

AIX MARSEILLE UNIVERSITE

Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

LE DIAGNOSTIC DES HEMORRAGIES FOETO-MATERNELLES

Présenté et publiquement soutenu

Le 16 Avril 2018

Par

GAUCHER Julie
Née le 08 Août 1994

Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Sage-Femme
Année universitaire 2017/2018

Membres du jury :

- BALZING Marie-Pierre, Directrice du département de formation initiale de l'EU3M, sage-femme enseignante
- COMTE Florence, sage-femme enseignante
- PONS Anne-Laure, sage-femme praticienne, centre hospitalier du pays d'Aix

AIX MARSEILLE UNIVERSITE

Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée

LE DIAGNOSTIC DES HEMORRAGIES FOETO-MATERNELLES

GAUCHER Julie
Née le 8 Août 1994

Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme d'état de Sage-Femme

Année universitaire 2017-2018

Validation 1ère session 2018 :		**oui** □	**non** □
Mention :	Félicitations du Jury	□	
	Très bien	□	
	Bien	□	
	Assez bien	□	
	Passable	□	
Validation 2ème session 2018 :		**oui** □	**non** □
Mention :			

Visa et tampon de l'école

LE DIAGNOSTIC DES HEMORRAGIES FOETO-MATERNELLES

Revue de la littérature

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce mémoire, et en particulier :

Ma directrice de mémoire, Marie Pierre Balzing d'avoir accepté de diriger ce travail, de m'avoir consacré autant de temps et de m'avoir apporté tous ses précieux conseils.

L'ensemble des enseignants de l'Ecole Universitaire de Maïeutique Marseille Méditerranée pour la qualité des enseignements fournis tout au long de ce cursus.

Ma famille pour leur soutien sans faille depuis toujours.

Mes parents pour leur amour, leur patience, pour tout ce qu'ils m'ont inculqué et sans qui je ne serais pas là où j'en suis.

Mon frère et ma sœur pour m'avoir changé les idées si souvent.

Mes amis savoyards pour leurs encouragements et leur présence depuis le début.

Ma sage-fem'ily, mes acolytes depuis quatre ans pour leur amitié dans les bons comme dans les mauvais moments et sans qui rien n'aurait été pareil.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS *1*

INTRODUCTION A L'ETUDE *2*

MATERIELS ET METHODES *6*

RESULTATS *11*

ANALYSE ET DISCUSSION *27*

CONCLUSION *38*

GLOSSAIRE *40*

BIBLIOGRAPHIE *41*

ANNEXES *45*

AVANT-PROPOS

Madame G, s'est présentée à la maternité pour des contractions utérines douloureuses. Il s'agissait d'une primipare à 41 semaines d'aménorrhée ayant mené une grossesse d'évolution normale et sans antécédents notables.
Le fœtus était en présentation du siège décomplété mais la patiente présentait un bassin normal à la scanno-pelvimétrie et le fœtus était eutrophe : la voie basse a donc été acceptée.

L'examen général et obstétrical à l'entrée n'exposait aucune particularité et l'analyse du rythme cardiaque fœtal (RCF) s'est avérée strictement normale.

Le travail s'est déroulé physiologiquement : travail spontané, constantes maternelles normales, dilatation harmonieuse, présentation caudale bien accommodée et sans anomalies du RCF jusqu'à dilatation complète.
La pose d'une perfusion d'ocytocine a été effectuée en fin de travail.

Des anomalies du RCF sont apparues à dilatation complète avec une présentation caudale en voie d'engagement, à type de ralentissements variables typiques dont certains étaient plus sévères (profonds et atypiques 4).

Un peu plus d'une heure après le début de la dilation complète, la patiente a débuté les efforts expulsifs qui ont duré 30 minutes. L'accouchement, après manœuvres de Lovset et de Bracht, a été effectué sans difficulté.

L'enfant est né en état de mort apparente avec un poids de 2700g. Très hypotonique, il présentait une pâleur importante. Un choc hypovolémique a été diagnostiqué nécessitant une réanimation néonatale lourde : intubation, ventilation, massage cardiaque externe, pose de cathéter veineux ombilical et remplissage vasculaire.
La mesure du pH et des lactates au sang du cordon n'a pas pu être réalisée (cordon exsangue).
Au vu de l'état néonatal, un test de Kleihauer a été réalisé par prélèvement sanguin à la mère. Il s'est avéré positif à 40mL soit 80 hématies fœtales pour 10 000 hématies maternelles, permettant de poser le diagnostic d'hémorragie fœto-maternelle.
Les examens pratiqués en soins intensifs ont révélé un électroencéphalogramme pathologique et une leucomalacie.

INTRODUCTION A L'ETUDE

Une hémorragie fœto-maternelle (HFM) ou transfusion fœto-maternelle est définie par le passage d'hématies fœtales dans la circulation sanguine maternelle.

La physiopathologie d'une HFM est mal connue. En effet, il s'agit d'un évènement souvent imprévisible, sans facteur déclenchant évident dans la plupart des cas.
Parfois, certaines étiologies sont retrouvées comme les traumatismes abdominaux, les versions par manœuvre externe (VME), les contextes obstétricaux particuliers (fausses couches, grossesses extra-utérines, …) ou même l'accouchement. [1]
Elles peuvent présenter des formes cliniques et paracliniques très variées.

En période anténatale, les signes cliniques maternels sont inconstants et non spécifiques. La diminution des mouvements actifs fœtaux (MAF) est le signe clinique le plus fréquemment observé mais il a aussi été constaté dans certains cas : une anasarque foeto-placentaire, des modifications pathologiques du rythme cardiaque fœtal (RCF) (tachycardie fœtale, diminution des oscillations ou ralentissements inexpliqués, tracé sinusoïdal) ou encore dans les HFM massives une mort fœtale in utero (MFIU). La sensibilité de ces signes étant médiocre, le diagnostic des HFM est essentiellement biologique.

L'importance de l'HFM conditionne le pronostic fœtal. Dans les cas les plus graves, elles peuvent conduire au décès périnatal ou à des séquelles d'intensité variable étroitement corrélées à l'importance de l'anémie engendrée (par exemple : anasarque, lésions neurologiques fœtales hypoxiques, …). [2]

Les circonstances diagnostiques sont donc très variées et dépendent de l'importance des conséquences maternelles et fœtales.

Il n'existe pas de seuil consensuel permettant de classer la sévérité des HFM par rapport au volume d'hématies fœtales transfusé.

Des chercheurs ont suspecté ce phénomène dès le XVIIIème siècle mais il n'a été démontré que dans les années 50. S'en sont suivis les travaux de E. Kleihauer et K.Betke qui ont mis au point en 1957 le test de Kleihauer-Betke (TK) permettant d'identifier les globules rouges fœtaux circulant dans le sang maternel. [1,2]

Ce test ancien reste encore aujourd'hui l'examen de référence pour diagnostiquer les HFM.

Le TK est un test microscopique et cytochimique sur frottis sanguin. Les hématies adultes et fœtales sont exposées à une solution acide puis les lames sont colorées. Les hématies sont classées grâce à leur différence de solubilité en milieu acide. [1,3]

En effet, les hématies adultes sont dénaturées par cette solution alors que les hématies fœtales lui sont résistantes. Après coloration, les hématies fœtales peuvent ainsi être comptées et le résultat est rapporté à 10 000 hématies adultes (HF/10 000 HA). [1,3]

Cependant, le TK est une technique souvent controversée, sa fiabilité est discutée. Il s'agit d'une technique mal standardisée et manuelle, les hématies sont comptées par l'opérateur à l'aide d'un microscope, ce qui peut engendrer une source d'erreur non négligeable.

En ce qui concerne le compte des hématies positives, le fait de les rapporter à 10 000 hématies adultes revient à faire une estimation d'un certain champ de la lame choisi par le lecteur. C'est pourquoi ce décompte est très observateur-dépendant et possède une reproductibilité médiocre. De ce fait, la justesse des résultats positifs est discutable.

Dans certains cas, l'interprétation du TK est délicate, de part la présence d'hématies maternelles contenant un taux élevé d'hémoglobine fœtale (HbF). Les hématies sont dans ce cas d'une couleur « intermédiaire » et il faut alors faire la différence entre un dégradé de coloration correspondant à des hématies fœtales ou à des hématies maternelles contenant un taux élevé d'HbF. Il est donc nécessaire que l'opérateur soit expérimenté. Malgré cela, il peut y avoir des résultats positifs faussement élevés, comme le montre la grande variabilité des résultats des contrôles inter-laboratoires. [1]

Parallèlement, ce test est de plus en plus prescrit par les praticiens étant donné qu'il est inscrit dans les examens complémentaires recommandés par le CNGOF dans le contexte de la prévention de l'alloimmunisation foetomaternelle. [3]

Le diagnostic des HFM demeure difficile. Actuellement, de nouveaux tests diagnostiques sont en cours de développement et d'optimisation afin d'améliorer la prise en charge des HFM et leur détection.

La cytométrie en flux (CMF) fait notamment partie de ces nouveaux tests. Initialement prévue pour étudier la population leucocytaire, c'est une méthode qui permet la mesure simultanée et individuelle de plusieurs caractéristiques physiques et biologiques d'une cellule en suspension dans un liquide. Cette technique peut servir notamment à estimer une population moyenne étudiée mais aussi à identifier d'éventuelles sous-populations de cellules. [4]

Pour pouvoir fonctionner, le cytomètre en flux combine plusieurs technologies (Annexe I) [5]: fluidique, optique, électronique et informatique.

Les cellules sont poussées par un système de pompe et envoyées devant un faisceau laser qui permet de mesurer ou d'évaluer certains paramètres cellulaires (taille, granularité définie par rapport à la complexité de la cellule étudiée, fluorescence dont l'intensité de chaque signal est dépendant des propriétés des cellules). Elles défilent alors chacune leur tour à vitesse élevée devant une source lumineuse. Les appareils sont reliés à un ordinateur lequel enregistre les données et affiche les résultats de mesure. [6]

Les cellules doivent être préalablement marquées par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes : les colorants fluorescents les plus utilisés sont FITC (isothiocyanate de fluorescéïne) et PE (phycoérythrine). [7]

Cette technologie permet d'étudier rapidement plusieurs dizaines de milliers de cellules (10^4 cellules par seconde). C'est une technique analytique et préparative mais contrairement aux techniques microscopiques, il est impossible de réaliser une analyse morphologique de la cellule. [4]

La CMF se développe de plus en plus en hématologie. Différents anticorps sont utilisés pour caractériser les hématies fœtales au sein d'une population de cellules maternelles, comme par exemple, les anticorps anti-Rh1 qui définissent le statut Rhésus. Dans ce cas, cela limite l'utilisation aux mères Rh : -1 portant un fœtus Rh : +1. Secondairement, les anticorps anti-HbF se sont développés pour identifier les cellules fœtales. Il est également possible de réaliser un double marquage pour mieux distinguer les différentes populations (anticorps anti-Rh1 et anti-HbF ou anticorps anti-HbF et anhydrase carbonique (AC) normalement présente dans les hématies adultes). [7]

La mesure du pic systolique de vélocité (PSV) de l'artère cérébrale moyenne (ACM) par doppler fait également partie de ces méthodes exploitables pour le diagnotic des HFM. En effet, il s'agit d'un site de choix pour repérer l'accélération pathologique du flux sanguin observée dans les anémies fœtales. Cette augmentation du flux sanguin est due à la diminution de la concentration en O2, responsable d'une augmentation du débit cardiaque et ainsi une redistribution du flux sanguin vers le cœur et le cerveau. [8,9]

Ce test est un outil diagnostique et pronostique non invasif. La mesure est variable par rapport à l'âge gestationnel et est exprimée en MoM. Une anémie est considérée comme significative à partir de 1,5 MoM de PSV. Cet examen est cependant moins fiable à partir de 35 semaines d'aménorhée. [9]

De ce constat découle la question de recherche suivante : En quoi les nouveaux tests diagnostiques (notamment la CMF, le PSV-ACM, le dosage de l'α-foetoprotéine et le test d'agglutination) pourraient-ils représenter une alternative plus fiable que le test de Kleihauer pour le diagnostic des HFM ?

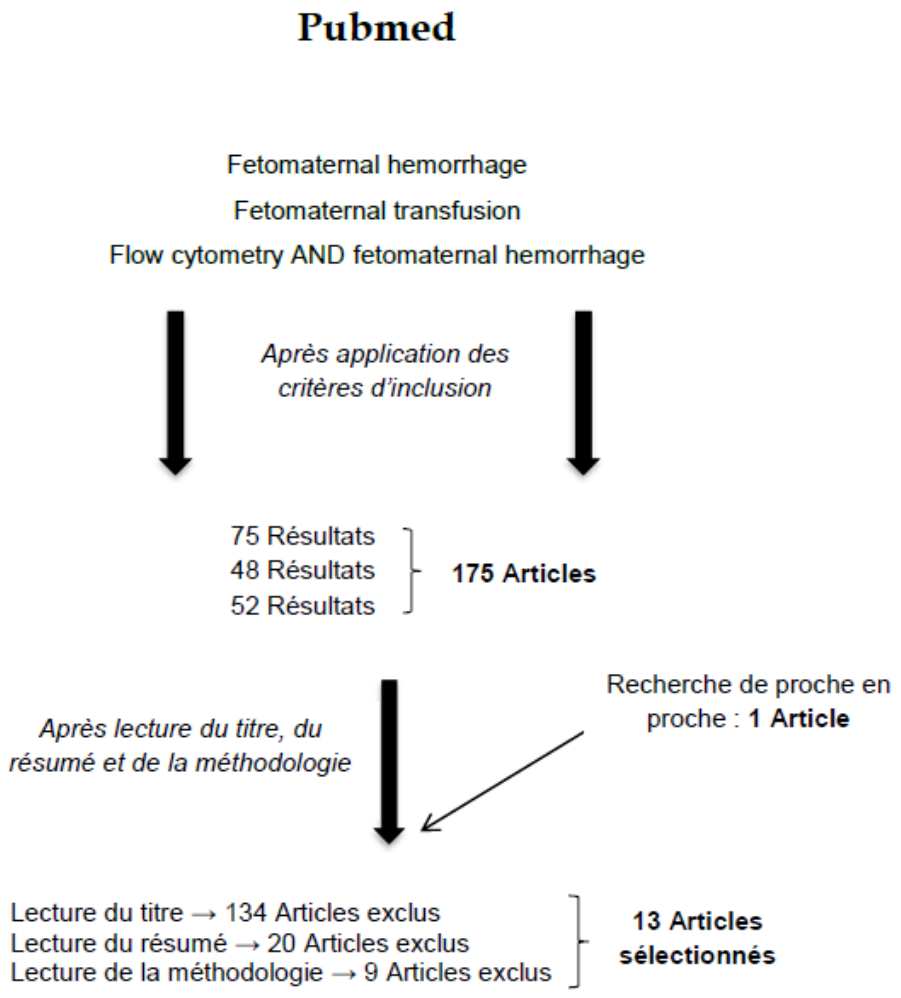
L'objectif de ce travail est de déterminer si les nouveaux tests diagnostiques peuvent représenter une alternative plus fiable que le TK pour le diagnostic des HFM.

Une revue de la littérature a été menée pour tenter de répondre à cette question.
Dans ce travail, l'utilisation du TK dans la prévention de l'allo-immunisation ne sera pas traitée.

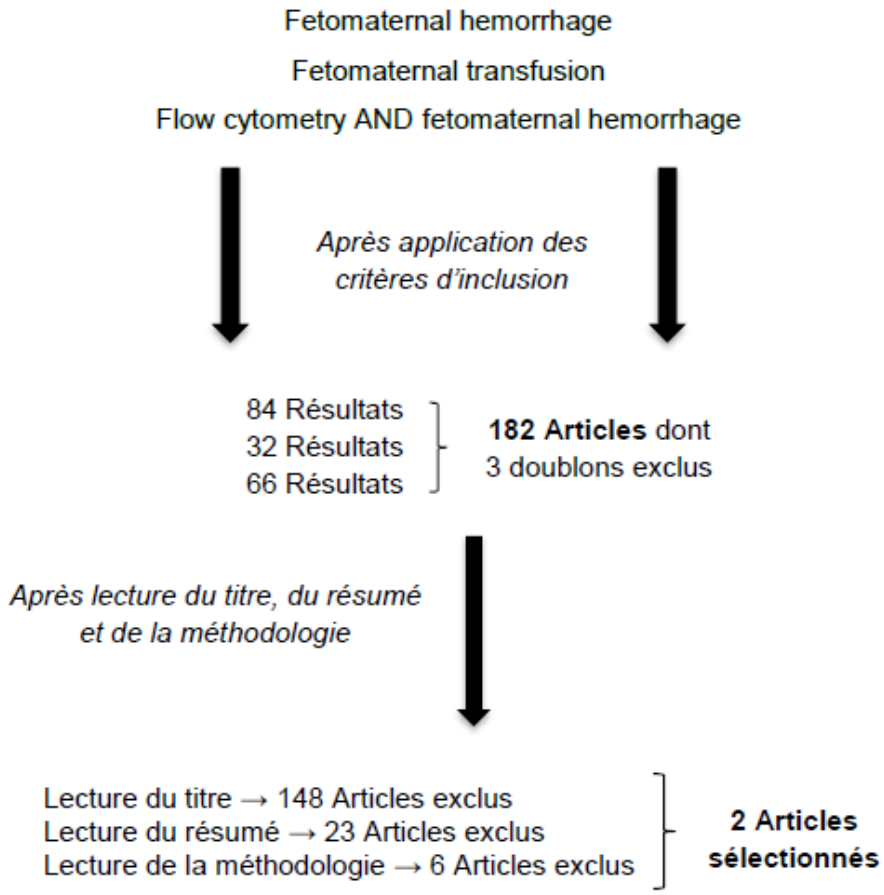
MATERIELS ET METHODES

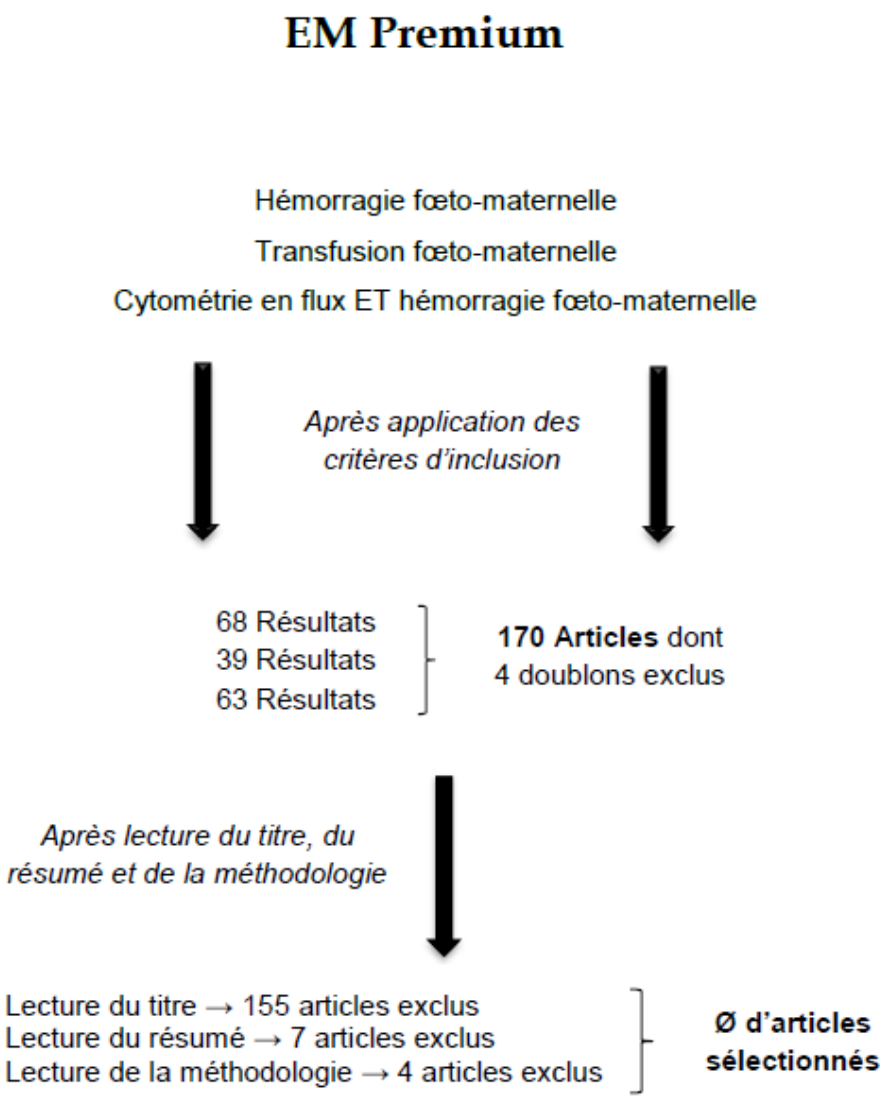
Une étude bibliographique par revue de la littérature scientifique a été menée pour répondre à l'objectif de recherche précédemment cité, à savoir : en quoi les nouveaux tests diagnostiques (notamment la CMF, le PSV-ACM, le dosage de l'α-foetoprotéine et le test d'agglutination) pourraient-ils représenter une alternative plus fiable que le test de Kleihauer pour le diagnostic des HFM ?

Les bases de données bibliographiques qui ont été interrogées sont : EM Premium, ScienceDirect et PubMed. Une recherche de proche en proche a également été réalisée à partir des articles sélectionnés afin de rendre la recherche la plus exhaustive possible.



Sciencedirect





Les mots clés utilisés pour cette recherche sont : « hémorragie fœto-maternelle », « transfusion fœto-maternelle », « cytométrie en flux », « cytométrie en flux ET hémorragie fœto-maternelle ». Les mêmes mots ont été utilisés pour la recherche en anglais. Différentes associations de ces mots clés ainsi que différentes orthographes ont été associées pour obtenir le plus de résultats possibles.

Les critères d'inclusion retenus sont :

- la langue d'écriture des articles : français et anglais,
- les articles traitant des HFM et des méthodes diagnostiques,
- les articles publiés à partir de l'année 2007, cette revue bibliographique faisant suite à un travail mené en 2006 par Stéphanie Cheutet.

Les critères de non-inclusion sont :

- une langue autre que celles précédemment citées,
- les articles antérieurs à l'année 2007, cette revue bibliographique faisant suite à un travail mené en 2006 par Stéphanie Cheutet,
- les articles payants.

Les critères d'exclusion sont :

- les articles avec résumé en anglais mais avec le texte complet dans une langue autre que le français ou l'anglais,
- les articles traitant uniquement de l'allo-immunisation et de la prophylaxie Rhésus.

La période de recueil des articles s'est étendue de Mars 2017 à Avril 2017.

Les articles ont été retenus à l'aide d'une grille de sélection tirée du guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) de 2000 (Annexe II). Dans un deuxième temps, une grille de lecture d'analyse des articles diagnostiques tirée du même document a été appliquée aux articles présélectionnés (Annexe III).

Chaque article a été analysé et il a été retenu :

- la référence de publication comprenant le nom de l'auteur principal, l'année de publication et le nom de la revue,
- les objectifs de l'étude,
- le type d'étude menée,
- les caractéristiques de la population étudiée,
- le ou les critères de jugement,
- les principaux résultats,
- les caractéristiques diagnostiques du test : sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive (VPP), valeur prédictive négative (VPN),
- les limites et biais de l'étude.

Il a également été évalué pour chaque article le niveau de preuve scientifique grâce au grade des recommandations soumis par l'ANAES (Annexe IV).

Dans la majorité des articles sélectionnés, le critère de jugement principal correspondait au coefficient de corrélation (noté « r » ou « r^2 »). Il s'agit d'un coefficient statistique qui permet de mettre en évidence une liaison entre deux types de séries de données statistiques. Il est compris entre +1 et -1. Plus ses valeurs sont proches de +1 plus la force de la relation entre les deux variables est grande (>0,95 : corrélation élevée). Il juge de la force de relation entre deux variables autrement dit de leur degré de dépendance. Une corrélation égale à +1 implique qu'il existe une relation linéaire positive entre les données étudiées. La « forte corrélation » de deux variables n'implique pas cependant qu'il y ait une relation de causalité entre elles (elles peuvent être corrélées à une troisième variable non mesurée). [11]

Le coefficient de variation (exprimé sous forme de pourcentage la plupart du temps) fait également partie des critères de jugement, il correspond au rapport de l'écart type à la moyenne. Plus sa valeur est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande. [12]

Les caractéristiques étudiées pour effectuer l'analyse d'un article diagnostique comprennent [13] :

- la sensibilité qui correspond à la probabilité que le test étudié soit positif si la personne est atteinte de la maladie. Il s'agit du nombre de vrais positifs divisé par le nombre total de personnes atteintes. Plus un test est sensible, moins il comporte de faux négatifs et mieux il permet, s'il est négatif, d'exclure la maladie.

- la spécificité qui correspond à la probabilité que le test soit négatif si la personne est indemne de la maladie. Il s'agit du nombre de vrais négatifs sur le nombre total de personnes indemnes de la maladie. Plus il est spécifique, moins il occasionne de faux positifs et mieux il permet, s'il est positif, d'affirmer la maladie.

- la valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif. Elle correspond au nombre de vrais positifs divisé par le nombre de personnes dont le test est positif.

- la valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif. Elle correspond au nombre de vrais négatifs divisé par le nombre total de personnes dont le test est négatif.

RESULTATS

Après interrogation des bases de données par les séries de mots clés précisées ci-dessus, il a été obtenu un grand nombre de résultats : 527 au total. De nombreux doublons ont été retrouvés sur les trois bases de données utilisées. Après élimination de ces derniers, il est resté 520 articles.

A l'issue de la première étape de sélection rapide, 84 articles ont été conservés après lecture du titre, 33 après lecture du résumé. Après lecture de la méthodologie et application de la deuxième procédure de sélection, 15 articles ont été finalement retenus.
Les 15 articles conservés sont présentés chacun sous forme de tableaux récapitulatifs, donnant une vision synoptique de l'étude et faciltant la compréhension du lecteur.

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2016 **A.Gielezynska** **International Journal of Laboratory Hematology** **[14]**	Rétrospective comparative Evaluation de 5 tests utilisant les mêmes échantillons pour le diagnostic des HFM : - 3 utilisant la CMF - 2 utilisant le TK	- 20 échantillons de donneurs RhD négatif pour évaluer la spécificité - 18 échantillons de donneurs RhD négatif - 18 échantillons de sang de cordon RhD positif → Préparation de mélanges simulant une HFM de 0,1 à 5% → Testés plusieurs fois dans la même journée pour évaluer la répétabilité - 14 échantillons de donneur D « faible » → Pour évaluer la spécificité des tests → Pour préparer 20 suspensions avec des hématies issues de 10 donneurs RhD positifs - 2 panels commerciaux de sang contrôlé examinés pendant 3 mois pour évaluer la reproductibilité - 98 échantillons de sang de femmes testés : 74 avant le travail et 2h après, 10 avant la naissance (dont 5 avant 40 semaines de grossesse) et 14 après le travail	Coefficient de corrélation	Coefficient de corrélation dans chaque test ≈1: - Anti-HbF+CA =0,993 - Anti-HbF =0,994 - Anti-D =0,997 - TK =0,982 · 1 cas : TK et CMF avec anti-HbF ininterprétable → taux élevé d'HbF maternelle · 13 cas : aucune hématie fœtale détectée · 81 cas : faibles HFM (0,15% soit moins de 3mL) · 3 cas : larges HFM (32, 56 et 77mL) · 2 cas : les fœtus présentaient une anémie sans détection d'HFM → infection au Parvovirus B9 et thalassémie TK comptant 2000 hématies : haut risque de fausse interprétation Pour les 4 autres tests : sensibilité et spécificité similaires Chaque test a ses avantages et ses inconvénients → Nécessité d'avoir une méthode de routine	Sensibilité non calculable pour chaque test Spécificité [0,00] pour 20 échantillons de donneurs : - CMF avec anti-HbF ≈ 0,022 - CMF avec anti-HbF + CA ≈ 0,020 - CMF avec anti-D ≈ 0,014 - Test de Kleihauer pour 10 000 hématies ≈ 0,049	4 Pas d'échantillon de populations particulières comme les hémoglobinopathies, les β thalassémies, … dans lesquelles il est retrouvé une persistance importante d'HbF CMF avec anti-D limitée aux patientes Rhésus négatif portant un fœtus Rhésus positif

Parution Auteur Revue	*Type et objectifs de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2007 **B-J. Fernandes** **Prenatal Diagnosis** **[15]**	Prospective randomisée · Evaluer le nombre d'hématies fœtales dans la circulation maternelle afin de quantifier le volume d'une éventuelle HFM · Améliorer la prévention de l'allo-immunisation Rhésus · Fournir une surveillance fœtale appropriée dans les HFM significatives → Comparaison du TK et de la CMF pour mesurer les HFM chez les patientes après une biopsie de trophoblaste → Détermination du volume de l'HFM par CMF et à l'aide de la mesure de l'α-foetoprotéine dans le sang maternel	200 femmes ont participé à un essai contrôlé et randomisé après une biopsie de trophoblaste : - 100 à l'aide d'une pince à biopsie - 100 à l'aide d'une canule d'aspiration 7mL de sang prélevé immédiatement après le geste et 60min post procédure 21 échantillons n'ont pas été analysés → délai dépassé pour l'analyse 9 n'ont pas été analysés → résultats du laboratoire indisponibles → Au total : 170 échantillons (87 aspirations + 83 pinces à biopsie)	Coefficient de corrélation	Coefficient de corrélation r^2=0,99 entre le TK et la CMF Pas de différence significative avant et après la procédure en utilisant les 2 méthodes Pas de corrélation entre la concentration en hématies fœtales et la mesure de l'α-foetoprotéine dans le sérum maternel (r^2=0,001) Résultats de la CMF comparables au TK même si celle-ci est plus facilement réalisable CMF plus sensible aux limites inférieures de détection des hématies fœtales Examens de biopsie de trophoblaste étudiés pas associés à un risque plus important d'HFM	Non calculées et non calculables	2 Peu de données chiffrées sur les résultats statistiques

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limite et biais*
2012 **E-A. Fong** **International journal of Laboratory Hematology** **[16]**	Rétrospective comparative Evaluer une nouvelle méthode pour la quantification des HFM : Trillium QuikQuant anti-HbF FITC kit, en comparaison d'une méthode existante : Millipore anti-HbF FITC method	67 échantillons de sang total de femmes RhD négatif (33 en anténatal et 34 en postpartum) 108 échantillons préparés avec un pourcentage connu d'hématies fœtales grâce à : - des échantillons de sang de cordon (20 échantillons) - des échantillons de donneurs RhD négatif (20 échantillons de sang masculin)	Coefficient de corrélation	Bonne corrélation entre les 2 méthodes et les valeurs attendues → Coefficient de corrélation = 0,99 Avec le test de Wilcoxon, Millipore anti-HbF FITC donne des résultats significativement plus élevés par rapport aux valeurs attendues et à celles du Trillium QuikQuant (respectivement P=0,0003 et P<0,0001) Avec le test de Bland-Altman qui montre s'il y a une différence éventuelle avec les résultats attendus : - 0,06% (Trillium) équivalent à 1,3mL - 0,13% (Millipore) équivalent à 2,8mL Millipore anti-HbF nécessite des étapes de lavage donc test plus long que le trillium QuikQuant	Non calculées et non calculables	4 Technique utilisant un anti-HbF pour distinguer les hématies mais la population étudiée ne prend en compte que les RhD négatifs Augmentation physiologique du taux d'hématies maternelles contenant de l'HbF pendant la grossesse et taux élévés chez les patients souffrant de pathologies héréditaires de l'hémoglobine (14 à 70%) : résultats faussés

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2007 **A.Agaylan** **Transfusion medicine** **[17]**	Rétrospective comparative Décrire et comparer au TK une nouvelle technique pour le diagnostic de routine des HFM : « FMH particle gel immunoassay (PaGIA) »	208 échantillons de sang collectés dans le post partum chez des femmes RhD négatif → Préparation d'échantillons avec l'ajout d'hématies de donneurs RhD positif avec des concentrations connues	Nombre d'hématies positives	· 203 échantillons sans HFM évidente · 1 HFM significative avec des résultats positifs dans les 2 tests · 2 patientes avec un TK élevé mais négatif avec FMF-PaGIA : 2 faux positifs dus à la persistance héréditaire d'HbF · 2 échantillons positifs avec FMF-PaGIA mais négatif avec le TK : Patiente s'étant révélée RhD positif Test capable de détecter des HFM ≥ 0,3% d'hématies RhD positif dans des échantillons de RhD négatif (pour 5µL) Sensibilité dépendante du volume total de sang à tester : peut être facilement adaptée pour détecter des volumes inférieurs 0,3% en augmentant le volume de sang à tester (à partir de 10µL)	Pas de données chiffrées Spécificité calculée = 99%	4 Test applicable uniquement chez les patientes RhD négatif portant un fœtus RhD positif

Parution Auteur Revue	*Type et objectifs de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2013 **L.Wong** **International journal of laboratory hematology** **[18]**	Prospective Proposer une nouvelle méthode « Probability state modeling approach » (PSM) pour quantifier le taux d'HbF par rapport au taux d'hématies fœtales (Basé sur GemStone® et FMH QuikQuant®) → Amélioration de la précision et la reproductibilité dans le diagnostic des HFM → Comparaison aux résultats des méthodes traditionnelles	200 échantillons : - 68 « FETALtrol® » (mixtures préparées) pour le contrôle positif - 132 échantillons de sang « humain » Analyse des 200 échantillons effectuée par des opérateurs différents pour évaluer la reproductibilité	· Coefficient de corrélation · Coefficient de variation	Pourcentages d'hématies fœtales allant de 0 à 24,9% Bonne corrélation entre les résultats générés par la méthode GemStone® PSM en comparaison de la méthode experte WinList® (r^2=0,9986) Coefficient de variation : - Analyse manuelle – intra analyste : 10,6% - Analyse manuelle – interanalyste : 22,6 % - GemStone PSM – intra analyste : 0 % - GemStone PSM – inter analyste : 0% Reproductibilité de 100% avec GemStone ® Comparaison du temps nécessaire entre la méthode « classique » et PSM : → WinList® pour 200 échantillons : 150min → Automated PSM analysis avec GemStone® : 16 min Coefficient de variation élevé dans certains cas car taux bas d'hématies fœtales (<0,03%) Si valeurs basses exclues, coefficient de variation diminué	Non calculées et non calculables	2 Biais non identifiés

Parution Auteur Revue	*Type et objectifs de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2016 **F. Bellussi** **Fetal Diagnosis and Therapy** **[19]**	Rétrospective Analyser le rôle de l'artère cérébrale moyenne et du pic systolique de vélocité dans la prédiction d'une HFM sévère et de le comparer avec les tests biophysiques existants	Cas inclus dans une étude rétrospective (hôpital universitaire de Bologne en Italie) de janvier 2011 à Décembre 2014 et revue de la littérature 35 femmes enceintes à 31 ± 5 semaines d'aménorrhée → 3 cas inclus avec l'étude menée : - Diminution des MAF + RCF non réactif avec des décélérations - Diminution des MAF + RCF sinusoïdal - Diminution des MAF + RCF non réactif → 32 cas inclus avec la revue de la littérature : - 12 cas de diminution des MAF - 10 cas de traumatisme maternel - 3 cas d'anasarque fœtal - 1 cas de contractions utérines - 1 cas d'élargissement de l'oreillette droite - 1 cas de STT - 4 cas récupérés d'une analyse rétrospective traitant des transfusions intra-utérines	Pic systolique maximal de l'artère cérébrale moyenne (MCA-PSV)	RCF décrit dans 27 cas : - 18 rythmes sinusoïdaux - 6 non réactifs - 2 avec des décélérations - 1 avec tachycardie MCA-PSV= 1,9±0,3 MoM (anémie significative à partir de 1,5MoM) HFM confirmée par TK dans 27 cas et par CMF dans 4 cas, par les 2 dans le dernier cas Césarienne réalisée dans les 32 cas répertoriés dans la littérature : - 1 mort fœtale - 1 mort néonatale - Transfusions in utero (TIU) dans 5 cas - Après la naissance dans 9 cas - TIU + après la naissance : 2 cas - 4 cas transfusés mais non répertoriés - 12 cas avec données non disponibles Age gestationnel moyen à l'accouchement 33±4 semaines d'aménorrhée Un seul cas avec des valeurs normales pour MCA-PSV mais valeur limite = 1,45 MoM ; >1,5 MoM dans tous les cas mais >2MoM dans 14 cas Bon indicateur d'une anémie fœtale sévère indépendamment de l'étiologie	Non calculées et non calculables MCA-PSV : un des meilleurs facteurs prédictifs de l'HFM, bonne sensibilité mais VPP faible → Nécessité d'un diagnostic sanguin maternel	4 Indicateur indirect L'anémie diagnostiquée n'est pas forcément due à une HFM

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2008 **A.Pourazar** **Iranian Biomedical Journal** **[20]**	Rétrospective comparative Evaluer une HFM dans une mixture artificielle avec différentes méthodes de CMF (anti-D et anti-HbF)	40 mélanges artificiels préparés avec des échantillons de sang adulte RhD négatif et des échantillons de sang de cordon fœtal RhD positif Echantillons préparés de manière à simuler 4 niveaux d'HFM : - 0,25% - 0,5% - 1% - 2%	Coefficient de corrélation (r^2)	Pourcentage d'hématies fœtales identifiées en comparant les 2 méthodes : · 0,25% HFM : - Anti-D = 0,305 ± 1,30 - Anti-HbF = 0,261 ± 7,081 · 0,5% HFM : - Anti-D = 0,5356 ± 1,24 - Anti-HbF = 0,496 ± 0,119 · 1% HFM : - Anti-D = 0,98 ± 4,6 - Anti-HbF = 0,878 ± 9,4 · 2% HFM : - Anti-D = 1,804 ± 0,20 - Anti-HbF = 1,48 ± 0,281 Méthode utilisant la CMF avec anti-D plus précise (r^2=0,9672) par rapport aux valeurs attendues par rapport à celle utilisant anti-HbF (r^2=0,8842)	Non calculées et non calculables	4 La méthode utilisant anti-D est applicable seulement aux femmes RhD négatif portant un fœtus RhD positif

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2011 **H. De Wit** **Hematopathology American Society for Clinical Pathology** **[21]**	Prospective Déterminer une moyenne de référence d'hématies fœtales dans la circulation maternelle pendant le dernier trimestre de grossesses non compliquées à l'aide de la CMF	Femmes enceintes recrutées par les sages-femmes : incluses si grossesses uniques ou gémellaires non compliquées à partir de 26 SA ou plus Critères d'exclusion : grossesses triples, traumatisme abdominal récent, chirurgie abdominale ou technique de diagnostic prénatal invasive, transfusion ou transfusion intra-utérine pendant cette grossesse Sang collecté : - 284 échantillons étudiés dans 4 laboratoires différents → 48 secondairement exclus pour des données manquantes ou problèmes dans les laboratoires → 236 finalement retenus	Coefficient de variation Coefficient de corrélation	Pour la qualité du contrôle interne des échantillons, les coefficients de variations entre les 4 laboratoires varient de 6,3% à 31,2% par rapport aux références établies par la CMF Le compte des hématies fœtales varie entre 0% et 0,50% Pas de corrélation entre le pourcentage d'hématies fœtales retrouvées et l'âge gestationnel (r=-0,096) Moyenne de référence d'hématies fœtales présentes dans la circulation maternelle pendant la 2ème partie de la grossesse établie à environ 0,125%	Non calculées et non calculables	2 Biais non identifiés

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2013 **B.M. Kumpel** **Transfusion Medicine** **Official Journal of The British Blood Transfusion Society** **[22]**	Prospective, comparative Comparer une HFM estimée par TK ou CMF pour 37 patients avec HFM massive, et identifier les facteurs de risques obstétricaux ou problèmes techniques rencontrés	38 échantillons de sang anticoagulés de femmes pendant la grossesse ou après l'accouchement incluant : - 6 cas de MFIU inexpliquées - 5 cas d'anémies néonatales sévères nécessitant une transfusion en urgence - 9 cas d'urgences obstétricales chez RhD négatif - 6 après traumatismes anténataux - 12 problèmes après diagnostic de routine FMH + 18 échantillons de donneurs et 10 échantillons de sang de cordon ont été testés	Nombre d'hématies fœtales dans la circulation maternelle	25 HFM détectées avec CMF utilisant des anti-HbF dont 8 cas d'HFM massives (>100ml) chez lesquels ont été retrouvées soit MFIU, mort néonatale ou anémie néonatale sévère à chaque fois pendant les 6 dernières semaines de grossesse Résultats similaires obtenus entre le TK, la CMF avec anti-HbF et avec anti-D Différences observées pour la CMF en fonction du réactif utilisé et des méthodes Causes des HFM massives non identifiées	Non calculées et non calculables	4 Interférence de l'HbF présente chez certaines patientes : problèmes techniques avec TK et CMF anti-HbF

Parution Auteur Revue	*Type et objectifs de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2014 **D. Corcoran** **Blood transfusion** **[23]**	Prospective → Déterminer la prévalence de résultats faux positifs avec le test à l'élution acide (TK) à cause du taux élevé d'HbF dans le sang maternel → Rechercher la prévalence chez une population de femmes enceintes ou ayant récemment accouché	Toutes les patientes possédant un risque plus ou moins avéré d'HFM *(British Committee for Standards in Haematology guidelines)* entre juin 2012 et août 2012 Pendant la même période, inclusion de toutes les femmes RhD négatif ayant accouché d'un enfant RhD positif → Testé par TK et CMF utilisant un anti HbF → 88 patientes au total : - 6 RhD positif + 26 RhD négatif en anténatal entre 11 et 40+ SA - 56 RhD négatif après l'accouchement d'un enfant RhD positif	Nombre d'hématies fœtales dans la circulation maternelle Taux d'hémoglobine fœtale dans le sang maternel	Cellules fœtales détectées dans 36% des cas avec la CMF et dans 45% des cas avec le TK CMF considérée comme plus efficace dans la distinction des hématies maternelles F et des hématies fœtales Comparaison de l'estimation des HFM par : - CMF avec anti-HbF : 0,41 (0-2,19) mL - TK : 0,59 (0-23,93) mL Avec p=0,012 + Analyse d'un groupe de 9 patientes où il a été retrouvé une HFM > 1mL pour évaluer l'impact de la présence d'HbF : résultats entre les 2 méthodes → seuil allant de 0,34mL à 23,28mL Chez 6 patients, surestimation >1mL et 4 de ces 6 patients avaient des seuils d'HbF allant de 8,88 à 32,3% Plus la présence d'HbF maternelle est élevée plus l'HFM est surestimée avec le TK Chez 3 patientes, population HbF > 16%, l'HFM a été surestimée > 3mL	Non calculées et non calculables	2 Biais non identifiés

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2012 **E. Cosmi** **International Journal of Gynecology and Obstetrics** **[24]**	Prospective Evaluer si le pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne peut aider dans le diagnostic d'une anémie fœtale liée à une HFM	Femmes enceintes sélectionnées de septembre 2004 à septembre 2007 en unité de soins mère-enfant par rapport à un potentiel risque d'HFM Toutes les femmes chez qui était suspectée une HFM ont eu des échographies détaillées pour exclure par exemple les anomalies fœtales et pour évaluer une éventuelle anémie fœtale (MCA-PSV) et confirmer via le TK 15 femmes sélectionnées : - 10 avec fœtus anémiés (environ 29,6 SA) : 1 STT, 9 suspectés d'HFM après traumatisme maternel - 5 avec fœtus non anémiques (environ 28,9 SA)	Taux d'hématies fœtales Taux d'hémoglobine fœtale	TK a confirmé l'HFM dans les 15 cas sélectionnés Différence significative entre les 2 groupes par rapport aux taux d'hémoglobine en tenant compte de l'âge gestationnel moyen (p<0,001) Utilisation du MCA-PSV assez sensible pour le diagnostic (pas de chiffre) des HFM : Dans les 10 cas d'anémie fœtale détectée par cette méthode → confirmé par des prélèvements d'échantillons de sang fœtal après l'accouchement Dans les 5 autres cas, MCA-PSV normal car HFM due à un décollement placentaire	Non calculées Sensibilité calculée par rapport à la détection d'une HFM peu importe la cause = 75%	4 Peu de cas sélectionnés dans l'étude Méthode permettant le diagnostic indirect d'une HFM

Parution Auteur Revue	*Type et objectifs de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critère de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2008 **D.J. Radel** **Transfusion Immunohematology** **[25]**	Prospective comparative et randomisée → Evaluation d'une méthode permettant la fixation-perméabilité d'un anticorps anti-D avec un anticorps anti-HbF → Identification et semi quantification des hématies maternelles et fœtales tout en déterminant le statut Rh dans le même test	25 échantillons randomisés de donneurs utilisés pour la méthode FMB/D → Valider la détermination du groupe Rh 100 échantillons de femmes enceintes ou dans le post partum testés avec la méthode FMB/D et comparés avec le TK 3 échantillons préparés avec du sang de donneur et du sang de cordon pour simuler différents taux d'HFM et évaluer le temps de mise en œuvre des méthodes	Coefficient de variation	Détermination Rh des donneurs simples cohérente dans tous les cas Chez les femmes enceintes ou en post partum détermination également identique Comparaison entre la méthode FMB/D et TK où les résultats ont coïncidés dans 97% des cas (n=36 et p=0,32) Coefficients de variation intra-essai et inter-essai étaient de moins de 20% Dans un cas, discordance entre le TK et la méthode FMB/D, le TK surestime l'HFM	Non calculées et non calculables	2 Peu de données chiffrées Comparaison basée sur la dose RhIg à administrer ou non

Parution Auteur Revue	*Type et objectifs de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2012 **C. Pastoret** **International Clinical Cytometry Society** **[26]**	Prospective → Evaluer la performance du kit « FMH QuikQuant » en combinaison avec le « FCM analyzer FC500 » → Valider que ce kit est une méthode efficiente et fiable pour la recherche d'HFM	Groupe contrôle : 58 échantillons préparés avec des dilutions différentes (1/10 000, 1/2000, 1/1000, 1/500 et 1/100) et testés Echantillons de donneurs RhD négatif inclus pour établir une référence du taux de cellules F dans la population générale 83 femmes enceintes incluses dans cette étude du 30 juin au 29 Août 2011 d'âge moyen 29,3 ans : - 55 cas après l'accouchement de femmes Rh négatif - 10 diminutions des MAF - 8 hémorragies anténatales - 4 traumatismes abdominaux pendant le 3ème trimestre - 4 MFIU - 2 problèmes placentaires	Coefficient de corrélation Intervalle de confiance	Comparaison des résultats au niveau des échantillons tests TK/CMF : - CMF : bonne corrélation (r=0,97) avec les valeurs attendues et IC=95% - TK : r=0,94, IC=95% Le taux d'hématies fœtales détecté : - CMF : correspondance parfaite avec les dilutions préparées - TK : systématiquement surestimation des résultats Meilleure reproductibilité pour la CMF avec un coefficient de variation inférieur à 20% (pour un faible taux d'hématies fœtales) et supérieur à 29% dans le TK Résultats avec les échantillons prélevés chez les femmes enceintes : confirme la surestimation systématique du TK Bonne corrélation entre la CMF et le TK (r=0,87, IC=95%) mais 2 faux positifs avec le TK liés à la présence d'HbF maternelle (respectivement 5,4% et 8,9%)	CMF : - Sensibilité de 89,8% - Spécificité de 93,2%	2 Biais non identifiés

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2007 **V. Porra et Al** **Transfusion Immunohematology** **[27]**	Prospective Evaluer la performance du « Fetal Cell Count Kit » en comparaison au TK	455 échantillons de femmes enceintes ou juste après l'accouchement 74 échantillons de femmes donneuses constituant la population contrôle 124 échantillons constitués de sang adulte + sang de cordon (avec des concentrations différentes de 0,01 à 5,00%) pour «étalonner»	Coefficient de corrélation Coefficient de variation	Le « Fetal Cell Count Kit » peut être utilisé en cas d'hémoglobinopathies contrairement au TK (faux positifs) Coefficient de variation intra-essai pour l'analyse de 100 000 évènements entre 14,60 et 3,75% (pour 0,10 et 1,00 % concentration en cellules fœtales) → Précision de la méthode améliorée avec l'augmentation du nombre d'évènements comptés (pour 200 000 évènements CV=9,84% pour un pourcentage de 0,10% de cellules fœtales) Résultats de bonne corrélation avec les valeurs attendues (r>0,99 et p<0,01) Bonne corrélation entre le TK et la CF chez les échantillons tests (r=0,94, p<0,01) mais surestimation du compte de cellules fœtales avec le TK Chez le groupe d'échantillons « patientes » : - 405 échantillons négatifs avec les 2 méthodes - 50 échantillons positifs avec le TK (dont 6 larges HFM allant de 67mL à 252mL) ▪ 44 de ces 50 échantillons également positifs avec la cytométrie en flux : dont 6 échantillons, contradiction entre les 2 tests → Faux positifs du TK Pour 2 échantillons avec de larges HFM : TK avec des résultats plus bas que la CMF (1,60 vs 5,03% et 2,10 vs 4,26%)	Non calculées et non calculables	2 Pas d'information sur le Rh des patientes incluses dans l'étude

Parution Auteur Revue	*Type et objectif de l'étude*	*Caractéristiques de la population*	*Critères de jugement*	*Principaux résultats*	*Sensibilité, spécificité, VPP, VPN*	*Niveau de preuve Limites et biais*
2012 **E.Chambers** **Official Journal of The British Blood Transfusion Society Transfusion Medicine** **[28]**	Prospective → Comparaison de l'efficacité de l'HPLC (high performance liquide chromatography), AE (acid elution : TK) et de la CMF pour la quantification des HFM	Echantillons de sang chez 1 adulte masculin et 13 femmes en anténatal ou post partum (4 au T1, 1 au T2, 2 au T3, 6 en post partum) → 5 de ces patients contrôlés par CMF (anti-D + anti-HbF) pour une confirmation d'HFM → 4 cas contrôlés avec CMF utilisant un anti-HbF après une HFM massive (3 MIU et une anémie néonatale sévère)	Cellules F Taux de globules rouges fœtaux	Donneur adulte masculin : peu de d'HbF Cellules fœtales plus importantes dans la population de femmes enceintes TK positif pour 7 échantillons alors qu'il n'y avait pas de cellules fœtales présentes 3 cas d'HFM surestimées par le TK 1 large HFM sous-estimée par le TK 11 des 13 échantillons de femmes ont révélé un haut taux d'HbF (>5%) et particulièrement dans 4 cas (10%) Technique utilisant l'HPLC moins sensible et spécifique (pas de chiffre) pour déterminer une HFM que les méthodes « cellulaires »	Non calculées et non calculables	4 Etude de faible puissance

ANALYSE ET DISCUSSION

Validité interne de l'étude

o Limites liées au sujet

Le diagnostic des HFM est un sujet complexe. Il s'agit d'une pathologie certes peu fréquente mais qui peut revêtir des conséquences irréversibles (décès, anoxie cérébrale, …). De ce fait, cette pathologie est peu connue même au sein des équipes médicales. Le TK est la plupart du temps prescrit dans un contexte de recherche d'une allo-immunisation chez des patientes Rhésus négatif et très rarement dans un contexte de recherche d'une HFM après un facteur de risque avéré ou non. Ajouté à cela, son identification est difficile puisque le TK est un outil diagnostique manuel peu reproductible et dont la fiabilité est discutée.

Un certain nombre de difficultés ont été rencontrées au cours de ce travail de recherche, notamment la maitrise de la langue anglaise appliquée à la médecine étant donné que la quasi-totalité des articles sont des articles anglophones.

Les limites du sujet et les objectifs de l'étude ont été également difficiles à établir au vu de la complexité du sujet et des nombreux domaines entrant en jeu comme l'immunologie, la biologie, l'obstétrique, la médecine prénatale et la néonatologie.

o Biais

Quelques biais ont été relevés, ce qui pourrait remettre en cause l'exhaustivité de l'étude. Premièrement, un biais de publication présent dans la majorité des revues de la littérature lié au fait que la plupart du temps seuls les articles possédant des résultats statistiquement significatifs sont publiés aux dépens des autres.

Un biais linguistique peut également être mentionné étant donné que seuls des articles en français et en anglais ont pu être sélectionnés pour cette revue. Il faut aussi prendre en compte que la langue choisie pour la publication dépend de la significativité des résultats : les résultats significatifs sont souvent publiés à l'étranger et en anglais contrairement aux résultats non significatifs publiés dans la langue d'origine des auteurs (donc moins accessibles).

Un biais de sélection est également présent, trois bases de données ont été utilisées « PubMed », « Sciencedirect » et « EM Premium » ce qui a pu restreindre l'étendue de l'étude. Pour essayer de minimiser ce biais, la sélection des articles a été affutée par une recherche de proche en proche. Les articles payants n'ont pas pu être retenus.

Validité interne des articles

Parmi les quinze articles sélectionnés, il est distingué deux groupes. En effet, sept d'entre eux possèdent un niveau de preuve scientifique 2 et huit un niveau de preuve scientifique 4.

Cependant, il est important de noter que la majorité des revues dans lesquelles les articles ont été publiés présentent un facteur d'impact élevé. Le facteur d'impact correspond à l'indicateur d'importance d'une revue par rapport à une autre ainsi qu'à la fréquence de citation d'un article de celle-ci. Il permet ainsi de porter un jugement sur sa fiabilité.

La plus grande partie des articles sélectionnés avait pour objectif la comparaison entre deux tests diagnostiques notamment entre le TK et la CMF. Dans de nombreux articles, il ne figurait pas les variables diagnostiques utiles pour évaluer la fiabilité d'un test par rapport à un autre, à savoir la sensibilité, spécificité, VPP et VPN. Ceci a rendu difficile l'évaluation de la validité des tests en question.

La variable majoritairement utilisée dans ces articles est le coefficient de corrélation. Ainsi les résultats attendus peuvent être comparés avec les résultats obtenus par tests étudiés, permettant ainsi d'évaluer la marge d'erreur de chacun d'entre eux (faux positifs notamment).

Discussion

Pour mémoire, l'objectif principal de ce travail de recherche est de déterminer si les nouveaux tests diagnostiques peuvent représenter une alternative plus fiable que le TK pour le diagnostic des HFM.

Les HFM sont des pathologies rarement diagnostiquées par des moyens cliniques. En effet, les signes cliniques sont inconstants voire absents. Lorsqu'ils sont présents, ces signes ne sont pas spécifiques, la diminution des MAF étant le signe le plus fréquemment rencontré. Des signes cliniques échographiques peuvent également être retrouvés grâce à l'étude du doppler de l'artère cérébrale moyenne. Quant à l'enregistrement du RCF, il est la plupart du temps peu informatif. Il est donc impossible de se fier seulement à la clinique pour identifier une éventuelle HFM. Le diagnostic est donc essentiellement biologique même si certaines méthodes comme l'échographie peuvent participer au diagnostic.

Plusieurs techniques ont été décrites pour pallier notamment au manque de reproductibilité et de fiabilité du TK : plusieurs méthodes de CMF, le dosage de l'α-foetoprotéine (αFP), la méthode d'agglutination en gel.

- **Le test de Kleihauer**

Le TK consiste en un comptage microscopique des hématies fœtales dans la circulation sanguine maternelle. Les différentes cellules sont reconnues grâce à une inégalité de résistance à l'acidité. Le compte des hématies fœtales retrouvées est ramené à 10 000 hématies adultes, le TK ramenant à 2000 hématies adultes ayant rapporté un risque élevé de fausse interprétation. [14]

Dans la majorité des études sélectionnées, le TK a été comparé à d'autres méthodes diagnostiques en développement. Des échantillons tests ont été préparés avec des pourcentages connus de cellules fœtales dans du sang de donneurs adultes. Il en découle dans de nombreux cas que le TK surestime l'HFM lorsqu'elle est présente. [23,25,26,27,28]

Il a également été relevé quelques cas de sous-estimation de résultats dans les larges HFM par rapport aux autres tests utilisés. [27,28]

La corrélation avec les échantillons tests préparés et les résultats attendus est donc moins bonne qu'avec la CMF ce qui est confirmé avec les échantillons de sang directement prélevés chez les patientes. [26]

Selon Deirdre Corcoran et Al. [23], l'estimation d'une HFM chez un groupe de patientes à risque diffèrerait en fonction de la méthode utilisée à savoir le TK et la CMF. En effet, les cellules fœtales ont été détectées dans 36% des cas pour la CMF et dans 45% des cas avec le TK, ce qui confirme ainsi la surestimation fréquente des résultats avec ce test (jusqu'à >3mL chez certaines patientes qui possèdent une population importante d'HbF).

Pour la majorité des auteurs, les erreurs d'interprétation (TK surestimé, ininterprétable ou faussement positif) sont dues à une persistance héréditaire plus ou moins importante d'HbF maternelle qui entraine une confusion lors du comptage des hématies fœtales. [14,17,23,26,28]

La reproductibilité du TK est également assez médiocre selon Cedric Pastoret et Al. [26] avec un coefficient de variation supérieur à 29%. La spécificité étant elle aussi insuffisante (Spécificité [0,00] = 0,049 pour le TK contre 0,022 pour la CMF avec anti-HbF) [14].

Par ailleurs, le test n'est pas utilisable chez les patientes porteuses d'une hémoglobinopathie. [27]

Toutes ces données confirment ainsi que le TK est un test à haut risque de fausses interprétations. L'HFM étant une pathologie pouvant se solder par une issue gravissime, il est important à présent de discuter de la fiabilité des autres tests disponibles.

La cytométrie en flux

La CMF est l'une des méthodes en développement pour le diagnostic des HFM. C'est une technique assez ancienne puisque les premières ébauches de comptage cellulaire automatisé datent de 1934 avec Modalvan. Le premier cytomètre en flux a vu le jour dans les années 80 mais servait à cette époque à étudier la population leucocytaire. Ce n'est que depuis quelques années que cette méthode s'intéresse à la population érythrocytaire. [5]

Pour rappel, la CMF étudie différents paramètres cellulaires. Les cellules sont en suspension dans un fluide. Elles sont préalablement marquées par des anticorps monoclonaux et associées à des fluorochromes puis sont propulsées devant un faisceau laser (rappel du fonctionnement d'un cytomètre en flux en Annexe I).

Différents antigènes sont présents à la surface ou dans les globules rouges, c'est pourquoi différents anticorps sont utilisés pour caractériser les hématies fœtales au sein de la population de cellules maternelles :

- les anticorps anti-RhD ou anti-Rh1 : anticorps présents à la surface des hématies en fonction du statut Rhésus. Cependant, leur utilisation est très réductrice du fait que les antigènes sont présents uniquement chez les Rh : 1. Ils sont applicables exclusivement pour les patientes Rhésus négatif portant un fœtus Rhésus positif.

- les anticorps anti-HbF : les hématies fœtales comportant physiologiquement des quantités d'HbF plus importantes que les hématies maternelles, ce taux d'anti-HbF va pouvoir être quantifié grâce à cet anticorps. Les cellules seront différenciées grâce à leur inégalité de fluorescence en fonction du contenu en HbF des cellules.

Parfois, des doubles marquages sont proposés pour pouvoir mieux distinguer les deux populations de cellules comme, par exemple, l'utilisation conjointe des anticorps anti-Rh1 et anti-HbF ou des anticorps anti-HbF et anti-anhydrase carbonique. [7]

Parmi les articles étudiés, les résultats sont partagés. En effet, pour certains auteurs, les résultats entre le TK et la CMF sont comparables avec souvent des coefficients de corrélation proche de 1 entre les deux méthodes. [14,15,22,25]

Tandis que pour Abassali Pourazar et Al. [20], la CMF avec anticorps anti-Rh1 est plus précise. Cependant, cette méthode n'est pas utilisable chez toutes les patientes comme il l'a été précédemment évoqué. Cette technique n'est donc pas généralisable à l'ensemble de la population.

Selon Bernard J. Fernandes et Al. [15], la CMF est une technique plus facilement réalisable et plus sensible aux limites inférieures.

Deirdre Corcoran et Al. [23] soulignent que la CMF est plus efficace dans la distinction de l'HbF maternelle et des hématies fœtales, permettant ainsi d'éviter les erreurs d'interprétations responsables de faux positifs du TK qui sont liées aux taux élevés d'HbF chez certaines patientes.

Dans l'étude de Cédric Pastoret et Al. [26], des dilutions simulant une HFM ont été préparées, le taux d'hématies fœtales détecté par CMF correspondait parfaitement aux résultats attendus et montrait ainsi une meilleure corrélation que les résultats obtenus avec le TK. De plus, il a été souligné que la CMF présentait une meilleure reproductibilité avec un coefficient de variation inférieur à 20% pour des seuils d'HFM bas.

Cependant une étude menée par Harry de Wit et Al. [21] souhaitant déterminer une moyenne d'hématies fœtales dans la circulation maternelle, a mis en évidence que le coefficient de variation entre quatre laboratoires différents était très variable, à savoir entre 6,3% et 31,2% par rapport aux références établies par la CMF.

Pour Blair Wylie et Al [32], le coefficient de variation entre quatre laboratoires différents pour le TK est de 153% contre moins de 10% pour la CMF, ce qui s'explique facilement par l'automatisation plus importante de la CMF.

Tous ces résultats pris en compte, il est difficile d'établir des généralités et des protocoles précis.

Malgré tout, la CMF se développe de plus en plus avec des méthodes et kits diagnostiques de plus en plus performants.

En effet, dans l'étude de E.A. Fong et Al. [16], deux méthodes cytométriques utilisant l'anticorps anti-HbF sont comparées dont un nouveau kit « Trillium QuickQuant anti-HbF FITC » qui se révèle plus performant (plus rapide et plus précis que son prédécesseur).

L. Wong et Al. [18] abordent une nouvelle approche de la CMF. Une méthode complètement informatisée basée sur l'analyse des données par un algorithme probabiliste prédéfini : chaque cellule est testée individuellement avec la probabilité qu'elle appartienne à tel ou tel groupe/famille de cellules et sera assignée en fonction de cette probabilité. Cette nouvelle méthode s'est avérée irréprochable avec une reproductibilité de 100% et des coefficients de variation de 0% intra- et inter-analyste contre respectivement 10,6% et 22,6% pour la méthode « classique ». Il est également important de noter que l'analyse de 200 échantillons prend 16 minutes contre 150 habituellement.

En ce qui concerne les hémoglobinopathies, la CMF est plus facilement utilisable que le TK.

Des études ont également été menées par le Centre National de Référence en Hématologie Périnatale (CNRHP) sur la CMF.

En 2011, une étude a été conduite comparant le TK à une technique par immunomarquage anticorps anti-HbF. Cette dernière a permis de conclure sur la nature de certaines cellules ininterprétables limitant ainsi le risque de faux positifs. En effet, les hématies fœtales et les hématies adultes possèdent une intensité de fluorescence différente permettant de les distinguer plus aisément. Ce test a également pour avantage qu'il n'est pas limité par le statut Rhésus des patientes. Il s'agit d'un test rapide et automatisé qui limite les erreurs « opérateur-dépendant ». (Annexe V) [29]

Une autre étude datant de la même année rapporte les mêmes conclusions que la précédente mais émet l'éventualité d'effectuer une première étape de recherche d'hématies fœtales via le TK. (Annexe VI) [30]

Concernant le double marquage anticorps anti-HbF et anticorps anti-anhydrase carbonique, l'équipe de E. Rabut et Al. a déterminé que ce test devrait être utilisé en deuxième intention si, après un premier test avec un réactif anti-HbF, le résultat était ininterprétable. Notamment dans le cas de patientes Rh1 pour lesquelles l'anticorps anti-D ne peut être utilisé. Ce test est donc, à leur avis, non utilisable en routine au vu de son prix. Il a également été émis le fait qu'il serait intéressant, dans les cas de résultats ininterprétables, d'effectuer une électrophorèse de l'hémoglobine pour éliminer toute difficulté d'interprétation liée à la présence d'une hémoglobinopathie. (Annexe VII) [31]

Les différentes caractéristiques de la CMF et du TK étant exposées, C. Huissoud et Al. se sont intéressés, en 2009, à effectuer une comparaison de ces derniers [2] :

Tableau 1 Comparaison des tests diagnostiques standard de l'HFM.
Comparison of biological tests in fetomaternal hemorrhage.

	Test de Kleihauer (technique standard)	Cytométrie de flux (Ac. anti-γ, Ac. anti-AC)[a]
Variabilité interobservateur	+	±
Variabilité intra-observateur (biais échantillonnages inclus)	+	±
Quantification	+	±
Accessibilité	+	±
Faux positifs	+	±
Faux négatifs		
Incompatibilité fœtomaternelle	+	+
Post-transfusionnel	+	+
Fin de grossesse	+	+

[a] Ac. anti-γ : Ac. antichaîne gamma de l'hémoglobine F ; Ac. anti-AC : Ac. Anti-anhydrase carbonique.

Il est intéressant d'observer que les différences entre les deux tests ne sont pas remarquables.

Plusieurs autres auteurs ont effectué ces comparaisons dans leurs études et les résultats étaient assez similaires [7,32] :

- le TK ressort comme un test facile à mettre en place dans les laboratoires, rapide dans son exécution et utilisant des réactifs peu couteux. De plus, il s'avère plus sensible aux limites de détection inférieure avec une capacité de détection à environ 1 hématie fœtale sur 10 000 hématies adultes. Cependant, sa réalisation nécessite des opérateurs expérimentés et il manque toujours de reproductibilité et de spécificité.

- des sous-estimations sont fréquemment décrites lorsque l'âge gestationnel augmente de par la diminution progressive du contenu en HbF des hématies fœtales et des surestimations liées à une persistance anormale d'HbF (héréditaire ou hémoglobinopathie).

- la CMF est décrite comme moins sensible avec une limite de détection à 5 hématies fœtales pour 10 000 hématies maternelles. Cependant, il s'agit d'une technique beaucoup plus précise et reproductible du fait de son automatisation. Néanmoins, l'appareil nécessaire pour ce type d'examen n'est pas toujours disponible dans tous les hôpitaux ou laboratoires et lorsqu'il est disponible, il l'est rarement de nuit ou les week-ends, ce qui en limite son usage.

○ Doppler de l'artère cérébrale moyenne

En ce qui concerne le diagnostic échographique par doppler de l'artère cérébrale moyenne, Federica Bellussi et Al [19] ont démontré qu'il s'agit d'un des meilleurs facteurs prédictifs d'une HFM.

Le pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne est une méthode pertinente pour le diagnostic des HFM sévères ainsi qu'un outil rapide et non invasif. [33]

Il augmente chez les fœtus anémiques. Cette augmentation est liée à une baisse de la viscosité sanguine ainsi qu'à une élévation du débit cardiaque fœtal. Cette méthode possède une bonne sensibilité mais une VPP faible [6,11]. En effet, il s'agit d'un bon indicateur d'une anémie fœtale sévère indépendamment de son étiologie. C'est un indicateur indirect, l'anémie diagnostiquée n'est pas forcément liée à une HFM.

○ Dosage de l'α-foetoprotéine

Le dosage de l'αFP est évoqué dans certaines études comme pouvant participer au diagnostic des HFM. Elle est synthétisée dans le foie fœtal et dans le tractus gastro-intestinal. Elle est ensuite éliminée dans les urines du fœtus constituant le liquide amniotique puis elle passe dans la circulation maternelle. [34]

Son expression est très précoce pendant la grossesse, sa concentration est maximale à 14 SA puis elle diminue progressivement. L'augmentation de son taux est principalement liée à un risque d'anomalie de fermeture du tube neural (anencéphalie, spina bifida, …) ou d'anomalie de fermeture de la paroi abdominale (laparoschisis, omphalocèle notamment). Elle peut également être associée à un risque de pré-éclampsie, de retard de croissance intra-utérin, de MFIU et d'hématome rétro-placentaire. [34]

Pour certains auteurs, sa présence en quantité élevée peut également indiquer un saignement avec « effraction de la barrière placentaire » autrement dit une HFM. [34]

Une seule étude sélectionnée aborde le dosage de l'αFP et pour ses auteurs, il n'y a aucune corrélation dans la population étudiée entre la concentration en hématies fœtales et celle en αFP dans le sang maternel. [15] Annemarie Stroustrup et Al. sont du même avis et affirment qu'il s'agit d'un biomarqueur inefficace dans un contexte d'HFM. [35]

En effet, le taux varie pendant la grossesse et dépend donc de l'âge gestationnel, de l'hématocrite fœtale et du taux initial de l'αFP fœtale. De plus, ce marqueur n'est pas spécifique de l'HFM et il est nécessaire de posséder un dosage de départ afin d'avoir une valeur de référence pour pouvoir observer une éventuelle augmentation.

L'utilisation du dosage de l'αFP est relayée au second plan derrière le TK et la CMF mais peut parfois constituer un élément déterminant pour orienter le diagnostic.

○ Test d'agglutination et test des rosettes

Le test d'agglutination en gel est basé sur la réaction entre anticorps et antigène D dans un tube contenant un milieu gélosé. Le sang maternel est incubé avec des anticorps anti-D et la réaction ne peut s'effectuer uniquement en la présence d'hématies fœtales Rh : 1 (donc D positif) signant ainsi la présence d'une HFM. La lecture est réalisée après centrifugation [17] :

- lorsque le résultat est positif, une couche de particules ou une agglutination est présente sur le haut du tube ;

- lorsqu'il est négatif, les particules tombent au fond du tube et ne s'agrègent pas entre elles.

Les résultats de ce test sont similaires à ceux obtenus avec le TK : le test est spécifique et facile à réaliser. Néanmoins, il est applicable seulement chez les patientes Rh : -1 portant un fœtus Rh : 1.

Le test « rosette » présente le même inconvénient, et n'a été traité dans aucun article étudié. Cependant, l'équipe d'Agathe Maillon et Al. [36] a prouvé qu'il s'agissait d'un test de dépistage qualitatif simple, rapide et sensible pour les patientes Rh : -1 qui pourrait être utilisé en première ligne et complété par un TK ou la CMF si le dépistage s'avérait positif.

Ces deux méthodes représentent des alternatives de dépistage intéressantes en première ligne mais ne sont pas généralisables pour le diagnostic des HFM.

○ La problématique du seuil

Une HFM est la plupart du temps exprimée sous forme de pourcentage où son volume est égal au double du volume globulaire transfusé si l'hématocrite fœtale est égale à 0,5. Cependant, plusieurs formules existent et il n'y a pas d'uniformisation d'utilisation au sein des différents laboratoires. [2]

Les résultats d'estimation des HFM sont donc très différents en fonction des formules utilisées. L'équipe de Blair Wylie et Al. [32] en a effectué une comparaison en mettant en parallèle quatre formules différentes et les résultats oscillaient entre 108mL et 162 mL pour un même résultat au TK.

Il n'existe pas de seuil consensuel de volume transfusé définissant différents niveaux de gravité d'HFM. Le retentissement fœtal est variable en fonction du degré d'anémie et de la vitesse d'installation de l'HFM qui est un facteur pronostique très important. Mais en règle générale, plus une HFM est importante, plus elle est grave.

Pour une HFM entre 0,5mL et 5mL il n'y a pas de retentissement fœtal constaté. Sachant qu'une hématie fœtale pour 10 000 hématies adultes correspond à 0,5mL de sang fœtal. Au-delà, le risque d'anémie fœtale est proportionnel au volume de sang transfusé. [2, 37]

Les seuils décrits pour lesquels il est retrouvé un risque accru de mortalité et de morbidité fœtales oscillent entre 20mL/kg à 51mL/kg de sang fœtal transfusé. Malgré tout, il est très difficile de calculer un seuil prédictif en prenant seulement en compte les critères biologiques. De nombreuses variations sont observées dans le calcul d'une HFM et la plupart du temps, il s'agit d'une succession d'estimations menant à l'extrapolation du volume de l'HFM. [2]

A savoir qu'en fonction du seuil retenu, l'épidémiologie du phénomène varie. En effet, pour un seuil admis à 80mL de sang fœtal transfusé, il est retrouvé 1 cas pour 10 000 grossesses tandis que si un seuil supérieur à 30mL est admis, on observe que ce phénomène atteint alors les 3 cas pour 1000 grossesses. [37]

Le volume de l'HFM n'est pas un facteur suffisant pour évaluer seul la gravité du phénomène. Il est important d'ajouter à cela une évaluation du bien être fœtal et d'intégrer l'ensemble des données cliniques et paracliniques disponibles : par exemple, la diminution des MAF qui est directement corrélée aux taux d'HbF et qui est un facteur évocateur précoce de l'altération du bien être fœtal. [2, 37]

L'équipe de C. Huissoud et Al. a ainsi mis au point une classification des différents types d'HFM dont le point de départ est le volume fœtal transfusé. Cette figure propose une conduite à tenir en fonction des éléments présents avec des seuils d'HFM à titre indicatif [2] :

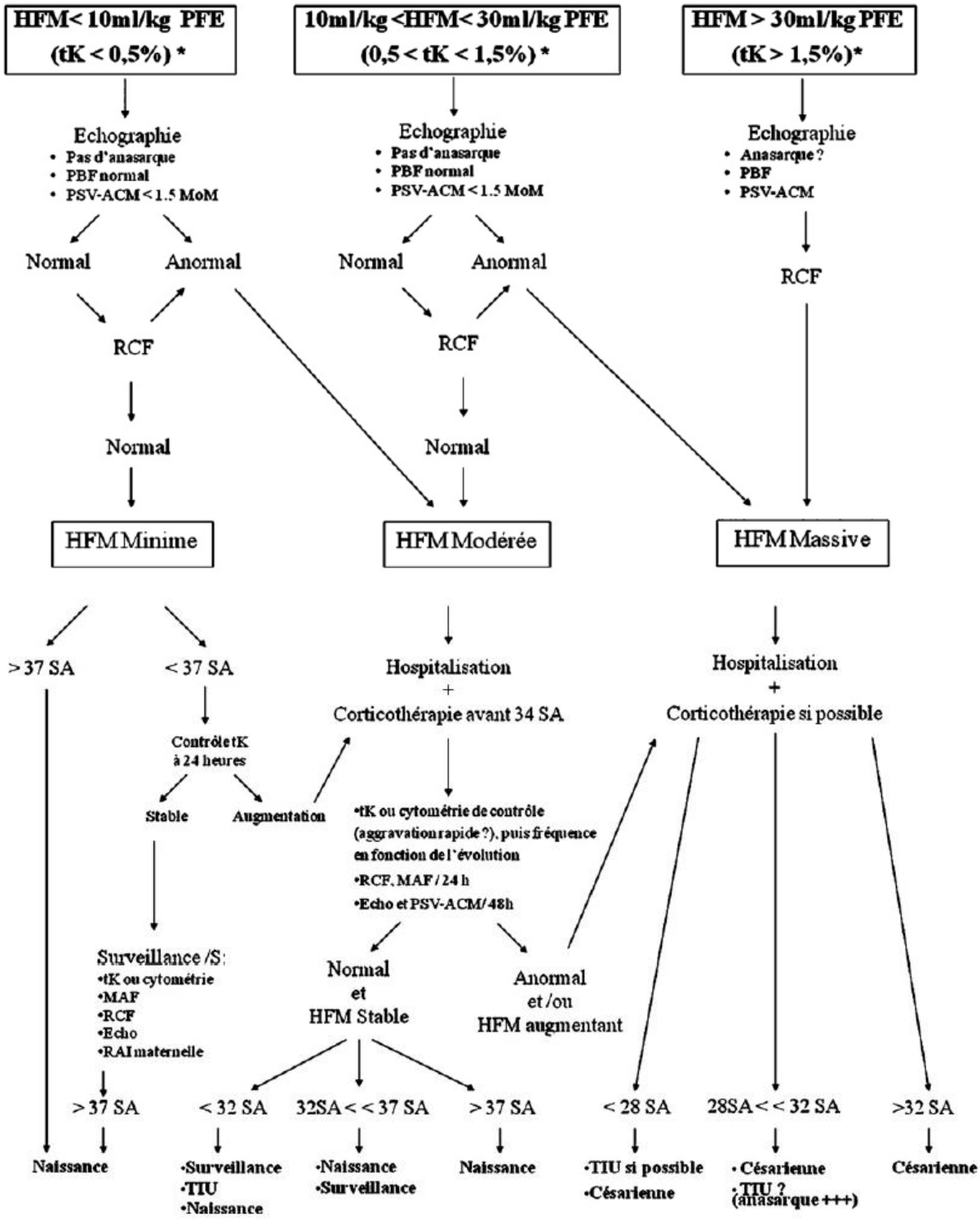


Figure 1 Les seuils sont donnés à titre indicatif. Il est souhaitable d'éliminer les faux positifs liés à la persistance maternelle d'une Hb F chez les femmes à risque d'hémoglobinopathie, surtout en cas d'HFM minime. Remarques : (*i*) Attention aux situations pouvant influer sur la quantification de l'HFM, *e.g.* incompatibilité fœto-maternelle, injection de gamma globulines anti-D (tableau 2). (*ii*) Toujours prévenir l'allo-immunisation anti-D et rechercher l'apparition d'Ac. irréguliers. (*iii*) Dans les rares cas où le contexte le permet une IRM du cerveau fœtal peut compléter l'évaluation du retentissement cérébral des HFM massives, notamment après TIU itératives. *PBF : Profil Biophysique Fœtal échographique, PFE : Poids fœtal estimé, RCF : Rythme Cardiaque Fœtal.* * Valeur de tK pour un fœtus de 2200 g.

D’autres auteurs se sont intéressés à l’identification d’une étiologie pour ces HFM. Il s’est avéré que dans 82% des cas, aucun facteur favorisant n’a été retrouvé. [37]

L’étude de Bernard J. Fernandes et Al. [15] appuie cette hypothèse en démontrant qu’aucun des examens de biopsie de trophoblaste n’est associé à un risque plus élevé d’HFM. L’étude de M. Uriel et Al. [38] s’intéressant à la mise en travail et à l’accouchement voie basse par rapport au risque associé d’HFM, montre que ces deux facteurs ne sont pas liés à une augmentation des HFM contrairement aux césariennes.

C’est pourquoi les HFM sont des évènements difficilement prévisibles et dont la caractérisation et la quantification ne sont pas aisées.

CONCLUSION

Certaines méthodes décrites précédemment ne sont pas en mesure d'être généralisables et d'effectuer le diagnostic d'une HFM à elles seules. En effet, l'échographie n'est qu'un indicateur indirect, elle ne permet pas d'établir le diagnostic ni la quantification de l'HFM. L'αFP est un indicateur peu spécifique et les tests d'agglutination et des rosettes sont trop restrictifs pour être appliqués à l'ensemble de la population.

Deux méthodes supplantent les autres : le TK et la CMF.

Le TK reste malgré tout le test de référence en France pour le diagnostic des HFM. Mis à part la surestimation systématique lors de persistance héréditaire d'HbF maternelle ou d'une hémoglobinopathie, il présente des résultats acceptables. Certes, il est admis que la CMF apporte des résultats diagnostiques plus fiables mais des freins sont encore présents pour sa généralisation. Notamment, cet examen diagnostique est peu disponible, puisqu'il reste couteux : 10 euros environ pour les réactifs par analyse en CMF contre 1 euros pour le TK plus 18,70 euros de cotation de l'acte. Dans l'avenir, il serait intéressant d'associer ces deux techniques afin d'adopter une stratégie plus standardisée au diagnostic et à la prise en charge des HFM. [7,32]

En 2017, le CNRHP a effectué un bilan d'évaluation externe de qualité pour le TK afin d'homogénéiser les pratiques en ce qui concerne son indication et de juger sa variabilité d'interprétation en fonction des laboratoires. La mise en place de ces campagnes de contrôle de qualité démontre toujours une variabilité inter-laboratoires importante avec comme dans les données étudiées dans ce travail, une surestimation du comptage des hématies fœtales. Ils soulignent néanmoins une amélioration par rapport à la campagne précédente. (Annexe VIII) [39]

Afin d'éviter les erreurs d'interprétation du TK, la CMF a été développée dans le but d'utiliser une méthode plus fiable et mieux standardisée. C'est une méthode toujours en développement mais très prometteuse. Dans certaines études, cette méthode est préférée dans les diagnostics d'urgence. Elle pourrait à terme devenir l'examen de référence dans ce domaine. [38]

En effet, la validité de cette méthode a été prouvée à maintes reprises puisqu'elle a démontré sa précision, sa reproductibilité et sa rapidité d'exécution. Elle demeure toujours un examen de deuxième intention lors d'une interprétation compliquée du TK, au vu de son coût d'exécution plus important et du matériel nécessaire onéreux.

Il en découle un manque de standardisation de ces deux tests. Bien que la CMF soit une technique plus fiable, elle possède également des discordances dans certains cas. Comme il l'a été abordé dans ce travail, des possibilités de modernisation de ces méthodes et d'informatisation complète de ces procédés sont en cours d'évaluation.

En ce qui concerne le TK, en 2015, un automate de coloration des lames a été testé par l'équipe de E. Valot. Il s'est avéré que le décompte des cellules était facile et que la technique possédait une bonne reproductibilité. La standardisation de ce type de méthode facilite l'accréditation et l'uniformisation du diagnostic en fonction des laboratoires. Un lecteur d'image doit par ailleurs être prochainement couplé à cet automate pour qu'il n'y ait plus aucune manipulation à effectuer par l'opérateur. [40]

De nombreuses améliorations sont donc attendues dans les années à venir avec l'automatisation complète de ces méthodes qui pourront à terme diminuer le risque d'erreur d'interprétation, de faux positifs et permettre une reproductibilité parfaite.

Le problème du diagnostic des HFM repose également sur le fait que les pratiques sont assez hétérogènes contrairement aux allo-immunisations materno-fœtales. En effet, le diagnostic d'une éventuelle HFM est très rarement envisagé devant des signes qui pourtant pourraient être évocateurs d'une telle pathologie quel que soit le Rhésus de la patiente, à savoir : des anomalies du RCF, un accident traumatique maternel, la diminution des MAF, un ou des signes échographies d'anémie fœtale, et la MFIU notamment. [41]

Ainsi, il est important que le personnel médical soit sensibilisé et mieux informé sur cette pathologie potentiellement mortelle si rare soit-elle et que des examens diagnostiques soient prescrits à bon escient dans ce genre de situation.

GLOSSAIRE

AC : Anhydrase carbonique (CA en anglais)

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

CMF : Cytométrie en flux

CNRHP : Centre National de Référence en Hématologie Périnatale

FITC : Isothionate de fluorescéïne (fluorochrome)

HbF : Hémoglobine fœtale

HFM : Hémorragie foeto-maternelle

MAF : Mouvements actifs fœtaux

MFIU : Mort fœtale in utero

PE : Phycoérythrine (fluorochrome)

PSV ACM : Pic systolique de vélocité de l'artère cérérbrale moyenne (MCA-PSV en anglais)

RCF : Rythme cardiaque fœtal

TK : Test de Kleihauer

VME : Version par manœuvre externe

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

BIBLIOGRAPHIE

[1] : Bassan C., Charpentier A. (2014) Test de Kleihauer par technique cytochimique, EMC Biologie médicale, volume 9, n°2

[2] : Huissoud C., Divry V., Rudigoz R.-C. (2009) Hémorragie foetomaternelle : Le point de vue du clinicien, Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la reproduction, 38, 286-297

[3] : Leblanc R.-M. (2016) Les examens d'immuno-hématologie de la femme enceinte, CNBH Formation, Option bio n°553-554

[4] : Gendron M-C. (2003) Cytométrie en flux, EMC Biologie médicale, 12, Article 90-60-0065

[5] (Annexe I) : Duperray C., La cytométrie en flux, Institute For Regenerative Medicine and Biotherapy, CHU de Montpellier

[6] : Institut français de l'éducation, La cytométrie en flux http://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/immunite-et-vaccination/thematiques/cellules-immunes-et-organes-lymphoides/la-cytometrie-en-flux

[7] : Bassan C. (2013) Mise au point technique d'une nouvelle méthode de quantification des hématies contenant de l'hémoglobine fœtale par cytométrie en flux. Comparaison avec le test de Kleihauer, Facultés des Sciences Pharmaceutiques et biologiques de Lille

[8] : Abbara A. (2014) Doppler en Obstétrique : Indications, Documents pédagogiques pour les internes en gynécologie obstétrique, CNGOF

[9] : Fritz G. (2016) Anémie fœtale, Le Doppler en obstétrique, formation échofoetus CHU Strasbourg

[10] : ANAES (2000) Guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations, service de recommandations professionnelles

[11] : Bathelot B. (2016) Définition : coefficient de corrélation, Définitions marketing L'encyclopédie du marketing

[12] : Institut national de la statistique et des études économiques (2016), Coefficient de variation, Définitions

[13] : ANAES (2000) Analyse d'un article diagnostique, Guide d'analyse de la littérature et gradations des recommandations

[14] : Gielezynska A., Stachurska A., Fabijanska-Mitek J., Debska M., Muzyka K., Kraszewska E. (2016) Quantitative fetomaternal hemorrhage assessment with the use of five laboratory tests, International Journal of Laboratory Hematology n°38 p419-425

[15] : Fernandes B.J., von Dadelszen P., Fazal I., Bansil N., Ryan G. (2007) Flow cytometric assessment of feto-maternal hemorrhage ; a comparison with Betke-Kleihauer, Prenatal Diagnosis n°27 p641-643

[16] : Fong E.A., Finlayson J., Robins F., Davies J., Joseph J., Rossi E., Grey D.E. (2012) Evaluation of a new rapid anti-HbF FITC assay, Trillium QuikQuant, for detection and quantitation of foetomaternal haemorrhage, International Journal of Laboratory Hematology n°35 p106-110

[17] : Agaylan A., Meyer O., Ahrens N., Dudenhausen J., Bombard S., Salama A. (2007) A rapid gel agglutination test for the determination of fetomaternal haemorrhage, Transfusion Medicine n°17 p395-398

[18] : Wong L., Hunsberger B.C., Bruce Bagwell C., Davis B.H. (2013) Automated quantitation of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry for HbF-containing fetal red blood cells using probabilité state modeling, International Journal of Laboratory Hematology n°35 p538-554

[19] : Bellussi F., Perolo A., Ghi T., Youssef A., Pilu G., Simonazzi G. (2017) Fetal Diagnosis and Therapy n°41 p1-7

[20] : Pourazar A., Homayouni V., Rezaei A., Andalib A., Oreizi F. (2008) Iranian Biomedical Journal n°12 p43-48

[21] : de Wit H., Nabbe K., Kooren J, Adriaansen H., Roelandse-Koop E, Schuitemaker J., Hoffmann J. (2011) Reference values of fetal erythrocytes in maternal blood during pregnancy established using flow cytometry,
Hematopathology n°136 p631-636

[22] : Kumpel B.M., MacDonald A.P., Bishop D.R., Yates A.F., Lee E. (2013) Quantitation of fetomaternal haemorrhage and F cells in unusual maternal blood samples by flow cytometry using anti-D and anti-HbF, Transfusion Medicine, Official Journal of the British Blood Transfusion Society n°23 p175-186

[23] : Corcoran D., Murphy D., Donnelly J.C., Ni Ainle F. (2014) The prevalence of maternal F cells in a pregnant population and potential overestimation of foeto-maternal haemorrhage as a consequence, Blood Transfusion n°12 p570-574

[24] : Cosmi E., Rampon M., Saccardi C., Zanardo V., Litta P. (2012) Middle cerebral artery peak systolic velocity in the diagnosis of fetomaternal hemorrhage, International Journal of Gynecology and Obstetrics n°117 p128-130

[25] : Radel D.J., Penz C.S., Dietz A.B., Gastineau D.A. (2008) A combined flow cytometry-based method for fetomaternal hemorrhage and maternal D, Transfusion, Immunohematology n°48 p1886-1891

[26] : Pastoret C., Le Priol J., Fest T., Roussel M. (2013) Evaluation of FMH QuikQuant for the detection and quantification of fetomaternal hemorrhage, International Clinical Cytometry Society, Cytometry Part B : Clinical Cytometry n°84B p37-43

[27] : Porra V., Bernaud J., Gueret P., Bricca P., Rigal D., Follea G., Blanchard D. (2007) 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, Immunohematology n°47 p1281-1289

[28] : Chambers E., Davies L., Evans S., Birchall J., Kumpel B. (2012) Comparison of haemoglobin F detection by the acid elution test, flow cytometry and high-performance liquid chromatography in maternal blood samples analysed for fetomaternal haemorrhage, Transfusion Medicine, Official Journal of the British Blood Transfusion Society n°22 p199-204

[29] (Annexe V) : Huguet-Jacquot S., Larsen M., Carbonne B., Cortey A., Mailloux A. (2011) Détection et quantification des hémorragies foeto-maternelles par immunomarquage anti-HbF : une alternative au test de Kleihauer, CNRHP

[30] (Annexe VI) : Huguet-Jacquot S., Hoffmann J., Larsen M., Carbonne B., Cortey A., Mailloux A. (2011) Evaluation du kit FMH QuikQuant (Trillium) dans la détection et la quantification des hémorragies foeto-maternelles : une alternative au test de Kleihauer sur automate d'hématologie, le cell-dyn sapphire (abbott diagnotics), CNHRP

[31] (Annexe VII) : Rabut E., Castro-Fernandez A., Meknache N. (2017) Recherche et quantification de l'hémorragie foeto-maternelle par cytométrie en flux avec double marquage anti-hémoglobine F et anti-anhydrase carbonique, 28ème congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, Eurofins laboratoire Biomnis

[32] : Wylie B., D'Alton (2010) Fetomaternal hemorrhage, Obstetrics and gynecology vol 115 n°5 p1039-1051

[33] : Friszer S., Cortey A., Pierre F., Carbonne B. (2010) Using Middle Cerebral Artery Peak Systolic Velocity to Time In Utero Transfusions in Fetomaternal Hemorrhage, Obstetrics and Gynecology, vol. 115 n°5

[34] : Geyla C., Subtil D., Vaast P., Coulon C., Clouqueur E., Deruelle P., Debarge V. (2014) Interprétation des valeurs atypiques des marqueurs sériques, Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction, vol 43 n°1 p5-11

[35] : Stroustrup A., Plafkin C. (2016) A Pilot Prospective Study of Fetomaternal Hemorrhage Identified by Anemia in Asymptomatic Neonates, J Perinatol. Author manuscript; available in PMC

[36] : Maillon A., Mailloux A., Toly-Ndour C., Cortey A., Huguet-Jacquot S. (2015) Evaluation du kit FMH Rapid Screen d'Immucor® pour la détection d'une hémorragie foeto-maternelle, CNRHP

[37] : Rubod C., Mubiaya N., Le Goueff F., Decocq J., Delahousse G. (2004) Macrotransfusion foeto-maternelle spontanée révélée par une diminution de la perception des mouvements actifs fœtaux, Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction Vol 33, N° 3 p. 241-244

[38] : M. Uriel M., Subira D., Plaza J., Castanon S., Canamares M., Diaz Recasens J. (2010) Identification of feto-maternal haemorrhage around labour using flow cytometry immunophenotyping, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology n°151 p20–25

[39] (Annexe VIII) : Huguet-Jacquot S., Vassault A., Plantier A., Oudin O., Brument A., Zerr V., Delaby H., Toly-Ndour C., M.Vaubourdolle M., Mailloux A. (2017) Bilan de la mise en place d'un programme d'évaluation externe de la qualité pour le test de Kleihauer, CNRHP

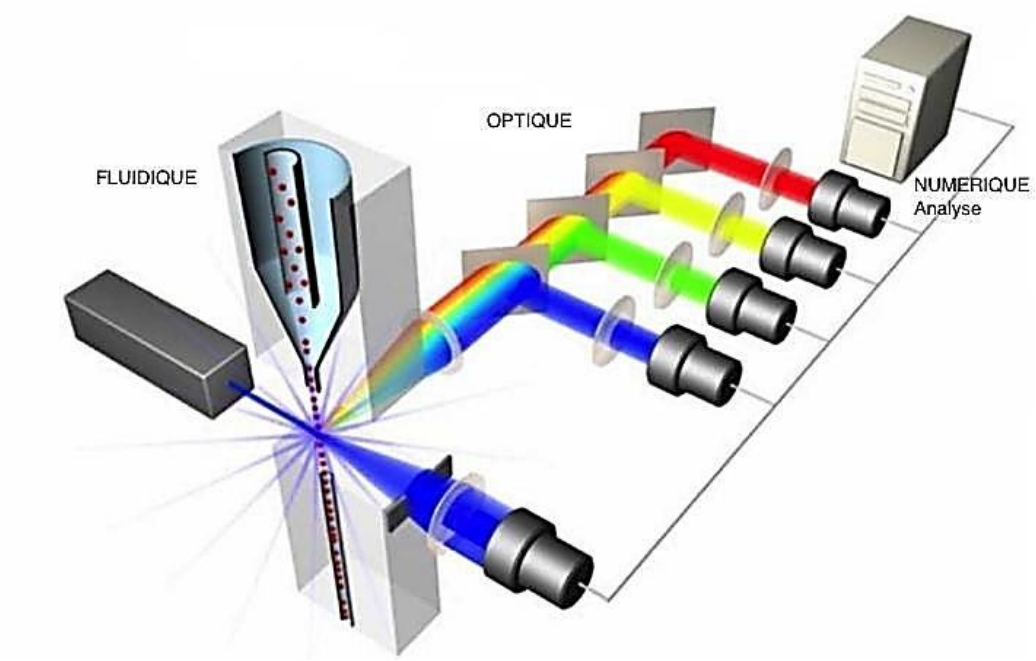
[40] : Valot E., Aubry C., Brusson N., Chevalier C., Jallet V., Lachaume V., Piquaud C., Branger M., Slimane M., Krause C., Morel P. (2015) Evaluation d'un automate de coloration « K-matic » pour le test de Kleihauer, Transfusion clinique et biologique n°22 p 150

[41] : Abarra A. (2015) Test de Kleihauer, Gynécologie et obstétrique

ANNEXE I : Cytomètre en flux [5]

Pour pouvoir fonctionner le cytomètre en flux combine plusieurs technologies :

- Fluidique : pour introduire et canaliser les cellules vers la zone d'analyse
- Optique : source d'excitation et récupération des signaux
- Electronique et informatique : convertir les signaux optiques en signaux électriques puis les numériser pour en faire une analyse sur ordinateur



ANNEXE II : Première procédure de sélection des articles [10]

Grille de sélection des articles (ANAES, 2000)

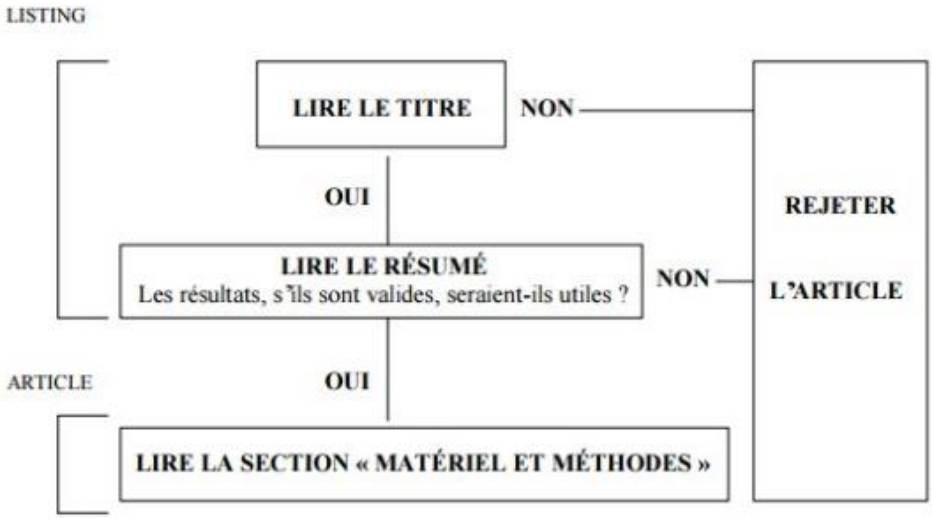


Figure 1. Les premières étapes de la sélection d'un article médical.

ANNEXE III : Grille de lecture des articles diagnostiques [10]

Titre et auteur de l'article :

Revue/Année/Vol/Pages :

Thème de l'article :

	OUI	NON	?
1. Les objectifs sont clairement définis	☐	☐	
2. Méthodologie			
- Le test étudié est comparé à un test de référence fiable et valide, déterminé a priori	☐	☐	
- La méthode de sélection des patients est décrite	☐	☐	
- La fréquence de la maladie dans l'échantillon étudié correspond aux données épidémiologiques connues	☐	☐	
- Le terme « normal » est défini	☐	☐	
3. Analyse des résultats			
- Les résultats sont analysés en aveugle quand c'est possible	☐	☐	
- Les caractéristiques diagnostiques du test sont calculées ou calculables (sensibilité, spécificité)	☐	☐	
4. L'utilité clinique tu test est recherchée	☐	☐	

ANNEXE IV : Grade des recommandations de l'ANAES [10]

Grade des recommandations	Niveau de preuve scientifique fourni par la littérature
A Preuve scientifique établie	Niveau 1 - essais comparatifs randomisés de forte puissance ; - méta-analyse d'essais comparatifs randomisés ; - analyse de décision fondée sur des études bien menées.
B Présomption scientifique	Niveau 2 - essais comparatifs randomisés de faible puissance ; - études comparatives non randomisées bien menées ; - études de cohortes.
C Faible niveau de preuve scientifique	Niveau 3 - études cas-témoins.
	Niveau 4 - études comparatives comportant des biais importants ; - études rétrospectives ; - séries de cas ; - études épidémiologiques descriptives (transversale, longitudinale).

ANNEXE V

DETECTION ET QUANTIFICATION DES HEMORRAGIES FOETO-MATERNELLES PAR IMMUNOMARQUAGE ANTI HbF : UNE ALTERNATIVE AU TEST DE KLEIHAUER

Stéphanie Huguet-Jacquot[1], Marc Larsen[1], Bruno Carbonne[1], Anne Cortey[1], Agnès Mailloux[1]

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

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'élution 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 mis au point 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 des échantillons a été faite sur un cytomètre de flux (CyFlow SL-4 – Partec) (Figure 2).

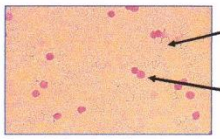


Figure 1 : Test de Kleihauer (cas d'une HFM massive)



Figure 2 : CyFlow SL-4 (Partec)

Méthode:

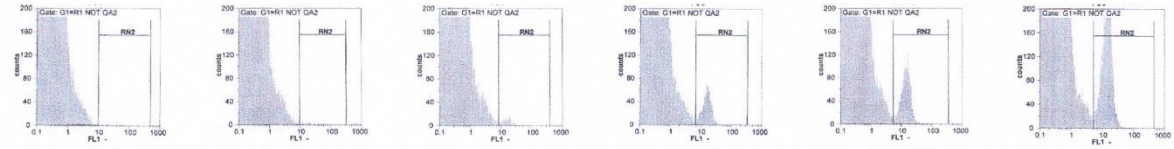
- 10 µl de sang total prélevé sur Citrate ou EDTA dilué au 1/20 dans du PBS.
- + 750 µL 0.05% glutaraldehyde-PBS, incubation pendant 10 min.
- + 1.5 mL de solution de perméabilisation 0.1% Triton-PBS, incubation pendant 10 min. Centrifugation et décantation.
- + 5 µl d'anti-HbF-FITC (Invitrogen), incubation pendant 15 min.
- + 1mL de PBS.
- Analyse sur le CyFlow SL-4.

1ère partie : Nous avons validé la technique en utilisant différents mélanges artificiels de sang fœtal / sang adulte (de 0 hématies fœtales (HF)/10000 hématies adultes (HA) à 600 HF/10000 HA). Cinq séries indépendantes ont été réalisées dont 3 analysées 3 fois. 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 83 patients : 22 échantillons avec un TKI positif (entre 5 et 538/10000), 12 échantillons avec un TKI entre < 1 et 4/10000, 36 échantillons avec un TKI négatif et 13 échantillons avec des cellules ininterprétables. Les échantillons de patientes rhésus D négatif ont également été analysés avec l'anti-RhD-FITC (BRAD3).

Résultats:

1ère partie - Mélanges artificiels de sang fœtal / sang adulte (0 HF / 10000 HA à 600 HF / 10000 HA) : Exemples de graphiques



RN2 = 0 HF / 10000 HA | 5 HF / 10000 HA | 25 HF / 10000 HA | 100 HF / 10000 HA | 200 HF / 10000 HA | 500 HF / 10000 HA

Nous avons remarqué une bonne stabilité de l'intensité du marquage quelque soit le nombre d'HF.

Le coefficient de variation intra-série est proche de 10% pour un TKI entre 5/10000 et 25/10000, proche de 5% entre 50/10000 et 100/10000 et < 2,5% pour des valeurs > 200/10000.
Le coefficient de variation inter-série est proche de 15% pour les valeurs entre 5/10000 et 10/10000 et proche de 10% pour un TKI > 25/10000.
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	43,30%	17,32%	5,59%	9,73%	7,67%	2,12%	0,97%	1,67%	0,15%	2,50%	0,46%
CV Intra-série II	0,00%	7,53%	18,41%	6,25%	3,22%	3,76%	0,86%	2,49%	1,26%	15,35%	2,64%
CV Intra-série III	21,65%	10,19%	7,07%	7,14%	1,82%	6,11%	2,34%	1,11%	2,38%	0,84%	2,08%
CV Inter-série	54,21%	14,31%	16,54%	6,58%	10,81%	11,16%	7,89%	11,17%	11,65%	6,38%	5,56%

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

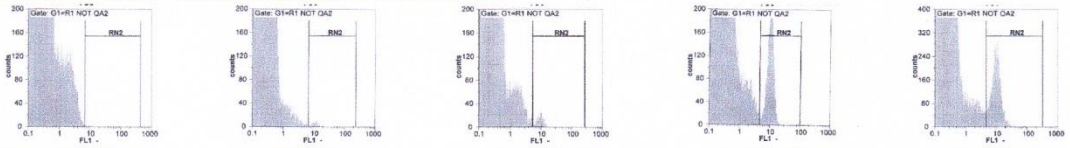
Il n'y a aucune différence significative entre les cinq séries (p<0,05 test t).

La limite de sensibilité de la technique avec un CV de 15% a été trouvée proche de 5 HF / 10000 HA.

Le ratio d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec le TKI (en moyenne, pente 1,04; r^2=0,96 – Deming) et avec BRAD3 (en moyenne, pente 1,09; r^2=0,92 – Deming).

2ème partie - échantillons cliniques :

Analyse de 70 échantillons cliniques avec un TKI entre 0 and 538/10000. Exemples de graphiques :



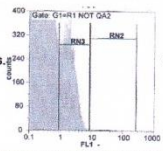
RN2= 0 HF / 10000 HA | 13 HF / 10000 HA | 37 HF / 10000 HA | 406 HF / 10000 HA | 538 HF / 10000 HA

Le pourcentage d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec le TKI pour un TKI > 5 (Pente 1,01 ; r^2=0,92 - Deming).

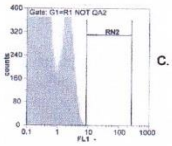
Le pourcentage d'HF est bien corrélé aux valeurs obtenues avec BRAD3 pour un TKI >5 (Pente 1,16 ; r^2=0.92 - Deming).

Analyse de 13 échantillons cliniques avec des cellules ininterprétables au TKI. Exemples de graphiques :

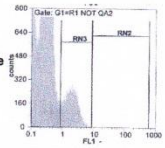
A.Quelques cellules ininterprétables.



B. Nombreuses cellules ininterprétables



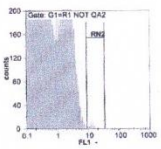
C. 1,6% d'HbF à l'électrophorèse de l'hémoglobine



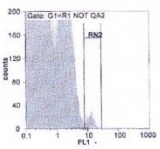
Exemples de graphiques permettant de conclure que les cellules ininterprétables sont des F-cells car l'intensité de fluorescence plus faible de ces cellules est stable entre 1 et 10, tandis que les HF se situent au delà de 10.

De plus, afin de savoir si les HF se distinguent des F-cells, nous avons analysé des mélanges artificiels entre l'échantillon C. (1,6% d'HbF) et du sang fœtal. On observe 2 pics bien distincts même pour des petits pourcentages d'HF :

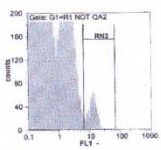
5 HF / 10000 HA



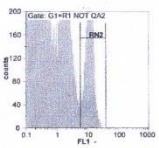
25 HF / 10000 HA



100 HF / 10000 HA



500 HF / 10000 HA



Conclusions:

. Les résultats des mélanges artificiels de sang foetal et de sang adulte montrent une bonne corrélation avec les résultats obtenus par le TKi, même pour les valeurs faibles. Cette tendance est confirmée avec les échantillons de patients.

. Par ailleurs, cette technique permet de conclure sur la nature des cellules ininterprétables car elles se distinguent bien des HF par leur intensité de fluorescence plus faible .

. 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).

ANNEXE VI

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-Jacquot[1], Johannes Hoffmann[2], Marc Larsen[1], Bruno Carbonne[1], Anne Cortey[1], Agnès Mailloux[1]

[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'élution 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).

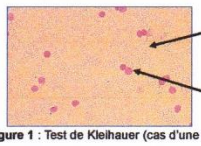


Figure 1 : Test de Kleihauer (cas d'une HFM massive)

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.



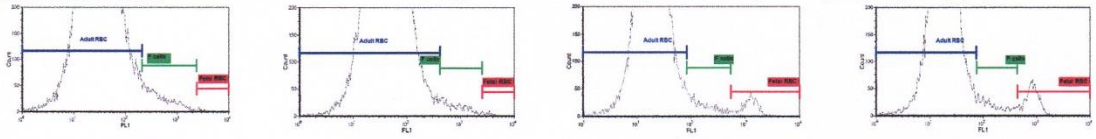
Figure 2 : Cell-Dyn Sapphire (Abbott Diagnostics)

1ère partie : Nous avons validé la technique en utilisant différents mélanges artificiels de sang fœtal / sang adulte (de 0 hématies fœtales (HF)/10000 hématies 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 fœtal / sang adulte, exemples de graphiques



5 HF / 10000 HA | 25 HF / 10000 HA | 200 HF / 10000 HA | 500 HF / 10000 HA

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%

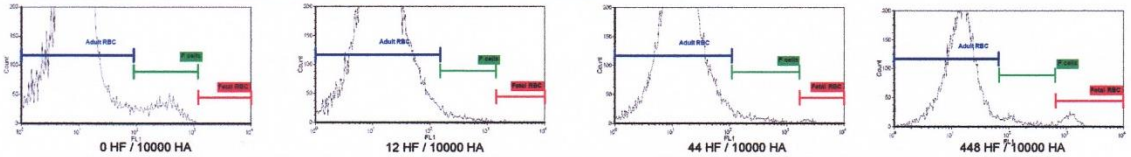
Tableau 1 : Coefficients de variation intra-série et coefficients de variation inter-série pour les 5 séries de mélanges artificiels de sang fœtal et sang adulte.

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



0 HF / 10000 HA | 12 HF / 10000 HA | 44 HF / 10000 HA | 448 HF / 10000 HA

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)

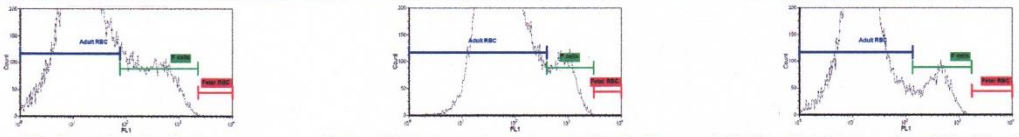
Tableau 2 : Passing Bablok entre KBT / FMH QuikQuant et BRAD3 / FMH QuikQuant.

Variable	TKI	BRAD3
Variable	**HbF**	**HbF**
Taille de l'échantillon	147	79
Droite de regression	**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 regression	**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 (↘ Intensité), du délai entre le marquage et le passage du tube sur le Sapphire (↗ 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.

ANNEXE VII

Recherche et quantification de l'hémorragie fœto-maternelle par cytométrie en flux avec double marquage anti-hémoglobine F et anti-anhydrase carbonique

eurofins | Biomnis

E. RABUT, A. CASTRO-FERNANDEZ, N. MEKNACHE
Laboratoire Biomnis, Ivry-sur-Seine, FRANCE

Introduction

But : Evaluer la technique de détection et quantification de l'hémorragie fœto-maternelle (HFM) par cytométrie en flux (CMF), à l'aide d'un kit utilisant un double marquage anti-hémoglobine fœtale (anti-HbF) et anti-anhydrase carbonique (anti-AC).

Méthode

L'anticorps anti-HbF est dirigé contre l'hémoglobine fœtale exprimée dans les érythrocytes fœtaux, et dans un faible pourcentage d'hématies adultes. En cas d'augmentation de l'HbF chez l'adulte, la recherche d'HFM à l'aide d'un réactif anti-HbF seul ou par technique cytochimique de Kleihauer peut être ininterprétable. L'utilisation d'un deuxième anticorps anti-AC présente alors tout son intérêt car l'expression de l'anhydrase carbonique est limitée aux hématies adultes.

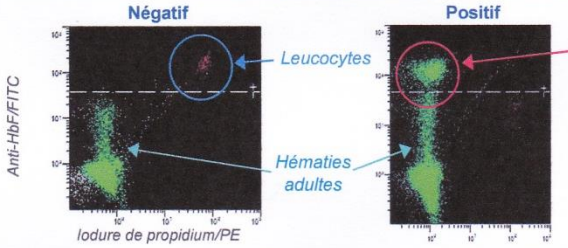
29 prélèvements de sang total EDTA de femmes enceintes, dont 22 présentent un résultat ininterprétable et 7 un résultat positif avec le réactif de routine anti-HbF FMH QuikQuant (IQ Products) ont été testés avec le réactif Fetal Cell Count Kit (IQ Products), sur cytomètre en flux Navios, Beckman-Coulter. L'acquisition est effectuée sur 100 000 évènements.

Les contrôles internes de qualité FetalTrol, IQ Products (1 niveau négatif et 1 niveau positif fort) sont utilisés pour encadrer les séries. Le contrôle positif fort permet de définir les régions (hématies adultes/ hématies fœtales). Le CV maximum acceptable a été défini à 15% pour ce niveau positif fort.

En parallèle : réalisation d'une électrophorèse capillaire de l'hémoglobine chez toutes les patientes présentant un résultat ininterprétable avec le réactif FMH QuikQuant.

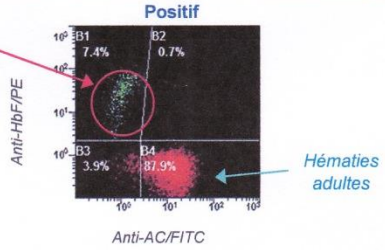
Résultats

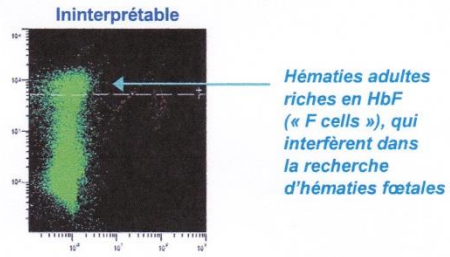
Réactif anti-HbF (FMH QuikQuant)

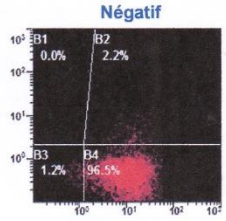


L'iodure de propidium est utilisé pour exclure les cellules nucléées qui génèrent une autofluorescence.

Réactif anti-HbF + anti-AC (Fetal Cell Count Kit)





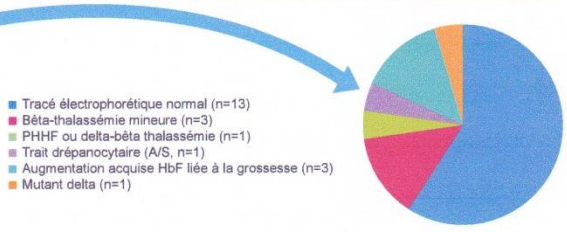


Comparaison des 2 réactifs de cytométrie en flux

	Marquage anti-HbF/iodure de propidium (kit FMH QuikQuant)	Marquage anti-HbF/anti-AC (kit Fetal Cell Count)
N = 22 échantillons	Résultat ininterprétable	<0,06 %
Échantillon positif n°1	7,84 %	6,63 %
Échantillon positif n°2	1,47 %	1,77 %
Échantillon positif n°3	0,96 %	1,40 %
Échantillon positif n°4	0,16 %	0,10 %
Échantillon positif n°5	5,51 %	7,40 %
Échantillon positif n°6	3,31 %	4,22 %
Échantillon positif n°7	0,12 %	0,13 %

Les résultats sont exprimés en % d'hématies fœtales dans la circulation maternelle.
Le seuil de positivité de la méthode est de 0,06% (soit environ 3 mL de sang fœtal).

Electrophorèse de l'hémoglobine des 22 patientes présentant un résultat ininterprétable avec le réactif anti-HbF QuikQuant



Conclusion

Ce kit est intéressant en 2ème intention chez les patientes présentant un premier résultat ininterprétable avec le réactif anti-HbF (notamment chez les patientes RH:1 pour lesquelles l'utilisation d'un réactif anti-D en CMF n'est pas possible). Chez ces patientes, il peut être par ailleurs conseillé de compléter le bilan par une électrophorèse de l'hémoglobine en l'absence d'antécédent (27% de patientes présentant une hémoglobinopathie dans notre série).

Réactif non utilisable en 1ère intention car le conditionnement du kit n'est pas adapté à notre activité de routine (seulement 25 tests/kit) et le réactif est par ailleurs coûteux. Temps technicien nécessaire : environ 2h

Poster P066 - 28e Congrès de la Société Française de Transfusion Sanguine, 20 au 22 Septembre 2017, Bordeaux, France

ANNEXE VIII

Bilan de la mise en place d'un programme d'évaluation externe de la qualité pour le test de Kleihauer

S. Huguet-Jacquot[1], A. Vassault[2], A. Plantier[1], O. Oudin[1], A. Brument[1], V. Zerr[1], H. Delaby[1], C. Toly-Ndour[1], M.Vaubourdolle[3], A. Mailloux[1]
1. Centre National de Référence en Hémobiologie périnatale(National Center of Reference in Perinatal Haemobiology -CNRHP).Hôpitaux universitaires est Parisien – Hôpital Saint Antoine – 75012 – PARIS
2. ASQUALAB - Bâtiment Leriche – 8 rue Maria Helena Vieira Da Silva - 75014-PARIS
3. Pôle de biologie médicale et pathologie – Hôpital Saint Antoine – 184 rue du Faubourg St Antoine – 75012 - PARIS

INTRODUCTION

Le test de Kleihauer (TKH) permet de détecter et de quantifier une hémorragie foeto-maternelle. Bien que son intérêt clinique reste indiscutable pour la prise en charge du fœtus mais également pour l'adaptation posologique des IgRh chez la patiente RH:-1 (prophylaxie rhésus), cette technique manuelle est cependant souvent décriée en raison de son manque de standardisation, sa grande variabilité inter-opérateur nécessitant un personnel entrainé à la lecture de ces lames. Les techniques de cytométrie en flux sont de plus en plus répandues mais ont également leur limite liée aux interférences avec les hématies adultes contenant de l'hémoglobine F (F-cells).

Actuellement dans le cadre de l'accréditation, il est obligatoire pour tous les examens de laboratoire de disposer d'un contrôle externe de qualité. C'est pourquoi en 2015, le CNRHP qui intègre dans ses missions (circulaire ministérielle DGOS 2004) la préparation de standard et de contrôle de qualité a collaboré avec l'association ASQUALAB pour mettre en place une évaluation externe de la qualité

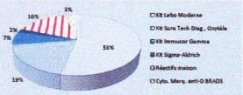
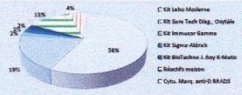
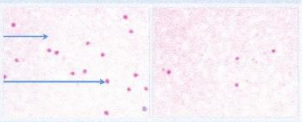
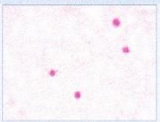
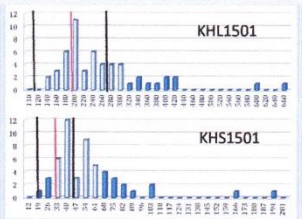
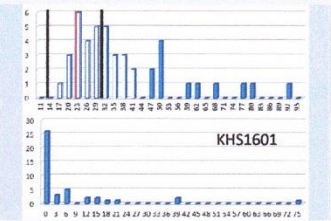
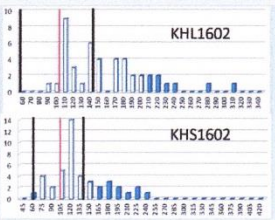
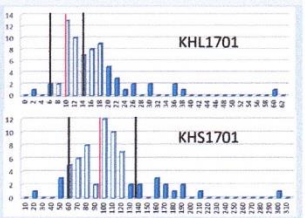
METHODE

Ce programme propose à la fois une lame colorée (KHL) et un sang total (KHS) associés à un cas clinique et un quiz portant sur la prestation de conseil (prophylaxie rhésus, examens complémentaires...).

Ces 2 échantillons sont issus de 2 mélanges calibrés préparés à partir d'un sang total adulte de groupe O RH:-1 et d'un sang de cordon de groupe O RH:1. Le sang total adulte RH:-1 provient d'un donneur prélevé par l'établissement français du sang. La négativité (absence de cellules ininterprétables) du test de Kleihauer (méthode colorimétrique et cytométrie en flux) pratiqué sur cette poche pour vérification a été confirmée. La valeur cible de chaque échantillon est obtenue par technique de cytométrie en flux avec un marquage anti-D (BRAD3).

Depuis 2015, 4 échanges ont été proposés.

RESULTATS

Périodes	Printemps 2015		Printemps 2016		Automne 2016		Printemps 2017	
Echantillons	KHL1501	KHS1501	KHL1601	KHS1601	KHL1602	KHS1602	KHL1701	KHS1701
Labos (N)	57		45		44		72	
Techniques de colorat° pour KHS								
TKH Globules rouges adultes / Globules rouges fœtaux					Même mélange pour les 2 échantillons 			
Valeur cible HF/10000HA	192	32	22	0	104	104	10	97
Moyenne robuste HF/10000HA	220	45	29		145	116	14	92
CV interlabo	25.1%	29.5%	27.3%		27.7%	27.7%	30.0%	27.0%
% de labo ayant : ≠ d'exactitude de ±40% / valeur cible	35%	59%	51%	47% negatif 37% positif	49%	33%	51%	28%
≠ d'exactitude de ±40% / moyenne robuste	22%	33%	33%	13% ininterprétable	20%	27%	31%	26%
Resultats Valeur cible +/-40% n TKH Barres Blanches = +/- 40% moyenne robuste	 KHL1501 KHS1501		 KHL1601 KHS1601		 KHL1602 KHS1602		 KHL1701 KHS1701	
Cas cliniques % bonnes réponses	78%	69%	78%	77%	77%	41,5%	86,5%	86%

CONCLUSION

Ces différentes campagnes montrent une variabilité inter-laboratoire importante entre 25 et 30% avec une surestimation des comptages par rapport à la valeur cible probablement due à une sous-estimation des hématies adultes. On note cependant une amélioration sur la campagne de 2017. Par ailleurs les résultats du quiz lié au cas clinique sont très variables. cette hétérogénéité des pratiques repose essentiellement sur le contrôle du Kleihauer et de la Recherche d'Agglutinine Irrégulière à distance alors que la prophylaxie rhésus est globalement bien conseillée.

Cette évaluation illustre les difficultés de standardisation du TKH avec une nécessité d'avoir des recommandations pour l'interprétation et le comptage des frottis.

RESUME

Le diagnostic des hémorragies fœto-maternelles – Revue de la littérature

Objectif : Déterminer si les nouvelles méthodes diagnostiques disponibles, comme la cytométrie en flux, l'étude échographique du doppler de l'artère cérébrale moyenne, le dosage de l'α-foetoprotéine et le test d'agglutination, représentent des techniques plus fiables que le test de Kleihauer pour le diagnostic des hémorragies fœto-maternelles. Le contexte particulier de l'allo-immunisation materno-fœtal ne sera pas abordé.

Matériels et méthode : Revue de la littérature conduite de Mars 2017 à Avril 2017 sur trois bases données (Pubmed, ScienceDirect, EM Premium) en utilisant les mots clés suivants : hémorragie fœto-maternelle, transfusion fœto-maternelle, cytométrie en flux ET hémorragie fœto-maternelle. Quinze articles ont été sélectionnés.

Résultats : Malgré son manque de reproductibilité, le test de Kleihauer demeure le test de référence dans le diagnostic des hémorragies fœto-maternelles. Cependant, la cytométrie en flux reste une technique plus fiable et plus précise que le test de Kleihauer mais elle présente un coût élevé qui peut limiter son utilisation. Les autres méthodes étudiées ne sont pas généralisables pour le diagnostic des hémorragies fœto-maternelles : l'étude du pic systolique de vélocité de l'artère cérébrale moyenne est un indicateur indirect de l'anémie indépendamment de son étiologie ; le dosage de l'α-foetoprotéine est un marqueur peu spécifique ; les tests d'agglutination et des Rosettes sont trop restrictifs puisque limités aux patientes Rhésus négatif.

Conclusion : Le manque de standardisation du test de Kleihauer est susceptible de s'améliorer avec le développement, ces dernières années, d'automates affinant sa reproductibilité. La cytométrie en flux reste une technique prometteuse de plus en plus répandue et elle est amenée à s'étendre dans l'avenir.

ABSTRACT

The diagnosis of fetomaternal hemorrhage – Literature review

Objective : To determine if the new diagnosis methods available, like flow cytometry, doppler echographic study of the middle cerebral artery, the determination of alpha-fetoprotein, the agglutination test, represent more reliable techniques than the Kleihauer test for the diagnosis of fetomaternal hemorrhage. The special context of maternal-fetal alloimmunization will not be discussed.

Materials and methods : Literature review conducted from March 2017 to April 2017 on three databases (Pubmed, ScienceDirect, EM Premium) by using the following keywords : fetomaternal hemorrhage, fetomaternal transfusion, flow cytometry AND fetomaternal hemorrhage. 15 articles were selected.

Results : Despite its significant lack of reproducibility, the Kleihauer test remains the reference test in the diagnosis of fetomaternal hemorrhage. However, the flow cytometry test remains a more reliable and accurate technique than the Kleihauer test but has a high cost that can limit its use. The other methods studied are not generalizable : peak systolic velocity in the middle cerebral artery is an indirect indicator of anemia irrespective etiology ; the determination of alpha-fetoprotein is a poorly specific indicator ; the agglutination and Rosette tests are too restrictive because they are limited to negative patients.

Conclusion : The lack of standardization of the Kleihauer test tends to ameliorate with the development in recent years of automata improving its reproducibility. Flow cytometry test remains a promising technique more and more widespread.