

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENTS SUPÉRIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

RÉPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE - UN BUT - UNE FOI



Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS)

Année universitaire 2011-2012

N°.....

TITRE

THESE

Présentée et soutenue publiquement le **03/03 / 2012** devant la Faculté de Médecine, de
Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako

Par M. Bakary Kossa DEMBELE

Pour obtenir le grade de DOCTEUR en Pharmacie (Diplôme d'État)

JURY

Président : Professeur Boubacar Sidiki CISSE

Membres : Professeur Mounirou BABY

: Docteur Abdoul Aziz DIAKITE

: Docteur Aldiouma GUINDO

Directeur de thèse : Professeur Dapa A. DIALLO

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

DEDICACES

A mon père feu Dounantjè DEMBELE et à ma mère feu Kanuya COULIBALY,
j'aurais voulu que vous voyez ce jour, mais **DIEU** l'a voulu ainsi, qu'il soit loué pour ce
qu'**IL** a fait. Vous resterez toujours dans ma mémoire.

A ma grand-mère feu Zélé DIARRA,

Tu étais au seuil de ce jour que tu as tant attendu, certes la mort t'a arrachée de mon
affection mais tu resteras toujours dans ma mémoire.

A la nation malienne pour l'effort fourni pour ma formation.

A tous les malades du monde entier.

MENTION SPECIALE

A mon Directeur de thèse Professeur Dapa A. DIALLO, je ne sais pas comment vous
remerciez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous m'avez accepté dans votre
service malgré mes défauts. Votre respect pour la personne humaine fait de vous une
personne à admirer. C'est en effet que vous avez initié ce travail dont vous l'avez suivi
tout au long de sa réalisation, en lui apportant toutes vos qualités scientifiques. Votre sens
critique très poussé mais aussi votre rigueur scientifique nous a conduits au terme de ce
travail. Que **DIEU** vous donne bonne santé et longévité. Amen !

REMERCIEMENTS

A l'ÉTERNEL DES ARMÉES qui m'a donné la bonne santé et m'a gardé au cours de mes études ; *gloire, honneur et magnificence te soit rendu aux siècles des siècles. Amen !*

A mes Tontons et Tantes : Amadou dit Kossa, Abel, Adama, Youssouf, Paul, Djiguiya, Soukalo, Céfa, Bintou DEMBELE et Eli COULIBALY ; Alima, Néma, Rebecca COULIBALY ; Fatoumata TANGARA ; Baselle COUMARE ; Maïmouna DEMBELE et Hawa OUATTARA,

C'est ici le lieu de vous dire merci pour vos prières et bénédictions pendant mes épreuves scolaires et universitaires. Vous m'avez toujours inculqué le sens du travail bien fait, de la dignité, du courage et de la persévérance ; puisse ce travail être une grande satisfaction pour vous tous.

A mon cher grand-frère Robert,

Je ne sais pas si un jour je trouverai un mot pour exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude, pour m'avoir supporté pendant toutes ces années d'études.

A mes frères et sœurs, merci pour tout. Les mots me manquent pour vous remercier du soutien dont vous m'avez fait bénéficier pendant mes études.

Que l'amour fraternel de notre SEIGNEUR nous unisse à jamais.

Je vous souhaite beaucoup de réussite dans toutes vos entreprises.

A mon papa Moussa COUMARE,

Tu m'as accepté sous ton toit pendant mon cycle universitaire. Tu m'as montré le chemin du travail bien fait, c'est ici le lieu de te remercier. Puisse ce travail être un sujet de joie pour toi.

A ma maman Esther KAMATE, tu es vraiment une mère poule pour moi. Tu m'as toujours montrée de bonnes choses, tes conseils ne m'ont jamais fait défaut, la meilleure façon de te dire merci, c'est de réussir.

A mes cousins et cousines, merci pour tous vos soutiens à mon égard.

A mon amie Rebecca DEMBELE,

Je te remercie pour tes conseils et le soutien que tu m'as apporté. Je ne pourrai jamais assez te remercier, j'implore DIEU qu'IL te donne plein de satisfaction dans ce travail.

A tout le personnel du laboratoire de biologie clinique de la FMPOS,

A mon grand-frère (ainé) Dr. Mohamed AG BARAIKA, comme le dit ce proverbe « La vache ne remerciera jamais assez la brousse tant qu'elle s'y retournera. » Ce modeste remerciement est l'un des fruits de ton travail bien fait, de tes conseils et de ton soutien.

A M. Alkassimou BA et Mme BAKAYOGO Djénèba COULIBALY, pour la formation que vous m'avez donnée et vos conseils quotidiens.

A tout le personnel du service d'Hématologie - Oncologie Médicale CHU-Point G

A mon cousin Dr. Abdoul Karim DEMBELE, pour son soutien à tous égards.

Aux Dr. Aboudramane Alou KONE, Dr. Aboubacrine Ali TOURE, Dr. Moussa BATHILY, Dr. Yacouba Lazare DIALLO, Dr. Madani LY.

A mes amis Eléazar DAO, Barou SOGOBA, Dr. Djénéba B.FOFANA, Dr. Michel COULIBALY, Dr. Mamadou Mamourou BERE et Dr. Benjamin SANOGO.

A mes cadets Oumar TESSOUGUE, Pierre GUINDO Ousmane KONATE, Abdoul Kader ISSOUFY bon courage pour le reste du cursus et la thèse

A tout le personnel du CRLD,

A mes camarades des écoles fondamentales et secondaires,

A mes Professeurs de la FMPOS,

A mes camarades de la deuxième promotion du “ numerus clausus ” de la FMPOS, pour ces années de travail et pour tous les moments de joie et de peine

A tout le groupe “Hysope”

A tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé à réaliser ce travail qui est aussi le vôtre.

Hommages

A notre Maître et Président du jury, **Professeur Boubacar Sidiki CISSE** :

Professeur honoraire de Toxicologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Ancien Recteur de l'Université du Mali,

Membre correspondant Etranger de l'Académie de Pharmacie de France au Mali.

Honorable Maître, vous nous faites, ce jour, un honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre respect.

A notre Maître et juge, **Professeur Mounirou BABY :**

Maître de conférence en hématologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie,

Chargé de cours d'hématologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie,

Directeur Général du Centre National de Transfusion Sanguine du Mali,

Secrétaire adjoint chargé des questions de recherches scientifiques, de formation et d'éthique de la Société Malienne d'Hématologie et Oncologie.

Cher maître, nous sommes flattés de vous avoir pour juger notre travail.

Votre générosité, votre diplomatie, votre disponibilité ainsi que vos qualités intellectuelles nous honorent.

Recevez ici très cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance et gratitude

A notre Maître et juge, **Docteur Abdoul Aziz DIAKITE** :

Praticien hospitalier du CHU-GT

Maître assistant en pédiatrie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Pédiatre spécialiste en hématologie pédiatrique,

Responsable de l'unité fonctionnelle de prise en charge de la drépanocytose,

Diplômé Universitaire sur la surveillance épidémiologique des maladies tropicales.

Permettez nous de vous remercier pour ce grand honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Votre simplicité, votre disponibilité constante et votre dynamisme font de vous un être admiré de tous.

Soyez rassuré de notre reconnaissance et de notre profonde gratitude.

A notre Maître et juge, **Docteur Aldiouma GUINDO :**

Titulaire d'un PhD. d'hématologie – Immunologie de l'université de LONDRES,

Maître assistant en hématologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Responsable du Laboratoire de biologie clinique et de recherche du CRLD,

Membre de la société Française d'hématologie,

Secrétaire général de la Société Malienne d'hématologie oncologie.

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger notre travail.

Votre rigueur scientifique, votre souci pour un travail accompli, votre disponibilité et votre simplicité nous ont touchés.

Veillez cher Maître, recevoir nos profondes reconnaissances.

A notre Maître et Directeur de thèse, **Professeur Dapa Aly DIALLO** :

Professeur Titulaire d'hématologie,

Responsable de l'enseignement de cours d'hématologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Chef de Service d'Hématologie-Oncologie du Centre Hospitalier-Universitaire du Point-G,

Chef de laboratoire de biologie clinique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,

Président de la Société malienne d'Hématologie et oncologie,

Président de la Société Africaine Francophone d'Hématologie (SAFHEMA),

Membre de la société Française d'Hématologie,

Membre du conseil d'administration des laboratoires Pierre FABRE,

Directeur Général du Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose.

Cher Maître, vous nous avez fait honneur en nous confiant ce travail.

Votre courage, votre ponctualité, votre disponibilité et votre compréhension sont, entre autres, des qualités enviées de tous.

Votre connaissance, votre rigueur scientifique et votre souci de bonne formation font de vous un Maître admirable.

C'est l'occasion pour nous de vous exprimer humblement nos vives émotions.

ABREVIATIONS ET SIGLES

CCMH	: Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
CHME	: Centre Hospitalier Mère Enfant
CHU-GT	: Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURE
CNRST	: Centre National de Recherche Scientifique et Technologique
CRLD	: Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose
CVD	: Center Vaccin Development
°c	: Degré Celsius
DEAP	: Département Epidémiologique, des Affections Parasitaires
DS	: Déviation Standard
EDTA	: Ethylène Di aminoacide Tétracétique
FMPOS	: Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie
FS	: Ferritine Sérique
ft	: fentolite
g/dl	: gramme par décilitre
GB	: Globules Blancs
GR	: Globules Rouges
H	: heure
Hb Glyquée	: Hémoglobine Glyquée
HbA ₁	: Hémoglobine adulte majeure A ₁
HbA ₂	: Hémoglobine adulte mineure A ₂
HbC	: Hémoglobine C
HbF	: Hémoglobine foetale
L	: litre
LMC	: Leucémie Myéloïde Chronique
min	: minute
ml	: millilitre
mm ³	: millimètre cube
ng/L	: nano gramme par litre

Parmt	: Paramètre
p	: Seuil de Signification
pg/cell	: picogramme par cellule
Plt	: Plaquettes
PTME	: Prévention Transmission Mère Enfant
Rétic	: Réticulocytes
SPSS	: Statistical Package for Social Science
TCMH	: Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
VGM	: Volume Globulaire Moyen

SOMMAIRE

	PAGES
INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS.....	3
MATERIELS ET METHODES.....	4
RESULTATS.....	25
COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	33
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	36
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	38
RESUME.....	42
FICHE SIGNALITIQUE.....	43
ANNEXES.....	44

Liste des Tableaux :

Tableau I : distribution des volontaires selon le sexe.....**25**

Tableau II : distribution des volontaires selon l'âge et le sexe.....**26**

Tableau III : moyenne (\pm 1DS), médiane et valeurs de référence de l'hémoglobine A₂.....**27**

Tableau IV : valeurs moyennes (\pm 1DS) et médianes des autres paramètres étudiés.....**28**

Tableau V : moyenne (\pm 1DS) des paramètres étudiés selon la tranche d'âge.....**29**

Tableau VI : moyenne (\pm 1DS) des paramètres étudiés selon le sexe.....**31**

Tableau VII : comparaison des valeurs moyennes d'hémoglobine A₂ de notre population à celles rapportés par d'autres études.....**32**

INTRODUCTION

L'hémoglobine humaine est constituée de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux, constituant la globine. Chacune de ces chaînes protéiques dites de type α et β est pelotonnée sur elle-même et forme 8 segments hélicoïdaux notés de A à H ; elles ménagent entre les hélices E et F, une poche destinée à recevoir un pigment appelé hème [1]. La synthèse des chaînes constituant la globine est précoce dans la vie et obéit à une cinétique particulière [2] commandée par des gènes de type α pour les chaînes de type α ($\zeta_1, \zeta_2, \alpha_1, \alpha_2$) et type β pour les chaînes de type β ($\epsilon, G_\gamma, A_\gamma, \delta, \beta$). Les gènes qui codent pour les chaînes α sont au nombre de quatre ; ceux qui codent pour les chaînes γ sont au nombre de deux (G_γ et A_γ). Ainsi la période embryonnaire est caractérisée par trois types d'hémoglobines : les hémoglobines Gowers I et II et l'hémoglobine Portland. Durant la période fœtale, on observe une synthèse plus importante d'hémoglobine fœtale HbF ($\alpha_2 \beta_2$). C'est à partir de ce moment que commence la synthèse des hémoglobines A1 ($\alpha_2 \beta_2$) hémoglobine adulte majeure et A₂ ($\alpha_2 \delta_2$) ou hémoglobine adulte mineure. Après la naissance on trouve les hémoglobines A₁, A₂, F, et glyquée. La formule hémoglobinique de l'adulte est atteinte 6 mois après la naissance avec les proportions suivantes définies par les techniques densitométriques : Hb A₁ = 76- 97%, Hb A₂ = 2- 3,5%, Hb F \leq 1%, Hb glyquée = traces [3, 4].

Des mutations ou délétions au niveau de ces gènes peuvent conduire à des syndromes thalassémiques associées ou non à des manifestations cliniques [5]. Les α thalassémies sont plus souvent secondaires à des délétions chromosomiques ; elles sont incompatibles avec la vie lorsque la délétion concerne les 4 gènes α , elles entraînent une anémie modérée lorsque deux ou trois gènes sont touchés par la délétion et restent asymptomatiques lorsque seulement un gène est délété. Les β thalassémies sont la conséquence de mutations ou plus rarement de délétions chromosomiques [6, 7]. En l'absence de données de biologie moléculaire, les syndromes thalassémiques sont caractérisés en pratique, à partir de paramètres biologiques essentiels à savoir les fractions hémoglobiniques F, A₂ et A₁, le statut martial, les constantes érythrocytaires et le taux d'hémoglobine de l'individu. Les β thalassémies sont caractérisées par une augmentation du taux des fractions F et A₂ de l'hémoglobine alors que les α thalassémies

se caractérisent par une baisse du taux d'hémoglobine A₂. Le taux d'hémoglobine F comme celui de l'hémoglobine A₂ peuvent toutefois être modifiés au cours de pathologies diverses ou d'états physiologiques comme la carence martiale, l'hémolyse, la drépanocytose, les hémoglobinopathies par l'hémoglobine instable, l'érythropoïèse accrue, la grossesse, les suites d'aplasies médullaires, les suites de greffe de moelle osseuse, les récupérations d'érythroblastopénies transitoires, les hémopathies malignes, l'insuffisance médullaire globale, la Leucémie myéloïde chronique, la maladie de Fanconi ou de Backfan-Damond, le syndrome myélomonocytaire de l'enfant, les syndromes préleucémiques, les hémorragies aiguës; la persistance héréditaire de la synthèse de l'hémoglobine fœtale s'accompagne d'un taux d'hémoglobine F élevé variant entre 1 et 35% selon les mutations [8,9]. Après migration en pH alcalin, technique utilisée plus couramment jusqu'à une période récente, le taux d'hémoglobine A₂ n'est pas évaluable chez le sujet ayant l'hémoglobine C, à cause de sa co-migration avec cette hémoglobine. De ce fait les complications spécifiques à l'association hémoglobine C et thalassémie sont peu décrites. Le système Capillarys est un système qui permet en routine, de séparer l'hémoglobine A₂ de l'hémoglobine C et de les quantifier. Il nous a paru intéressant de déterminer par cette technique d'électrophorèse utilisée dans plusieurs laboratoires à Bamako, les valeurs de référence de l'hémoglobine A₂ permettant à long terme de caractériser les syndromes thalassémiques dans notre contexte quel que soit le phénotype hémoglobine de l'individu [10].

OBJECTIFS

1- Objectif général :

Déterminer les valeurs de référence du taux d'hémoglobine A₂ à Bamako

2- Objectifs spécifiques :

- Mesurer les valeurs d'Hb A₂ dans une population de 6 mois à 45 ans

- Calculer les percentiles 2,5 et 97,5 des valeurs d'HbA₂ déterminées dans la population étudiée.

METHODOLOGIE

1- Cadre d'étude :

Des enfants et adolescents volontaires ont été recrutés dans les services de pédiatrie du Centre Hospitalo-universitaire de Gabriel Touré, du Centre Hospitalier Mère-Enfant de Bamako. Les adultes ont été recrutés à la faculté de médecine de pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako au Point G. Le laboratoire privé ALGI de Quinzambougou de Bamako a servi de lieu de traitement des échantillons prélevés. Le choix de ce laboratoire a été motivé du fait que c'était le seul laboratoire capable de déterminer les fractions d'hémoglobines sur Capillarys[®] 2 Sebia.

2- Description des sites de recrutement

2.1- Description du service de pédiatrie du CHU-Gabriel TOURE :

Le service de pédiatrie est situé au sein du CHU-GT qui est sur la rive gauche du fleuve Niger, dans la ville de Bamako la capitale du Mali. Ce service est dirigé par deux Professeurs de pédiatrie assisté par un maître de conférence chef de service, deux maîtres assistants, cinq médecins pédiatres, deux médecins généralistes, vingt huit médecins en cours de spécialisation, neuf techniciens supérieurs de santé, dix neuf techniciens de santé, douze aides soignants et quatre manœuvres. Il s'agit d'un service de troisième niveau de référence de la pyramide sanitaire au Mali qui reçoit les enfants des communes II et III essentiellement avec environs 50 000 consultations annuelles. Ces deux communes ont respectivement 159 805 et 128 872 habitants environs.

Le département de pédiatrie est divisé en deux parties :

- **A l'étage :**

- **L'oncologie pédiatrique** : comprend 10 salles climatisées dont chacune dispose d'un lit réservé à l'hospitalisation des enfants cancéreux.

Une salle de consultation

Une salle de soins

La pédiatrie IV : comprend 4 grandes salles dont chacune dispose de 4 lits réservés à l'hospitalisation des enfants de 2 ans.

- **L'unité de réanimation et de néonatalogie** : comprend 4 salles d'hospitalisations :

Une salle pour les nouveaux instables ;

Une salle pour les nouveaux prématurés instables ;

Une salle pour les nouveaux stables ;

Une salle pour les prématurés stables ;

Une salle de surveillance régulière ;

Une salle d'observation des nouveaux vus au cours de la permanence et de garde dont l'état ne nécessite pas une hospitalisation ;

Une salle d'observation des bébés kangourou.

- **Une unité kangourou** : composée de

2 salles d'hospitalisation ;

Une salle de consultation.

L'unité kangourou a pour but le suivi de l'enfant prématuré.

- **Six (6) salles d'hospitalisations V.I.P**

- **En bas de l'étage :**

Le service de pédiatrie I : composée de :

Trois (3) salles d'hospitalisations comportant chacune huit (8) lits ;

Une salle de soins.

- **Le service de pédiatrie II** : composée de :

Trois(3) salles d'hospitalisations comportant chacune huit (8) lits,

Une d'observation,

Une boîte de consultation des urgences,

Une occupée par le CVD,

Une occupée par le DEAP.

- **Le service des urgences pédiatriques** : composée de

Une salle d'hospitalisation comprend :

Trois (3) salles réparties comme suite :

Une salle pour les grands enfants ;

Deux (2) salles pour les nourrissons ;

Une salle de consultation des urgences ;

Une salle de soins des malades vus aux urgences

Une unité de nutrition ;

Une unité de P.T.M.E ;
Une salle de consultation de la drépanocytose ;
Une salle de consultation de l'oncologie pédiatrique ;
Une salle de perfusion et
Une unité V.I.H

2.2- Description du service de pédiatrie du CHME le Luxembourg :

Il est situé au sein du CHME le Luxembourg dans le quartier Hamdallaye de Bamako. Il est dirigé par un médecin pédiatre assisté des étudiants en année de thèse, des infirmiers et aides soignants. Ce service est sollicité par les populations de Lafiabougou et Hamdallaye. Il est composé de cinq salles, de la salle 20 à 24. Chacune de ces salles comprend deux lits ; en plus des lits la salle 21 comprend également deux berceaux.

2.3- Description du laboratoire de biologie clinique de la FMPOS :

Le laboratoire de biologie clinique est situé au sein de la FMPOS. Il assure la formation pratique des étudiants de la dite faculté. Il apporte un appui aux structures sanitaires dans le diagnostic et le suivi des malades du Mali ; il fait à ce titre des activités d'hématologie de routine et de cytologie spécialisée. Le laboratoire est dirigé par un professeur titulaire d'hématologie assisté par un Maître de conférence en hématologie biologique, un Maître assistant en hématologie biologique et un assistant en hématologie clinique.

Le plateau technique est composé de :

Deux microscopes optiques Leica DM 2000,
Un microscope optique Leitz LABORLUX S,
Un bain marie Fisher Scientific,
Un ABX micros 60 18 parmt,
Un Citadel 1000[®],
Une cyto-centrifugeuse SHANDON,
Une centrifugeuse KOKUSAN,
Deux séchoirs électroniques (memmert et JOUAN Iso 9001),
Une balance analytique type Voyager,

Un agitateur type VORTEX-GENIE,
Un Option 4 plus Biomérieux,
Un Protofluor-Z,
Un réfrigérateur ARISTON,
Un réfrigérateur ARTHUR MARTIN,
Un réfrigérateur Brandt,
Un congélateur Ultima II (REVCO),
Trois ordinateurs.

3- Type d'étude :

Nous avons réalisé une étude d'observation transversale allant du 17 août au 07 octobre 2009.

4- Population d'étude :

Cette étude a concerné les sujets âgés de 6 mois à 45 ans des deux sexes.

5- Variables indépendantes de l'étude :

- Age compris entre 6 mois à 45 ans ;
- Ferritinémie, Volume globulaire moyen, taux d'hémoglobine F ;
- Fractions d'hémoglobines déterminées par électrophorèse en capillaire de zone (technique Capillarys[®]).

6- Taille de l'échantillon et prélèvements :

La taille de l'échantillon de cette étude a été déterminée conformément aux directives publiées par la NCCLS (National Consensus Committee on Laboratory Standards) du comité national américain sur les standards des laboratoires [11]. Selon la NCCLS, le nombre minimum de valeurs observées requises pour les percentiles 2,5 et 97,5 d'une distribution est de 39 et recommande en conséquence d'inclure au moins 120 sujets, c'est ainsi que dans cette étude nous avons inclus 127 volontaires pour le sous groupe des enfants et adolescents et 123 pour le sous groupe des adultes. Du fait de la nature des examens biologiques, deux types de prélèvements ont été effectués ; un sur tube contenant un anticoagulant (EDTA) et un sur tube sec. La quantité totale de sang prélevé était de 4 ml pour les enfants et 10 ml chez les adultes. Tous les prélèvements ont été des prélèvements veineux. Le tube EDTA K₂ était destiné à l'hémogramme, le taux des réticulocytes et l'électrophorèse de l'hémoglobine et le tube sans anticoagulant était destiné à la détermination du taux de ferritine sérique pour tous les volontaires.

6.1- Critères d'inclusion :

- Tout sujet âgé de 6 mois à 45 ans ayant donné son consentement éclairé ou pour qui un assentiment signé d'un parent ou d'un tuteur légal a été obtenu,
- Tout sujet n'ayant pas de pathologie hématologique grave notamment une anémie sévère.

6.2- Critères de non inclusion :

- Tout sujet pour qui un consentement ou un assentiment signé n'a pas été obtenu.
- Les femmes enceintes,
- Les malades souffrant d'une pathologie cancéreuse,
- Les sujets sous supplémentation martiale,
- Les sujets chez qui une hémolyse ou une hémorragie récente, ou une hémoglobinopathie a été documentée.

7.1- Paramètres sociodémographiques :

Ces paramètres ont concerné l'âge et le sexe.

7.2- Paramètres cliniques :

- Antécédents médicaux,
- Etat de la peau et des muqueuses (pâleur, ictère)
- Etat de la rate (splénomégalie), du foie (hépatomégalie), des aires ganglionnaires (adénopathies) et des amygdales (hypertrophie amygdalienne).

7.3- Paramètres hématologiques :

- Constantes érythrocytaires
- Taux d'hémoglobine
- Taux des réticulocytes
- Taux d'hémoglobines A₂, A₁ et F

7.4- Paramètre biochimique :

Le paramètre biochimique mesuré a été le taux de ferritine sérique.

7.5- Méthodes de détermination des paramètres biologiques :

- L'hémogramme et la formule leucocytaire ont été déterminés à l'aide d'un compteur automatique de type Diana 5 Evolution XENIA 27parmt.
- Le taux des réticulocytes a été déterminé sur un frottis coloré par le bleu de crésyl brillant après comptage au microscope optique.
- L'électrophorèse de l'hémoglobine a été réalisée sur l'automate Capillary[®] 2 Sebia.

7.5.1 Numération cellulaire sur l'automate DIANA 5 / Xénia

- **Principe**

DIANA 5 / Xénia compte par impédance le nombre des leucocytes, d'érythrocytes et de thrombocytes.

- **Calibrateur et Contrôles**

Calibrateur HYCEL-CAL Réf. R2C7020A (2 tubes)

Contrôle DIANATROL N Réf. R2A7040A (4 N)

Contrôle DIANATROL AQ Réf. R2A7141A (1B+4N+1H)

Contrôle DIANATROL AQ Plus Réf. R2A7242A (2B+4N+2H)

- **Réactifs**

HEMALYSE 5

HEMATON 5

HEMACORE

- **Mesures de sécurités sur le prélèvement, conservation des échantillons et réactifs**

L'échantillon de sang veineux a été prélevé sur anticoagulant EDTA K2 (le calibrage du VGM varie de 2-3 % selon l'anti-coagulant). Le rapport d'EDTA K2 au sang total était de 1 à 2 mg par ml de sang. Les échantillons ont été conservés à température ambiante (20 ± 2 °c) et les analyses effectuées dans les douze heures suivant le prélèvement. Les échantillons ont été transportés, et conservés à 2 °- 8 °c.

Les réactifs ont été stockés entre 8°C et 30°C jusqu'à la date de péremption, contrôles et calibrants entre 2°C et 8°C jusqu'à la date de péremption.

- **Mode opératoire**

L'analyseur compte par impédance le nombre des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes.

Les cellules en suspension dans un milieu isotonique traversent un orifice où un champ électrique est établi. En passant à travers l'orifice, les cellules provoquent une augmentation d'impédance proportionnelle à leur volume. L'instrument compte le nombre de cellules et les trie en fonction de leur taille, permettant ainsi l'analyse de leur distribution. Le grand nombre de cellules comptées améliore beaucoup l'exactitude de l'appareil en réduisant considérablement le risque d'erreurs statistiques.

L'amélioration des instruments et des réactifs en hématologie a permis de déterminer en routine le nombre des globules rouges, des plaquettes et des globules blancs.

L'introduction de techniques complémentaires comme le centrage hydrodynamique et l'analyse combinée de l'impédance et de la lumière diffusée par les cellules (illuminées par un rayon laser focalisé) permettent l'analyse de 5 populations de leucocytes (lymphocytes, monocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles).

Pour être utilisés sur l'analyseur, les réactifs ont été présentés avec des caractéristiques bien particulières.

Le diluant a permis une bonne dispersion des éléments figurés du sang afin de réduire le risque causé par le passage simultané de plus d'une cellule dans l'orifice. Lorsque la concentration s'élève, les passages en coïncidence deviennent inévitables. Le procédé de focalisation hydrodynamique qui centre et étire le flux de dilution cellulaire réduit considérablement ce risque sans l'éliminer totalement. L'analyseur dispose d'algorithmes pour corriger automatiquement les résultats.

L'analyseur contrôle aussi la fréquence d'acquisition des signaux. Au delà de certaines fréquences, la vitesse d'injection de la préparation cellulaire est réduite automatiquement. Ce procédé breveté étend la linéarité à des niveaux très élevés. La linéarité théorique du comptage de particules est portée à 20 Téra/L et 1,5 Téra/L respectivement pour le canal des GR et celui des GB. Toutefois, compte tenu de la difficulté à se procurer de tels échantillons, les linéarités revendiquées pour le comptage des particules ont été déterminées avec des kits spécialisés disponibles dans le commerce 8,5 Téra/L pour le canal GR et 450 giga/L pour le canal GB.

Le diluant a un effet important sur la mesure du Volume Globulaire Moyen.

De stricts contrôles ont été effectués en production pour maintenir constants l'osmolarité et le pH d'un lot à l'autre. La production des réactifs a été effectuée dans des conditions de contrôles stricts du niveau de poussière en atmosphère filtrée dans des locaux en surpression. La filtration stérilisante 0,22 µm des produits permet d'assurer leur protection contre des contaminations significatives en micro-organismes et en poussières. Des agents conservateurs freinent le développement de germes qui pourraient contaminer les réactifs lors de leur utilisation.

Le comptage des GB nécessite une destruction rapide des GR. L'agent de lyse détruit la membrane des GR, réduisant la plupart du temps le stroma cellulaire à l'état de débris de très petites tailles qui ne sont plus détectables par la méthode de mesure. Cette action lysante a été ralentie pour préserver au mieux la structure nucléaire des globules blancs.

D'autres facteurs ont leur importance pour assurer la qualité des résultats, par exemple une agitation suffisante des échantillons de sang (8 retournements complets doux successifs pour un tube de moins de 5 ml de 75 mm de haut rempli à 75% au plus). Dans le cas où le sang a été sédimenté plus de 4 H, l'agitation a été prolongée.

- Comptage des GB, GR et Plt

L'analyseur compte les globules blancs, les globules rouges comme les plaquettes par mesure de l'impédance électrique. Le sang est dilué avec une solution saline isotonique qui maintient la forme des globules et qui conduit le courant électrique. Un volume précis de sang dilué est injecté à travers un orifice de diamètre 75µm dans un cymomètre de flux quantitatif (pour les GR/ Plt comme pour les GB) alors qu'un courant constant est appliqué de part et d'autre de l'orifice.

Lorsqu'une cellule passe à travers un orifice, elle déplace son propre volume de diluant, augmentant ainsi momentanément la résistance au passage du courant électrique. Cette variation temporaire de l'impédance est proportionnelle au volume de diluant déplacé, c'est à-dire au volume de la cellule. L'instrument amplifie les impulsions électriques et les compte pour déterminer le nombre des GB, GR et Plt.

Sur l'histogramme de distribution en taille des plaquettes, on constate parfois que les bases des histogrammes des GR et Plt se recouvrent. Lorsque ce recouvrement est important, il n'est pas possible de déterminer simplement le seuil approprié entre les deux

populations et des algorithmes plus sophistiqués sont nécessaires pour distinguer les plaquettes des globules rouges. L'analyseur corrige le résultat des plaquettes. La distribution non corrigée reste représentée en noir dans l'histogramme des plaquettes.

Comme les GR sont généralement 500 à 1000 fois plus nombreux que les GB, il faut détruire les premiers pour pouvoir compter les seconds. C'est pourquoi ces cellules sont analysées sur des préparations différentes :

Les GB sont mesurés sur une dilution hémolysée au 1/251 μ l. Les GR et Plt sont mesurés sur une dilution au 1/ 6000 réalisée en cascade depuis une prédilution au 1/ 72. Les GB n'interfèrent généralement plus de façon significative sur le comptage des GR à ce taux de dilution.

Lorsque la dilution des GR/Plt est terminée, l'agent de lyse est ajouté à une partie de la prédilution afin de détruire la membrane des GR et libérer ainsi leur contenu en hémoglobine.

- Formule leucocytaire

Les sous-populations leucocytaires ont été distinguées les unes des autres par l'analyse du cytogramme que l'on obtient en combinant les informations électriques et optiques appariées cellule par cellule.

Certaines conditions de test (tels que l'échantillonnage, dilution, température de la réaction, mélange réactionnel et durée de la réaction) sont contrôlées par l'analyseur. D'autres conditions, telles que la température ambiante, comme celles des réactifs et des échantillons, la méthode de prélèvement, l'emploi des réactifs appropriés comme une agitation correcte des échantillons juste avant la mesure sont contrôlés par le laboratoire .

Il ne faut pas sous-estimer l'importance des facteurs pré-analytiques et d'environnement dans la qualité globale de l'analyse.

La lyse permet l'analyse de 5 populations leucocytaires avec la mesure de quatre sous-populations leucocytaires : lymphocytes, monocytes, granulocytes neutrophiles, éosinophiles et granulocytes basophiles.

Les différentes sous-populations ont été extraites du cytogramme grâce à des techniques d'analyse d'images et à leur interprétation par un logiciel breveté.

- Détermination du taux d'hémoglobine

La détermination du taux d'Hb sur analyseur est une adaptation de la méthode de référence basée sur la transformation de l'Hb en cyanmethémoglobine. Cette méthode a été acceptée en 1966 lors d'un congrès International d'hématologie (publiée en 1967) à la suite des recommandations faites par un comité d'experts constitué (1964) par le << international Committee for Standardisation in Haematology, ICSH >>

La NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) aux Etats-Unis a publié en février 1984 un premier document << Standard Approved >> intitulé << Reference Procedure for the Quantitative Détermination of Hemoglobin in Blood >> [11]. La dernière édition de ce standard approuvé (H 15- A3) a été publié le 12/01/2000.

L'agent de lyse ajouté dans la dilution des GB contient un sel de cyanure à 0,03% qui réagit avec l'hémoglobine libérée des érythrocytes pour être convertie en un composé cyanmethémoglobinique. Son absorbance est lue à 560 nm à travers la chambre des GR.

La mesure de la cyanmethémoglobine testée est comparée à celle d'une référence (un blanc réactif) alors que la chambre des GB est remplie de diluant isotonique propre.

Une fonction du rapport de ces deux mesures détermine la concentration en hémoglobine. L'instrument affiche et imprime le résultat avec le système d'unités sélectionné dans le laboratoire (en g/dl ou g/l).

- Détermination du VGM et du VMP

Pour diverses raisons, les impulsions des cellules qui passent près des bords de l'orifice sont déformées. Leurs amplitudes peuvent être sur-estimées (jusqu'à 30%), ce qui conduit sur la plupart des analyseurs à des histogrammes de répartition en taille artificiellement déformés sur la droite.

Pour compenser ce phénomène qui perturbe gravement la mesure de l>IDR (Indice Distribution GR), la plupart des analyseurs, même de haute gamme, ne disposant pas de la focalisation hydrodynamique des GR/Plt, tentent de trier les impulsions pour déterminer l>IDR, par exemple en comparant la hauteur de l'impression par rapport à sa surface ou sa durée.

Cet analyseur est équipé d'un dispositif de focalisation hydrodynamique en amont qui aligne et centre les cellules dans l'orifice. Dans ces conditions idéales, les déformations des signaux en fonction de la zone de passage dans l'orifice sont éliminées par principe.

La focalisation hydrodynamique ne permettant pas d'éviter complètement les phénomènes de coïncidence, un algorithme réalise automatiquement l'élimination des signaux déformés par le phénomène de coïncidence pour construire l'histogramme de distribution selon la taille des cellules. L'histogramme relatif donne une image encore plus exacte de la distribution en volume des cellules.

Les autres paramètres, à savoir : Hématocrite (Hte), Teneur Corpusculaire Moyen en Hémoglobine (TCMH) et Concentration Corpusculaire Moyen en Hémoglobine (CCMH) sont calculés par des formules suivantes.

$$Hte = VGM \times Nbre\ GR$$

$$TCMH = \frac{Hb\ (g/dl)}{NbreGR\ /\ mm^3}$$

$$CCMH = \frac{Hb\ (g/dl)}{Ht\ (\%)}$$

- Valeurs de référence et limites patient

L'analyseur compare les résultats mesurés pour chaque patient avec les Références Patients sélectionnés et les valeurs Limites.

Si un résultat excède la Référence Patient correspondante, il apparaît en bleu à l'écran et à l'impression ; un signe (+) ou un signe (-) est ajouté selon qu'il est supérieur ou inférieur à l'intervalle de référence.

S'il est en dehors des Valeurs Limites, le résultat apparaît en rouge à l'écran comme à l'impression ; le paramètre est souligné à l'impression pleine page et demi-page. Un point (!) accompagne le signe (+) ou (-) affiché.

Les valeurs de référence proposées par défaut le sont seulement à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir lui-même les valeurs de Référence Patient et ses Valeurs Limites, et indiquer dans son Manuel d'Assurance Qualité (GBEA- Guide de Bonne Exécution des Analyses) la source de telles valeurs.

Lorsqu'un résultat est signalé en Valeur Limite, l'échantillon de sang est reanalysé pour contrôler sa reproductivité. Il est aussi comparé à un résultat antécédent, le cas échéant.

7.5.2 Numération manuelle des réticulocytes

Principe

Il consiste à compter les globules rouges jeunes.

Matériel et réactifs

- Un bain marie à 37°C
- Un tube à hémolyse sec
- Une lame porte objet
- Huile d'immersion
- Vortex-Génie
- Portoirs pour lames
- Le colorant : le bleu de crésyl brillant qui est reçu dans le laboratoire de biologie clinique de la FMPOS sous forme de poudre conservée dans des flacons teintés (25g).
- Gants
- Blouses

Mode opératoire

1. Préparation du Colorant:

A l'aide de la poudre on prépare la solution de bleu de crésyl brillant à 1% dans de l'eau physiologique que l'on filtre.

2. Réalisation des frottis

On fait un mélange à partie égale de sang et de solution de bleu de crésyl brillant à 1%. On agite ce mélange au Vortex-Génie et on incube au bain marie à 37°C pendant 30 mn. Après l'incubation on effectue le frottis mince que l'on sèche à l'air libre.

3. Lecture des frottis :

On observe à l'immersion à l'objectif x100.

La substance réticulo-filamenteuse apparaît colorée en bleu sombre.

Le pourcentage des réticulocytes est obtenu lorsque le décompte atteint 1000 hématies au minimum.

Il se calcule à partir de la formule suivante :

Nombre total de réticulocytes parmi 1000GRX100/Nombre total de GR comptés

Le nombre absolu des réticulocytes est obtenu en multipliant le nombre des globules rouges donné par la numération par le pourcentage des réticulocytes.

Dispositions particulières

- Le frottis a été fait sur des lames dégraissées, prête à l'emploi.
- Après la confection les frottis ont été séchés immédiatement à l'air pour éviter la réaction cellulaire.

7.5.3 Détermination des types d'hémoglobines par Capillarys 2 (Sebia)

Principe

Il consiste à séparer les différents types d'hémoglobines dans un champ électrique selon leur charge et leur mobilité et à les quantifier.

Matériels et réactifs

- EDTA
- Tampon alcalin
- Solution hémolysante
- Solution de lavage
- Centrifugeuse
- Vortex
- Imprimante ou ordinateur
- Gants
- Coton ou compresse
- Blouses
- Feuille A4 (Rame)

Mode opération

Le système Capillarys utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre. Avec cette technique, les molécules chargées sont séparées dans un champ électrique (haute tension) selon leur mobilité dans un tampon alcalin et selon le flux électroosmotique.

Le système Capillarys possède des capillaires montés en parallèle permettant sept analyses simultanées. L'échantillon est dilué dans la solution hémolysante puis injecté

par l'aspiration à l'extrémité anodique du capillaire. Les hémoglobines sont séparées par application d'une haute tension puis détectées directement à 415 nm coté cathodique. Avant chaque test, les capillaires sont lavés avec une solution de lavage puis remplis de tampon pour l'analyse suivante. En tampon alcalin, les hémoglobines normales et anormales (ou variants) sont détectées dans l'ordre suivant, de la cathode vers l'anode : δA^2 (variant A₂), C, A₂/O-Arab, E, S, D, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart, J, N-Baltimore et H. A 415nm l'anhydrase carbonique n'est pas visualisée sur le profil électrophorétique, ce qui permet d'identifier les variants de l'hémoglobine A₂ qui migrent dans cette zone.

Préparation de l'échantillon

Laisser sédimenter les globules rouges pendant plusieurs heures (jusqu'à ce que les globules rouges se séparent du plasma et que le plasma devienne limpide (temps optimum : 1 nuit à 2 - 8°C) ou centrifuger l'échantillon de sang à 5 000 tours/min pendant 5 min. Eliminer délicatement le maximum de volume de plasma. Vortexer pendant cinq secondes.

Limites

Les échantillons de sang ont été prélevés exclusivement sur tube **EDTA K2**. Ne pas utiliser d'échantillon de sang contenant plus de plasma résiduel au dessus du culot de globules rouges car l'analyse en serait affectée. Enlever l'excès de plasma avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillon de sang non sédimenté. Seuls les globules rouges ont été analysés.

Eviter les échantillons vieillis (plus de 7 jours), ou stockés improprement ; la présence d'agrégats visqueux ainsi générés pourrait affecter l'hémolyse automatique des échantillons. Les produits de dégradation pouvaient en effet interférer sur le profil électrophorétique.

Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés.

7.5.4 Détermination de la Ferritine sérique par VIDAS[®] Ferritin

Principe :

Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique par sandwich en une étape de détection finale en fluorescence (ELFA).

Matériel

- Pipette à embout jetable permettant la distribution de 100 µl ;
- Gants non talqués à usage unique ;
- Lunettes ;
- Blouse ;
- Immunoglobulines monoclonales de souris anti- Ferritine marquées à la phosphatase alcaline + azoture de sodium ;
- Tampon de lavage 1 (phosphate de sodium) ;
- Tampon de lavage 2 (diéthanolamine) ;
- Cuvette de lecture avec substrat.

Précautions d'utilisation

- Le coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives au produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).
- Ne pas utiliser les cônes dont le sachet est percé ;
- Ne pas utiliser de cartouches visiblement altérées (feuille aluminium ou plastique endommagé) ;
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui ;
- Ne pas mélanger les réactifs (ou consommables) de lots différents ;
- Ne pas utiliser de gants talqués, le talc pouvant entraîner de faux résultats pour certains tests immunoenzymatiques ;
- Les réactifs du coffret contiennent un conservateur (azoture de sodium), susceptible de réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre et de former des azotures métalliques explosifs. Il est recommandé de rincer à l'eau tout rejet.
- Le tampon de lavage 2 contient un agent nocif (diéthanolamine 11,5%), prendre connaissances des risques et des conseils de prudence.
- Le substrat contient un agent irritant, prendre connaissance du risque et des conseils de prudence.

Conditions de stockage

- Conserver le coffret VIDAS FER à 2- 8 °c.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Laisser à 2- 8 °c les réactifs non utilisés.
- A l'ouverture du coffret, vérifier l'intégrité et la bonne fermeture du (des) sachet(s) de cônes ; dans le cas contraire, ne pas utiliser les cônes.
- Après chaque utilisation, bien refermer le sachet avec son déshydratant pour maintenir la stabilité des cônes et replacer la totalité du coffret à 2- 8 °c.
- Tous les composants sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui, lorsqu'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

Echantillons

1. Nature et prélèvement des échantillons

Sérum ou plasma (héparine de lithium ou EDTAK2).

Il est préconisé à chaque laboratoire de valider le type de tube de prélèvement utilisé.

L'utilisation de sérums inactivés par la chaleur n'a pas été validée. Il n'a pas été observé pour ce dosage d'influence significative :

- de l'hémolyse (après surcharge d'échantillons en hémoglobine de 0 à 300 µml/l) ;
- de la lipémie (après surcharge d'échantillons en lipides de 0 à 2 g/l d'équivalents triglycérides) ;
- de la bilirubinémie (après surcharge d'échantillons en bilirubine de 0 à 513 µmol/l).

Il est néanmoins conseillé de ne pas utiliser d'échantillons visiblement hémolysés, lipémiques ou ictériques et d'effectuer si possible un nouveau prélèvement.

2. Stabilité des échantillons

Les échantillons peuvent être stockés 7 jours à 2 – 8 °c au maximum ; au-delà, les congeler à – 25° ± 6 c. Ce délai n'a pas été dépassé pour nos cas.

Les congélations et décongélations successives ont été évitées.

Mode opératoire

1. Saisie des données de la carte MLE

A l'ouverture d'un nouveau lot, les spécifications (ou données usine) ont été entrées dans l'instrument (VIDAS ou mini VIDAS) à l'aide de la carte MLE (fiche de spécifications)

incluse dans chaque coffret. Si cette opération n'était pas effectuée avant de commencer les tests, l'instrument ne pourrait pas éditer de résultat. Ces spécifications ne sont entrées qu'une seule fois pour chaque lot.

Il est possible de saisir les spécifications manuellement ou de façon automatique grâce à la carte MLE.

2. Calibration

La calibration, à l'aide d'un Calibrateur fourni dans le coffret, doit être effectuée à l'ouverture de chaque nouveau lot après entrée des spécifications du lot puis tous les 14 jours. Cette opération permet d'ajuster la calibration à chaque instrument et à l'évolution éventuelle du réactif dans le temps.

Le Calibrateur a été analysé en double (voir manuel d'utilisation). La valeur du Calibrateur était comprise dans les limites de RFV ("Relative Fluorescence Value") fixées. Si ce n'est pas le cas : on allait faire une calibration.

3. Contrôle de qualité

Un contrôle est inclus dans chaque coffret VIDAS FER.

Ce nouveau doit être utilisé à l'ouverture de nouveau coffret afin de vérifier l'absence d'altération des réactifs. Chaque calibration a été également vérifiée à l'aide de ce contrôle. Pour que l'instrument puisse vérifier la valeur du contrôle, il faut l'identifier par "C1".

Si la valeur du contrôle s'écarte des valeurs attendues, les résultats ne peuvent être validés.

4. Réalisation du test

- Sortir uniquement les réactifs nécessaires, les laisser 30 minutes à la température ambiante avant utilisation.
- Utiliser une cartouche "FER" et un cône "FER" pour chaque échantillon, contrôle ou Calibrateur à tester. Vérifier que le sachet de cônes a bien été refermé après chaque utilisation.
- Taper ou sélectionner "FER" sur l'instrument pour entrer le code du test. Le Calibrateur identifié obligatoirement par "S", doit être utilisé en double. Si le contrôle doit être testé, il sera identifié par "C1".

- Homogénéiser à l'aide d'un agitateur de type vortex le Calibrateur, le contrôle et les échantillons.
- Distribuer 100µl de Calibrateur, d'échantillon ou de contrôle dans le puits échantillon.
- Placer dans l'instrument les cônes et les cartouches. Bien vérifier la concordance des codes (couleurs et lettres) entre le cône et la cartouche.
- Démarrer l'analyse (voir Manuel d'utilisation). Toutes les étapes sont alors gérées automatiquement par l'instrument. Les résultats sont obtenus en 30 minutes environ.
- A la fin de l'analyse, retirer les cônes et les cartouches de l'instrument.
- Eliminer les cônes et cartouches utilisés dans un récipient approprié.

5. Interprétation des résultats

Dès le test terminé, les résultats sont analysés automatiquement par le système informatique. L'instrument effectue deux mesures de fluorescence dans la cuvette de lecture pour chacun des tests. La première lecture prend en compte le bruit de fond dû à la cuvette substrat avant mise en contact du substrat avec le cône. La seconde lecture est effectuée après incubation du substrat avec l'enzyme présente dans le cône. Le calcul de la RFV (Relative Fluorescence Value) est le résultat de la différence des deux mesures. Il apparaît sur la feuille de résultats.

Les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une couche de calibration mémorisée (modèle mathématique : << modèle logistique à 4 paramètres >>) et sont exprimés en ng/ml (préparation NIBSC 80/578).

Les échantillons qui présentaient des concentrations en ferritine supérieures à 1200 ng/ml ont été redosés après dilution au 1/ 10 voire au 1/100 dans le tampon de dilution FER(R1).

Si le facteur de dilution n'a pas été saisi lors de la création de la liste de travail (voir Manuel d'utilisation), on multiplie le résultat par le facteur de dilution pour avoir la concentration de l'échantillon.

L'interprétation des résultats du test a été faite en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

6. Limite du test

Une interférence peut être rencontrée pour sérum contenant des anticorps dirigés contre des composants du réactif, c'est pourquoi les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

8- Critères d'éligibilité pour la détermination des valeurs de référence de l'hémoglobine A₂ et tests statistiques utilisés.

Les critères d'éligibilité pour la détermination des valeurs de référence de l'hémoglobine A₂ ont été :

- Un volume globulaire moyen (VGM) normal c'est-à-dire compris entre 75 et 85 fl pour les volontaires âgés de 6 mois à 12 ans, 85 et 95 fl pour les volontaires âgés de 13 à 45 ans.
- Un taux d'hémoglobine F normal c'est-à-dire $\leq 1\%$.
- Un taux de ferritine sérique normal autrement dit compris entre 20 et 180 ng/L.

Ces critères ont conduit à retenir 41 volontaires pour calculer les valeurs de référence de l'hémoglobine A₂. Les données relatives à ces 41 volontaires ont été enregistrées et analysées sur le logiciel SPSS 12.0. L'âge moyen des volontaires a été calculé avec le logiciel Excel 2003. Pour la comparaison des moyennes des différents paramètres étudiés selon le sexe des volontaires, nous avons eu recours au test d'ANOVA, pour la comparaison de nos valeurs à celles rapportées par certains auteurs à travers le monde nous avons utilisé le test de student. Les valeurs comprises entre les percentiles 2,5 et 97,5 ont été considérées comme les valeurs de référence. Le seuil de signification des différences observées a été fixé à un $p \leq 0,05$.

9- Considérations éthiques :

Les volontaires inclus dans l'étude ont reçu une information orale et écrite détaillée sur le but et le déroulement de l'étude. Un formulaire de consentement écrit pour les adultes et d'assentiment pour les enfants a été soumis en deux exemplaires par le clinicien chargé de faire le recrutement à chaque volontaire ou le parent (tuteur) qui y a apposé son empreinte digitale ou sa signature. L'étude a été autorisée par le comité d'éthique institutionnel de la faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie de Bamako.

RESULTATS

1- LES PARAMETRES SOCIO-DEMOGRAPHIQUES

Tableau I : distribution des volontaires selon le sexe.

Sexe	Fréquence	Pourcentage
Masculin	23	56,1
Féminin	18	43,9
Total	41	100

Le sexe masculin était le plus représenté avec 56,1% de la population étudiée.

Tableau II : distribution des volontaires selon l'âge et le sexe.

Sexe	Classe d'Age	
	6 mois à 15 ans	16 ans à 45 ans
Masculin	9	14
Féminin	11	7
Total	20 (48,8)	21 (51,2)

La classe d'âge 16 ans à 45 ans était la plus représentée avec 51,2% de notre échantillon. Il y avait presque autant d'enfants que d'adultes (49% contre 51%).

2- LES PARAMETRES ETUDIES

Tableau III : moyenne (\pm 1DS), médiane et valeurs de référence de l'hémoglobine A₂ de nos 41 volontaires.

Hémoglobine	Moyenne \pm 1DS	Médiane	Percentile	Percentile
			2,5	97,5
A₂ (%)	2,98 \pm 0,23	3,00	2,50	3,68

Les 95% des valeurs de l'hémoglobine A₂ chez nos volontaires se situent entre 2,50 et 3,68%. La valeur moyenne est de 2,98 \pm 0,23.

Tableau IV : valeurs moyennes (\pm 1DS) et médianes des autres paramètres étudiés.

Effectif = 41		
Paramètres	Moyenne \pm 1DS	Médiane
FS (ng/L)	72,49 \pm 43,47	57,00
GR (Téra/L)	4,65 \pm 0,36	4,70
Hb (g/dl)	12,57 \pm 1,22	12,50
VGM (fl)	84,05 \pm 5,15	85,60
TCHM (pg/cell)	27,01 \pm 2,03	27,30
CCMH (g/dl)	32,11 \pm 0,80	32,00
Rétic (/mm ³)	33,13.10 ³ \pm 13,04	29,20

1DS : une déviation standard

Tableau V : moyenne (\pm 1DS) des paramètres étudiés selon la tranche d'âge.

Paramètres		Effectif = 41		Signification P
		6 mois à 15 ans (20) Moyenne \pm 1DS	16 ans à 45 ans (21) Moyenne \pm 1DS	
Hb A ₂	(%)	2,98 \pm 0,24	2,98 \pm 0,22	0,95
FS	(ng/L)	71,07 \pm 48,04	73,84 \pm 39,80	0,84
GR	(Téra/L)	4,63 \pm 0,34	4,68 \pm 0,38	0,63
Hb	(g/dl)	11,74 \pm 0,87	13,35 \pm 0,97	0,01
VGM	(fl)	79,85 \pm 3,82	88,08 \pm 2,19	0,01
TCMH	(pg/cell)	25,38 \pm 1,34	28,56 \pm 1,17	0,01
CCMH	(g/dl)	31,78 \pm 0,54	32,43 \pm 0,88	0,01
Rétic	(/mm ³)	27,75.10 ³ \pm 9,70	38,26.10 ³ \pm 13,94	0,01

FS : Ferritine Sérique

() : Effectif selon la tranche d'âge

1DS : une déviation standard

La comparaison de ces paramètres selon l'âge ne montre pas de différence entre l'enfant et l'adulte pour taux d'hémoglobine A₂ de ferritine sérique ou du nombre de globules rouges. Les valeurs des autres paramètres (Hb, VGM, TCMH, CCMH, Rétic) sont en revanche significativement plus hautes chez l'adulte que l'enfant ($p \leq 0,05$).

Tableau VI : moyenne (\pm 1DS) des paramètres étudiés selon le sexe

Paramètres	Effectif = 41		
	Masculin (23)	Féminin (18)	Signification
	Moyenne \pm 1DS	Moyenne \pm 1DS	p
Hb A ₂ (%)	2,97 \pm 0,22	2,99 \pm 0,25	0,78
FS (ng/L)	82,39 \pm 47,30	59,85 \pm 35,36	0,10
GR (Téra/L)	4,72 \pm 0,33	4,56 \pm 0,38	0,16
Hb (g/dl)	12,83 \pm 1,47	12,23 \pm 0,71	0,12
VGM (fl)	84,22 \pm 5,54	83,83 \pm 4,76	0,81
TCMH (pg/cell)	27,10 \pm 2,09	26,89 \pm 2,00	0,74
CCMH (g/dl)	32,17 \pm 0,85	32,04 \pm 0,74	0,61
Rétic.10 ³ (/mm ³)	33,71. \pm 14,79	32,39. \pm 10,79	0,75

FS : Ferritine Sérique

() : Effectif selon le genre

1DS : une déviation standard

Aucune différence significative n'a été observée pour les paramètres étudiés en fonction du sexe.

Tableau VII : comparaison des valeurs moyennes d'hémoglobine A₂ de notre population à celles rapportés par d'autres études.

Hémoglobine	Auteurs						
	Notre Etude Bamako, Mali N = 41	p*	LUSINA D. et al. France N = 114 [12]	p**	TAN G.B. et al. Singapour N = 104 [13]	p***	FREDERIC C. et al .Belgique, Bruxelles N = 107 [14]
A ₂ (%)	2,98 (2,50 - 3,68)	10 ⁻⁴	2,75 (2,18 - 3,32)	10 ⁻⁴	2,40 (1,90 – 3,00)	10 ⁻⁴	2,90 (2,70 – 3,80)

$$p^* = p^{**} = p^{***} = 10^{-4}$$

N : taille de l'échantillon

[] : Référence bibliographique

() : Moyenne, valeurs de référence de Hb A₂

p*: comparaison des moyennes de notre étude à ceux rapportées par LUSINA D. et al ^[12]

p**: comparaison des moyennes de notre étude à ceux rapportées par TAN G.B. et al ^[13]

p***: comparaison des moyennes de notre étude à ceux rapportées par FREDERIC C. et al ^[14]

Le taux de l'hémoglobine A₂ trouvé chez nos 41 volontaires est significativement plus élevé que ceux rapportés par certains auteurs [12, 13,14].

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

1- QUESTIONS LIEES A LA METHODOLOGIE

L'effectif sur le quel a porté notre étude était de 41 volontaires âgés de 6 mois à 45 ans. Cette taille d'échantillon est dans l'intervalle de taille minimum recommandé dans le guide du NCCLS [11]. Le recrutement a été fait dans deux services de pédiatries de Bamako et au laboratoire de biologie clinique de la FMPOS. Le choix des deux services de pédiatries a été motivé par leur activité de consultation plus importante qui pouvait nous permettre d'atteindre la taille souhaitée dans un délai imparti.

De même le choix du laboratoire privé a été motivé par le fait que c'était le seul laboratoire capable de déterminer les fractions d'hémoglobines sur Capillarys.

L'exclusion de pathologies diverses ou d'états physiologiques comme la carence martiale, l'hémolyse, les hémoglobinopathies, les états d'érythropoïèse accrue, la grossesse, les suites d'aplasies médullaires, les suites de greffe de moelle osseuse, les récupérations d'érythroblastopénies transitoires, les hémopathies malignes, l'insuffisance médullaire globale, la LMC, la maladie de Fanconi ou de Backfan- Damond, le syndrome myélomonocytaire de l'enfant, les syndromes préleucémiques et les hémorragies aiguës, a permis d'éliminer les biais d'interprétation prévisibles des paramètres biologiques essentiellement l'hémoglobine A₂ et les constantes érythrocytaires. Les résultats obtenus au terme de cette étude peuvent ainsi être considérés comme représentatifs pour la population de Bamako.

2 - LES VALEURS DE REFERENCE DE L'HB A₂

Les 95% des valeurs de l'hémoglobine A₂ étaient comprises entre 2,50 et 3,68%. La moyenne est de $2,98 \pm 0,23$. **Metaxotou et al.** ont rapporté des valeurs moyennes de 2,5% chez l'enfant de 6 mois, 2,7% à 1 an, 2,9% à 18 mois et 2,8% à 2 ans [30]. **Wajman.** a rapporté une valeur moyenne de l'hémoglobine A₂ similaire à la nôtre [31]. Le taux moyen d'hémoglobine A₂ de notre étude était en revanche significativement supérieur à ceux rapportés par certains auteurs [12, 13,14]. Ces différences observées entre les différents pays pourraient trouver leur explication dans des différences méthodologiques : les caractéristiques des populations, les techniques d'analyses et la

taille des échantillons. Ceci justifie l'établissement des normes locales pour chaque paramètre biologique et par chaque laboratoire.

Dans notre étude, la valeur moyenne comme les valeurs extrêmes du taux d'HbA₂ ne diffèrent pas selon le genre et l'âge.

3- LES PARAMETRES ERYTHROCYTAIRES

3.1- Le nombre des globules rouges et le taux d'hémoglobine :

Le nombre de GR comme le taux d'hémoglobine était plus élevé chez l'homme que chez la femme. Mais cette différence n'est pas significative. Ce résultat a été confirmé par l'institut régional d'hématologie [16] et par une étude américaine NHANES II (Second National Health and Nutrition Examination) portant sur 1454 enfants sains âgés de 1 à 11 ans [18]. Ce même constat a été rapporté par l'institut Pasteur de Madagascar en 2000 portant sur 35 hommes et 32 femmes d'âge compris entre 18 et 45 ans [19,24]. Les valeurs moyennes d'hémoglobine de même que celles des globules rouges observées dans notre population, sont inférieures à celles rapportées par certains [19, 22,23]. Ces différences observées entre notre étude et d'autres pays pourraient trouver leur explication dans des différences méthodologiques : les caractéristiques des populations étudiées en particulier, les études de concordances entre les appareils de mesure ne sont pas disponibles.

Keïta [24] a fait le même constat à propos d'une étude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques à Donéguebougou, un village de la commune de Kati situé à une soixantaine de km de Bamako, chez 100 volontaires âgés de 6 mois à 45 ans en 2003.

3.2- Les constantes érythrocytaires :

Les valeurs moyennes du VGM étaient plus basses que celles rapportées par d'autres auteurs [19, 23]. **Arnal C. et Girot R**, ont rapporté des valeurs moyennes de VGM similaires à celles observées dans notre population dans la tranche d'âge 16 à 45 ans, qui est par contre significativement inférieure dans notre population dans la tranche d'âge 6 mois à 15 ans. Les valeurs moyennes de la CCMH et de la TCMH de notre étude étaient plus basses que celles rapportées par certains auteurs en Afrique et dans certaines populations non africaines [19, 25, 26].

Comme chez la population étudiée par Keïta à Donéguébougou [24], les taux moyens du TCMH dans notre étude augmentaient significativement avec l'âge.

4- LE TAUX DES RETICULOCYTES ET LA FERRITINE SERIQUE :

La valeur moyenne du taux des réticulocytes était de $33,71.10^3 \pm 14,79/\text{mm}^3$ en valeur absolue. **Arnal C.** et **Giroit R.** [27] ont trouvés des valeurs moyennes plus élevées que celles rapportées dans notre population.

Nos valeurs moyennes sont nettement plus basses que celles observées chez le nouveau-né, lors de la détermination des valeurs de référence érythrocytaires et leucocytaires à la naissance dans le district de Bamako chez 481 nouveau-nés [28] cela pourrait être expliqué par l'état physiologique particulier du nouveau-né.

Les valeurs moyennes du taux de la ferritine sérique sont de $82,39 \pm 47,30\text{ng/L}$ pour le sexe masculin, et $59,85 \pm 35,36\text{ng/L}$ pour le sexe féminin. Cette différence n'est pas statistiquement significative ($p=0,10$). **Morel P.** et al. [29], en 1995 à Paris en France, chez les nouveau-nés, lors de la détermination des valeurs de référence de la ferritine sérique en pédiatrie à l'aide de l'automate ACS 180, ont trouvé que la ferritine variait en fonction de l'âge mais pas en fonction du sexe de l'enfant, et qu'elle atteignait progressivement les valeurs de l'âge adulte de l'ordre de $35 \mu\text{g/L}$ vers l'âge de 10 ans.

CONCLUSION

Notre étude conduite auprès de 41 volontaires dans le district de Bamako, a permis de constater que les valeurs de référence de l'hémoglobine A₂ dans la population étudiée ne différaient pas selon l'âge et le sexe. Les différences observées avec les données obtenues ailleurs par d'autres auteurs, incitent à la détermination systématique des valeurs de référence biologiques propres à chaque population dans son contexte géographique.

RECOMMANDATIONS

➤ **AU MINISTERE DE LA SANTE**

- ✓ Appuyer et financer :
 - Des études sur le typage des différents types d'hémoglobines de 6 mois à 45 ans.
 - Des études sur les valeurs de référence des types d'hémoglobines.
- ✓ Diffuser les résultats aux structures de santé du pays.

➤ **AU C.R.L.D.**

- ✓ Conduire des études sur des paramètres qui modifient le taux d'HbA₂ dans certaines pathologies.

➤ **AU C.N.R.S.T.**

Promouvoir la recherche sur les hémoglobinopathies en générales et les thalassémies en particulier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **PERUTZ MF., LEHMANN H:** Molecular pathology of haemoglobin. Nature 1998; 222:902-9.
2. **STAMATOYANNOPOULOS G., GROSVELD F. :** Hemoglobin switching.In: **STAMATOYANNOPOULOS G., MAJERUS PW., PERLMUTER RM., VARNUS H.,** editors. The molecular basis of blood diseases. Philadelphia: WB Saunders; 2001.P; 135-82
3. **FRANKLIN BUNN H., FORGET BG.:** hemoglobin molecular, genetic and clinical aspects. Saunders, Philadelphia, 1986.
4. **STEINBERG MH.** et al. Disorders of hemoglobin. New York, Cambridge University Press, 2001.
5. **LABIE D., ELION J.,** Bases moléculaires et pathologiques des maladies de l'hémoglobine. EMC-Hématologie 2005; 2:220-239.
6. **WEATHERALL DJ., CLEGG JB.:** The thalassemia syndromes. Oxford, Blackwell Science, 2001.
7. **STAMATOYANNOPOULOS G.** et al. The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Company, 1887.
8. **MAIER-REDELSPERGER M., GIROT R.** Les aspects cellulaires de la distribution et de la production de l'hémoglobine fœtale. Hématologie, 1996; 2 (5): 437-42
9. **HIGGS DR.** et al. Clinical features and molecular analysis of acquired hemoglobin H disease. Am J med 1983; 75: 181.

- 10. LISSOIR B., WALLEMACQ P., MAISIN D.** Electrophorèse des protéines sériques : comparaisons de la technique en capillaire de zone Capillarys® (Sebia). Ann. Biol. Clin. 2003; 61: 557-62
- 11. NCCLS.** How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline- Second Edition (C28-A2). Vol.20, No.13, 2000.
- 12. LUSINA D., SIFI A., MATHIEU P., ADAM M.-N., LE PENNEC M.-P., GUEROUT T., BALEDENT F. :** Evaluation of high performance liquid chromatography modular system for the diagnosis of haemoglobinopathies. Ann.Bio.Clin.Vol.56,No.6,734-9,Novembre-Décembre1998,Prat.quot.
<http://www.jle.com/en/print/e-docs/00/00/C5/69/article.phtml> (**consulté le 11/06/2009**).
- 13. TAN G.B., AW T.C., DUNSTAN R.A., and LEE S.H.:** Evaluation of high performance liquid chromatography for routine estimation of haemoglobins A₂ and F. Clin.pathol.1993; 46: 852-856.
- 14. FRÉDÉRIC C., CHANGYNIG L., BERNARD F., BÉATRICE G., JACQUES J., FRANÇOISE V:** Evaluation of a Capillary Electrophoresis Method for Routine Determination of Hemoglobins A₂ and F. Clinical Chemistry 45: 2, 237- 243 (1999).
- 15. BAO W., DALFERS ER. , SRINIVASAN SR., WEBBER LS. , BERENSON GS:** Normative distribution of complete blood count from early childhood through adolescence: the Bogalusa Heart Study. Pre Med 1993; 22: 825- 37.

- 16. Institut Régional pour la Santé. Hématologie.** La Riche : ISRA, Département Statistiques et Epidémiologie ; 1991.
- 17. GONZALEZ SILVA M., BERNARD DM., GABEZON I.** Hematologic values and iron levels in a rural student population. *Sangre* 1994; 39: 309-404.
- 18. YIP R., JOHNSON C., DALLMAN PR.** Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. *Am J Clin Nutr* 1984; 39: 427- 36.
- 19. RAKOTO ALSON O, RATSITORAHINA M., PFISTER P., LAGANIER R., DROMIGNY JA.** Estimation des valeurs normales de l'hémogramme à Madagascar. *Arch. Institut Pasteur de Madagascar* 2000; 66 (1& 2): 68-71.
- 20. SAXENA S, WONG ET.** Heterogeneity of common hematologic parameters among racial, ethnic, and gender subgroups. *Arch. Path. Lab. Med.* 1990; 114: 175- 719.
- 21. SHIGA S., KOYANAGI I., KANNAGI R.** Clinical reference values for laboratory hematology tests calculated using the iterative truncation method with correction: Part 1. Reference values for erythrocyte count, hemoglobin quantity, hematocrit and other erythrocyte parameters including MCV, MCH, MCHC and RDW. *Rinsho Byori* 1990; 38: 93- 103.
- 22. MENARD D, MANDENG MJ, TOTHY MB, KELEMBHO EK, GRESENGUET G. and TALARMIN A.** Immunohematological Reference Ranges for Adults from the Central African Republic. *Clin. and Diagn. Lab. Immun.* 2003; 10, No.3: 443-445.
- 23. BASSIMBLIE J, CABANNES R., SANGARE A., TEA D.** Normes hématologiques de l'enfant africain vivant en milieu tropical africain. *Med Afr, noire* 1988, vol.21, n°90, pp. 9-15, 5 pages.

24. KEITA M.N.

Etude de quelques paramètres hématologiques et biochimiques à Donéguébougou : l'expérience d'introduction des bonnes pratiques de laboratoire au MRTC/DEAP/FMPOS. *Thèse de Pharmacie, Bamako, 2003:58-70; 81p.*

25. HINCHLIFFE RF., LILLEYMAN JS: Pratical paediatric haematology, Chichester, John Wiley and Sons, 1987

26. OSKI FA: Normal blood values in the newborn period. In: **FA Oski, JL Naiman.** Hematologic problems in the newborn. Philadelphia, WB Saunders Co, 1982: 1-31

27. ARNAL C. et GIROT R. Drépanocytose chez l'adulte. *Encycl. Méd. chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-006-D-16, 2002,15p.*

28. BARAIKA M. AG

Valeurs de référence érythrocytaires et leucocytaires à la naissance dans le district de Bamako. *Thèse de Pharmacie, Bamako, 2010 :19 & 20 ; 48p.*

29. MOREL P., GUIBOURDENCHE J., and PORQUET D. : Détermination des valeurs de référence de la ferritine sérique en pédiatrie à l'aide de l'automate ACS 180.Immuno-analyse & Biologie Spécialisée. Vol.10, Issue 5, 1995, p.285-290.

30. METAXOTOU- MAVROMATI AD. et al.: Developmental changes in Hemoglobin F levels during the first two years of life in normal and heterozygous beta- thalassemia infants. *Pediatrics, 1982, 69: 734-731.*

WAJMAN H.: Diagnostic et dépistage de la drépanocytose.*Rev. Prat. 2004 ; 54 : 1545.*

RESUME

Du 17 aout au 07 octobre 2009 nous avons conduit une étude prospective chez 41 sujets âgés de 6 mois à 45 ans tous sexes et âges confondus dans le district de Bamako. Elle s'est déroulée au service de pédiatrie de CHU-GT, CHME Luxembourg et à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako. Cette étude avait pour objectif de déterminer les valeurs de référence de la fraction A₂ de l'hémoglobine dans cette population.

L'étude a été autorisée par le comité d'éthique institutionnel de la faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie de Bamako. L'évaluation des paramètres biologiques nécessaires l'étude, a porté sur la détermination des constantes érythrocytaires, du taux des réticulocytes, de la ferritine sérique et des fractions hémoglobiniques. La détermination des fractions hémoglobiniques a été faite par le système Capillarys. La saisie et l'analyse des données ont été faites sur SPSS. Le test de d'ANOVA a été utilisé pour la comparaison des valeurs moyennes, des médianes et les percentiles 2,5 et 97,5 avec un seuil de signification fixé à $p \leq 0,05$.

L'analyse de ces données a montré que les valeurs de l'hémoglobine A₂ sont comprises entre 2,50 et 3,68%. Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative de la fraction A₂ de l'hémoglobine selon l'âge ou le sexe des volontaires soumis à l'étude.

Ces résultats incitent à déterminer systématiquement des valeurs de référence biologiques propres à chaque population dans son contexte géographique.

Mots clés: valeurs, HbA₂, Bamako.

Fiche Signalitique

Nom et prénoms : DEMBELE Bakary Kossa

Email : bakarykossa_dembele@yahoo.fr

Tel : (00223) 79 38 04 00

Année de soutenance : 2011 - 2012

Nationalité : Malienne

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la FMPOS.

Secteur d'intérêt : Hématologie, Hémoglobinopathie.

Résumé

Du 17 aout au 07 octobre 2009 nous avons conduit une étude prospective chez 41 sujets âgés de 6 mois à 45 ans tous sexes et âges confondus dans le district de Bamako. Elle s'est déroulée au service de pédiatrie de CHU-GT, CHME Luxembourg et à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako. Cette étude avait pour objectif de déterminer les valeurs de référence de la fraction A₂ de l'hémoglobine dans cette population.

L'étude a été autorisée par le comité d'éthique institutionnel de faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie de Bamako. L'évaluation des paramètres biologiques nécessaires l'étude, a porté sur la détermination des constantes érythrocytaires, du taux des réticulocytes, de la ferritine sérique et des fractions hémoglobiniques. La détermination des fractions hémoglobiniques a été faite par le système Capillarys. La saisie et l'analyse des données ont été faites sur SPSS. Le test d'ANOVA a été utilisé pour la comparaison des valeurs moyennes, des médianes et les percentiles 2,5 et 97,5 avec un seuil de signification fixé à $P \leq 0,05$.

L'analyse de ces données a montré que les valeurs de l'hémoglobine A₂ sont comprises entre 2,50 et 3,68%. Nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative de la fraction A₂ de l'hémoglobine selon l'âge ou le sexe des volontaires soumis à l'étude.

Ces résultats incitent à déterminer systématiquement des valeurs de référence biologiques propres à chaque population dans son contexte géographique.

Mots clés: valeurs, HbA₂, Bamako.

ANNEXES

Détermination Des types d'hémoglobines Par le Capillarys 2 (Sebia)	1/4
---	------------

Objet : Ce document décrit la procédure d'analyse des échantillons de sang par le Capillarys 2 (Sebia).

Domaine d'application : Biologiste, Pharmacien, ou Médecin, Etudiant en Année de thèse ou Interne de Pharmacie ou de Médecine, Technicien de laboratoire.

Document de référence : Manuel de l'opérateur.

Détermination Des types d'hémoglobines Par le Capillarys 2 (Sebia)	2/4
---	------------

SOMMAIRE

- I- Principe**
- II- Matériels et Réactifs**
- III- Mode opération**
- IV- Préparation de l'échantillon**
- V- Limites et Mesures de sécurités**

Principe

Il consiste à déterminer quantitativement et à séparer les différents types d'hémoglobines dans un champ électrique, en fonction de leur charge et leur mobilité.

Matériels et réactifs

- EDTA ou Citrate, Héparine
- Tampon alcalin
- Solution hémolysante
- Solution de lavage
- Centrifugeuse
- Vortex
- Imprimante ou ordinateur
- Gants
- Coton ou compresse
- Blouses
- Feuille A4 (Rame)

Mode opération

Le système Capillarys utilise le principe de l'électrophorèse capillaire en solution libre. Avec cette technique, les molécules chargées sont séparées dans un champ électrique (haute tension) selon leur mobilité dans un tampon alcalin et selon le flux

Détermination	
Des types d'hémoglobines	3/4
Par le Capillarys 2 (Sebia)	

électroosmotique.

Le système Capillarys possède des capillaires montés en parallèle permettant sept analyses simultanées. L'échantillon est dilué dans la solution hémolysante puis injecté par l'aspiration à l'extrémité anodique du capillaire. Les hémoglobines sont séparées par application d'une haute tension puis détectées directement à 415 nm coté cathodique. Avant chaque test, les capillaires sont lavés avec une solution de lavage puis remplis de tampon pour l'analyse suivante. En tampon alcalin, les hémoglobines normales et anormales (ou variants) sont détectées dans l'ordre suivant, de la cathode vers l'anode : δA^2 (variant A2) , C , A2/O-Arab , E , S , D , G-Philadelphia , F , A , Hope , Bart , J , N-Baltimore et H. A 415nm l'anhydrase carbonique n'est pas visualisée sur le profil électrophorétique, ce qui permet d'identifier les variants de l'hémoglobine A₂ qui migrent dans cette zone.

Préparation de l'échantillon

Laisser sédimenter les globules rouges pendant plusieurs heures (jusqu'à ce que les globules rouges se séparent du plasma et que le plasma devienne limpide (temps optimum : 1 nuit à 2 - 8°C) ou centrifuger l'échantillon de sang à 5 000 tours/min pendant 5 min. Eliminer délicatement le maximum de volume de plasma. Vortexer pendant cinq secondes.

Limites et précautions de sécurités

Les échantillons de sang ont été prélevés exclusivement sur tube **EDTA K2**. Ne pas utiliser d'échantillon de sang contenant plus de plasma résiduel au dessus du

culot de globules rouges car l'analyse en serait affectée. Enlever l'excès de plasma avant l'analyse.

Ne pas utiliser d'échantillon de sang non sédimenté. Seuls les globules rouges ont été analysés.

Eviter les échantillons vieillis (plus de 7 jours), ou stockés improprement ; la présence

Détermination	
Des types d'hémoglobines	4/4
Par le Capillarys 2 (Sebia)	

d'agrégats visqueux ainsi générés pourrait affecter l'hémolyse automatique des échantillons. Les produits de dégradation pouvaient en effet interférer sur le profil électrophorétique.

Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés.

<p style="text-align: center;">Numération cellulaire automatique</p> <p style="text-align: center;">Sur Diana 5 / Xénia</p>	1/10
---	-------------

Objet : Ce document décrit la procédure d'analyse des échantillons de sang par le **DIANA 5 / Xénia**.

Domaine d'application : Biologiste, Pharmacien, ou Médecin, Etudiant en Année de thèse ou Interne de Pharmacie ou de Médecine, Technicien de laboratoire.

Document de référence : Manuel de l'opérateur.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	2/10
--	-------------

SOMMAIRE

I- Principe

II- Calibrateur, Contrôles et Réactifs

III- Mesures de sécurités, Conservation sur le prélèvement, échantillons et réactifs

IV- Mode opératoire

V- Valeurs de référence et limites patient

Principe

DIANA 5 / Xénia compte par impédance le nombre des leucocytes, d'érythrocytes et de thrombocytes.

Calibrateur et Contrôles

- Calibrateur HYCEL-CAL Réf. R2C7020A (2 tubes)
- Contrôle DIANATROL N Réf. R2A7040A (4 N)
- Contrôle DIANATROL AQ Réf. R2A7141A (1B+4N+1H)
- Contrôle DIANATROL AQ Plus Réf. R2A7242A (2B+4N+2H)

Réactifs

- ✓ HEMALYSE 5
- ✓ HEMATON 5
- ✓ HEMACORE

Mesures de sécurités sur le prélèvement, conservation des échantillons et réactifs

L'échantillon de sang veineux a été prélevé sur anticoagulant EDTA K2 ou Na2 (le calibrage du VGM varie de 2-3 % selon l'anti-coagulant). Le rapport d'EDTA K2 au sang total était de 1 à 2 mg par ml de sang. Les échantillons ont été conservés à température ambiante (20 ± 2 °c) et les analyses effectuées dans les douze heures suivant le prélèvement. Les échantillons ont été transportés, et conservés à 2 ° - 8 °c.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	3/10
--	-------------

Les réactifs ont été stockés entre 8°C et 30°C jusqu'à la date de péremption, contrôles et calibrants entre 2°C et 8°C jusqu'à la date de péremption.

Mode opératoire

L'analyseur compte par impédance le nombre des globules blancs, des globules rouges et des plaquettes.

Les cellules en suspension dans un milieu isotonique traversent un orifice où un champ électrique est établi. En passant à travers l'orifice, les cellules provoquent une augmentation d'impédance proportionnelle à leur volume. L'instrument compte le nombre de cellules et les trie en fonction de leur taille, permettant ainsi l'analyse de leur distribution. Le grand nombre de cellules comptées améliore beaucoup l'exactitude de l'appareil en réduisant considérablement le risque d'erreurs statistiques.

L'amélioration des instruments et des réactifs en hématologie a permis de déterminer en routine le nombre des globules rouges, des plaquettes et des globules blancs.

L'introduction de techniques complémentaires comme le centrage hydrodynamique et l'analyse combinée de l'impédance et de la lumière diffusée par les cellules (illuminées par un rayon laser focalisé) permettent l'analyse de 5 populations de leucocytes (lymphocytes, monocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles et éosinophiles).

Pour être utilisés sur l'analyseur, les réactifs ont été présentés avec des caractéristiques bien particulières.

Le diluant a permis une bonne dispersion des éléments figurés du sang afin de réduire le risque causé par le passage simultané de plus d'une cellule dans l'orifice. Lorsque la concentration s'élève, les passages en coïncidence deviennent inévitables. Le procédé de focalisation hydrodynamique qui centre et étire le flux de dilution cellulaire réduit considérablement ce risque sans l'éliminer totalement. L'analyseur dispose d'algorithmes pour corriger automatiquement les résultats.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	4/10
--	-------------

L'analyseur contrôle aussi la fréquence d'acquisition des signaux. Au delà de certaines fréquences, la vitesse d'injection de la préparation cellulaire est réduite automatiquement. Ce procédé breveté étend la linéarité à des niveaux très élevés. La linéarité théorique du comptage de particules est portée à 20 Téra/L et 1,5 Téra/L respectivement pour le canal des GR et celui des GB. Toutefois, compte tenu de la difficulté à se procurer de tels échantillons, les linéarités revendiquées pour le comptage des particules ont été déterminées avec des kits spécialisés disponibles dans le commerce 8,5 Téra/L pour le canal GR et 450 giga/L pour le canal GB.

Le diluant a un effet important sur la mesure du Volume Globulaire Moyen.

De stricts contrôles ont été effectués en production pour maintenir constants l'osmolarité et le pH d'un lot à l'autre. La production des réactifs a été effectuée dans des conditions de contrôles stricts du niveau de poussière en atmosphère filtrée dans des locaux en surpression. La filtration stérilisante 0,22 µm des produits permet d'assurer leur protection contre des contaminations significatives en micro-organismes et en poussières. Des agents conservateurs freinent le développement de germes qui pourraient contaminer les réactifs lors de leur utilisation.

Le comptage des GB nécessite une destruction rapide des GR. L'agent de lyse détruit la membrane des GR, réduisant la plupart du temps le stroma cellulaire à l'état de débris de très petites tailles qui ne sont plus détectables par la méthode de mesure. Cette action lysante a été ralentie pour préserver au mieux la structure nucléaire des globules blancs.

D'autres facteurs ont leur importance pour assurer la qualité des résultats, par exemple une agitation suffisante des échantillons de sang (8 retournements complets doux successifs pour un tube de moins de 5 ml de 75 mm de haut rempli à 75% au plus). Dans le cas où le sang a été sédimenté plus de 4 H, l'agitation a été prolongée.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	5/10
--	-------------

- Comptage des BG, GR et Plt

L'analyseur compte les globules blancs, les globules rouges comme les plaquettes par mesure de l'impédance électrique. Le sang est dilué avec une solution saline isotonique qui maintient la forme des globules et qui conduit le courant électrique. Un volume précis de sang dilué est injecté à travers un orifice de diamètre 75µm dans un cymomètre de flux quantitatif (pour les GR/ Plt comme pour les GB) alors qu'un courant constant est appliqué de part et d'autre de l'orifice.

Lorsqu'une cellule passe à travers un orifice, elle déplace son propre volume de diluant, augmentant ainsi momentanément la résistance au passage du courant électrique. Cette variation temporaire de l'impédance est proportionnelle au volume de diluant déplacé, c'est à-dire au volume de la cellule. L'instrument amplifie les impulsions électriques et les compte pour déterminer le nombre des GB, GR et Plt.

Sur l'histogramme de distribution en taille des plaquettes, on constate parfois que les bases des histogrammes des GR et Plt se recouvrent. Lorsque ce recouvrement est important, il n'est pas possible de déterminer simplement le seuil approprié entre les deux populations et des algorithmes plus sophistiqués sont nécessaires pour distinguer les plaquettes des globules rouges. L'analyseur corrige le résultat des plaquettes. La distribution non corrigée reste représentée en noir dans l'histogramme des plaquettes.

Comme les GR sont généralement 500 à 1000 fois plus nombreux que les GB, il faut détruire les premiers pour pouvoir compter les seconds. C'est pourquoi ces cellules sont analysées sur des préparations différentes :

Les GB sont mesurés sur une dilution hémolysée au 1/251µl. Les GR et Plt sont mesurés sur une dilution au 1/ 6000 réalisée en cascade depuis une prédilution au 1/ 72. Les GB n'interfèrent généralement plus de façon significative sur le comptage des GR à ce taux de dilution.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	6/10
--	-------------

Lorsque la dilution des GR/Plt est terminée, l'agent de lyse est ajouté à une partie de la prédilution afin de détruire la membrane des GR et libérer ainsi leur contenu en hémoglobine.

- Formule leucocytaire

Les sous-populations leucocytaires ont été distinguées les unes des autres par l'analyse du cytogramme que l'on obtient en combinant les informations électriques et optiques appariées cellule par cellule.

Certaines conditions de test (tels que l'échantillonnage, dilution, température de la réaction, mélange réactionnel et durée de la réaction) sont contrôlées par l'analyseur. D'autres conditions, telles que la température ambiante, comme celles des réactifs et des échantillons, la méthode de prélèvement, l'emploi des réactifs appropriés comme une agitation correcte des échantillons juste avant la mesure sont contrôlés par le laboratoire. Il ne faut pas sous-estimer l'importance des facteurs pré-analytiques et d'environnement dans la qualité globale de l'analyse.

La lyse permet l'analyse de 5 populations leucocytaires avec la mesure de quatre sous-populations leucocytaires : lymphocytes, monocytes, granulocytes neutrophiles, éosinophiles et granulocytes basophiles.

Les différentes sous-populations ont été extraites du cytogramme grâce à des techniques d'analyse d'images et à leur interprétation par un logiciel breveté.

- Détermination du taux d'hémoglobine

La détermination du taux d'Hb sur analyseur est une adaptation de la méthode de référence basée sur la transformation de l'Hb en cyanmethémoglobine. Cette méthode a été acceptée en 1966 lors d'un congrès International d'hématologie (publiée en 1967) à la suite des recommandations faites par un comité d'experts formé à ce propos (1964) par le << international Committee for Standardisation in Haematology, ICSH >> La NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) aux Etats-Unis a

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	7/10
--	-------------

publié en février 1984 un premier document << Standard Approved >> intitulé << Reference Procedure for the Quantitative Détermination of Hemoglobin in Blood >> [11]. La dernière édition de ce standard approuvé (H 15- A3) a été publié le 12/01/2000. L'agent de lyse ajouté dans la dilution des GB contient un sel de cyanure à 0,03% qui réagit avec l'hémoglobine libérée des érythrocytes pour être convertie en un composé cyanmethémoglobinique. Son absorbance est lue à 560 nm à travers la chambre des GR. La mesure de la cyanmethémoglobine testée est comparée à celle d'une référence (un blanc réactif) alors que la chambre des GB est remplie de diluant isotonique propre. Une fonction du rapport de ces deux mesures détermine la concentration en hémoglobine. L'instrument affiche et imprime le résultat avec le système d'unités sélectionné dans le laboratoire (en g/dl ou g/l).

- Détermination du VGM et du VMP

Pour diverses raisons, les impulsions des cellules qui passent près des bords de l'orifice sont déformées. Leurs amplitudes peuvent être sur-estimées (jusqu'à 30%), ce qui conduit sur la plupart des analyseurs à des histogrammes de répartition en taille artificiellement déformés sur la droite.

Pour compenser ce phénomène qui perturbe gravement la mesure de l'IDR (Indice Distribution GR), la plupart des analyseurs, même de haute gamme, ne disposant pas de la focalisation hydrodynamique des GR/Plt, tentent de trier les impulsions pour déterminer l'IDR, par exemple en comparant la hauteur de l'impression par rapport à sa surface ou sa durée.

Cet analyseur est équipé d'un dispositif de focalisation hydrodynamique en amont qui aligne et centre les cellules dans l'orifice. Dans ces conditions idéales, les déformations des signaux en fonction de la zone de passage dans l'orifice sont éliminées par principe. La focalisation hydrodynamique ne permettant pas d'éviter complètement les phénomènes de coïncidence, un algorithme réalise automatiquement l'élimination des

<p>Numération cellulaire automatique</p> <p>Sur Diana 5 / Xénia</p>	<p>8/10</p>
---	--------------------

signaux déformés par le phénomène de coïncidence pour construire l'histogramme de distribution selon la taille des cellules. L'histogramme relatif donne une image encore plus exacte de la distribution en volume des cellules.

Les autres paramètres, à savoir : Hématocrite (Hte), Teneur Corpusculaire Moyen en Hémoglobine (TCMH) et Concentration Corpusculaire Moyen en Hémoglobine (CCMH) sont calculés par des formules suivantes.

Hte = VGM x Nbre GR

$$TCMH = \frac{Hb \text{ (g/dl)}}{NbreGR / mm^3}$$

$$CCMH = \frac{Hb \text{ (g/dl)}}{Ht \text{ (%)}}$$

Valeurs de référence et limites patient

L'analyseur compare les résultats mesurés pour chaque patient avec les Références Patients sélectionnés et les valeurs Limites.

Si un résultat excède la Référence Patient correspondante, il apparaît en bleu à l'écran et à l'impression ; un signe (+) ou un signe (-) est ajouté selon qu'il est supérieur ou inférieur à l'intervalle de référence.

S'il est en dehors des Valeurs Limites, le résultat apparaît en rouge à l'écran comme à l'impression ; le paramètre est souligné à l'impression pleine page et demi-page. Un point (!) accompagne le signe (+) ou (-) affiché.

Les valeurs de référence proposées par défaut le sont seulement à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir lui-même les valeurs de Référence Patient et ses Valeurs Limites, et indiquer dans son Manuel d'Assurance Qualité (GBEA- Guide de Bonne Exécution des Analyses) la source de telles valeurs.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	9/10
--	-------------

Lorsqu'un résultat est signalé en Valeur Limite, l'échantillon de sang est analysé une fois de plus pour contrôler son exactitude. Il est aussi comparé à un résultat antécédent, le cas échéant.

- Numération manuelle des réticulocytes

Principe

Il consiste à compter les globules rouges jeunes.

Matériel et réactifs

- Un bain marie à 37°C
- Un tube à hémolyse sec
- Une lame porte objet
- Huile d'immersion
- Vortex-Génie
- Portoirs pour lames
- Le colorant : le bleu de crétyl brillant qui est reçu dans le laboratoire de biologie clinique de la FMPOS sous forme de poudre conservée dans des flacons teintés (25g).
- Gants
- Blouses

Mode opératoire

1. Préparation du Colorant:

A l'aide de la poudre on prépare la solution de bleu de crétyl brillant à 1% dans de l'eau physiologique que l'on filtre.

2. Réalisation des frottis

On fait un mélange à partie égale de sang et de solution de bleu de crétyl brillant à 1%. On agite ce mélange au Vortex-Génie et on incube au bain marie à 37°C pendant 30 mn. Après l'incubation on effectue le frottis mince que l'on sèche à l'air libre.

Numération cellulaire automatique Sur Diana 5 / Xénia	10/10
--	--------------

3. Lecture des frottis :

On observe à l'immersion à l'objectif x100.

La substance réticulo-filamenteuse apparaît colorée en bleu sombre.

Le pourcentage des réticulocytes est obtenu lorsque le décompte atteint 1000 hématies au minimum.

Il se calcule à partir de la formule suivante :

Nombre total de réticulocytes parmi 1000GRX100/Nombre total de GR comptés

Le nombre absolu des réticulocytes est obtenu en multipliant le nombre des globules rouges donné par la numération par le pourcentage des réticulocytes.

Dispositions particulières

- Utiliser pour le frottis une lame dégraissée, prête à l'emploi.
- Après la confection du frottis sécher immédiatement le frottis à l'air pour éviter la réaction cellulaire.

Détermination De la Ferritine sérique Par VIDAS® Ferritin	1/6
--	------------

Objet : Ce document décrit la procédure d'analyse des échantillons de sang par **VIDAS® Ferritin**.

Domaine d'application : Biologiste, Pharmacien, ou Médecin, Etudiant en Année de thèse ou Interne de Pharmacie ou de Médecine, Technicien de laboratoire.

Document de référence : Manuel de l'opérateur.

Sommaire

- I. PRINCIPE**
- II. MATERIEL ET REACTIFS**
- III. PRECAUTIONS D'UTILISATION**
- IV. CONDITIONS DE STOCKAGE DES REACTIFS ET ECHANTILLONS**
- V. MODE OPERATOIRE**
- VI. INTERPRETATION DES RESULTATS**
- VII. LIMITES DU TEST**

Principe

Le principe du dosage associe la méthode immunoenzymatique par sandwich en une étape à une détection finale en fluorescence (ELFA).

Matériel et Réactifs

- Pipette à embout jetable permettant la distribution de 100 µl ;
- Gants non talqués à usage unique ;
- Lunettes ;
- Blouse.
- Immunoglobulines monoclonales de souris anti- Ferritine marquées à la phosphatase alcaline + azoture de sodium ;
- Tampon de lavage 1(phosphate de sodium).
- Tampon de lavage 2 (diéthanolamine).
- Cuvette de lecture avec substrat.

<p>Détermination</p> <p>De la Ferritine sérique</p> <p>Par VIDAS[®] Ferritin</p>	<p>2/6</p>
--	-------------------

Précautions d'utilisations

- Le coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives au produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer ; ne pas inhaler).
- Ne pas utiliser les cônes dont le sachet est percé.
- Ne pas utiliser de cartouches visiblement altérées (feuille aluminium ou plastique endommagé).
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui.
- Ne pas mélanger les réactifs (ou consommables) de lots différents.
- Ne pas utiliser de gants talqués, le talc pouvant entraîner de faux résultats pour certains tests immunoenzymatiques.
- Les réactifs du coffret contiennent un conservateur (azoture de sodium), susceptible de réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre et de former des azotures métalliques explosifs. Il est recommandé de rincer à l'eau tout rejet.
- Le tampon de lavage 2 contient un agent nocif (diéthanolamine 11,5 %), prendre connaissance des risques et des conseils de prudence.
- Le substrat contient un agent irritant, prendre connaissance du risque et des conseils de prudence.

Conditions de stockage des réactifs

- Conserver le coffret VIDAS FER à 2 - 8 °c.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Laisser à 2 – 8°c les réactifs non utilisés.

<p>Détermination</p> <p>De la Ferritine sérique</p> <p>Par VIDAS[®] Ferritin</p>	<p>3/6</p>
--	-------------------

- A l'ouverture du coffret, vérifier l'intégrité et la bonne fermeture du (des) sachet(s) de cônes ; dans le cas contraire, ne pas utiliser les cônes.
- Après chaque utilisation, bien refermer le sachet avec son déshydratant pour maintenir la stabilité des cônes et replacer la totalité du coffret à 2 – 8°C.
- Tous les composants sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette étui, lorsqu'ils sont conservés dans les conditions préconisées.

Echantillons

1. Nature et prélèvement des échantillons

Sérum ou plasma (héparinate de lithium ou EDTAK2).

Il est préconisé à chaque laboratoire de valider le type de tube de prélèvement utilisé.

L'utilisation de sérums inactivés par la chaleur n'a pas été validée.

Il n'a pas été observé pour ce dosage d'influence significative :

- de l'hémolyse (après surcharge d'échantillons en hémoglobine de 0 à 300 µml/L) ;
- de la lipémie (après surcharge d'échantillons en lipides de 0 à 2 g/L d'équivalents triglycérides) ;
- de la bilirubinémie (après surcharge d'échantillons en bilirubine de 0 à 513 µmol/ L) ;

Il est néanmoins conseillé de ne pas utiliser d'échantillons visiblement hémolysés, lipémiques ou ictériques et d'effectuer si possible un nouveau prélèvement.

2. Stabilité des échantillons

Les échantillons peuvent être stockés 7 jours à 2 – 8 °c au maximum ; au delà, les congeler à -25° ± 6 c. Ce délai n'a pas été dépassé pour nos cas.

Eviter les congélations et décongélations successives.

Mode opératoire

1. Saisie des données de la carte MLE

Détermination De la Ferritine sérique Par VIDAS® Ferritin	4/6
--	------------

A l'ouverture d'un nouveau lot, les spécifications (ou données usine) ont été entrées dans l'instrument (VIDAS ou mini VIDAS) à l'aide de la carte MLE (fiche de spécifications) incluse dans chaque coffret. Si cette opération n'était pas effectuée avant de commencer les tests, l'instrument ne pourrait pas éditer de résultats. Ces spécifications ne sont entrées qu'une seule fois pour chaque lot.

Il est possible de saisir les spécifications manuellement ou de façon automatique grâce à la carte MLE.

1. Calibration

La calibration, à l'aide d'un calibrateur fourni dans le coffret, doit être effectuée à l'ouverture de chaque nouveau lot après entrée des spécifications du lot puis tous les 14 jours. Cette opération permet d'ajuster la calibration à chaque instrument et à l'évolution éventuelle du réactif dans le temps.

Le calibrateur, a été analysé en double (voir manuel d'utilisation). La valeur du calibrateur était comprise dans les limites de RFV ("Relative Fluorescence Value") fixées. Si ce n'est pas le cas : faire une calibration.

2. Contrôle de qualité

Un contrôle est inclus dans chaque coffret VIDAS FER.

Ce nouveau doit être utilisé à l'ouverture de nouveau coffret afin de vérifier l'absence d'altération des réactifs. Chaque calibration a été également vérifiée à l'aide de ce contrôle. Pour que l'instrument puisse vérifier la valeur du contrôle, il faut l'identifier par "C1".

Si la valeur du contrôle s'écarte des valeurs attendues, les résultats ne peuvent être validés.

Détermination De la Ferritine sérique Par VIDAS[®] Ferritin	5/6
---	------------

4. Réalisation du test

- Sortir uniquement les réactifs nécessaires, les laisser 30 minutes à température ambiante avant utilisation.
- Utiliser une cartouche “FER” et un cône “FER” pour chaque échantillon, contrôle ou calibrateur à tester. Vérifier que le sachet de cônes a bien été refermé après chaque utilisation.
- Taper ou sélectionner “FER ”sur l’instrument pour entrer le code du test. Le calibrateur identifié obligatoirement par “S”, doit être utilisé en double. Si le contrôle doit être testé, il sera identifié par “C1”.
- Homogénéiser à l’aide d’un agitateur de type vortex le calibrateur, le contrôle et les échantillons.
- Distribuer 100µl de calibrateur, d’échantillon ou de contrôle dans le puits échantillon.
- Placer dans l’instrument les cônes et les cartouches. Bien vérifier la concordance des codes (couleurs et lettres) entre le cône et la cartouche.
- Démarrer l’analyse (voir Manuel d’utilisation). Toutes les étapes sont alors gérées automatiquement par l’instrument. Les résultats sont obtenus en 30 minutes environ.
- A la fin de l’analyse, retirer les cônes et les cartouches de l’instrument.
- Eliminer les cônes et cartouches utilisés dans un récipient approprié.

Interprétation

Dès le test terminé, les résultats sont analysés automatiquement par le système informatique. L’instrument effectue deux mesures de fluorescence dans la cuvette de lecture pour chacun des tests. La première lecture prend en compte le bruit de fond dû à la cuvette substrat avant mise en contact du substrat avec le cône. La seconde lecture est effectuée après incubation du substrat avec l’enzyme présente dans le cône. Le calcul de

<p>Détermination</p> <p>De la Ferritine sérique</p> <p>Par VIDAS® Ferritin</p>	<p>6/6</p>
---	-------------------

la RFV (Relative Fluorescence Value) est le résultat de la différence des deux mesures. Il apparait sur la feuille de résultats.

Les résultats sont calculés automatiquement par l'instrument par rapport à une couche de calibration mémorisée (modèle mathématique : << modèle logistique à 4 paramètres>>) et sont exprimés en ng/ml (préparation NIBSC 80/578).

Les échantillons présentant des concentrations en ferritine supérieures à 1 200 ng/ml doivent être redosés après dilution au 1/ 10 voire au 1/100 dans le tampon de dilution FER(R1).

Si le facteur de dilution n'a pas été saisi lors de la création de la liste de travail (voir Manuel d'utilisation), multiplier le résultat par le facteur de dilution pour avoir la concentration de l'échantillon.

L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

Limite du test

Une interférence peut être rencontrée avec certains sérums contenant des anticorps dirigés contre des composants du réactif, c'est pourquoi les résultats de ce test doivent être interprétés en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.