

INCERTITUDE DE MESURE : 2 niveaux, méthode SFBC		
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. guide SFBC vol.1)	$U_c \approx \sqrt{u^2_{\text{étalon}} + u^2_{\text{méthode (repro CIQ)}}$	CNRHP – seuils de décision clinique
Quantification de l'incertitude (niveau 1)	0,798 ± 0,082 µg/dL 0,798 ± 10,3 %	10 %
Quantification de l'incertitude (niveau 2)	1,288 ± 0,136 µg/dL ou 1,288 ± 10,5 %	10 %

#### Calcul de U étalon

- Valeur de l'étalon BNL BE1449 = 0,750 µg/dL
- Valeur de l'étalon corrigée (en prenant en compte la valeur assignée de la bilirubine totale : certificat LNE) = 0,722
- Par différence : u(étalon) = 0,028 µg/dL au niveau 1, en proportion u(étalon) = 0,045 µg/dL au niveau 2

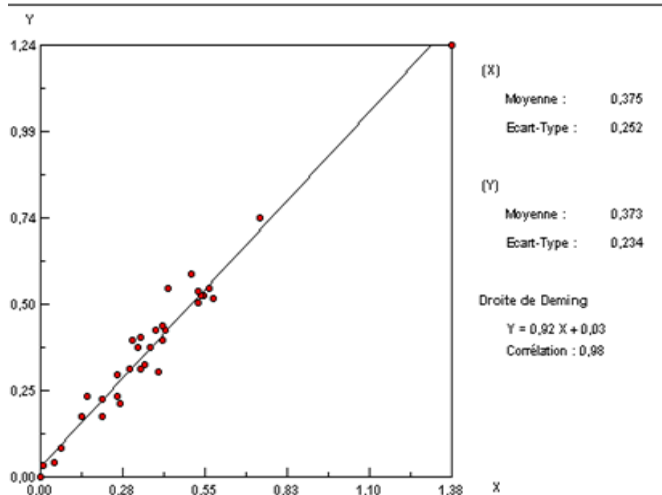
#### Éléments de calcul intermédiaires

	Niveau 1	Niveau 2
Moyenne (µg/dL)	0,798	1,288
CV fidélité intermédiaire (%)	3,8	4,0
Ecart-type (µg/dL)	0,0301	0,0511
u(CIQ) (µg/dL)	0,0301	0,0511
u(étalon) (µg/dL)	0,028	0,045
u(c) composée (µg/dL)	0,041	0,068
u(c) composée élargie (k=2) (µg/dL)	0,082	0,136
u(c) composée élargie (k=2) (%)	10,3	10,5

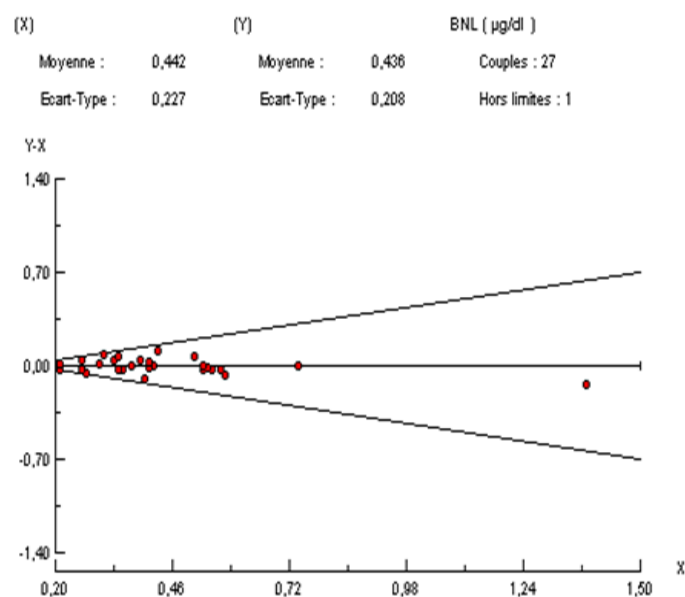
#### Conclusion

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Méthode SFBC
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD</b>	Indiko vs DXc-800 : méthode utilisée au LBU (2007) en garde ou en backup
<b>Nombre de mesures :</b>	
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	
<b>Equation de la droite de régression :</b>	
<b>Diagramme des différences et/ou des rapports :</b>	

BNL                      Domaine testé : 0,00 à 1,38 µg/dl                      Couples : 33



Niveau	X	Y calculé	Inexactitude tolérable	Inexactitude observée	Conclusions
Bas	0,20	0,21	0,03	0,01	Accepté
Moyen	0,50	0,49	0,09	-0,01	Accepté
Élevé	1,50	1,41	0,26	-0,09	Accepté



Période de Validation : Graphique des différences Y-X/X

**Conclusion :**

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable <input type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
Hémolyse	
Turbidité	
Bilirubine, ictère	NA
Médicaments	NA
...	

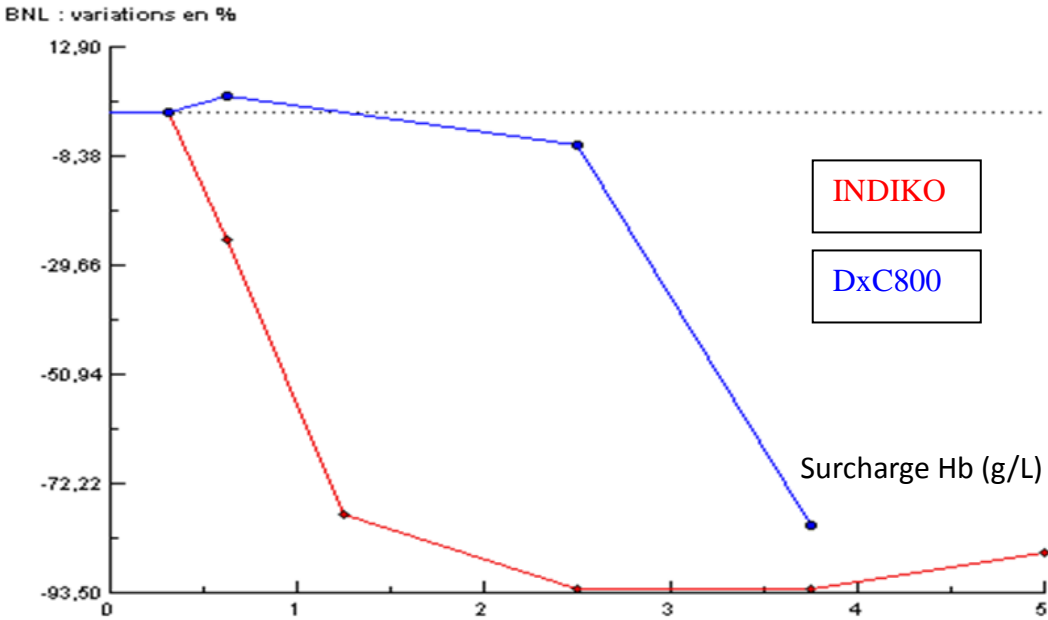
**Essai de surcharge pour l'étude de l'interférence de l'hémoglobine**

**Protocole expérimental**

tube n°	1	2	3	4	5	6	7
pool (µl)	900	900	900	900	900	900	900
hémolysat (60,5 g/l) (µl)	0	5	10	20	40	60	80
NaCl 150 mM (µl)	100	95	90	80	60	40	20
surcharge Hb (g/L)	0	0,302	0,605	1,21	2,42	3,63	4,84



**Résultats**



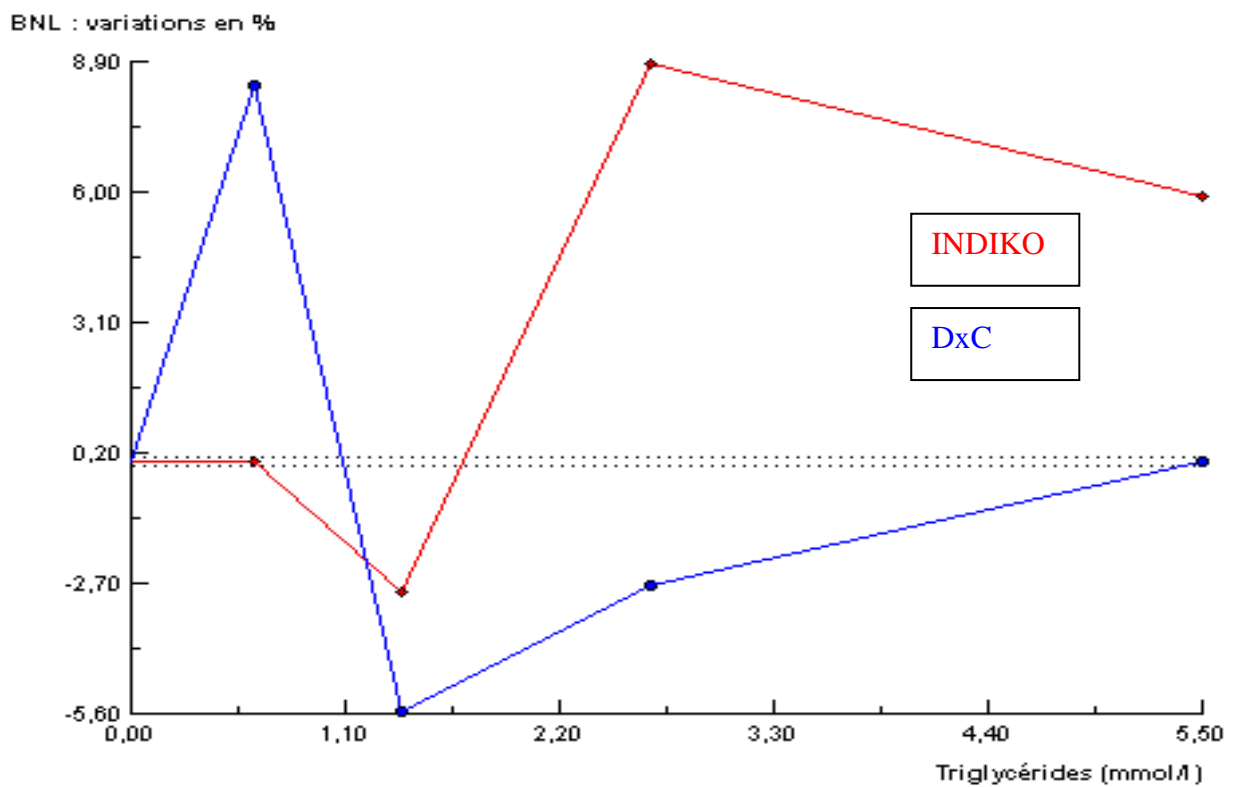
**Conclusion**

## Essai de surcharge pour la turbidimétrie

### Protocole expérimental

tube n°	A	B	C	D	E
dilution intralipide 20%	/	1/80e	1/40e	1/20e	1/10e
NaCl 150 mM (μl)	100	/	/	/	/
volume (μl)	/	100	100	100	100
pool plasma (μl)	900	900	900	900	900
aspect	clair	opalescent	opalescent	lactescent	lactescent
équivalence triglycérides (mM)	1,52	2,16	2,92	4,19	7,02
absorbance 600 nm	0,4	0,637	1,264	2,438 (dil 1/2)	1,724 (dil 1/2)

### Résultats



### Conclusion

### CV (%) retenu par le laboratoire :

Il est très difficile de retrouver dans la littérature un consensus sur le CV acceptable pour la technique manuelle du test de Kleihauer. Les CV sont très variables d'une publication à l'autre en fonction du type de comparaison (intra-laboratoire allant de 10 à 40%, inter-laboratoire parfois >100%, du niveau des échantillons testés). Tout le monde s'accorde à conclure sur le manque de reproductivité de la technique.

*Raafat A, Fraser N, Main R, Urbaniak SJ. A quality assurance scheme for the Kleihauer test : The Scottish experience 1988-1996. Transfusion Medicine, 1997, 7, 221-226.*

*Duckett JR, Constantine G. The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? Br J Obstet Gynaecol. 1997 Jul;104(7):845-6.*

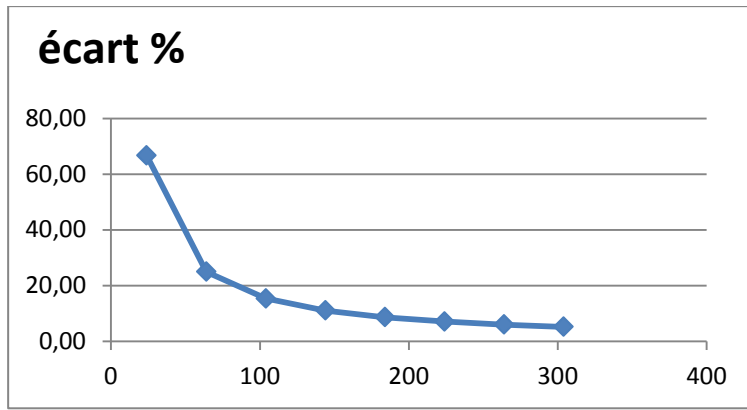
*Corsetti JP, Cowles JW, Cox MT, Blumberg N. A Rapid and Accurate Single-Drop Modification of the Acid-Elution Technique for Detecting Fetomaternal Hemorrhage. Vox sanguinis 1988 ; 54 : 39-42*

De plus une recherche de ce qui se fait pour la cytologie au niveau de la formule sanguine manuelle ne semble pas applicable pour le test de Kleihauer car les pourcentages cellulaires du test de Kleihauer sont très faibles souvent <1% (résultat rendu en nombre d'hématies fœtales pour 10000 hématies adultes) : Table de Rümke ou calcul des CV limites  $y=1/\text{racine}(\text{valeur cible})\times 100$  non transposable au Kleihauer.

Nous nous sommes basés sur le principe que le comptage devait se situer avec un CV compatible avec la pratique clinique et notamment avec la prophylaxie rhésus. En effet chez la patiente RH1 négatif l'adaptation posologique des IgRH se fait en fonction du résultat du Kleihauer. Le CV du Kleihauer doit permettre une bonne adaptation de la posologie en IgRH avec au minimum 20µg d'anti-D /ml de globules rouges RH1 positif pour une prophylaxie suffisante. Pour évaluer ce CV limite nous avons utilisé l'abaque d'adaptation posologique du Rhophylac (*Prevention of fetomaternal rhesus-D allo-immunisation. Practical aspects. J Gynecol Obstet Biol Reprod 2006 ; 35 : 1S123-1S130.*)

Pour une efficacité maximale il faut que la quantité d'anti-D passif administré soit  $\geq 20\mu\text{g}/\text{ml}$  de GR fœtaux RhD positif. Abaque de calcul basé sur la notion suivante : 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 calculé avec une légère surestimation des doses pour une efficacité maximale.

Kleihauer maximum avant changement de posologie	Volume de sang fœtal	Volume de Globules rouges fœtaux	Quantité d'anti-D minimum à administrer	Nombre de dose de 200µg	Quantité d'anti-D effectivement administrée	Quantité d'anti-D en trop	Nombre d'hématies fœtales supplémentaires couvertes	Ecart acceptable
	1HF/10000HA = 0,5mL sang fœtal	Vol sg / 2	vol GRx20µg/ml				80µg = 4x20µg	<b>16/Kleihauer seuil x100</b>
HF/10000HA	mL	mL	µg		µg	µg	20µg couvre 4 HF supplémentaires	%
24	12	6	120	1	200	80	16	<b>66,67</b>
64	32	16	320	2	400	80	16	<b>25,00</b>
104	52	26	520	3	600	80	16	<b>15,38</b>
144	72	36	720	4	800	80	16	<b>11,11</b>
184	92	46	920	5	1000	80	16	<b>8,70</b>
224	112	56	1120	6	1200	80	16	<b>7,14</b>
264	132	66	1320	7	1400	80	16	<b>6,06</b>
304	152	76	1520	8	1600	80	16	<b>5,26</b>



Kleihauer HF/10000HA

## VARIABILITE INTER-OPERATEURS

La variabilité inter-opérateur a été effectuée sur les CIQ lot 133 à 163 et 3 EEQ :

Au CNRHP un lot de CIQ est passé par semaine. Les lots 133 à 163 correspondent à une période allant du 15/09/2016 au 20/04/2017. Chaque lot a été compté par au moins 7 opérateurs différents.

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable <input type="checkbox"/>							
Echantillons lot CIQ	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire	Conclusion <sup>3</sup>
133	12	25	3.9	15.87	/	30	
134	13	31	3.7	12.04	/	30	
135	15	51	5.6	11.09	/	30	
136	15	14	1.8	13.06	/	30	
137	13	42	3.6	8.54	/	30	
138	12	21	2.4	11.43	/	30	
139	14	29	3.6	12.12	/	30	
140	13	42	3.4	8.08	/	30	
141	13	16	2.5	15.64	/	30	
142	14	18	2.4	13.39	/	30	
143	11	97	5.8	5.94	/	20	
144	13	25	4.0	15.51	/	30	
145	14	30	2.8	9.22	/	30	
146	13	28	2.3	8.34	/	30	
147	15	41	3.9	9.45	/	30	
148	11	24	3.5	14.67	/	30	
149	11	34	3.2	9.43	/	30	
150	13	30	6.2	20.36	/	30	
151	15	41	4.8	11.65	/	30	
152	13	28	3.9	13.91	/	30	
153	14	26	5.2	20.25	/	30	
154	9	30	3.3	10.78	/	30	
155	13	56	4.2	7.51	/	25	
156	15	14	1.7	12.16	/	30	
157	11	32	5.1	16.01	/	30	
158	12	25	3.1	12.42	/	30	
159	12	38	7.6	19.91	/	30	
160	12	20	2.7	13.34	/	30	
161	13	56	4.8	8.65	/	25	
162	14	16	3.0	19.30	/	30	
163	12	15	1.6	11.12	/	30	
Juillet 2015 KHL1501 (Asqualab)	12	191	16.7	8.70	/	10	
Juillet 2015 KHS1501 (Asqualab)	21	31	8.7	27.99	/	30	
Avril 2016 KHL1601 (Asqualab)	14	25	4.4	17.7	/	30	

Conclusion :

INCERTITUDE DE MESURE : Méthode CIQ/EEQ		
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14)	<b>Méthode CIQ/EEQ</b> Utilisation des valeurs de l'étude de la fidélité intermédiaire	CNRHP – seuils de décision clinique

Eléments de calcul :

Statistique descriptive des écarts des EEQ (HF/10000HA)			
	Valeur faible Mai 2015 1505E1 (Eurocell) Avril 2016 KHS1601 (Asqualab)	Valeur moyenne Juillet 2015 KHS1501 (Asqualab) Avril 2016 KHL1601 (Asqualab)	Valeur haute Mai 2015 1505E2 (Eurocell) Juillet 2015 KHL1501 (Asqualab) Décembre 2016 KHL1602 (Asqualab) Décembre 2016 KHS1602 (Asqualab)
Moyenne	0	-4	-11.5
Ecart-type	0	2.828	15.478
Minimum	0	2	3
Maximum	0	6	34
Etendue	0	4	31
Effectif	2	2	4
u(EEQ)	<b>0</b>	<b>3.651</b>	<b>16.842</b>

	5HF/10000HA	25HF/10000HA	200HF/10000HA
Moyenne (HF/10000HA)	5.607	25.964	211.929
CV fidélité intermédiaire (%)	26.73	11.65	6.119
Ecart-type (HF/10000HA)	1.499	3.024	12.967
u(CIQ) (HF/10000HA)	1.499	3.024	12.967
u(EEQ) (HF/10000HA)	<b>0.000</b>	<b>3.651</b>	<b>16.842</b>
u(c) composée (HF/10000HA)	1.499	4.741	21.255
u(c) composée élargie (k=2) (HF/10000HA)	2.998	9.481	42.511
u(c) composée élargie (k=2) (%)	53.5	36.5	20.0

INCERTITUDE DE MESURE : Méthode CIQ/EEQ		
Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) <input type="checkbox"/> ; calcul <input checked="" type="checkbox"/>		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14)	<b>Méthode CIQ/EEQ</b> Utilisation des valeurs de l'étude de la fidélité intermédiaire	CNRHP – seuils de décision clinique
Quantification de l'incertitude Valeur faible 5HF/10000HA	5.607 ± 2,998HF/10000HA ou 5.607 ± 53,5 %	30 % Contrôle des résultats
Quantification de l'incertitude Valeur moyenne 25HF/10000HA	25,964 ± 9,481HF/10000HA ou 25,964 ± 36.5 %	30 % Contrôle des résultats
Quantification de l'incertitude Valeur haute 200HF/10000HA	211,929 ± 42,511HF/10000HA ou 211,929 ± 20 %	10 % Contrôle des résultats

Conclusion :

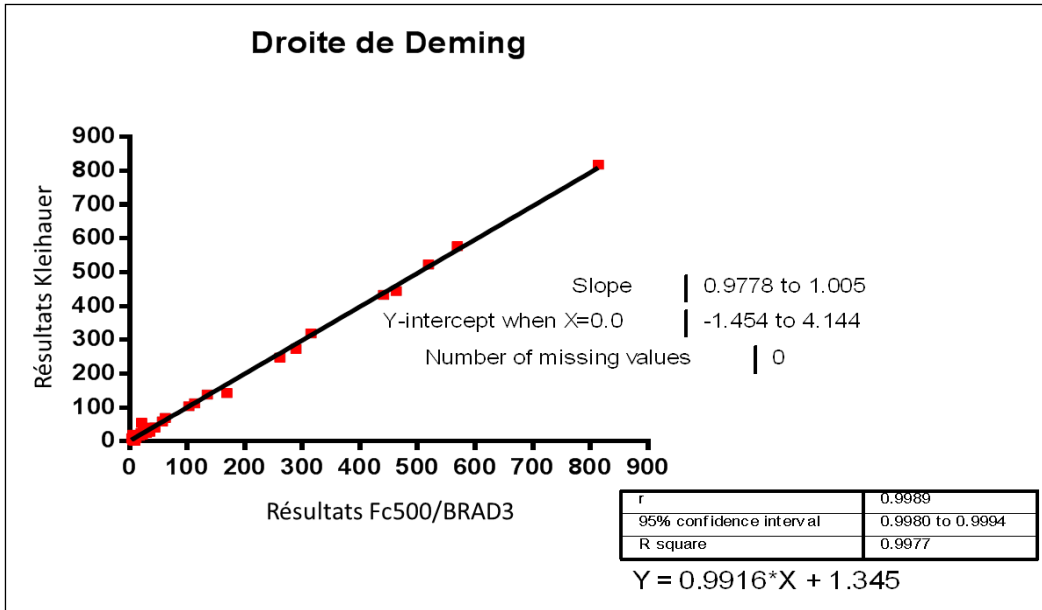
<b>COMPARAISON DE METHODES :</b> Applicable <input checked="" type="checkbox"/> ; non applicable (à justifier) <input type="checkbox"/>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	Méthode CNRHP
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :</b>	<b>Kleihauer manuel vs Cytométrie en flux Fc500/marquage BRAD3 (Anti-D-FITC).</b> <i>Little BH, Robson R, Roemer B, Scott CS.</i> <i>Immunocytometric quantitation of foetomaternal haemorrhage with the Abbott Cell-Dyn CD4000 haematology analyser. Clin Lab Haem. 2005; 27 : 21-31.</i>
<b>Nombre de mesures :</b>	
<b>Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :</b>	
<b>Méthode d'exploitation des résultats :</b>	
<b>Equation de la droite de régression :</b>	
<b>Diagramme des différences et/ou des rapports :</b>	

	KLEIHAUER	FC500	Moyenne	Difference
1	22	20	21	-2
2	35	29	32	-6
3	31	34	32,5	3
4	29	25	27	-4
5	29	27	28	-2
6	35	32	33,5	-3
7	24	28	26	4
8	103	104	103,5	1
9	17	17	17	0
10	39	41	40	2
11	29	29	29	0
12	44	41	42,5	-3
13	20	25	22,5	5
14	57	59	58	2
15	5	7	6	2
16	6	9	7,5	3
17	6	5	5,5	-1
18	6	3	4,5	-3
19	6	20	13	14
20	6	8	7	2
21	7	7	7	0
22	7	16	11,5	9
23	7	8	7,5	1
24	9	15	12	6
25	9	2	5,5	-7
26	11	10	10,5	-1
27	14	18	16	4
28	21	55	38	34
29	22	23	22,5	1
30	62	69	65,5	7
31	135	138	136,5	3

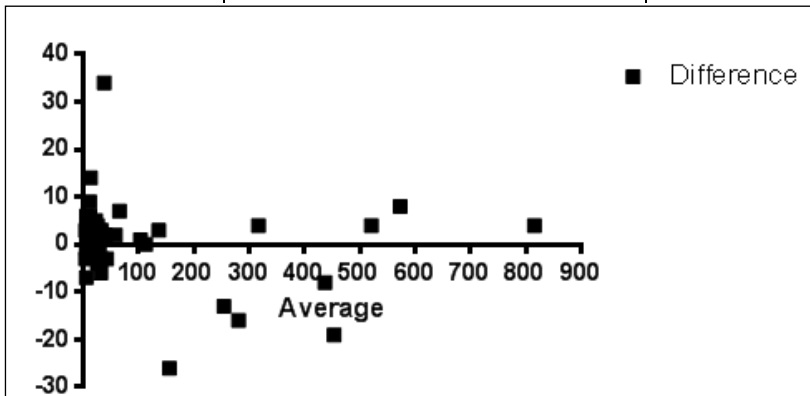
32	169	143	156	-26
33	4	9	6,5	5
34	4	9	6,5	5
35	3	9	6	6
36	3	6	4,5	3
37	261	248	254,5	-13
38	441	433	437	-8
39	569	577	573	8
40	814	818	816	4
41	289	273	281	-16
42	519	523	521	4
43	6	5	5,5	-1
44	28	24	26	-4
45	113	113	113	0
46	463	444	453,5	-19
47	8	8	8	0
48	35	37	36	2
49	315	319	317	4

	Kleihauer	Fc500
Nombre de valeurs	49	49
Minimum	3	2
25% Percentile	7	9
Médiane	24	25
75% Percentile	82,5	86,5
Maximum	814	818
Moyenne	99,94	100,4
Déviation standard	177,9	176,4
Ecart-Type	25,41	25,2

Correlation	r	0,9989
	95% confidence interval	0,9980 to 0,9994
	R square	0,9977
	P value	
	P (two-tailed)	< 0,0001
	P value summary	****
	Significant? (alpha = 0.05)	Yes
	Number of XY Pairs	49



Bland-Altman	Bais	
		0,5102
	SD of bias	8,539
	95% Limits of Agreement	
	From	-16,23
	To	17,25



Conclusion :

**INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B)  
(étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire)  
Applicable  ; non applicable (à justifier)**

<b>HbF</b>	Interférence des Fcells cellules adultes avec de l'hémoglobine foetale Kleihauer rendus ininterprétables
------------	---

Les Fcells se caractérisent par la présence de cellules de couleur rose allant du rose pâle au rose foncé. Ces dernières ne peuvent être distinguées de vraies cellules foetales. Nous ne réalisons pas de comptage précis des cellules ininterprétables mais nous qualifions leur présence un commentaire (quelques, assez nombreuses, nombreuses et très nombreuses cellules ininterprétables). Pour les patientes RH1 négatif, cela permet de sélectionner les patientes nécessitant un examen complémentaire : la réalisation d'un marquage en cytométrie en flux (marquage anti-DFITC BRAD3). Ce marquage va permettre de savoir si parmi ces cellules ininterprétables, il y a de vraies cellules foetales RH1 positif et ainsi adapter la posologie des IgRh. L'adaptation de posologie se fait à partir de 25HF/10000HA. Il est donc important de détecter ce seuil. Ce seuil est évalué en comptant le nombre de cellules rose moyen à rose foncé par champs. Ainsi à partir de 3 hématies de ce type par champs, on estime avoir atteint ce seuil et on rend nombreuses ou très nombreuses cellules ininterprétable. Il est alors nécessaire de faire le marquage en cytométrie en flux. Ayant décompté les cellules rose foncé (potentiellement vraies cellules foetales) mais aussi rose moyen (probablement F cells), il est probable que ce décompte surestime une éventuelle hémorragie foeto-maternelle, avec donc un marquage par excès.

Estimation du nombre de cellules ininterprétables :

Résultats	Quelques	Assez nombreuses	Nombreuses	Très nombreuses
Codes	NQCI	NANCI	NNCI	NTNCI
Nombre de cellules ininterprétables par champs Rose moyen à rose foncé	<1	1 à 3	3 à 10	> 10

Afin de vérifier la bonne adéquation de cette estimation, les lames de 50 échantillons de patients dont le résultat du test de Kleihauer montrait la présence de cellules ininterprétables ont été relues afin de quantifier le nombre de cellules de couleur rose moyen à rose foncé.

N° de dossier dans le SGL Synergy	Résultat du Kleihauer de la patiente	Calcul du Kleihauer hématies rose moyen à rose foncé/ 10000 HA	Marquage en cytométrie en flux Anti-D-FITC BRAD3
1122976304	NQCI	2	
2010280912	NQCI	1	
1122873718	NQCI	-	
1122974496	NQCI	24	
1122975973	NQCI	-	
1122976844	NQCI	3	
1123080857	NQCI	2	
2010178921	NQCI	-	
2010179758	NQCI	-	
2010280575	NQCI	15	
2010281609	NQCI	4	
2010383569	NQCI	2	
2010585667	NQCI	4	
2010990749	NQCI	-	
2010990760	NQCI	-	
2011093222	NQCI	2	

2011195542	NQCI	3	
2011403151	NQCI	-	
2011503291	NQCI	-	
2011503754	NQCI	-	
2011606102	NQCI	-	
2011606109	NQCI	15	
2011606256	NQCI	3	
2011810777	NQCI	-	
2011911895	NQCI	-	
2012014737	NQCI	9	
2012115577	NQCI	-	
2012215330	NQCI	-	
2012929097	NQCI	-	
2013028624	NQCI	-	
1123077106	NANCI	17	
2010281624	NANCI	12	
2010889191	NANCI	-	
1122773951	NNCI	-	<5
2010177821	NNCI	-	
2010991031	NNCI	9	
2011197758	NNCI	-	
2011197963	NNCI	7	
2012521980	NNCI	4	<5
2012421152	NNCI	11	10
2012624777	NNCI	7	6
2012419637	NNCI	27	<5
1122874453	NTNCI	35	<5
1123076994	NTNCI	20	<5
2010382322	NTNCI	5	
2010690785	NTNCI	-	
2010994879	NTNCI	48	
2011196089	NTNCI	4	
2011197939	NTNCI	20	
2011305321	NTNCI	31	<5

**Légende :**

NQCI : quelques cellules ininterprétables  
NANCI : assez nombreuses cellules ininterprétables  
NNCI : nombreuses cellules ininterprétables  
NTNCI : très nombreuses cellules ininterprétables  
- : Présence uniquement d'hématies rose pale.

**Conclusion**