 206 patients : 89 échantillons avec un TKI positif (entre 5 et 710/10000), 58 échantillons avec un TKI négatif et 59 échantillons avec des cellules ininterprétables. L'interprétation des graphiques a été faite par deux observateurs indépendants et les résultats moyennés. Les échantillons de patientes rhésus D négatif ont également été analysés avec l'anti-RhD-FITC (BRAD3).

Résultats:

1ère partie - Mélanges artificiels : Evaluation du kit FMH QuikQuant sur le Cell-Dyn Sapphire en utilisant différents mélanges artificiels de sang foetal / sang adulte, exemples de graphiques

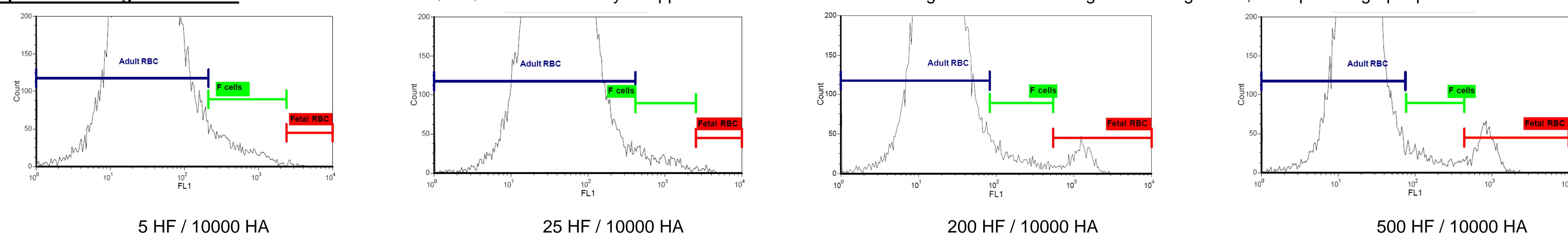


Figure 1 : Test de Kleihauer (cas d'une HFM massive)



Figure 2 : Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics)

Nous avons remarqué que l'intensité du marquage diminuait avec le nombre d'HF.

Le coefficient de variation intra-série est proche de 15% pour un TKI entre 5/10000 et 50/10000 et < 5% pour des valeurs > 50/10000.

Le coefficient de variation inter-série est proche de 30% pour un TKI < 25/10000, proche de 15% pour les valeurs entre 25/10000 et 300/10000 et proche de 10% pour un TKI > 300/10000.

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	12.50%	22.88%	14.70%	9.27%	10.33%	1.95%	1.67%	5.78%	1.22%	0.25%	4.23%
CV Intra-série II	45.80%	18.41%	7.78%	5.73%	10.97%	4.86%	3.22%	0.97%	4.69%	1.26%	3.74%
CV Intra-série III	66.62%	27.84%	10.86%	12.10%	10.98%	6.40%	3.18%	2.66%	3.25%	5.03%	5.87%
CV Intra-série IV	18.23%	39.31%	23.69%	18.28%	3.62%	1.37%	6.05%	1.87%	3.76%	1.00%	1.22%
CV Intra-série V	31.49%	16.34%	15.06%	13.88%	13.70%	7.18%	1.01%	0.45%	2.37%	2.25%	2.42%
CV Inter-série	41.69%	44.46%	33.44%	17.32%	14.33%	19.57%	17.39%	16.03%	12.65%	8.79%	10.79%

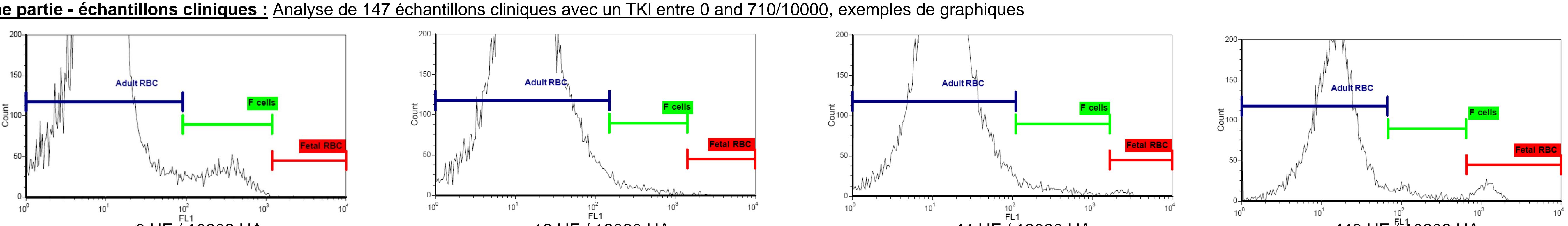
Tableau 1 : Coefficients de variation intra-série et coefficients de variation inter-série pour les 5 séries de mélanges artificiels de sang foetal et sang adulte.

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 10 HF / 10000 HA.

Le ratio d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec le TKI (pente 1,08; $r^2=0.98$ Passing Bablok) et avec BRAD3 (pente 1,19; $r^2=0.99$ Passing Bablok).

2ème partie - échantillons cliniques : Analyse de 147 échantillons cliniques avec un TKI entre 0 and 710/10000, exemples de graphiques



Le pourcentage d'HF obtenu avec FMH QuikQuant est bien corrélé aux valeurs obtenues avec le TKI (Pente 0.92 ; ordonnée à l'origine 1.00 ; $r^2=0.95$; (Passing Bablok)). (Tableau 2)

Le pourcentage d'HF obtenu avec FMH QuikQuant est bien corrélé aux valeurs obtenues avec BRAD3 (Pente 0.82 ; ordonnée à l'origine 2.18 ; $r^2=0.98$; (Passing Bablok)). (Tableau 2)

Les corrélations sont moins bonnes pour les TKI = 20, $r^2=0.65$ (TKI), $r^2=0.76$ (BRAD3). (Tableau 3)

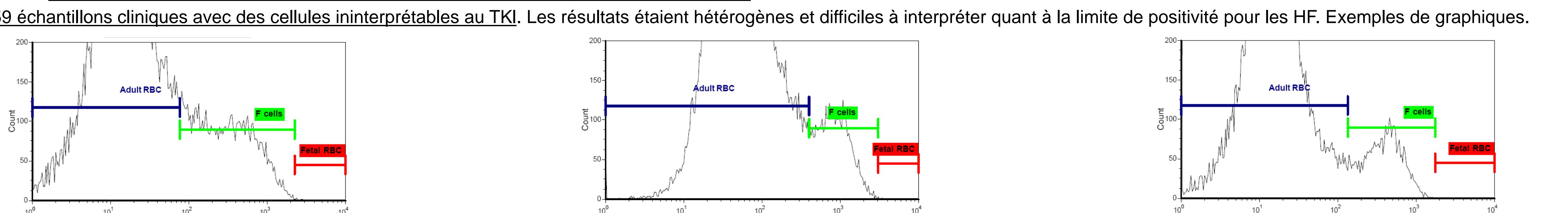
Tableau 2 :
Passing Bablok
entre KBT / FMH
QuikQuant et
BRAD3 / FMH
QuikQuant.

Variable	TKI	BRAD3
Variable	HbF	HbF
Taille de l'échantillon	147	79
Droite de régression	$y=1.0000+0.9167$	$y=2.1818+0.8182$
Ord à l'origine/ Pente B	1.0000 / 0.9167	2.1818 / 0.8182
Coefficientcorrélation r	0.9508	0.9753

Tableau 3 :
Passing Bablok
entre KBT / FMH
QuikQuant et
BRAD3 / FMH
QuikQuant
pour TKI<20.

Variable	TKI (with TKI = 20)	BRAD3 (with TKI = 20)
Variable	HbF	HbF
Taille de l'échantillon	105	44
Droite de régression	$y=1.0000+1.1250$	$y=2.2313+0.5896$
Ord à l'origine/ Pente B	1.0000 / 1.1250	2.2313 / 0.5896
Coefficientcorrélation r	0.6539	0.7638

Analyse de 59 échantillons cliniques avec des cellules ininterprétables au TKI. Les résultats étaient hétérogènes et difficiles à interpréter quant à la limite de positivité pour les HF. Exemples de graphiques.



A. Empâtement du pic des négatifs.

B. Intensité de fluorescence importante pour les pics négatifs

C. Pic d'intensité de fluorescence intermédiaire, HF ou F-cells?

Exemples de graphiques permettant de conclure que les cellules ininterprétables sont des F-cells. Mais la base du pic des F-cells ou la présence d'une intensité de fluorescence importante de ces pics intermédiaires rendent aléatoire le positionnement du curseur pour les HF.

Conclusions:

- . Les résultats des mélanges artificiels de sang foetal et de sang adulte montrent des problèmes pour les valeurs faibles de TKI et une bonne précision pour des valeurs élevées. Cette tendance est confirmée avec les échantillons de patients.
- . La difficulté réside dans la détermination de la limite de positivité du signal. En effet, l'intensité du signal dépend de la quantité d'HF (\rightarrow Intensité), du délai entre le marquage et le passage du tube sur le Sapphire (\rightarrow intensité). La présence de F-cells augmente ces difficultés parce que la fluorescence élevée de ces cellules peut masquer une petite quantité d'HF ou augmenter l'imprécision dans le décompte des HF.
- . 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).
- . Dans la majorité des cas, ce kit permet de conclure sur la nature des cellules ininterprétables, mais nécessite une 1ère étape de screening par le TKI.