



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.

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

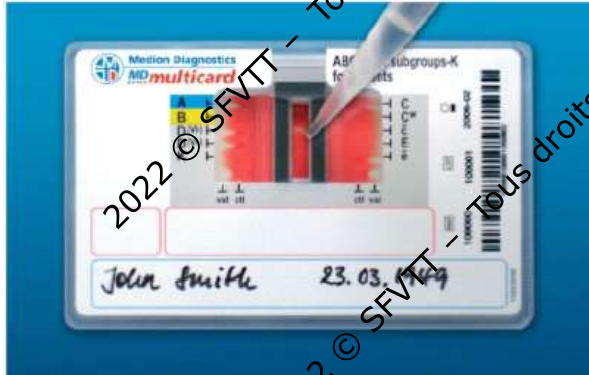
Présentation du dispositif MDmulticard®

- Test multiparamétrique permet le typage simultané ABO-RH1 et phénotypage RH-KEL1
- Principe de chromatographie en flux latéral
- Fournit un résultat final stable pendant ≤ 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

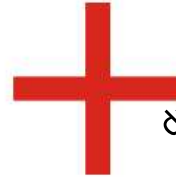
- Carte :
 - format carte de crédit
 - Une fenêtre centrale de dépôt de l'échantillon séparant 2 zones imprégnées par les anticorps monoclonaux en lignes parallèles de détection des antigènes
- pipettes x 2
- tube à hémolyse x 1
- Diluent F (Medion Grifols)

Méthode standard (1)



100 μ l cell suspension

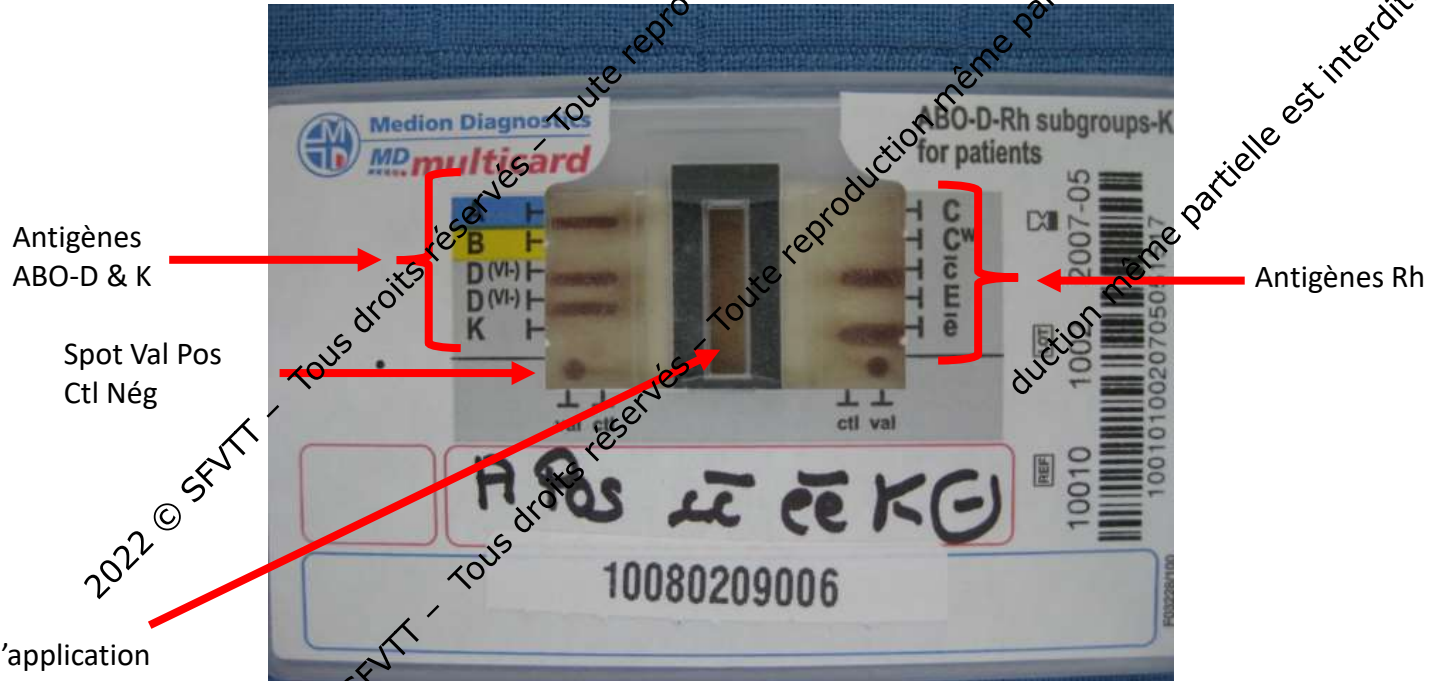
(dilution à 20% en diluent F)



300 μ 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

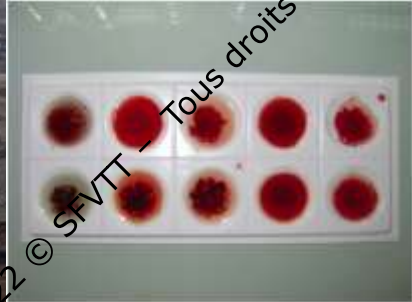
ENQUETE DE FAISABILITE EN ROLE 3, HMC KABUL INTERNATIONAL AIRPORT, 2011



Laboratoire
de KAIA
Novembre
2011



Principe : comparaison de praticabilité MDmulticard[®] 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 ≥ 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

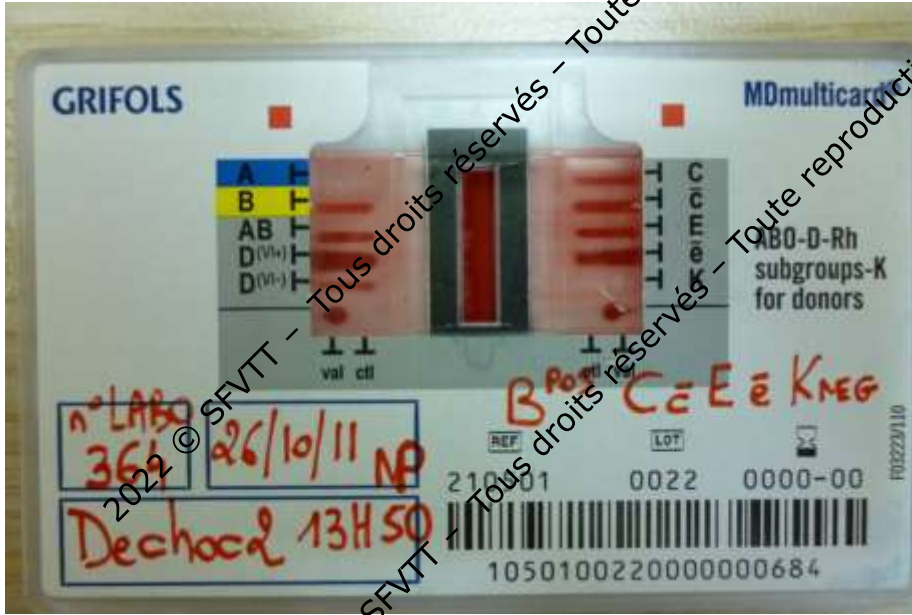
• Exigence de mise en œuvre :

- 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 hémomodulés 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

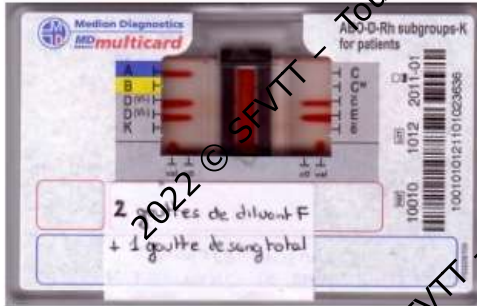
Echantillon testé : Hématocrite 40,4 %
Hémoglobine 13,7 g/dl



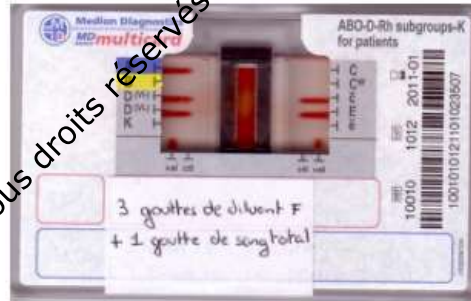
Carte témoin en méthode standard

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

N°Lot 1012
Pâremption 01/2011
Médicard 5906.1A 02/2012
Diluant F 13DIL061 09/2012
Voluven®

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



Carte témoin - 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	Témoin : 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

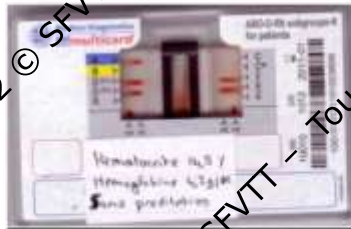
Echantillon testé :
Dilution 1/4
Hématocrite 14,5 %
Hémoglobine 4,2g/dl

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

Cartes témoins
selon protocole standard
Distribution 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 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%)

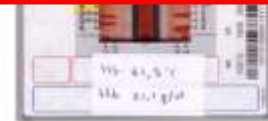
Procédure simplifiée
Distribution de 2 gouttes de diluant F
+ 1 goutte de sang total
dans la fenêtre de la MDrenalizant



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%)

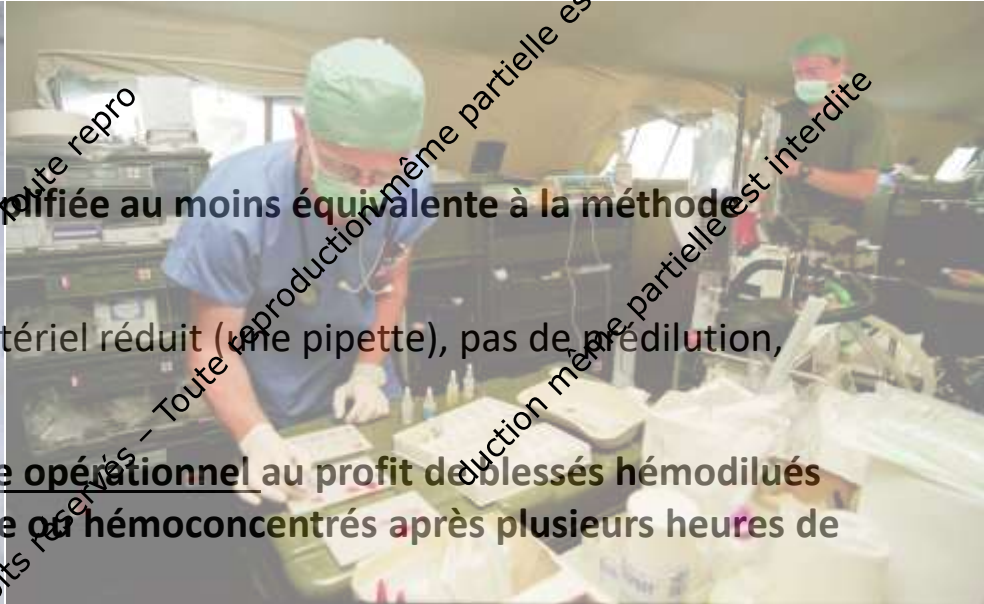
Tous les résultats sont lisibles et interprétables dans les 2 méthodes

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)



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

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

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

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

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 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.			

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



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 ?

Je vous remercie
de votre
attention

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.

