



PLACE DU TEST DE KLEIHAUER DANS LA PROPHYLAXIE RHESUS

Stéphanie HUGUET-JACQUOT

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP) - Responsable Dr Agnès Mailloux

DMU BioGem - Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien – AP-HP – Paris



CONTEXTE : RISQUE D'ALLO-IMMUNISATION ANTI-RH1 (RhD) CHEZ LA FEMME ENCEINTE RH1 NEGATIF

- **Permanent et lié à la survenue d'Hémorragies Foeto-Maternelles (HFM) = Passage d'hématies fœtales RH1 positif dans la circulation maternelle d'une femme enceinte RH1 négatif**
 - Spontanées (surtout au troisième trimestre)
 - ou induites par une série d'évènements (choc, accouchements, MFIU, IVG) ou manœuvres obstétricales (version, amniocentèse....)
- **Croît avec l'âge gestationnel**
- **Dépend de variables immunogénétiques individuelles**



PROPHYLAXIE RHESUS - DEFINITION

Basée sur l'injection d'IgRH (Ac anti-RH1) afin de neutraliser les globules rouges fœtaux RH1 positif circulant chez la mère RH1 négatif non immunisée anti-RH1.

- **Prévention ciblée** au cours de la grossesse, uniquement dans les situations à risque HFM. *Injection de Rhophylac® 200 µg*
- **L'immunoprophylaxie RH1 anténatale systématique du troisième trimestre de grossesse** - But : couvrir les HFM du troisième trimestre parfaitement inapparentes (responsables du tiers des allo-immunisations). *Injection de Rhophylac® 300 µg à 28SA.*
- **Prévention du post-partum** dans les 72 heures qui suivent l'accouchement. *Injection de Rhophylac® 200 µg*



PROPHYLAXIE RHESUS - EFFICACITE

Dépend de 3 paramètres :

1- Délai d'administration (maximum dans les 72 heures),

2- Voie d'injection (bio-disponibilité immédiate par la voie IV)

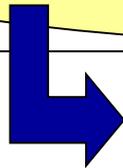
3- Adaptation de la posologie à l'importance de l'HFM

Apport égal ou supérieur à 20 μg d'IgRH par ml de globules rouges fœtaux RH1 positif ➤ **Test de Kleihauer**



PLACE DU KLEIHAUER DANS LA PROPHYLAXIE RHESUS

	ANTENATALE CIBLEE	ANTENATALE SYSTEMATIQUE	POSTNATALE
TEST DE KLEIHAUER	OUI APRES 15 SA	NON	OUI



Permet d'estimer le **volume de l'HFM** donc la **dose d'IgG anti-D nécessaire** pour prévenir une allo-immunisation

= **Adaptation de la posologie des IgRH**



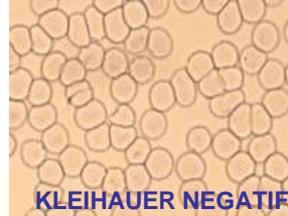
TEST DE KLEIHAUER

• TEST DE REFERENCE

Kleihauer et al , 1957

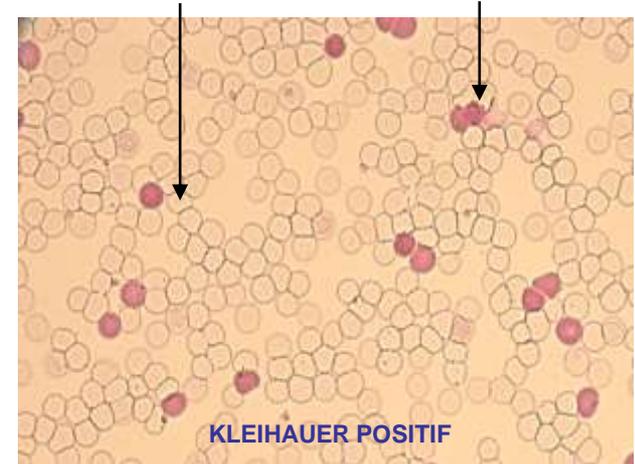
Test cytochimique sur frottis sanguin fixé à l'éthanol

- Elimination sélective de l'hémoglobine adulte sous l'action d'une solution tampon pH acide, tout en préservant le contenu en hémoglobine fœtale (HbF) des hématies.
- Comptage au microscope muni d'un oculaire quadrillé. 2^{ème} lame en cas de KH positif étant donné l'incertitude de mesure de la technique
- Plusieurs réactifs commerciaux disponibles / réactifs maison au CNRHP / automate : variabilité des colorations.



Erythrocytes adultes
ayant perdu Hb = formes
cellulaires fantomatiques,
sphériques, incolores

Erythrocytes avec
Hb fœtale fixant
phloxine : rose vif
et réfringent



**RESULTAT : 500 HF / 10 000 HA : soit 250 ml
de sang fœtal (gros passage)**

1 HF / 10 000 HA = 0,5 mL de sang fœtal



INCONVENIENTS DU TEST DE KLEIHAUER

Technique souvent décrite

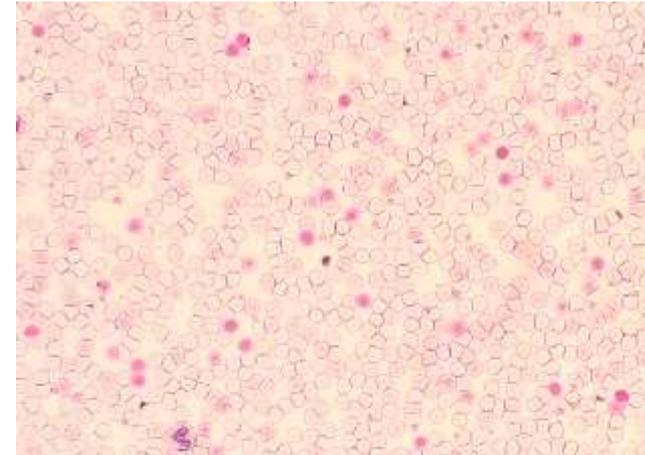
☞ Technique manuelle, non standardisée, nécessitant un personnel formé et entraîné

☞ Difficulté dans le décompte des cellules (grande variation inter-opérateur)

☞ Difficulté dans l'interprétation des frottis :

Problème des hématies maternelles avec un contenu élevé en HbF. Fcells liés à la grossesse ou hémoglobinopathie considérés à tort comme des tests de Kleihauer positifs

⇒ Cellules ininterprétables ➤ Aide de la cytométrie en flux

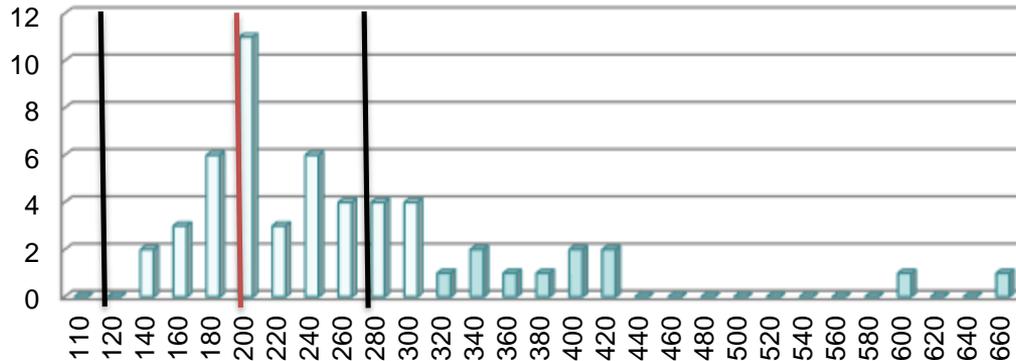


KLEIHAUER avec de très nombreuses cellules ininterprétables ou F-cells caractérisées par un dégradé dans la coloration rose des hématies



VARIABILITES INTER-OPERATEURS

EEQ Test de Kleihauer - Echantillon KHL1501
Répartition des résultats



Frottis coloré

Valeur cible à 192 HF/ 10000 HA

Moyenne robuste : 220 HF/HA

CV : 25,1 %

% des résultats présentent une
différence d'exactitude

supérieure à la limite de +/-40 %

De la valeur cible : 35%

De la moyenne robuste : 22%



TEST DE KLEIHAUER

- **Indiqué dans les situations à risque d'HFM supérieure à 12 ml de sang fœtal**
(*volume couvert par 200µg d'IgG anti-D*)
 - Accouchement (HFM > 12,5ml (25 HF/10 000) : 0,7%)
 - tout arrêt de grossesse après 15 SA
 - PSF et Amniocentèse trans-placentaire, Trauma, VME
- **Inutile :**
 - Avant 15 SA quelque soit le motif
 - Cerclage, Menace d'Accouchement Prématuro, Amniocentèse extra-placentaire.
- Il faut 200µg d'anti-D pour couvrir une HFM jusqu'à 24 HF/10 000 HA puis 20 µg par tranche de 4 HF/10 000 HA ➤ **Abaque de calcul**
- Abaque calculé avec une légère surestimation des doses pour une efficacité maximale.



Immuno-prophylaxie rhésus : calcul de doses d'IgRh Modalités pratiques en cas d'hémorragie foeto-maternelle dépassant 40 hématies fœtales pour 10 000 hématies maternelles :

Le calcul des doses s'effectue selon les modalités générales suivantes. (tableau)

KLEIHAUER (HF/10.000HA)	Dose de 200µg		Dose de 300µg		Voie d'administration
	Doses	µg	Doses	µg	
0-≤4	1	200µg	1	300	IV Directe
5-24	1	200µg	1	300	
25-44	2	400µg	1	300	
45-64	2	400µg	2	600	PERFUSION LENTE Dans NaCl à 9 pour mille
65-84	3	600µg	2	600	
85-104	3	600µg	2	600	
105-124	4	800µg	3	900	
125-144	4	800µg	3	900	
145-164	5	1000µg	3	900	
165-184	5	1000µg	4	1200	
185-204	6	1200µg	4	1200	
205-224	6	1200µg	4	1200	
225-244	7	1400µg	5	1500	
245-264	7	1400µg	5	1500	
265-284	8	1600µg	5	1500	
285-304	8	1600µg	6	1800	



TEST DE KLEIHAUER POSITIF INTERPRETATION ET CONSEILS DE PRISE EN CHARGE

PATIENTE RH1 NEGATIF

Patiente non accouchée

- Adaptation posologique à **partir de 25HF/ 10000 HA** (Statut RH1 du fœtus inconnu ou fœtus génotypé *RHD* positif)
- **KLEIHAUER à contrôler** avant l'injection et 24h après l'injection dès 5HF/ 10 000 HA (48h si supérieur à 100 HF/ 10000 HA)
- Si Kleihauer persiste positif hypothèse fœtus RH1 négatif (intérêt de la cytométrie) / saignement chronique / variant RH1 partiel chez la mère ou le fœtus / injection en IM...

Patiente à l'accouchement (MFI et IMG)

- Adaptation posologique à **partir de 25HF/ 10000 HA** si le nouveau-né est RH1 positif ou génotypé *RHD* positif
- **KLEIHAUER à contrôler** avant l'injection et 24 h après l'injection dès 5 HF/ 10 000 HA (48h si supérieur à 100 HF/10000 HA)
- **RAI à contrôler 6 mois après injection**



TEST DE KLEIHAUER POSITIF INTERPRETATION ET CONSEILS DE PRISE EN CHARGE PATIENTE RH1 NEGATIF

❖ **Moyen de juger d'une prophylaxie adéquate :**

= Négativation du Kleihauer de contrôle 24 à 48 h après l'injection d'IgG anti-D

La RAI n'est pas un moyen de juger d'une prophylaxie adéquate

- **Absence d'anti-D:**
 - pas d'injection ou injection IM (passage différé des anticorps) ?
 - HFM massive ?
- **Présence d'anti-D (et trace d'anti-C RH2) :**
 - anticorps en excès ?
 - Ratio de 20µg/ml de GR atteint ?



KLEIHAUER DE CONTROLE EFFICACITE IMMUNO-SUPPRESSIVE DES IgG ANTI-D

PATIENTE RH1 NEGATIF

- ✿ Contrôle avant injection d'IgRh pour tout KH $\geq 5\text{HF}/10000\text{HA}$
 - ☞ Posologie conseillée adaptée
(relargage d'hématies fœtales / erreur de comptage)
- ✿ Contrôle 24 ou 48h après pour tout KH $\geq 5\text{HF}/10000\text{HA}$
 - ☞ Négativisation du Kleihauer

Si KH persiste positif

+ microtitrage des anti-D (Taux d'Anti-D circulant suffisant) $\mu\text{T} \times 3\text{L} > 20\mu\text{g}/\text{mL} \times \text{KH} \times 0,25$
Rechercher la raison de cette absence de négativation

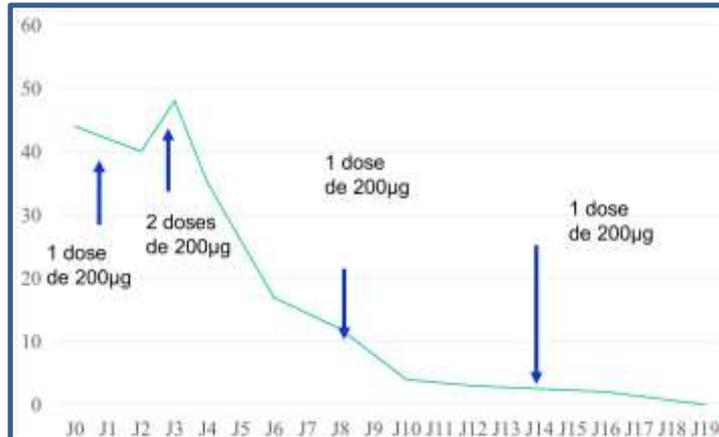
Objectif est de savoir si on doit réinjecter ou s'abstenir en cas de persistance de KH positif



KLEIHAUER DE CONTROLE EFFICACITE IMMUNO-SUPRESSIVE DES IgG ANTI-D PATIENTE RH1 PARTIEL

Nécessité de recourir à des doses plus importantes chez patientes RH1 partiel pour obtenir la négativation du test de Kleihauer.

Fixation des IgRh en **grande** partie sur les hématies des patientes de phénotype RH1 partiel, laissant une très faible partie d'IgRh circulante pouvant se fixer à la surface des hématies fœtales.



Exemple

Patiente présentant un allèle weak D type 4.0
Test de Kleihauer positif à 44 HF/10 000 HA à l'accouchement.

Négativation du test après 6 doses d'IgRh de 200 µg à J 19, au lieu des 2 doses pour une patiente RH:-1



ABSTENTION D'IMMUNOPROPHYLAXIE

- 1- injection datant de moins de 3 semaines**
- 2- microdosage d'anti-RH1 > à 12 ng/ml**
- 3- Test de Kleihauer à 0 HF/10000 HA**



LIMITE DU TEST DE KLEIHAUER : LES CELLULES ININTERPRETABLES

- **Fcells** : présence de cellules de couleur rose allant du rose pâle au rose foncé.
- Pas de distinction possible avec vraies cellules fœtales.
- Pas de comptage précis des cellules ininterprétables mais cotation de leur présence : **quelques** (<1/Champs) , **assez nombreuses** (1-3/Champs), **nombreuses** (3-10/Champs) et **très nombreuses cellules ininterprétables** (>10/Champs).
- Pour les patientes RH1 négatif, sélection des patientes nécessitant un examen complémentaire : la réalisation d'un marquage en **cytométrie en flux** (marquage anti-D-FITC BRAD3) pour adaptation de posologie à partir de 25HF/10000HA.
- Evaluation du seuil en comptant le nombre de cellules rose moyen à rose foncé par champs.
- Atteinte du seuil à partir de 3 hématies de ce type par champs : nombreuses cellules ininterprétable. Il est alors nécessaire de faire le marquage en **cytométrie en flux**.



LA CMF UNE ALTERNATIVE AU TEST DE KLEIHAUER CYTOCHIMIQUE

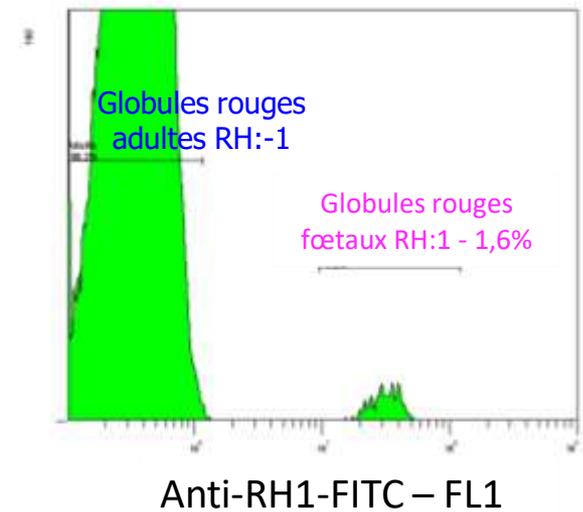
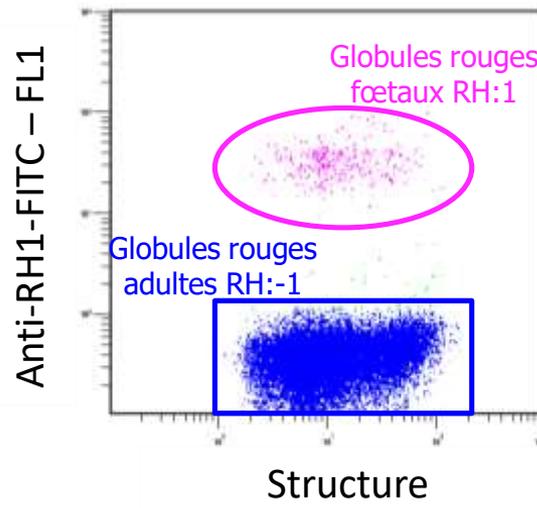
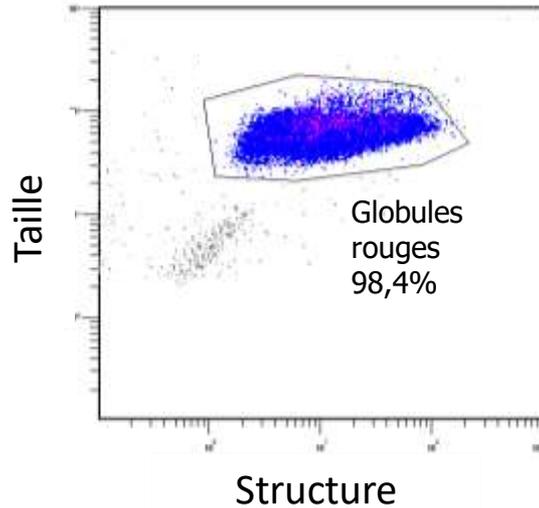
CMF adaptée à l'étude des évènements rares

- **Détection des hématies fœtales RH1 positif chez la patiente RH1 négatif**
= **Marquage de l'antigène RH1 / Anti-D-FITC BRAD3** ➔ **Prévention rhésus**
- **Détection des hématies fœtales dans la circulation maternelle quelque soit son statut RH1** = **Marquage intra-cytoplasmique de l'HbF**
 - **FMH QuikQuant Kit HbF**
 - **Fetal cell Count Kit HbF et AC**



MARQUAGE DE L'ANTIGÈNE RH1 (BRAD3)

PATIENTE RH1 NEGATIF



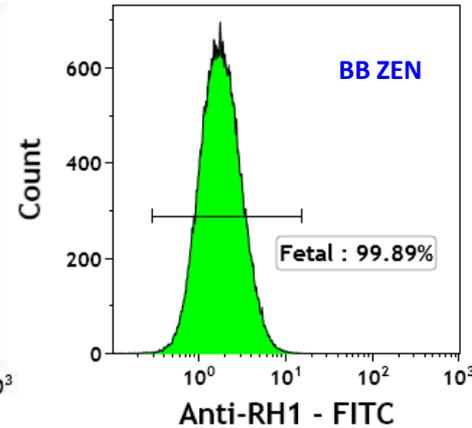
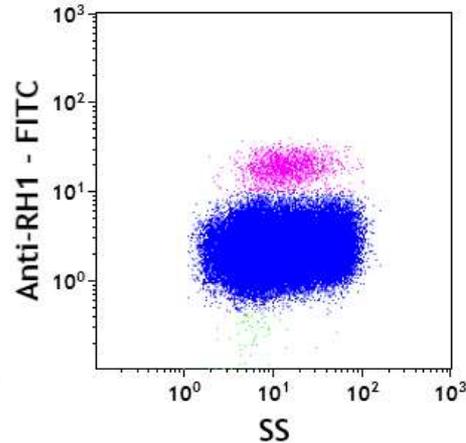
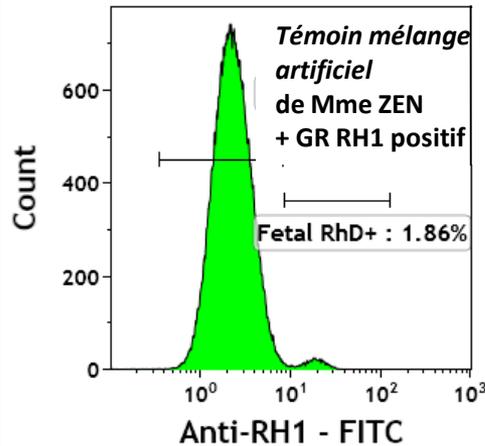
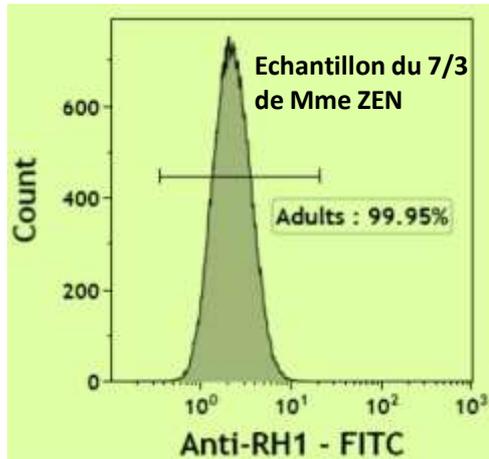


MARQUAGE DE L'ANTIGÈNE RH1 (BRAD3)

PATIENTE RH1 PARTIEL

Mme ZEN Antigène RH1 faible de type 4.0 ou 4.3 associé à un risque d'alloimmunisation anti-RH1

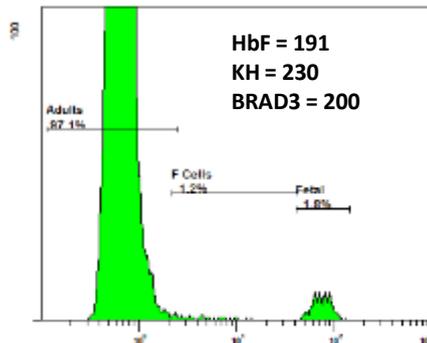
Kleihauer pour diminution des mouvements actifs fœtaux : 80HF/10000HA



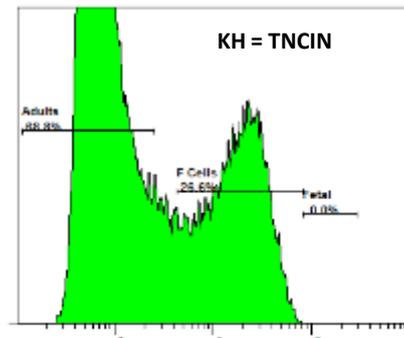


FMH QuikQuant™

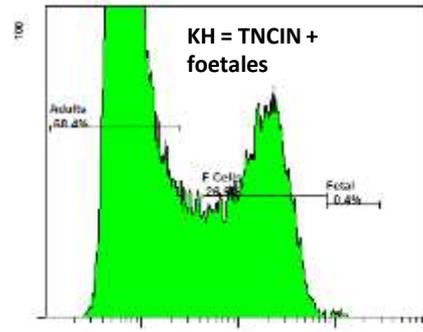
HbF seul



Anti-HbF FITC



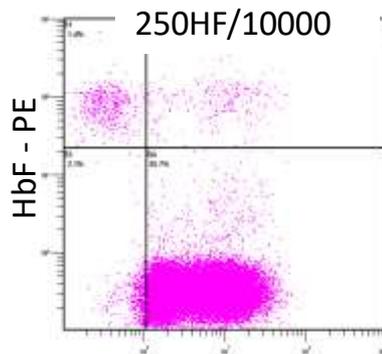
Anti-HbF FITC



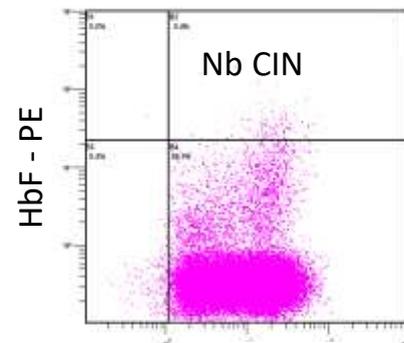
Anti-HbF FITC

Fetal Cell Count Kit™

HbF + Anhydrase carbonique



AC - FITC



AC - FITC



QUANTIFICATION des HFM en CMF

Bonne alternative au KH

Meilleure répétabilité et reproductibilité que le KH (limite de sensibilité à 5/10000)

Évite les problèmes d'interprétation (attention au marquage de l'HbF seul)

Marquage anti-D : technique simple et rapide mais d'utilisation limitée à la prophylaxie Rh chez la patiente RhD négatif et RhD partiel en complément du KH lame.

Nombreuses et très nombreuses cellules ininterprétables

Passage >24HF/10000HA en anténatal

Accouchement de jumeaux avec bébés RhD+/RhD- et passage

Marquage HbF ou HbF / AC : technique plus lourde peu adaptée à l'urgence mais utilisable pour toutes les indications (vrai Kleihauer).



CONCLUSION

Kleihauer examen essentiel afin de mener à bien la prophylaxie rhésus :

- Adaptation de posologie
- Kleihauer de contrôle lors de résultats positifs
- Abstention de traitement
- Examens complémentaires (CMF)

Présentation portant sur le **Kleihauer d'intérêt maternel**



Autre indication du Kleihauer : **Kleihauer d'intérêt foetal** qui est une urgence relative avec un délai de rendu de 6h, quelque soit le statut RH1 de la patiente.