KIT HEMOGLOBINE FOETALE

CL61036 - CL610920 - CL610940

IVD

APPLICATION

Le kit de coloration Shepard (modifié Kleihauer) est utilisé pour le dépistage et la quantification de l'hémorragie fœto-maternelle / passage transplacentaire de globules rouges fœtaux dans le sang maternel.
Les résultats obtenus doivent être considérés comme provisoires : des quantités significatives d'hémorragie fœto-maternelle doivent être confirmées par une méthode alternative (par exemple par cytométrie de flux).

PRINCIPE DE LA METHODE

L'hémoglobine fœtale (Hb F) est moins soluble dans un environnement acide que l'hémoglobine adulte (Hb A). Une technique introduite par Kleihauer[3] et modifiée par d'autres exploite cette différence par laquelle un frottis sanguin est préparé et après fixation dans l'alcool est à la fois acidifié et coloré dans l'hématoxyline. Ensuite, les hématies adultes (Hb A) solubilisées présentes dans les cellules adultes sont éluées dans une étape de rinçage aqueux, et dans l'étape finale, les hématies fœtales (Hb F) contenues dans les cellules fœtales sont colorées par l'éosine. De cette façon, les globules rouges (colorés en rouge par l'éosine) peuvent être distingués des globules blancs (colorés en gris pourpre par l'hématoxyline) et des cellules rouges adultes (non colorées, laissant des stromas vides). Une quantification précise est essentielle pour déterminer la quantité d'hémorragie foeto-maternelle[1].

PRESENTATION DU KIT

Réactifs	Colorant 2 flacons CL61036	Kit complet CL610920	Kit complet CL610940
➢ Solution 1 (hématoxyline alcoolique)	500ml	500ml	500ml
➢ Solution 2 (Chlorure ferrique acidifié)	250ml	250ml	250ml
➢ Contre colorant **CL61037** (Eosine aqueux 1 %)	-	1 litre	-
➢ Solution d'Ethanol **CL61059** Ethanol à 80%	-	1 litre	1 litre
➢ Contre-colorant Erythrosine (0.1%) **CL610610**			1 litre

PROTOCOLE

1. Préparer le réactif opératoire en mélangeant :
   2 volumes de solution 1
   1 volume de solution 2
   1 volume d'éthanol à 80 %.

2. Préparer un frottis récent, séché à l'air libre sur une lame de microscope propre à partir d'une collecte de sang sous anticoagulant ETDA dilué dans du sérum physiologique dans les proportions 1 : 2 à 1 : 3.

3. Fixer dans l'éthanol à 80 % pendant 5 minutes à température ambiante.

4. Sécher avec précaution à la verticale pendant environ 10min.

5. Placer dans la solution opératoire pendant 20 secondes.

6. Rincer à l'eau distillée.

7. Contre-colorer avec le contre colorant Eosine à 1 % ou l'Erythrosine à 0.1 % pendant 3 minutes

8. Rincer et sécher (préparer un montage temporaire si l'examen se fait avec de l'huile à immersion).

9. Pour l'examen au microscope, utiliser un objectif x10 et un oculaire x10 for screening et si besoin, utiliser un objectif x40 pour la quantification de l'hémorragie fœto-maternelle.

RESULTATS ATTENDUS

Les cellules rouges fœtales contenant l'Hb-F sont colorées en rouge. Les cellules rouges contenant l'hémoglobine maternelle (adulte) sont complètement éluées laissant des stromas vides. Les globules blancs sont colorés en gris pourpre.
Se reporter également aux références bibliographiques 4 et 2.

Notes

Il est préférable de recueillir du sang sous anticoagulant EDTA. Si nécessaire, des échantillons datant de 48 heures peuvent être utilisés.

Il est essentiel que la solution opératoire soit correctement préparée.

La solution opératoire est stable pendant six semaines maximum à température ambiante et peut être filtrée en cas de précipitations

La durée du protocole peut varier selon les préférences individuelles

Tenir à l'écart des flammes. NE PAS FUMER !

Des contrôles positifs et négatifs doivent être effectués avec chaque lot d'investigation.

Les contrôles négatifs sont préparés suivant la technique ci-dessus indiquée à partir d'échantillons de sang adulte normal dilué dans du serum physiologique.
Les contrôles positifs sont préparés en mélangeant 1 volume de sang de cordon ombilical avec 10 à 20 volumes de sang adulte dilué avec du sérum physiologique.

REFERENCES

1. Austin E, Bates S, de Silva Me et al (working party of the British Committee for Standards in Haematology, Transfusion Taskforce). Guidelines for the Estamination of Fetomaternal Haemorrhage. British Society for Haematology:London 2009.
2. Carpanen E, Parker Williams J. Kits for feto-maternal haemorrhage screening and quantitation . MHRA Evaluation Report 05053. HMSO 2005.
3. Kleihauer E, Braun H & Betke K (1957) *Demonstration von fetalem in den Erythrocten eines Blatausstrichs (Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear),* Klin.Wschr. 1957; **35**, 637.
4. Lewis SM, Bain BJ Bates I.Dacie and Lewis practical haematology, 10th edition Churchill Livingstone Elsevier 2006.

5. **Nierhaus K & Betke K** (1968) "*Eine vereinfatche modifikation der sauren Elution die cytologische Darstellung vom fetalem Haemoglobin (A simplified modification oft he acid elution for the cytological demonstration of fetal hemoglobin) Klin.Wschr. 1968; 46:47.*

6. Wallet LHB & Baxter Robinson J. Human haemoglobin variants and their identification. Laboratory Aids Series. 1968 Butterworths: London.

Bibliographie :

The estimation of fetomaternal haemorrhage. Transfusion Medicine, 1999,87-92. Prepared by a working party of the BCSH Blood Transfusion and General Haematology Task Forces.

Fabricant	**Distributeur**
CLIN-TECH Ltd.,	**LABO MODERNE**
Unit G, Perram Works,	**14 T. Ave des Louvresses**
Merrow Lane	
GUILDFORD, GU4 7BN	**92230 GENNEVILLIERS**

A partir du 1er Juin 2006 et dans le cadre de l'amélioration de la technique, la concentration en Eosine du contre-colorant de Shepard (CL61037) est dorénavant de 1 % au lieu de 0.5 %.

Remarque :

Les solutions 1 & 2 du kit CL61036 doivent être exclusivement utilisées en combiné l'une avec l'autre. Elles ne peuvent en aucun cas être utilisées en combiné avec d'autres réactifs. La société LABO-MODERNE décline toute responsabilité sur les résultats obtenus si l'utilisation n'est pas strictement conforme à la technique décrite ci-dessus et à la combinaison des deux réactifs originaux.

Mise à jour : C161-18 (Février 2020)