



MINISTÈRE  
DES ARMÉES

Liberté  
Égalité  
Fraternité



# Mise au point d'une méthode de groupage sanguin tout terrain

SFVTT 23 - 25 novembre 2022

Dr Benoît CLAVIER ©

Centre de Transfusion Sanguine des  
Armées - Clamart

2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite.

2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite.

2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite.

## Plan

- Présentation du dispositif
- Méthode standard
- 2009 : Evaluation de la robustesse 18 mois après péremption.
- 2011 : Enquête de faisabilité à KAIA (laboratoire de Role 3 – Kaboul International Airport – Afghanistan)
- 2015 : Mise au point d'une technique simplifiée
- 2016 - 2018 : Evaluation de la performance et fiabilité de la technique simplifiée
- 2016 : Etude et expérience en environnement extrême
- Conclusion

# Présentation du dispositif MDmulticard®

- Test multiparamétrique permet le typage simultané ABO-RH1 et phénotypage RH-KEL1
- Principe de chromatographie en flux latéral
- Fournit un résultat final stable pendant  $\leq 72$ h (+2 à +8°C). En pratique dans notre expérience peut atteindre plusieurs années à température ambiante.
- Echantillon : sang total anti-coagulé (ou sang total natif ou en sédimentés)

## • Matériel

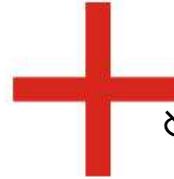
- Carte :
  - format carte de crédit
  - Une fenêtre centrale de dépôt de l'échantillon séparant 2 zones imprégnées par les anticorps monoclonaux en lignes parallèles de détection des antigènes
- pipettes x 2
- tube à hémolyse x 1
- Diluent F (Medion Grifols)

# Méthode standard (1)



**100 $\mu$ l cell suspension**

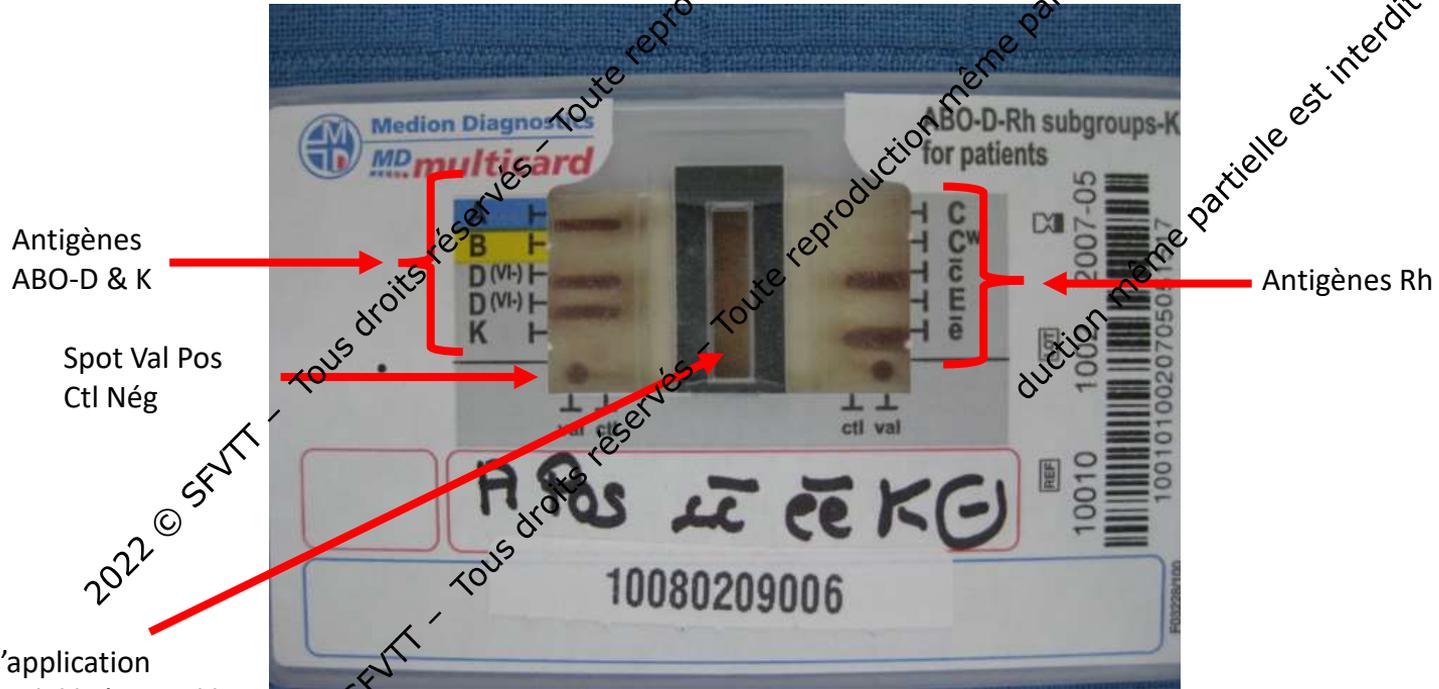
(dilution à 20% en diluent F)



**300 $\mu$ l diluent F**

# Méthode standard (2)

Lecture des résultats au bout de **5 minutes**  
*Aligner le spot Val avec la ligne noire*



# Méthode standard (3)



# EVALUATION DE LA ROBUSTESSE EN DUREE DE CONSERVATION – SFTS – STRASBOURG 2009

**150 échantillons** de donneurs < 4 jours

Groupe A 67  
O 64  
B 14  
AB 5

**Réactifs :**

- MDmulticard® sous groupes-K for patients **périmés depuis 18 mois**
- diluent F en cours de validité

**Méthode de référence :** Olympus PK 7200 – réactifs Diagenet

**Discordances testées** en technique gel filtration monoclonale Diamed – automate Swing

**Résultats :** 100 % validés (Val pos., Ctl nég.) **Aucune discordance / méthode de référence**

- 2 Cartes : réaction affaiblie pour le RhD. Les réactions sont non répétibles sur les autres supports MDmulticard® non périmés (RH1), gel filtration Diamed (RH1, 4+) et Olympus (RH1)
- 1 carte : bruit de fond répétable sur MDmulticard® non périmé => la durée de conservation n'est pas en cause

**Conclusion :** MDmulticard® conserve de bonnes performances au-delà de sa date de péremption si les conditions de conservation sont respectées

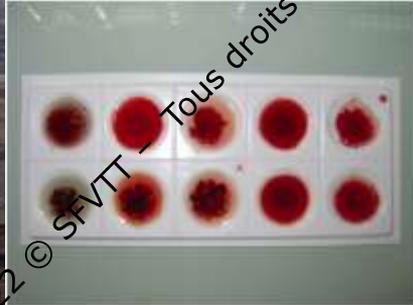
# ENQUETE DE FAISABILITE EN ROLE 3, HMC KABUL INTERNATIONAL AIRPORT, 2011



Laboratoire  
de KAIA  
Novembre  
2011



Principe : comparaison de praticabilité MDmulticard<sup>®</sup> groupage sur  
plaque avec réactifs liquides/ gel filtration



# ENQUETE DE FAISABILITE EN ROLE 3, HMC KABUL INTERNATIONAL AIRPORT, 2011



## Compte-rendu de l'enquête

### • Avantages :

- Rapidité : MDmulticard® 6 min / gel filtration 25 min
- Nombre de manipulations réduites avec MDmulticard® /plaque – réactifs liquides
- Résultats lisibles  $\geq 72$  h : la MDmulticard® peut accompagner le blessé depuis le théâtre d'opération jusqu'au retour en métropole

### • Limites : absence d'image spécifique des double-populations

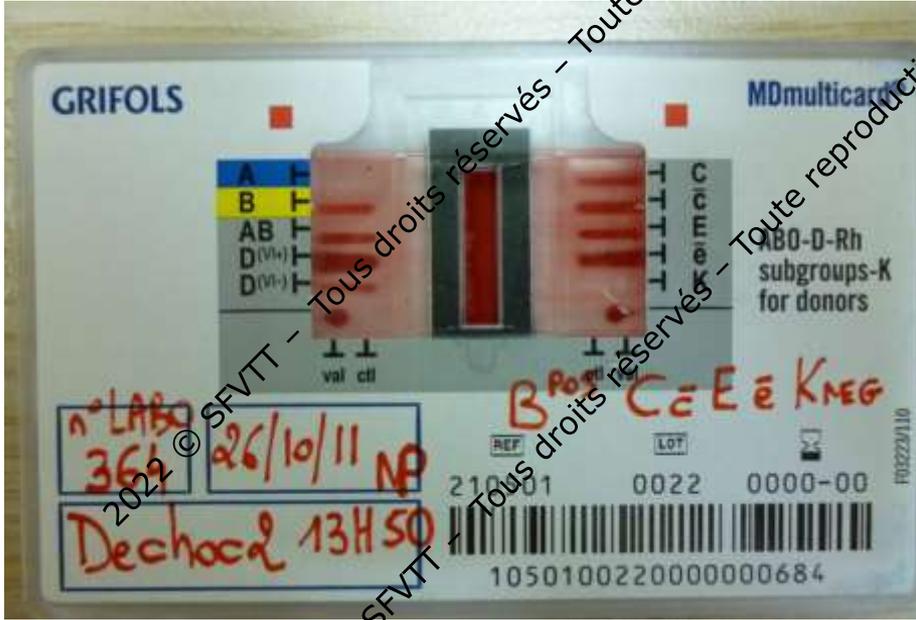
### • Exigence de mise en œuvre :

- Formation initiale
- Prédilution => difficulté pour un opérateur non technicien de laboratoire

# ENQUETE DE FAISABILITE

## ROLE 3, HMC DE KABUL INTERNATIONAL AIRPORT, 2011

*Erreur fortuite de méthodologie : oubli de pré-dilution  
(2 gtes de sang total + 6 gtes diluent)*



**Proposition  
d'une  
méthode  
simplifiée**

# MISE AU POINT ET ÉVALUATION DE LA ROBUSTESSE DE LA MÉTHODE SIMPLIFIÉE – SFTS – MONTPELLIER 2015

- **Objet :**

- mettre au point une méthode simplifiée sans dilution préalable
- vérifier sa robustesse sur échantillons hémodilués et hémococoncentrés

- **Protocole de mise au point :**

- carte témoin selon méthode standard
- méthode simplifiée : distribuer X gouttes de diluent F dans la fenêtre de la carte, distribuer 1 goutte de sang total dans la fenêtre de la carte, après 30 secondes distribuer 6 gouttes de diluent F, lire après 5 min.
- Trois cartes sont réalisées selon la méthode simplifiée en faisant varier le nombre de gouttes de diluent F (X) de 2 à 4.

# MÉTHODE SIMPLIFIÉE : RÉSULTATS

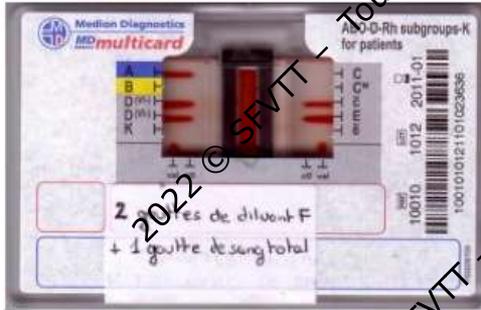
	N° Lot	Péremption
MDmulticard	1012	01/2011
Diluant F	5006.1A	02/2012

Echantillon testé : Hématocrite 40,4 %  
Hémoglobine 13,7 g/dl

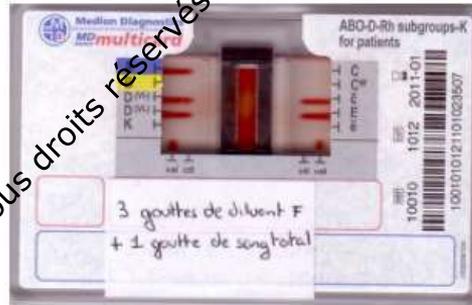


Carte témoin en méthode standard

Quelque soit le nombre de gouttes de diluant F distribués dans la fenêtre avant le dépôt de la goutte de sang total, le résultat est aussi lisible que sur la carte témoin.  
Choix : 2 gouttes de diluant F lors du dépôt initial pour la méthode simplifiée.



Distribution de 2 gouttes de diluant F  
+1 goutte de sang total  
dans la fenêtre de la MDmulticard



Distribution de 3 gouttes de diluant F  
+1 goutte de sang total  
dans la fenêtre de la MDmulticard



Distribution de 4 gouttes de diluant F  
+1 goutte de sang total  
dans la fenêtre de la MDmulticard

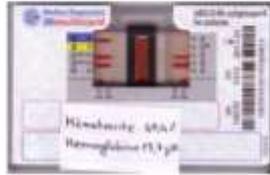
# VERIFICATION DE LA ROBUSTESSE SUR ECHANTILLONS HEMODILUES – Méthode standard

Médecinard  
Diluant F  
Volvex®

N°Lot  
1012  
5906.1A  
13DIL061

Premption  
01/2011  
02/2012  
09/2012

Echantillons de donneurs < 4j, A RH1, dilués en solution de remplissage Voluven®



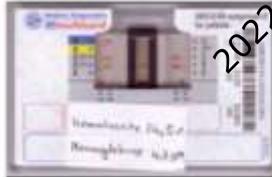
Carte Témoignage - échantillon natif  
Hématocrite 40,4 %  
Hémoglobine 13,7 g/dl



Dilution 3/4  
Hématocrite 30,5 %  
Hémoglobine 10,2 g/dl



Dilution 1/2  
Hématocrite 23,3 %  
Hémoglobine 7,7 g/dl



Dilution 1/4  
Hématocrite 14,5 %  
Hémoglobine 4,2 g/dl



Dilution 1/8  
Hématocrite 5,1 %  
Hémoglobine 1,7 g/dl

Echantillons	Témoignage : natif	3/4	1/2	1/4	1/8
Hb g/dl	13,7	10,2	7,7	4,2	1,7
Ht %	40,4	30,5	23,3	14,5	5,1

Résultats obtenus en méthode standard :

Le résultat devient pâle à partir de la dilution au 1/4 :  
hématocrite (Ht) = 14,5% (Hb=4,2g/dl).

Il reste lisible par un biologiste ou un technicien expérimenté.

2022 © SFVTT - Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

# VERIFICATION DE LA ROBUSTESSE SUR ECHANTILLONS HEMODILUES – Méthode standard / simplifiée

	N°Lot	Péremption
Mdmulticard	1012	01/2011
Diluant F	5006.1A	02/2012
Voluven®	13DIL061	09/2012

Echantillon testé :  
Dilution 1/4  
Hématocrite 14,5 %  
Hémoglobine 4,2g/dl

Méthode  
standard



Protocole standard : prédiluer dans un tube à hémolyse  
4 gouttes diluant F + 1 goutte de sang total  
Distribution de 2 gouttes de sang dilué dans la fenêtre de la MDMulticard

Méthode  
simplifiée



Protocole simplifié : distribution de 2 gouttes de diluant F  
+ 1 goutte de sang total  
dans la fenêtre de la MDMulticard

Echantillon choisi : le plus hémodilué encore  
lisible : Ht = 14,5% (Hb=4,2g/dl)

**Le résultat est nettement plus lisible et plus  
net en méthode simplifiée**

© SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite.

# VERIFICATION DE LA ROBUSTESSE SUR ECHANTILLONS HEMOCONCENTRES – Méthode standard / simplifiée

Echantillons	Témoin : natif	Retrait 250µl	Retrait 500µl	Retrait 750µl	Retrait 1000µl
Hb g/dl	16,6	18,5	19,8	21,1	22,5
Ht %	47,3	52,7	56,9	61,3	63,6

Mdrenalizant  
Diluant F

N°Lot  
1008

Péremption  
11/2009  
02/2012

**Procédure simplifiée**  
Distribution de 2 gouttes de diluant F  
+ 1 goutte de sang total  
dans la fenêtre de la MDrenalizant



**Hémoconcentration simulée** en  
retirant du plasma du tube primaire  
de 6ml (EDTA) à raison de 250µl à  
chaque fois.

**Cartes témoins standard / simplifiée**  
- échantillon le moins hémococoncentré  
(Hb 16,6g/dl – Ht 47,3%)

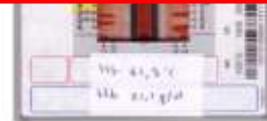
**Procédure simplifiée**  
Distribution de 2 gouttes de diluant F  
+ 1 goutte de sang total  
dans la fenêtre de la MDrenalizant



Retrait de 250 µl de plasma  
Hématocrite 52,7 %  
Hémoglobine 18,5 g/dl



Retrait de 500 µl de plasma  
Hématocrite 56,9%



Retrait de 750 µl de plasma  
Hématocrite 61,3%  
Hémoglobine 21,1 g/dl



Retrait de 1000 µl de plasma  
Hématocrite 63,6 %  
Hémoglobine 22,5 g/dl

- échantillon le plus hémococoncentré  
(Hb 22,5g/dl – Ht 63,6%)

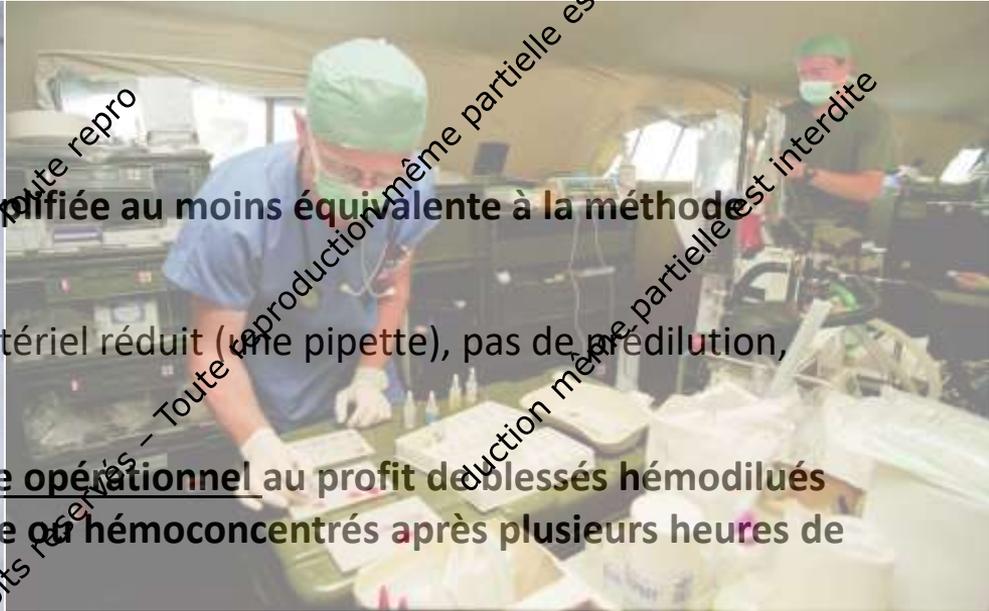
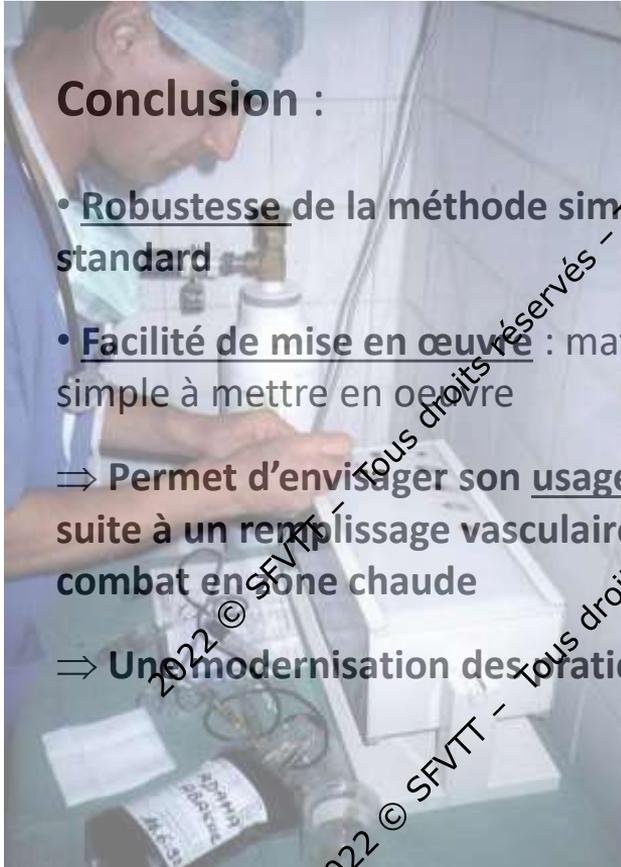
**Tous les résultats sont lisibles et interprétables dans les 2 méthodes**

2022 © SFVTT - Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

# MISE AU POINT ET ÉVALUATION DE LA ROBUSTESSE DE LA MÉTHODE SIMPLIFIÉE – SFTS – MONTPELLIER 2015

## Conclusion :

- **Robustesse** de la méthode simplifiée au moins équivalente à la méthode standard
- **Facilité de mise en œuvre** : matériel réduit (une pipette), pas de pré-dilution, simple à mettre en œuvre
- ⇒ Permet d'envisager son **usage opérationnel** au profit de blessés hémodilués suite à un remplissage vasculaire ou hémococoncentrés après plusieurs heures de combat en zone chaude
- ⇒ Une modernisation des pratiques en OPEX



# EVALUATION DE LA PERFORMANCE ET DE LA FIABILITÉ DE LA MÉTHODE SIMPLIFIÉE sur échantillons natifs, hémodilués et hémococoncentrés

Etude financée par Grifols – Novembre 2015

Publications : - AABB – Orlando 2016  
- Transfusion 2018; 58; 313-316

## Contexte :

- Améliorer la prise en charge des blessés en situation extrême : guerre, accident de la voie publique
- Par du personnel non biologiste, non technicien de laboratoire
- Tout en conservant la fiabilité

## Méthode :

- Evaluer la performance de la méthode simplifiée vs méthode de référence PK 7300 Beckman Coulter®, réactifs Diagast;
- Vérifier la fiabilité sur échantillons hémodilués et hémococoncentrés pour reproduire l'état du blessé hémorragique ou celui du combattant hémococoncentré après plusieurs heures de combat en zone chaude.

**Discordances comparées aux résultats sur MDmulticard® en méthode standard**  
ID Diaclon® gel agglutination system (Bio-Rad)



# EVALUATION DE LA PERFORMANCE ET DE LA FIABILITÉ DE LA MÉTHODE SIMPLIFIÉE sur échantillons natifs, hémodilués et hémoco concentrés

## Results

### Hemodilution protocol

Group split, 42 samples (of which 7 RH-1)  
Group A : 18 (out of which 3 RH-1)  
Group O : 16 (out of which 3 RH-1)  
Group B : 6 (out of which 1 RH-1)  
Group AB : 2



Each sample is tested 3 times: native state then diluted 1/2 and then diluted 1/4. Dilutions are performed with physiologic serum.

42 samples	Number of tests performed with simplified method & dilution rate			Total number of tests performed
	Native	1/2	1/4	
	42	42	42	126

### Split of Samples according to hemoglobin rate (Hb)

	Hb average g/dl	Standard deviation g/dl	Hb mini g/dl	Hb maxi g/dl
Native samples	16.3	1.2	13.4	18.9
Samples 1/2 hemodiluted	7.8	0.7	6.1	9.4
Samples 1/4 hemodiluted	3.9	0.3	3.2	4.5

### Concordance with reference method

146 tests have been performed: - 126 with hemodilution protocol, - 20 with hemo-concentration protocol

No discrepancy has been demonstrated compared to reference method. Three tests required 300 µl additional Diluent F to improve successfully readability.

### Hemo-concentration protocol

Group split, 10 samples  
Group A : 4 (dont 1 RH-1)  
Group O : 4 (dont 1 RH-1)  
Group B : 1  
Group AB : 1



Each sample is tested two times: at native state and then after removing 500µl of plasma.

10 samples	Number of tests performed with simplified method		Total number of tests performed
	Native	Hemo-concentrated	
	10	10	20

### Split of Samples according to hemoglobin rate (Hb)

	Hb average g/dl	Hb mini g/dl	Hb maxi g/dl
Native samples	16.2	13.6	17.7
Hemo-concentrated samples	15.2	15.2	20.1

## Conclusion

### Méthode simplifiée :

- Fiable, rapide, facile à mettre en œuvre;
- Résultats lisibles aussi bien avec du sang hémodilué que du sang hémoco concentré;
- Nombre de manipulations et matériel réduit;
- Mode opératoire compréhensible et facilement reproductible par un non technicien de laboratoire.

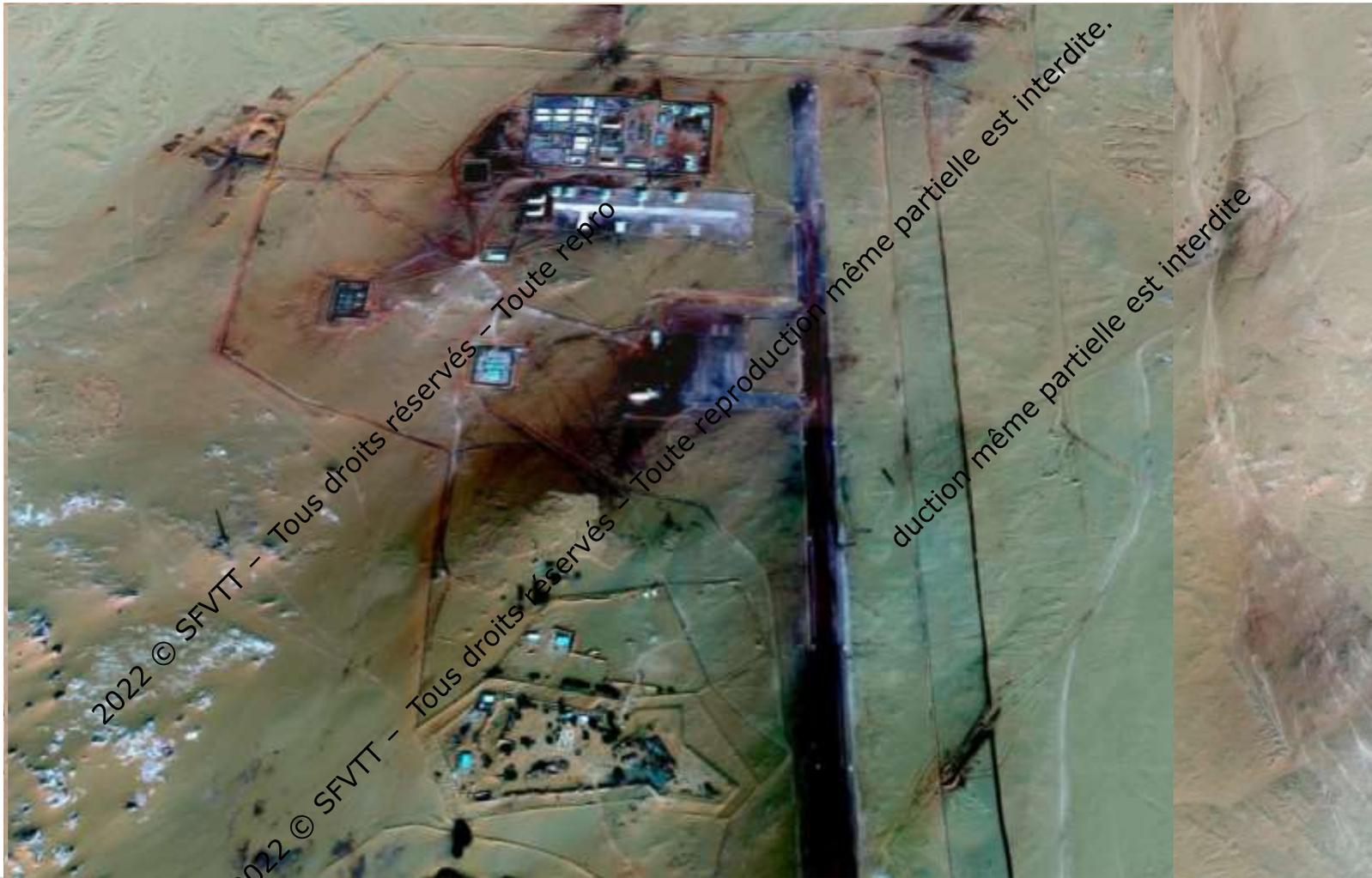
## Perspectives

Confirme l'intérêt en environnement extrême : théâtres d'opérations, accidents de la voie publique.  
Au profit de blessés hémorragiques et hémodilués après perfusion de cristaalloïdes ou soldats déshydratés après combat en atmosphère chaude.

# ÉTUDE DE LA FAISABILITE OPÉRATIONNELLE EN ZONE CHAUDE – ROLE 2



2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite.



2022 © SFVTT - Tous droits réservés - Toute repro

2022 © SFVTT - Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite

2022 © SFVTT - Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite.

2022 © SFVTT - Tous droits réservés - Toute reproduction même partielle est interdite



# ÉTUDE DE LA FAISABILITE OPÉRATIONNELLE EN ZONE CHAUDE – ROLE 2



2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute repro

2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite

2022 © SFVTT – Tous droits réservés – Toute reproduction même partielle est interdite



# ÉTUDE DE LA FAISABILITE OPÉRATIONNELLE EN ZONE CHAUDE – ROLE 2

## Méthode comparative : réalisée par deux IADE

MDmulticard® standard	MDmulticard® simplifiée	VS Références : Réactifs liquides sur plaque (GroupaKit Diagast)	& Résultats sur livret médical
20 échantillons, tests réalisés <72h après le prélèvement. Sous tente, 33-34°C, hygrométrie 15-20%. 40 tests (20 en méthode standard, 20 en méthode simplifiée)			
5 échantillons parmi les 20, tests réalisés entre 72 et 96h après le prélèvement. En extérieur, plein soleil vers 16h, 31°3, vent de sable, hygrométrie 15-20 %. 2 cartes sont sorties du blister et laissées en plein soleil pour être testées à la fin. 8 cartes sont laissées dans le blister exposé au soleil et utilisées au fur et à mesure des tests.			



# ÉTUDE DE LA FAISABILITE OPÉRATIONNELLE EN ZONE CHAUDE – ROLE 2

## Résultats

- 100 % conformes aux résultats attendus (réactifs liquides sur plaque et livret médical)
- Méthode standard : lecture plus facile qu'en méthode simplifiée
- Méthode simplifiée : 3 cartes présentent un bruit de fond non spécifique qui disparaît après addition de 6 gouttes de diluent F selon les recommandations du fournisseur.

## Avantages de la MDmulticard®

- Temps de formation aux 2 méthodes = 1h
- Praticabilité : confort d'utilisation vs réactifs liquides en plaque, espace nécessaire réduit, absence de centrifugation
- Rapidité : 10 déterminations en méthode standard en 20 min avec lecture différée => permet la gestion d'un afflux massif de blessés.
- Fournit un résultat ABO-D et phénotype Rh Kell complet en épreuve globulaire
- Relecture  $\leq 72h$  => Lecture à distance au retour en métropole après MEDEVAC

## Pour conclure : MDmulticard®

- Un réactif de laboratoire
- Adapté aux situations d'exception

# *IN MEMORIAM*

- Quelle place pour un produit de niche performant et utile dans une société d'envergure internationale solide ?
- Quelle place pour le bien commun / intérêts privés ?



© Etat-major des armées / France



Je vous remercie  
de votre  
attention

2022 © SFVTT -- Tous droits réservés -- Toute repro

2022 © SFVTT -- Tous droits réservés -- Toute reproduction même partielle est interdite