

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

S. HUGUET-JACQUOT^{1*}, C. TOLY-NDOUR¹, H. DELABY¹,
J. BEAUD¹, A. MAILLOUX¹

RÉSUMÉ

Le test de Kleihauer permet de détecter et de quantifier une hémorragie fœto-maternelle. Bien que souvent décrié pour son manque de reproductibilité et ses difficultés d'interprétation, cet examen biologique est réalisé par près de 200 laboratoires en France, dans un intérêt fœtal ou maternel dans le cadre de la prophylaxie de l'allo-immunisation Rhésus D. Fort de ses 60 ans d'expérience, le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale diffuse ses recommandations pour la réalisation technique et l'interprétation clinico-biologique du test de Kleihauer. Par ailleurs, la cytométrie en flux, la vérification de méthode et l'évaluation externe de la qualité sont des aides précieuses à ne pas négliger afin d'améliorer la maîtrise de ce test indispensable à une prestation de conseil de qualité.

MOTS-CLÉS : grossesse, test de Kleihauer, hémorragie fœto-maternelle, hémoglobine fœtale (HbF), allo-immunisation anti-RH1(D), prophylaxie Rhésus, cytométrie en flux

I. - INTRODUCTION

Depuis une soixantaine d'années, le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP) réalise le test de Kleihauer qui permet de détecter et de quantifier une hémorragie fœto-maternelle. Les difficultés techniques et d'interprétation de ce test explicitées dans la littérature et les différents échanges avec les biologistes l'utilisant nous ont amenés, d'une part, à contribuer à la mise en place d'un contrôle externe de la qualité de cette analyse biologique et, d'autre part, à rédiger des recommandations reposant sur notre longue expérience.

II. - DÉFINITION ET PROBLÉMATIQUE DU TEST DE KLEIHauer

Le test de Kleihauer est un examen permettant de détecter et de quantifier une hémorragie fœto-maternelle (HFM). Le test de référence, test cytochimique sur frottis sanguin fixé à l'éthanol mis au point en

¹ Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, BioGeM – Hôpital Saint-Antoine, APHP
* auteure correspondant :
stephanie.huguet-jacquot@aphp.fr

1957 (1), repose sur l'élimination sélective de l'hémoglobine adulte (HbA) sous l'action d'une solution à pH acide, tout en préservant le contenu érythrocytaire en hémoglobine fœtale (HbF). Plusieurs réactifs commerciaux existent, mais certains laboratoires, comme le CNRHP, utilisent des réactifs « maison ». Selon les réactifs employés, les colorations peuvent différer, d'où la nécessité de recourir à un témoin positif de coloration pouvant faire office de contrôle de qualité interne et qui est constitué d'un mélange artificiel calibré de sang adulte et de nouveau-né. Observés au microscope, les érythrocytes adultes ayant perdu leur hémoglobine ont l'aspect de cellules sphériques, fantomatiques et incolores. Les érythrocytes contenant de l'HbF ayant fixé la phloxine sont rose vif et sont réfringents (Figure 1).

Le test de Kleihauer est souvent décrié, car il n'est ni automatisé ni standardisé, et il nécessite un personnel formé et entraîné à sa réalisation sous peine d'une variation élevée du décompte des cellules d'un opérateur à un autre (2, 3, 4). Les résultats du contrôle externe de la qualité Asqualab, mis en place en 2016 en collaboration avec le CNRHP, sont démonstratifs à cet égard. Ainsi, pour un échantillon constitué de 192 hématies fœtales (HF) pour 10 000 hématies adultes (HA), un coefficient de variation (CV) de 25,1 % était constaté avec une différence d'exactitude > 40 % de la valeur cible pour 35 % des laboratoires. De même, pour un autre échantillon ciblé à seulement 32 HF pour 10 000 HA, un CV de 29,5 % était observé avec une différence d'exactitude > 40 % de la valeur cible pour 59 % des laboratoires (5). Une autre difficulté de cet examen biologique est liée à l'interprétation des frottis sanguins avec des hématies maternelles contenant de l'HbF (6). Ces hématies, appelées *F cells*, peuvent être présentes physiologiquement au cours de la grossesse (leur nombre est alors faible) ou en cas d'hémoglobinopathie (leur

nombre est alors plus élevé) et le test de Kleihauer est considéré, à tort, positif. Ces cellules ne doivent pas être quantifiées au risque d'induire en erreur le clinicien. Parmi les 38 810 tests réalisés au CNRHP en 2019-2020, 7,87 % étaient ininterprétables et 10 %, positifs.

III. - INDICATIONS DU TEST DE KLEIHauer

Le test de Kleihauer est indiqué dans trois situations :

- L'adaptation de la posologie des immunoglobulines anti-RH1 (IgRh, Rhophylac®) dans le cadre de la prophylaxie de l'allo-immunisation fœto-maternelle Rhésus D (RH:1) chez la patiente RH:-1 ou partiel, enceinte ou accouchée. Le test de Kleihauer est alors d'intérêt maternel et sa réalisation n'est pas urgente, mais le résultat de cet examen biologique doit être obtenu dans les 72 heures afin de garantir l'efficacité de cette prophylaxie,
- Le diagnostic étiologique d'une anémie fœtale ou néonatale ou d'une mort fœtale *in utero*,
- Le dépistage et le suivi d'une hémorragie fœto-maternelle, spontanée ou induite par des traumatismes ou des gestes obstétricaux, quel que soit le statut Rhésus de la mère.

Pour ces deux dernières indications, le test de Kleihauer est d'intérêt fœtal avec une urgence relative, et son résultat doit être connu en moins de 6 heures (7).

Une étude rétrospective des tests de Kleihauer réalisée au CNRHP de 2013 à 2014 (8), ainsi que de 2019 à 2020, a montré que les indications les plus fréquentes du test étaient : la prévention *post-partum*,

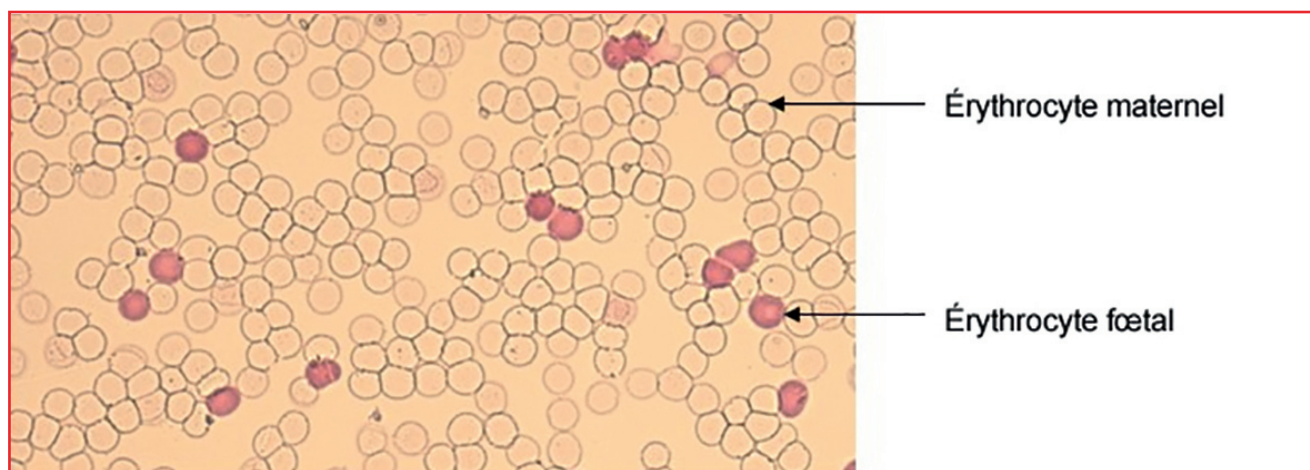


Fig 1.- Test de Kleihauer fortement positif (500 HF/10 000 HA), correspondant à une hémorragie fœtale de 250 mL de sang. Les érythrocytes fœtaux contiennent de l'hémoglobine F fixant la phloxine et sont rose vif et réfringents.

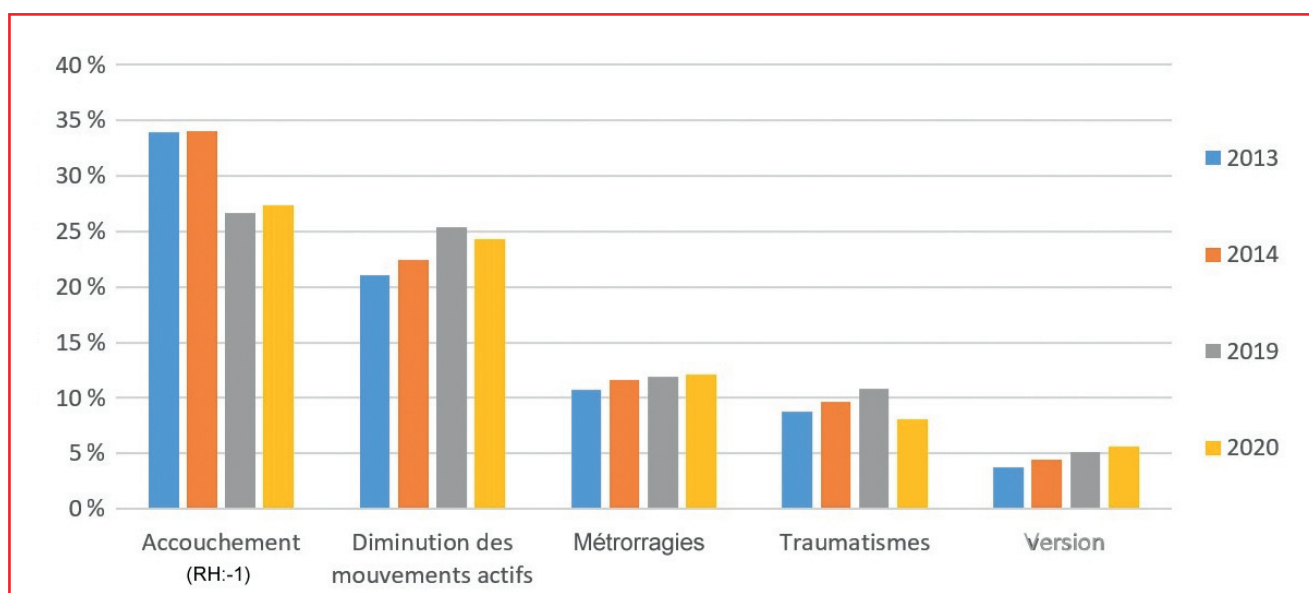


Fig 2.- Fréquence (%) des tests de Kleihauer, selon l'indication, pratiqués en 2013, 2014, 2019 et 2020.

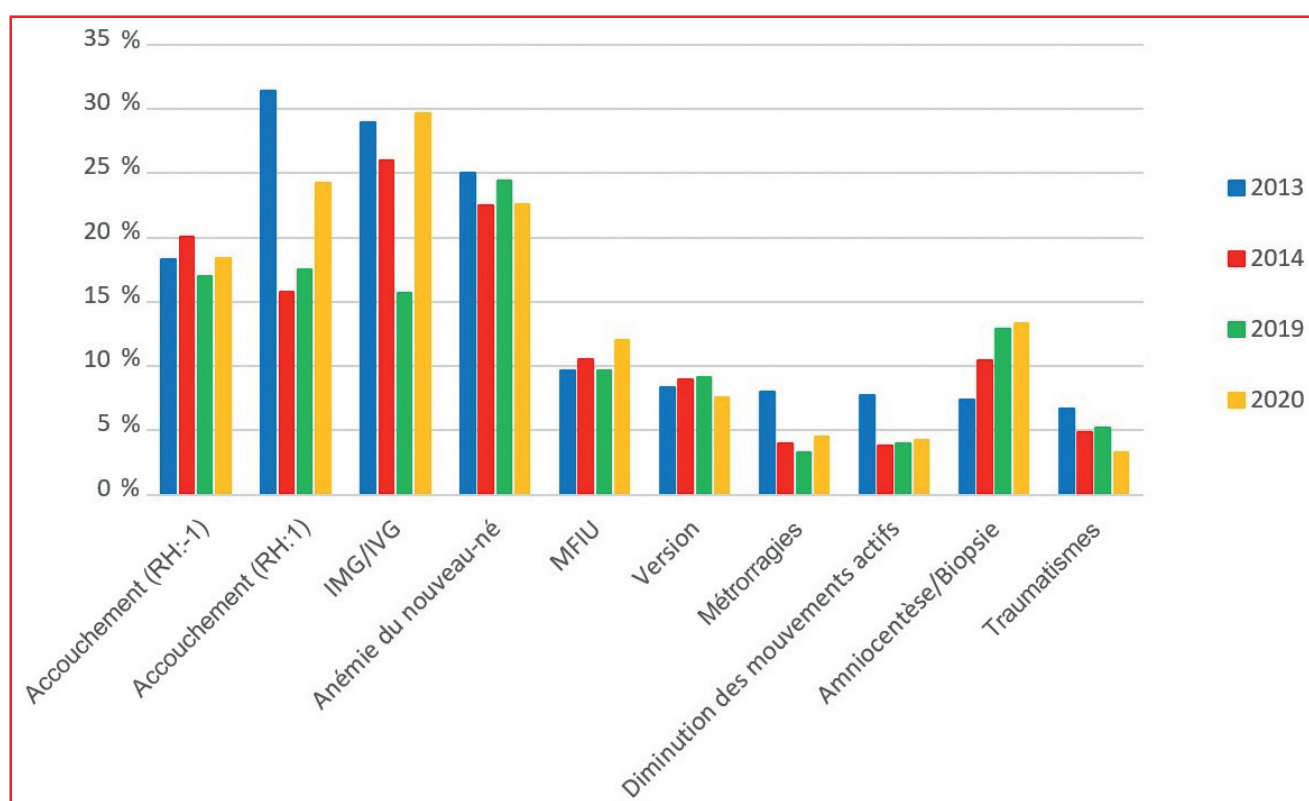


Fig 3.- Fréquence (%) de positivité du test de Kleihauer (≥ 1 HF/10 000 HA), selon l'indication de réalisation, en 2013, 2014, 2019 et 2020.

IMG : interruption médicalisée de grossesse ; IVG : interruption volontaire de grossesse ; MFIU : mort fœtale *in utero*.

de l'allo-immunisation Rhésus D chez une patiente RH:-1 (25 à 35 %), la diminution des mouvements actifs fœtaux (20 à 25 %), les métrorragies (11 %), les traumatismes (8 à 10 %), une version par manœuvre externe (3 à 6 %) (Figure 2). Pour 10 à 12 % des demandes, le contexte n'était pas précisé et 2 % concernaient un contrôle. Un test positif (≥ 1 HF/

10 000 HA) est plus fréquemment observé lorsqu'il y a des signes d'anémie fœtale ou néonatale, à l'accouchement quel que soit le statut RH1 maternel et en cas d'interruption de grossesse (Figure 3) ; il l'est fortement dans les indications où il y a un retentissement clinique, à savoir une anémie du nouveau-né, une mort fœtale *in utero* (Figure 4).

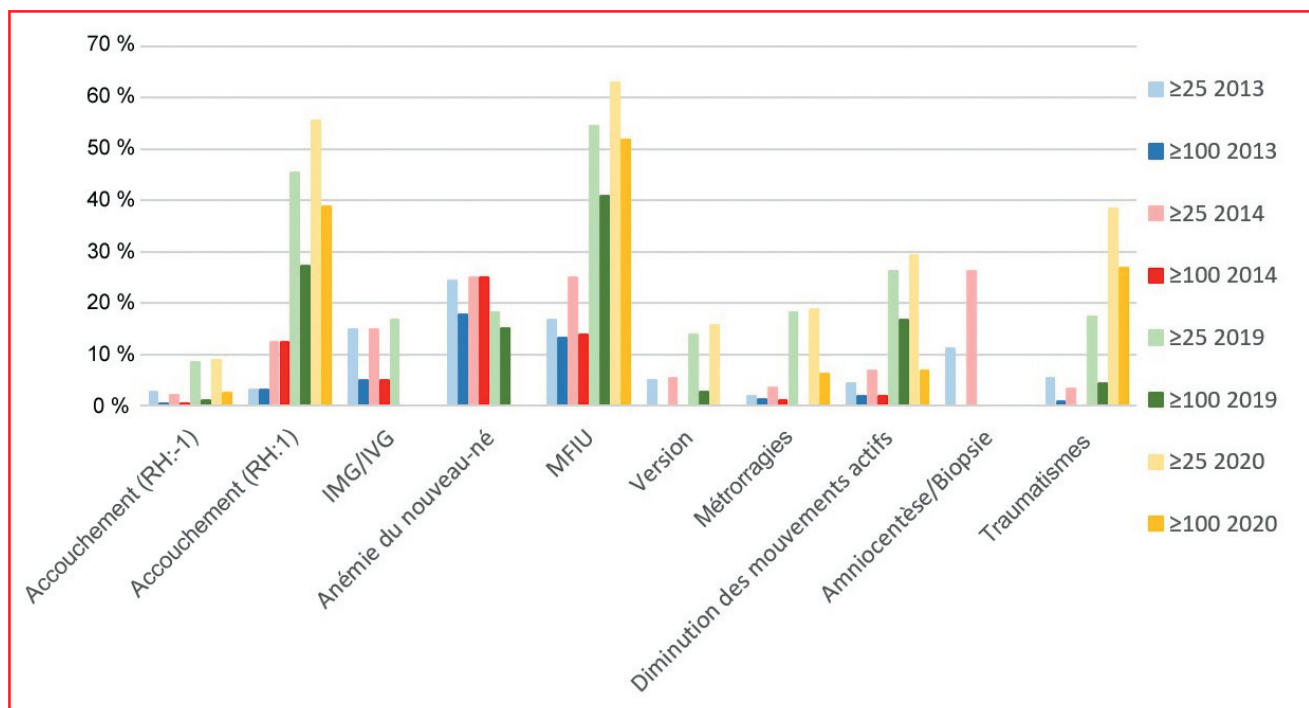


Fig 4.- Fréquence (%) de positivité du test de Kleihauer (≥ 25 HF/10 000 HA et ≥ 100 HF/10 000 HA) par indication de réalisation, en 2013, 2014, 2019 et 2020.

IMG : interruption médicalisée de grossesse ; IVG : interruption volontaire de grossesse ; MFIU : mort fœtale *in utero*.

Bien que l'intérêt du test de Kleihauer ait été remis en cause dans quelques indications, comme les diminutions des mouvements actifs ou une version par manœuvre externe (9, 10), il reste tout de même une valeur ajoutée lorsqu'il est bien maîtrisé par l'opérateur. En effet, il permet l'instauration d'une surveillance clinico-biologique adaptée de la mère et du fœtus dès sa positivité, même à des niveaux sans impact clinique, et ainsi d'anticiper la prise en charge d'une éventuelle HFM susceptible de s'intensifier et d'entraîner un retentissement clinique. La réalisation systématique en l'absence de toute indication de cet examen chez 296 femmes enceintes suivies à l'hôpital Trousseau (Paris) a révélé qu'il était négatif chez 87,8 % d'entre elles, ininterprétable chez 11,2 %, faiblement positif (< 1 HF/10 000 HA) et sans impact clinique chez 1,0 %.

IV. - INTERPRÉTATION DU TEST DE KLEIHauer ET PRESTATION DE CONSEIL

L'interprétation du test de Kleihauer et la prestation de conseil qui en découle ne sont possibles qu'en ayant connaissance :

- du contexte anté- ou postnatal de la demande et donc de son urgence,
- de la date de début de la grossesse afin de calculer le terme et donc d'avoir une estimation de la masse sanguine du fœtus (Figure 5),

- du phénotype ABO RH1 de la mère, des recherches d'agglutinines irrégulières effectuées ainsi que des dates d'administration d'IgRh et des doses injectées, permettant de donner un conseil quant à la prophylaxie Rhésus et les éventuels contrôles des agglutinines irrégulières à réaliser à distance.

Un test de Kleihauer est considéré comme positif à partir de 1 HF/10 000 HA avec un seuil fixé à 5 HF/10 000 HA à partir duquel un contrôle de cet examen est nécessaire. En dessous de ce seuil, l'HFM est sans impact clinique pour le fœtus, mais peut être responsable d'une allo-immunisation et, en particulier, anti-RH1 chez la mère en fonction de ses phénotypes érythrocytaires.

A) Signification clinique d'un test de Kleihauer positif

L'interprétation du test de Kleihauer repose sur la cohérence entre le volume de l'HFM, le terme de la grossesse et la clinique. Étant donné que 1 HF/10 000 HA correspond environ à 0,5 mL de sang fœtal (11) et que la masse sanguine d'un nouveau-né est d'environ 90 à 120 mL/kg de poids fœtal (Figure 5) (12), il est possible, lorsque le terme de la grossesse est connu, d'estimer la proportion de sang perdu par le fœtus.

Dans un contexte anténatal, il faut évaluer si l'HFM est suffisamment importante pour provoquer une ané-

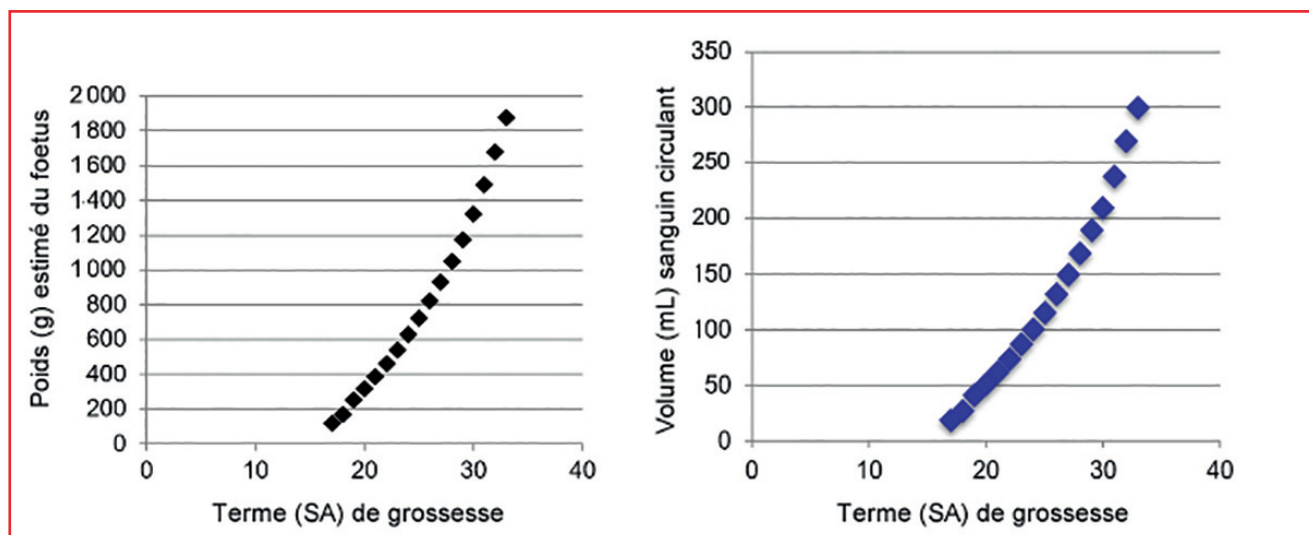


Fig 5.- Évolution du poids et du volume sanguin fœtal en fonction de l'âge gestationnel.
SA : semaine d'aménorrhée.

mie fœtale sévère (< 7 g/100 mL). En effet, le constat d'une HFM massive doit être signalé très rapidement à l'obstétricien suivant la patiente pour une prompt prise en charge clinique avec instauration d'une surveillance échographique (Doppler) et mesure du pic systolique de vélocité au niveau de l'artère cérébrale moyenne à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale. De même, il faut établir si la positivité du test est la séquelle d'un saignement passé ou si elle témoigne d'une HFM continue, et effectuer des contrôles 24 heures et 48 heures plus tard afin d'en évaluer la cinétique. Par ailleurs, si la patiente est RH:-1, les hématies fœtales sont-elles RH:1 ? Le résultat du génotypage *RHD* fœtal réalisé au cours de la grossesse permet d'avoir une idée du phénotype des hématies fœtales. En son absence, une analyse complémentaire par cytométrie en flux après marquage des éventuelles hématies fœtales RH:1 par un anticorps monoclonal anti-RhD (BRAD3) conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine peut être envisagée. Pour rappel, en cas de mort fœtale *in utero*, le génotypage *RHD* fœtal post-expulsion est impossible, car la demi-vie de l'ADN fœtal circulant dans le sang maternel n'est que de quelques heures. Il faut également prendre en compte l'éventuelle coexistence d'une immunisation chez la mère et/ou d'une incompatibilité ABO entre la mère et l'enfant pouvant accélérer le processus d'élimination des hématies fœtales. Dans ce contexte ou lors d'une HFM ancienne, l'HFM peut être sous-estimée. Les hématies fœtales en cours de lyse peuvent être observées : elles contiennent une ou plusieurs vacuoles blanches à l'emporte-pièce (Figure 6).

Exemple de calcul et d'interprétation d'un test de Kleihauer :

1 HF/10 000 HA correspond à 0,5 mL de sang fœtal ou 0,25 mL de globules rouges fœtaux,

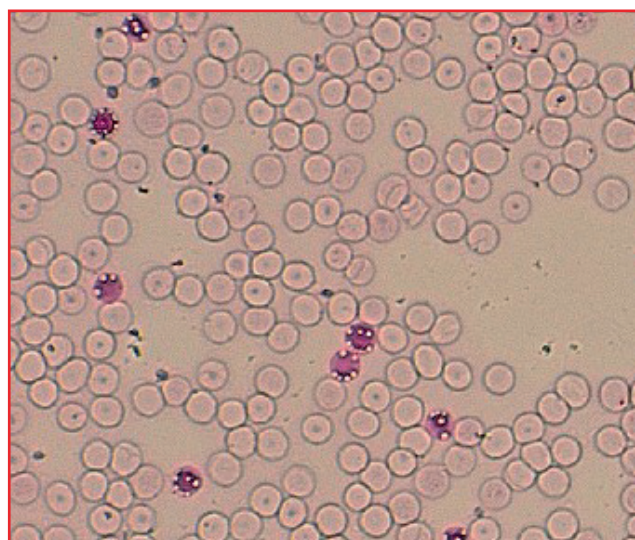


Fig 6.- Hématies fœtales vacuolées témoignant d'une HFM ancienne ou de cellules en cours de lyse.

2 HF/10 000 HA correspond à 1 mL de sang fœtal ou 0,5 mL de globules rouges fœtaux,

Le volume sanguin fœto-placentaire compris entre 90 à 120 mL/kg de poids fœtal,

Si on considère un bébé à terme de 4 kg victime d'une HFM massive, on peut faire le calcul suivant : $120 \times 4 \times 2 \text{ HF/10 000 HA} = 960 \text{ HF/10 000 HA}$.

Par conséquent, une valeur au-delà de 1 000 HF/10 000 HA ne peut pas être observée puisque le fœtus aurait perdu plus de la quasi-totalité de sa masse sanguine. Cela peut être dû à une erreur de comptage ou en rapport avec la présence maternelle de *F cells*. Il en est de même pour une valeur de 800 HF/10 000 HA

pour un bébé ayant 18 g/100 mL d'hémoglobine ou de 300 HF/10 000 HA à la vingtième semaine d'aménorrhée, en total désaccord avec la physiologie fœtale.

B) Les cellules ininterprétables ou *F cells*

Les cellules maternelles contenant de l'HbF ou *F cells*, colorées en rose pâle à rose foncé après application de phloxine (Figure 7), sont difficiles (pour celles rose foncé), à distinguer des authentiques cellules fœtales. Elles ne doivent pas être comptées précisément sous peine d'induire l'obstétricien en erreur, mais une cotation de leur présence peut être utile afin de sélectionner les patientes pour lesquelles une analyse du sang par cytométrie en flux s'avère nécessaire. Pour les patientes RH:-1, il est important de détecter le seuil de 25 HF/10 000 HA à partir duquel une adaptation de posologie des IgRh est nécessaire. L'évaluation de ce seuil peut être établie en comptant le nombre de cellules rose moyen à rose foncé (celles qui peuvent être confondues avec de vraies hématies fœtales) par champ microscopique. Au CNRHP, à partir de 3 hématies de ce type par champ, correspondant à de nombreuses cellules ininterprétables, il est nécessaire de réaliser le marquage des érythrocytes par un anticorps anti-RhD (BRAD3) marqué par l'isothiocyanate de fluorescéine.

L'observation de nombreuses *F cells* doit conduire à mettre en place un suivi clinique et échographique de la patiente et d'analyser (par électrophorèse) son hémoglobine afin d'expliquer le résultat du test de Kleihauer. Pour les patientes RH:-1, il est recommandé de compter, par cytométrie en flux, les cellules fœtales RH:1 pour adapter la posologie des IgRh administrées dans le délai des 72 heures. Pour les patientes RH:1, une analyse sanguine complémentaire par cytométrie en flux avec marquage de l'HbF, associé ou non à celui de l'anhydrase carbonique (AC), peut être réalisée.

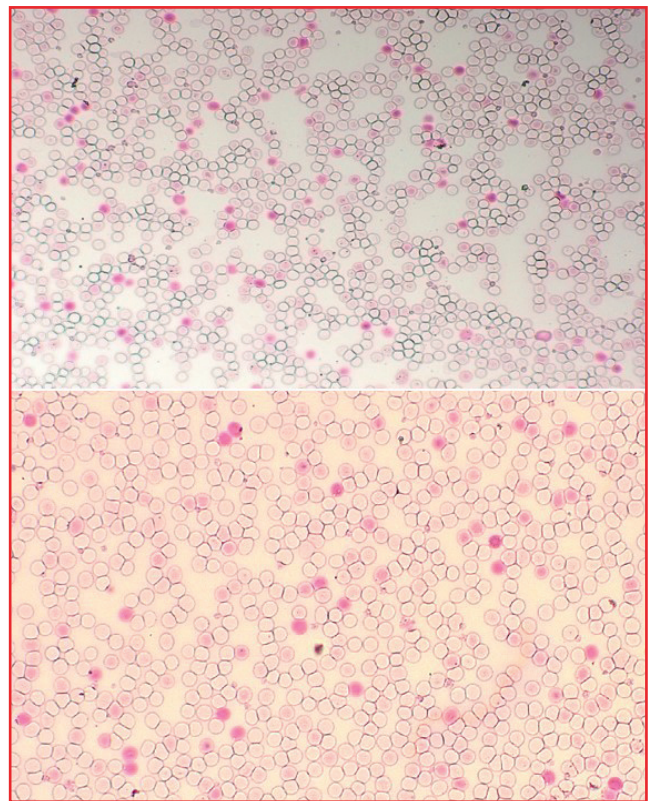


Fig 7.- Test de Kleihauer avec de très nombreuses cellules ininterprétables (*F cells*).

C) Place de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une bonne alternative au test de Kleihauer effectué sur frottis sanguin, car elle est adaptée à l'étude des événements rares. Il existe plusieurs possibilités de marquage des érythrocytes, chacun avec ses avantages et ses inconvénients. Le premier est celui de l'antigène RhD par l'anticorps monoclonal BRAD3 (Figure 8) (13-14). Le second décèle l'HbF et

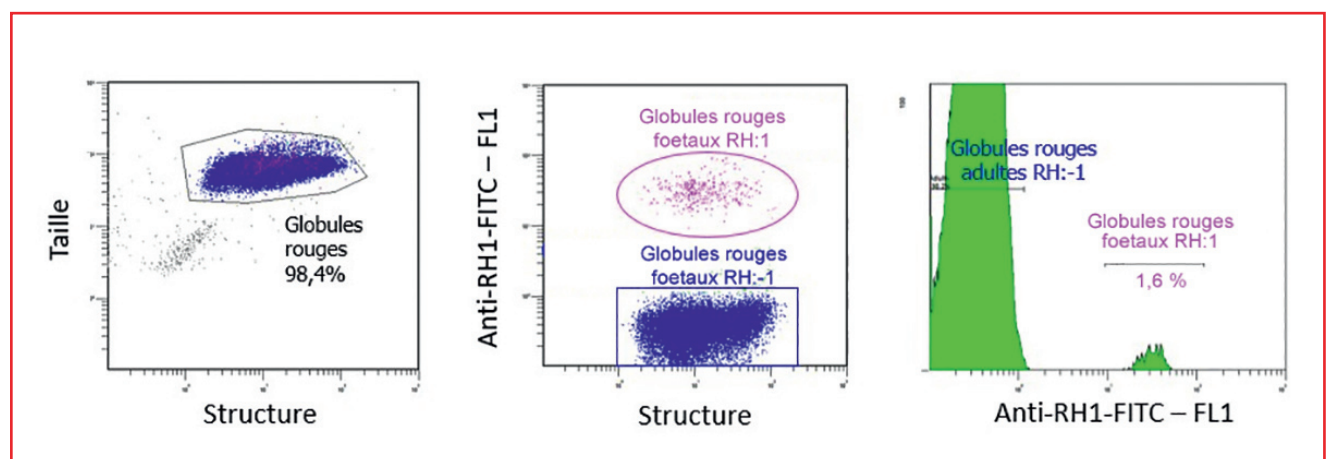


Fig 8.- Détection des hématies d'un fœtus de phénotype RH:1 dans le sang d'une mère de phénotype RH:-1 par marquage de l'antigène RH1 avec un anticorps monoclonal anti-RH1 (BRAD3).

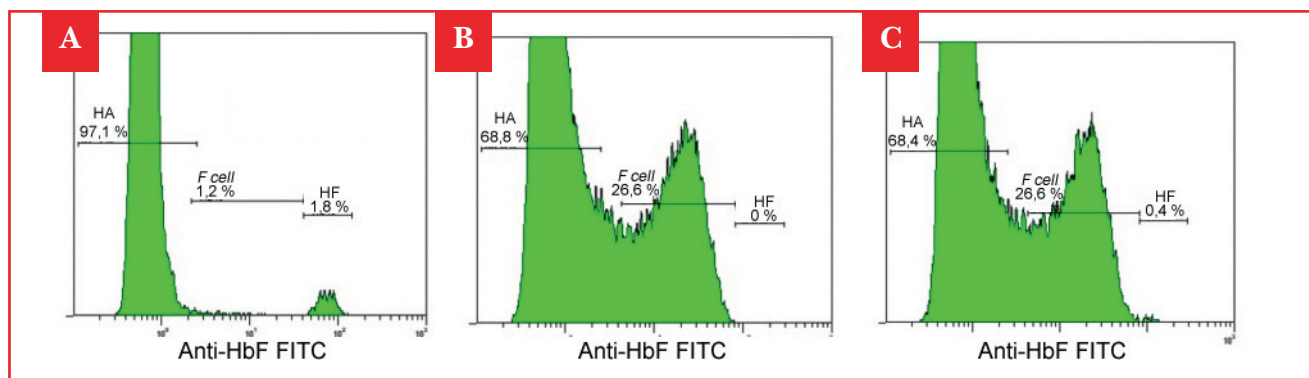


Fig 9.- Analyse du sang maternel par cytométrie en flux, avec marquage des érythrocytes par un anticorps anti-HbF conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (FMH QuickQuant™).

A, échantillon contenant 191 HF/10 000 HA (230 HF/10 000 HA détectées sur frottis sanguin et 200 HF/10 000 HA par cytométrie en flux avec marquage érythrocytaire par un anticorps anti-RhD [BRAD3]) ; B, échantillon sanguin avec de très nombreuses cellules ininterprétables (*F cells*) et C, supplémenté avec de vraies cellules fœtales.

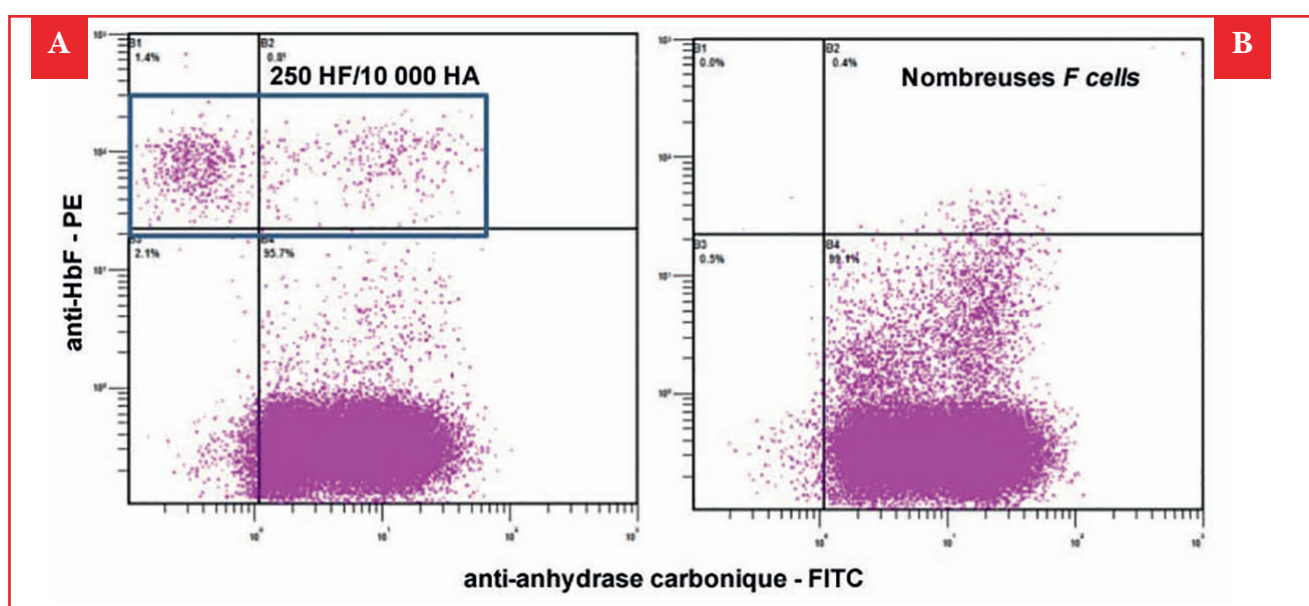


Fig 10.- Analyse de sang maternel par cytométrie en flux, avec double marquage des érythrocytes par un anticorps anti-HbF conjugué à la phycoérythrine (PE) et un anticorps anti-anhydrase carbonique (AC) conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Fetal Cell Count™).

A, test de Kleihauer positif (250 HF/10 000 HA), avec de vraies hématies fœtales HbF⁺AC⁺ ; B, test de Kleihauer avec de nombreuses cellules ininterprétables (*F cells*) HbF⁺AC⁺, sans hématies fœtales HbF⁺AC⁺.

deux kits sont commercialisés : d'une part FMH Quik-Quant™ avec un marquage unique de l'HbF (Figure 9) (15) et, d'autre part, Fetal Cell Count™ avec un double marquage HbF/AC (Figure 10), très utile en cas de fort taux d'HbF chez la mère. En effet, l'anhydrase carbonique (AC) étant un marqueur des hématies adultes, elle permet de mieux distinguer les vraies hématies fœtales HbF⁺AC⁺ des *F cells* HbF⁺AC⁺ (16).

La cytométrie en flux est une bonne alternative au test de Kleihauer effectué sur frottis sanguin, avec une meilleure répétabilité et reproductibilité (17). Cependant, cette méthode est assez peu adaptée à l'urgence que requiert le test Kleihauer d'intérêt fœtal. La limite de sa sensibilité est fixée à 5 HF/10 000 HA. Le mar-

quage BRAD3 est une technique simple et rapide, mais il est limité à la prophylaxie de l'allo-immunisation RhD chez la patiente RH:-1. Au CNRHP, nous l'appliquons en seconde intention en cas de nombreuses *F cells*, d'absence de négativation du test Kleihauer suivant l'administration d'IgRh, lors d'un passage > 25 HF/10 000 HA dans un contexte anténatal afin de s'abstenir d'injecter de multiples doses d'IgRh chez une patiente enceinte d'un fœtus RH:-1, et enfin à l'accouchement de jumeaux dont l'un est RH:1 et l'autre RH:-1 avec une valeur du test de Kleihauer > 25 HF/10 000 HA pour définir lequel des deux a saigné. Le marquage HbF ou HbF/AC, bien que laborieux, présente l'avantage d'être applicable pour toutes ces situations.

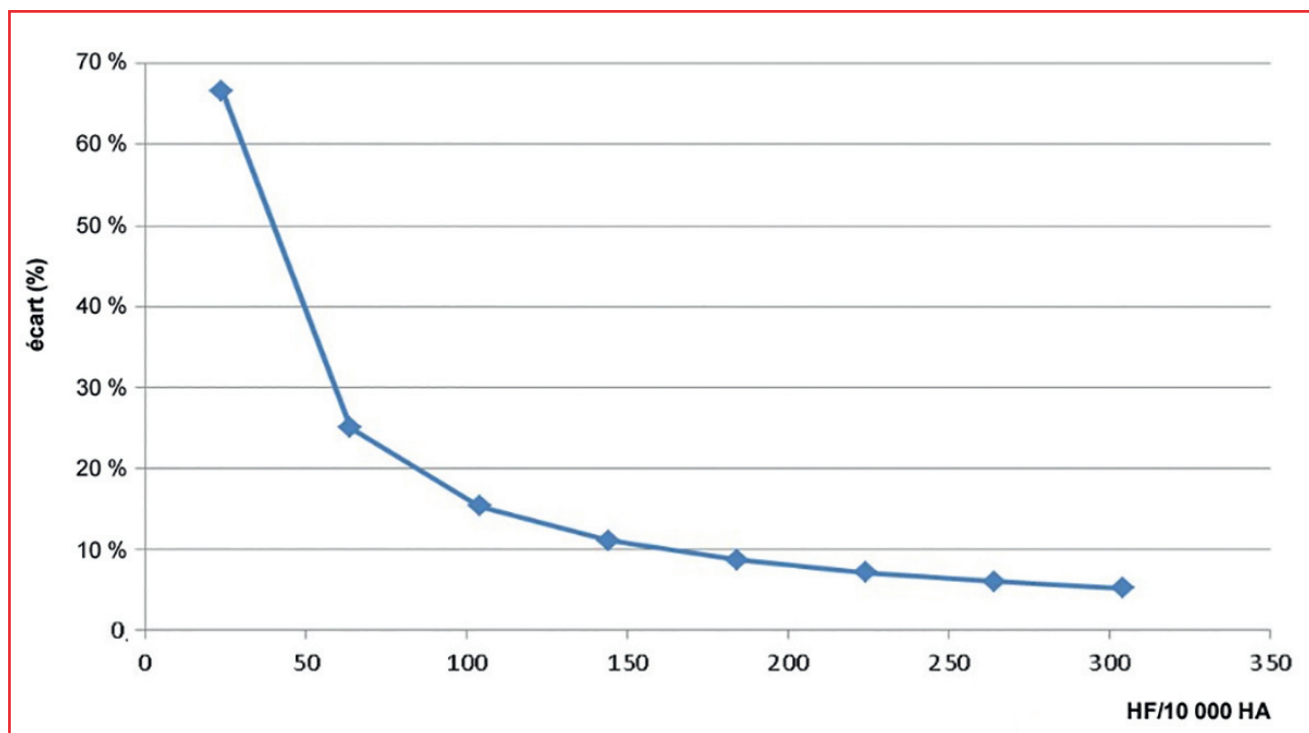


Fig 11.- Test de Kleihauer : CV acceptables en fonction du nombre de cellules observées sur frottis sanguin.

D) Apport de la vérification de méthode sur le test de Kleihauer

Le test Kleihauer est connu pour sa grande variabilité et son manque de reproductibilité, mais aucun CV acceptable n'est défini : il diffère d'une publication à l'autre selon le type de comparaison, intra-laboratoire (allant de 10 à 40 %) ou inter-laboratoire (parfois > 100 %), et est également fonction du niveau des échantillons testés.

Au CNRHP, nous avons choisi un CV compatible avec la pratique clinique et notamment avec la prophylaxie Rhésus. En effet, il doit permettre une bonne adaptation de la posologie d'immunoglobulines spécifiques, avec une administration minimale de 20 µg d'Ig anti-D/mL de globules rouges RH:1 pour une prophylaxie *ad hoc*. Ainsi, nous avons défini des CV limites en fonction du niveau des échantillons testés en utilisant l'abaque d'adaptation posologique du Rhophylac® (18) : 200 µg d'immunoglobulines spécifiques couvrent jusqu'à 24 HF/10 000 HA, puis 20 µg par tranche de 4 HF/10 000 HA. Un test de Kleihauer dont la valeur est de 24 HF/10 000 HA équivaut à 6 mL de globules rouges RH:1 s'il faut 20 µg d'anticorps anti-D/mL de globules rouges RH:1 pour une prophylaxie suffisante, au total, 120 µg sont donc nécessaires. Or, nous injectons 200 µg, soit 80 µg additionnels. Cet abaque est donc calculé avec une légère surestimation des doses pour une efficacité maximale couvrant 16 HF/10 000

HA supplémentaires, et sur lequel nous nous sommes fondés pour établir des écarts acceptables (Figure 11).

Par ailleurs, le calcul de l'incertitude de mesure, propre à chaque laboratoire, facilite la mise en place de règles de comptages adaptées afin de répondre aux exigences de performances. Au CNRHP, l'incertitude de mesure calculée selon la méthode CIQ/EEQ était de 53,5 %, 36,5 % et 20 % respectivement pour des valeurs de 5 HF, 25 HF et 200 HF pour 10 000 HA correspondant aux CV acceptables définis précédemment. Pour réduire cette incertitude, toute valeur supérieure à 5 HF/10 000 HA doit être contrôlée sur un deuxième frottis sanguin et par un second opérateur quand elle est supérieure à 25 HF/10 000 HA. Le résultat final est la moyenne des deux comptages. En cas de discordance supérieure au seuil de décision, un troisième frottis est examiné. De plus, des tests de Kleihauer de contrôle sont demandés afin d'évaluer la cinétique des HFM.

La méthode de comptage pratiquée au CNRHP, très standardisée, est la suivante :

Le frottis sanguin est scruté au microscope optique, avec un objectif x20 et deux oculaires périplans x10 M, dont un muni d'un quadrillage (100 petits carreaux). Une lecture de 10 champs consécutifs est un minimum afin de compter au moins 10 000 HA. Dans chaque champ, on compte le nombre d'hématies fœtales observées dans tout le quadrillage, soit X la somme totale

Tableau I - Posologie d'immunoglobulines (Ig) anti-D selon le volume de l'HFM estimé par le test de Kleihauer.

HF/10 000 HA	Rhopylac® 200		Rhopylac® 300		Voie d'administration
	Nombre de doses	Quantité (µg) d'Ig	Nombre de doses	Quantité (µg) d'Ig	
0-4	1	200	1	300	Intraveineuse directe
5-24	1	200	1	300	
25-44	2	400	1	300	
45-64	2	400	2	600	Perfusion intraveineuse lente (4 h) Rhopylac® dilué dans 250 mL de NaCl à 0,9 %
65-84	3	600	2	600	
85-104	3	600	2	600	
105-124	4	800	3	900	
125-144	4	800	3	900	
145-164	5	1000	3	900	
165-184	5	1000	4	1200	
185-204	6	1200	4	1200	
205-224	6	1200	4	1200	
225-244	7	1400	5	1500	
245-264	7	1400	5	1500	
265-284	8	1600	5	1500	
285-304	8	1600	6	1800	

des HF pour les 10 champs observés. On dénombre, dans chaque champ, les hématies adultes présentes dans 4 petits carreaux du quadrillage, soit Y la somme totale des HA sur les 10 champs ; cette valeur sera multipliée par 25 afin d'obtenir la valeur totale des HA pour 100 petits carrés.

On constate souvent une surestimation du test de Kleihauer en raison d'une sous-estimation du nombre d'hématies adultes. Afin de minimiser ce souci, il convient d'utiliser un oculaire muni d'un quadrillage. Il faut prêter attention aux hématies adultes situées à cheval sur les bords du quadrillage et de ne pas toutes les compter (seulement 2 bords sur 4) sous peine de surestimer leur nombre. Il est également important d'examiner suffisamment de champs pour dénombrer au moins 10 000 hématies adultes. En cas d'HFM importante, il est nécessaire d'effectuer une nouvelle coloration du frottis sanguin par la phloxine et un second comptage.

E) Apport d'un contrôle externe de qualité

Une évaluation externe de la qualité (EEQ) du test de Kleihauer est devenue impérative pour l'accréditation d'un laboratoire de biologie médicale. De plus, la réglementation et la norme obligent le biologiste à fournir une prestation de conseil associée au résultat. Depuis 2016, ASQUALAB a organisé, en collaboration avec le CNRHP, une EEQ comprenant deux échantillons sanguins (mélanges calibrés d'hématies fœtales et maternelles, avec une valeur cible) associés à un cas clinique et un quiz portant sur le risque fœtal, la

prophylaxie Rhésus et les examens complémentaires à réaliser.

Les différentes campagnes d'EEQ ont montré une surestimation du test de Kleihauer. Quant aux réponses relatives aux cas cliniques, même si la prophylaxie Rhésus est dans l'ensemble plutôt bien conseillée par les biologistes (70 à 95 % de bonnes réponses), on observe une hétérogénéité des pratiques concernant la demande d'examens complémentaires (10 à 95 % de réponses appropriées). Le risque fœtal est également mal apprécié (30 à 75 % de réponses appropriées). On constate cependant de meilleurs résultats, depuis 2019, liés à l'utilisation d'un oculaire quadrillé et au recours à l'EEQ pour l'habilitation des techniciens dans un tiers des laboratoires. Quant à la prestation de conseil, l'EEQ a permis son amélioration pour la moitié des laboratoires, principalement sur la demande de contrôle du test et sur l'évaluation du risque fœtal (19).

V. - TEST DE KLEIHAUER POSITIF ET CONSEILS DE PRISE EN CHARGE D'UNE PATIENTE RH:-1

Pour la patiente n'ayant pas accouchée, il est nécessaire d'adapter la posologie du Rhophylac® à partir de 25 HF/10 000 HA si le statut RH1 du fœtus est inconnu ou si le fœtus a été génotypé *RHD* positif (Tableau I). À partir de 5 HF/10 000 HA, la réalisation d'un test de Kleihauer est recommandé, d'une part avant l'injection d'immunoglobulines spécifiques pour s'assurer de l'absence d'une erreur de

comptage cellulaire ou de relargage d'hématies fœtales supplémentaires et, d'autre part, 24 heures après l'injection afin d'attester de sa négativation et donc de garantir l'efficacité de la prophylaxie. En cas de fort passage d'hématies fœtales (> 100 HF/ 10 000 HA), le contrôle post-injection peut être fait 48 heures après.

Pour la patiente à l'accouchement ou bien dans les contextes de mort fœtale *in utero* et d'interruption médicalisée de grossesse, la posologie du Rhophylac® doit également être adaptée à partir de 25 HF/10 000 HA si le nouveau-né est RH:1 ou en cas de génotypage *RHD* fœtal positif pendant la grossesse (Tableau I) (18). Là encore, à partir de 5 HF/10 000 HA, le test de Kleihauer doit être contrôlé avant l'injection du Rhophylac® et 24 heures après (48 heures en cas de fort passage). Une recherche d'agglutinines irrégulières 6 mois après l'accouchement est HF/10 000 HA afin de s'assurer que la patiente ne s'est pas immunisée. Si ce contrôle est trop précoce, un anticorps « immun » pourrait être masqué par la persistance des anticorps anti-RH1 injectés.

Si le test de Kleihauer reste positif 24 ou 48 heures après l'injection de Rhophylac®, il faut en établir la cause afin d'évaluer la nécessité d'administrer à la patiente une dose supplémentaire d'IgRh. En cas d'élimination d'hématies fœtales ralentie, réelle ou apparente, les causes sont multiples :

- Une femme RH:1 considérée à tort comme RH:-1 ou possédant un variant RH1 partiel : dans cette situation, le Rhophylac® se fixe sur les hématies propres à cette femme, diminuant ainsi la fraction libre des IgRh destinée aux hématies fœtales,
- Un enfant RH:-1 considéré à tort comme RH:1 : ce cas peut être observé si on se base sur le résultat du génotypage *RHD* fœtal et concerne le plus souvent les enfants possédant un variant silencieux du gène *RHD* (génotype positif, mais phénotype RH:-1). Cette particularité peut être vérifiée soit en réalisant un phénotypage RH1 chez le nouveau-né ou en cas d'impossibilité, par cytométrie en flux avec un marquage BRAD3 des hématies fœtales,
- Un enfant avec un variant RH1 affaibli,
- Une HFM initialement sous-estimée, en raison d'une erreur de comptage, d'un prélèvement sanguin réalisé trop tôt (avant les 24 ou 48 heures), d'une entrée différée de globules rouges fœtaux dans la circulation maternelle après la césarienne, d'où l'importance des tests de Kleihauer de contrôle.
- La chronicité de l'HFM, avec un passage continu d'hématies fœtales, qui nécessite l'ajout de doses complémentaires le cas échéant,

- Une élimination ralentie, si la posologie du Rhophylac® n'a pas été respectée (injection non faite ou limitée à une dose au lieu de plusieurs prescrites, intramusculaire au lieu d'intraveineuse).
- Une grossesse multifœtale, l'un RH:1 et l'autre RH:-1 ; si seul le fœtus RH:-1 saigne, le test Kleihauer ne se négativera pas lors des contrôles suivant l'injection de Rhophylac®. Là encore, la cytométrie en flux peut être un apport diagnostique afin de caractériser le phénotype RH1 des hématies fœtales trouvées dans le sang maternel.
- Une femme splénectomisée chez laquelle l'élimination des hématies fœtales est plus lente, ou traitée par IgIV (présence d'anticorps anti-idiotypiques neutralisant les IgRh ou bien saturation des récepteurs au fragment Fc des macrophages ralentissant l'élimination des complexes immuns globules rouges/IgRh).

Cas de la patiente RH1 partiel

Une femme RH1 partiel doit être considérée comme RH:-1 puisqu'elle peut s'immuniser contre les régions de la molécule RhD qu'elle ne possède pas et dans ce contexte, elle est candidate à la prophylaxie Rhésus. Il est souvent nécessaire de recourir à des doses plus importantes d'IgRh pour obtenir la négativation du test de Kleihauer en raison de leur fixation sur la majeure partie des hématies de la patiente. On observe d'ailleurs, chez ce type de patiente, un test direct à l'antiglobuline (anciennement test de Coombs direct) positif. Cette situation peut être illustrée par le cas de Mme A, RH1 partiel de type weak D 4.0, dont le test de Kleihauer déterminé lors de l'accouchement était positif (44 HF/10 000 HA). Sa négativation n'a pu être obtenue qu'après administration intraveineuse de 6 doses d'IgRh (200 µg) au lieu de 2 pour une patiente RH:-1 (20). Chez ce type de patientes, le contrôle du test de Kleihauer 24 heures après l'injection d'immunoglobulines spécifiques est donc essentiel.

VI. - TEST DE KLEIHauer POSITIF ET CONSEILS DE PRISE EN CHARGE D'UNE PATIENTE RH:1

Chez une patiente RH:1 pour laquelle un test de Kleihauer est positif, aucun traitement n'assure l'élimination rapide des hématies fœtales, qui persisteront alors plusieurs semaines, voire mois, dans la circulation maternelle. Il est donc important de réaliser des tests de contrôle toutes les 24 heures, au moins trois fois, étant donné la variabilité importante de l'analyse. Cette série de tests permet d'établir une cinétique d'évolution de l'HFM. Une HFM aiguë sera révélée par des valeurs HF/10 000 HA stables, tandis qu'une HFM chronique se traduira par des valeurs

croissantes. Une recherche des agglutinines irrégulières, dans les 2 à 3 mois, est également recommandée, car il existe un risque d'allo-immunisation maternelle par les hématies fœtales vis-à-vis d'autres antigènes que RH1.

VII. - CONCLUSION

Le test de Kleihauer, dont l'indication la plus fréquente en Île-de-France est la prophylaxie de l'allo-immunisation RhD, est largement prescrit en

urgence devant tout signe évocateur d'une souffrance fœtale ou dans un contexte de risque élevé d'HFM. Il permet ainsi d'optimiser la prise en charge médicale d'une patiente et du nouveau-né. Face à l'hétérogénéité de son exécution et de son interprétation et de la prestation de conseil en résultant, il a paru opportun au CNRHP d'apporter son expérience pour plus d'harmonisation afin de proposer aux cliniciens un test robuste auquel ils peuvent se fier pour la détection et le suivi d'une HFM.

Conflit d'intérêts : aucun

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Kleihauer E, Braum H, Betke K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear (in German). *Klin Wochenschr* 1957 ; **35** : 637-8.
- (2) Raafat A, Fraser N, Main R, Urbaniak SJ. A quality assurance scheme for the Kleihauer test : the Scottish experience 1988-1996. *Transfusion Med* 1997 ; **7** : 221-6.
- (3) Duckett JR, Constantine G. The Kleihauer technique : an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? *Br J Obstet Gynaecol* 1997 ; **104** : 845-6.
- (4) Corsetti JP, Cowles JW, Cox MT, Blumberg N. A rapid and accurate single-drop modification of the acid-elution technique for detecting fetomaternal hemorrhage. *Vox Sang* 1988 ; **54** : 39-42.
- (5) Huguet-Jacquot S, Vassault A, Plantier A, Oudin O, Brument A, Zerr V, *et al.* Bilan de la mise en place d'un programme d'évaluation externe de la qualité pour le test de Kleihauer. XXVIII^e congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, P-087. *Transfus Clin Biol* 2017 ; **24** (Suppl) : 348.
- (6) Corcoran D, Murphy D, Donnelly JC, Ainle FN. The prevalence of maternal F cells in a pregnant population and potential overestimation of foeto-maternal haemorrhage as a consequence. *Blood Transfus* 2014 ; **12** : 570-4.
- (7) Vaubourdolle M, Alvarez JC, Barbé F, Beaudeau JL, Boissier E, Caillon H, *et al.* Biologie d'urgence : les recommandations 2018 de la SFBC. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018 ; **76** : 23-44.
- (8) Huguet-Jacquot S, Toly-Ndour C, Jouannic JM, Cortey A, Carbonne B, Mailloux A. Tests de Kleihauer adressés au CNRHP : analyse rétrospective des pratiques en Île-de-France. XXVI^e congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine. *Transfus Clin Biol* 2015 ; **22** (Suppl) : 209
- (9) Athiel Y, Maisonneuve E, Bléas C, Maurice P, Cortey A, Toly-Ndour C, *et al.* Reduced fetal movement during pregnancy : is the Kleihauer-Betke test really useful? *J Gynecol Obstet Hum Reprod (Paris)* 2020 ; **49** : 101748.
- (10) Lemaitre J, Planche L, Ducarme G. Systematic Kleihauer-Betke test after external cephalic version for breech presentation : is it useful? *J Clin Med* 2020 ; **9** : 2053.
- (11) Huissoud C, Divry V, Rudigoz RC. Hémorragie fœtomaternelle : le point de vue du clinicien. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2009 ; **38** : 286-97.
- (12) Toly-Ndour C, Huguet-Jacquot S, Da Silva N, Taibi L, Maisonneuve E, Cortey A, *et al.* Actualités sur le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte. 60^e Journées Internationales de Biologie Médicale (2016) ; communication orale
- (13) Little BH, Robson R, Roemer B, Scott CS. Immunocytometric quantitation of foeto-maternal haemorrhage with the Abbott Cell-Dyn CD4000 haematology analyser. *Clin Lab Haematol* 2005 ; **27** : 21-31.
- (14) Lloyd-Evans, Kumpel BM, Bromelow I, Austin E, Taylor E. Use of a directly conjugated monoclonal anti-D (BRAD-3) for quantification of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Transfusion* 1996 ; **36** : 432-7.
- (15) Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion* 1998 ; **38** : 749-56.
- (16) Porra V, Bernaud J, Guéret P, Bricca P, Rigal D, Follea G, *et al.* Identification and quantification of fetal red blood cells in maternal blood by a dual-color flow cytometric method : evaluation of the Fetal Cell Count kit. *Transfusion* 2007 ; **47** : 1281-9.
- (17) Fernandes BJ, von Dadelszen P, Fazal I, Bansil N, Ryan G. Flow cytometric assessment of foeto-maternal hemorrhage; a comparison with Betke-Kleihauer. *Prenat Diagn* 2007 ; **27** : 641-3.
- (18) Cortey A, Brossard Y. Prevention of foeto-maternal Rhesus-D allo-immunization. Practical aspects. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2006 ; **35** : S123-30.
- (19) Huguet-Jacquot S, Vassault A, Oudin O, Toly-Ndour C, Delaby H, Vaubourdolle M, *et al.* Évaluation externe de la qualité pour le test de Kleihauer, une aide à la prestation de conseil. XXIX^e congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, CL-10. *Transfus Clin Biol* 2019 ; **26** (Suppl) : 93
- (20) Delaby-Fekkar H, Huguet-Jacquot S, Bourtafa N, Toly-Ndour C, Mailloux A. Prise en charge des hémorragies fœtomaternelles à l'accouchement chez des patientes RH1 partiel : à propos de 3 cas. XXIX^e congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, P-078. *Transfus Clin Biol* 2019 ; **26** (Suppl) : 59.