

Automatisation des techniques de quantification: de nouveaux outils pour conclure sur la nature passive ou immune des anti-D circulants

Dr Cécile TOLY-NDOUR – Dr Jenny BEAUD
Service d'hémobiologie fœtale et périnatale

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale
LBM des HU de l'Est Parisien – DMU BioGeMH
Hôpital Saint-Antoine – AP-HP Sorbonne Université – Paris

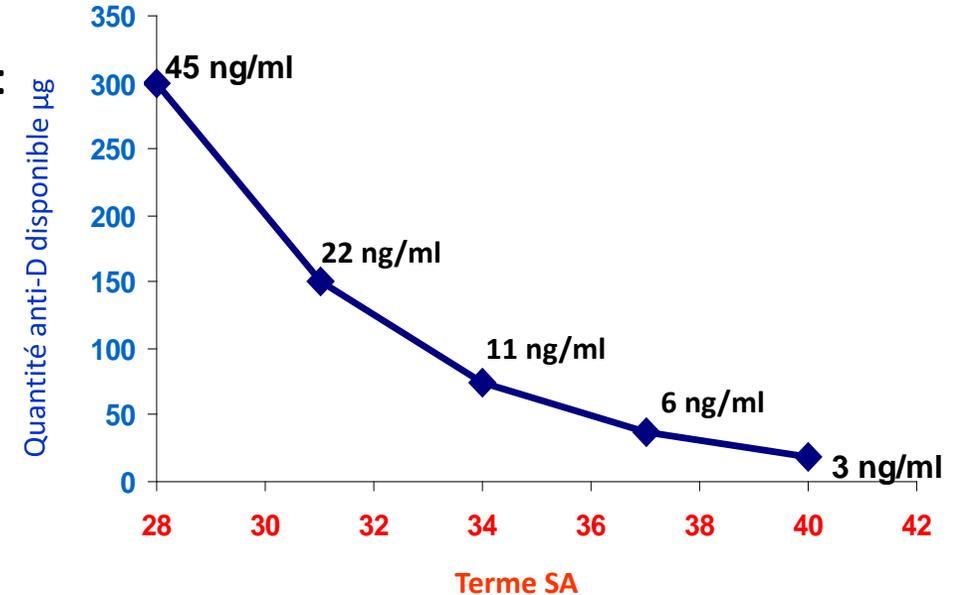


4^{ème} Journée « Yves Brossard »
d'hémobiologie fœtale et néonatale
Vendredi 24 janvier 2025

Prophylaxie Rh antenatale et positivité de la RAI pendant la grossesse

➤ Immunoprophylaxie systématique à 28 SA (Rhophylac 300) : positivité de la RAI avec un anti-D pendant tout le 3^{ème} trimestre de la grossesse.

➤ Immunoprophylaxie antenatale ciblée: positivation de la RAI avec un anti-D pendant les 2 à 3 mois qui suivent une injection de Rhophylac 200.

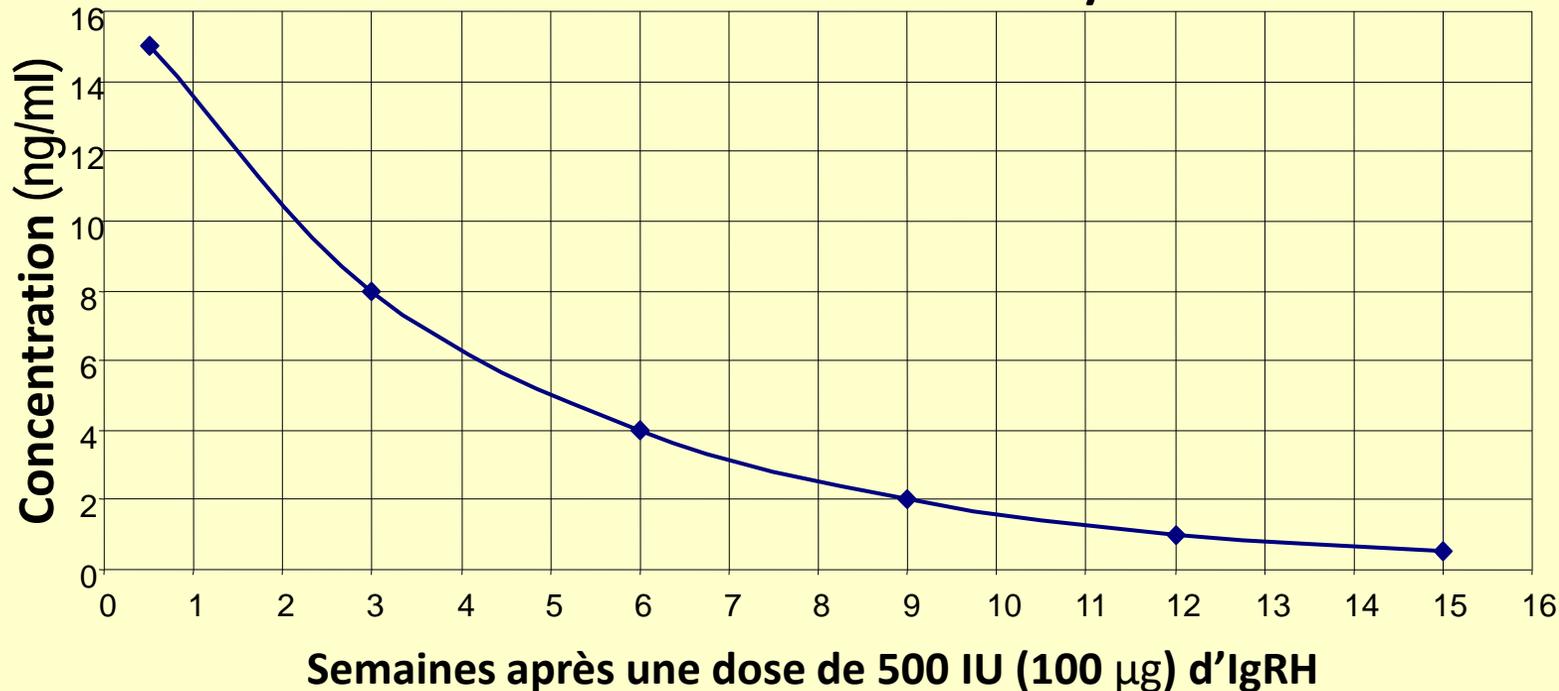


➤ **Malgré l'immunoprophylaxie des patientes peuvent s'allo-immuniser** (injection trop tardive par rapport à l'événement sensibilisant, hémorragie fœto-maternelle chronique de faible volume consommant les IgRH injectées au 3^{ème} trimestre, HFM aigue de volume important mais cliniquement silencieuse et non couverte par la concentration en IgRH circulantes...)

➤ **Comment s'assurer que l'anti-D identifié à la RAI est bien de nature passive et non immune ?**

Approche quantitative basée sur la pharmacocinétique des Immunoglobulines anti-D après injection

Evolution de la concentration théorique en anti-D (ng/ml) (voie IV)
= nombre de doses $\times 15/e^{0,03 t}$



- **Approche indispensable pour les laboratoires** effectuant des identifications d'anticorps chez la femme enceinte.
- **Renseignements des dates et doses d'injection indispensables** sur la demande pour permettre au biologiste de conclure.

Concentration théorique en anti-D après administration d'IgRh

Délai après l'injection	Concentration après administration de 1000 UI (200µg) d'anti-D (voie IV)	Concentration après administration de 1500 UI (300µg) d'anti-D (voie IV)
48h	30 ng/ml (0,15 UI/ml)	45 ng/ml (0,23 UI/ml)
1 semaine	24 ng/ml (0,12 UI/ml)	36 ng/ml (0,18 UI/ml)
3 semaines	15 ng/ml (0,08 UI/ml)	22,5 ng/ml (0,11 UI/ml)
6 semaines	7,6 ng/ml (0,04 UI/ml)	11,4 ng/ml (0,06 UI/ml)
9 semaines	3,8 ng/ml (0,02 UI/ml)	5,7 ng/ml (0,03 UI/ml)
12 semaines	1,8 ng/ml (0,01 UI/ml)	2,7 ng/ml (0,015 UI/ml)
15 semaines	0,9 ng/ml (0,005 UI/ml)	1,35 ng/ml (0,007 UI/ml)

Sensibilité du test indirect à l'antiglobuline (RAI) utilisé au CNRHP

(carte gel Bio-Rad / hématies des panels UPR))

→ seuil de positivité approximatif sur hématies tests natives

→ seuil de positivité approximatif sur hématies tests papainées

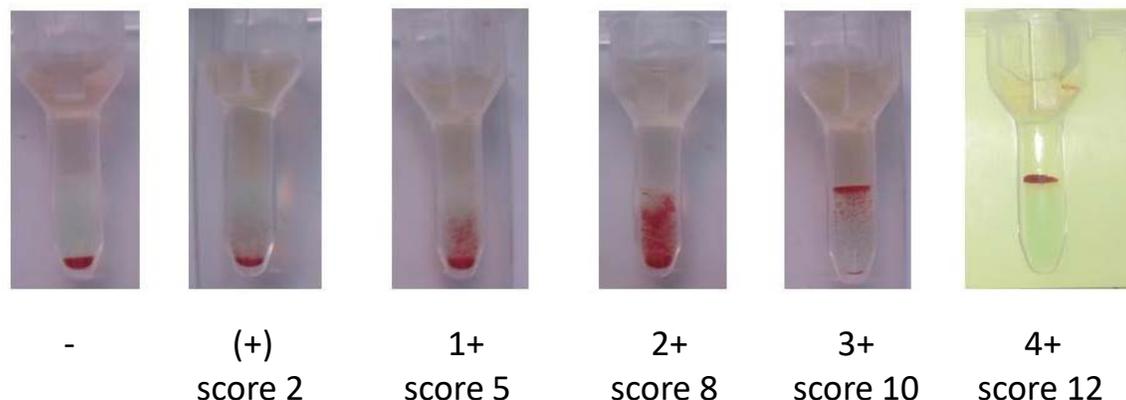
- **Approche quantitative importante dès le stade de l'identification des anticorps (RAI) en fonction du seuil de positivité des techniques et de l'intensité des réactions d'agglutination observées dans chaque puits positif**

L'approche quantitative est possible quelle que soit la méthode utilisée pour l'identification des anticorps (échelle de cotation de l'intensité des réactions d'hémagglutination)

Plaques Capture R® (Werfen)

- 4+  Score 90.0 à 99.9 → 4+
- 3+  de 65.0 to à.9 → 3+
- 2+  de 45.0 à 64.9 → 2+
- 1+  de 30.0 à 44.9 → 1+
- Indéterminé  de 20.0 à 29.9 → Indéterminé
- 0  de 0 à 19.9 → 0

Techniques en colonnes filtration: gel ou microbilles avec anti-globuline (Quidel Ortho, Bio-Rad, Grifols ...)



Plaques E.M.® Technology : hématies magnétisées (Diagast)

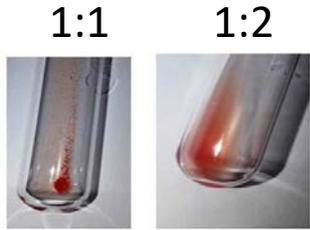


→ A chaque laboratoire de définir dans la technique qu'il utilise les seuils de positivité et les intensités des réactions attendues en fonction de la date et de la dose d'IgRh injectées

→ La réalisation supplémentaire d'un test de quantification permet d'avoir des données plus précises et de limiter les erreurs / elle est obligatoire en l'absence de notion d'injection d'IgRH ou en cas de forte réactivité de l'anticorps

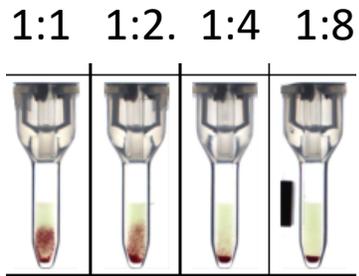
Tests de quantification des anti-D

Titration de l'anti-D en test indirect à l'antiglobuline en tube (milieu salin - hématies natives)



Technique non adaptée pour les anti-D faibles (= dans les concentrations des anticorps passifs) car non discriminante : titre très souvent <1

Titration de l'anti-D par test indirect à l'antiglobuline en méthode colonne-filtration (milieu BFI – hématies natives)



Technique un peu plus sensible que le titrage tube pour les anti-D faibles

Apport supplémentaire du score ($4+ = 12$, $3+ = 10$, $2+ = 8$, $1+ = 5$; $(+) = 2$)

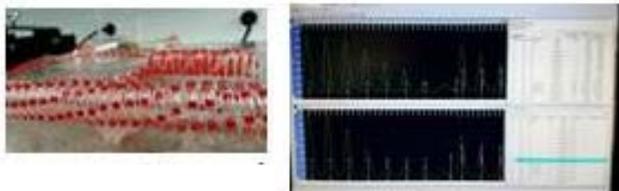
Peu précis. Nécessite souvent un suivi cinétique (réitération du test 2 à 3 semaines plus tard: si titre/score diminue : anticorps passifs, si stable ou augmente: probable immunisation anti-D associée)

Intérêt : peut être automatisé.

Développement accéléré en France depuis la parution de l'arrêté IH de 2018

Score 8 8 2 = 18 / titre 4

Quantification de l'anti-D par hémagglutination en flux continu (dosage pondéral) utilisant des hématies bromélinées et l'étalon international anti-D de l'OMS

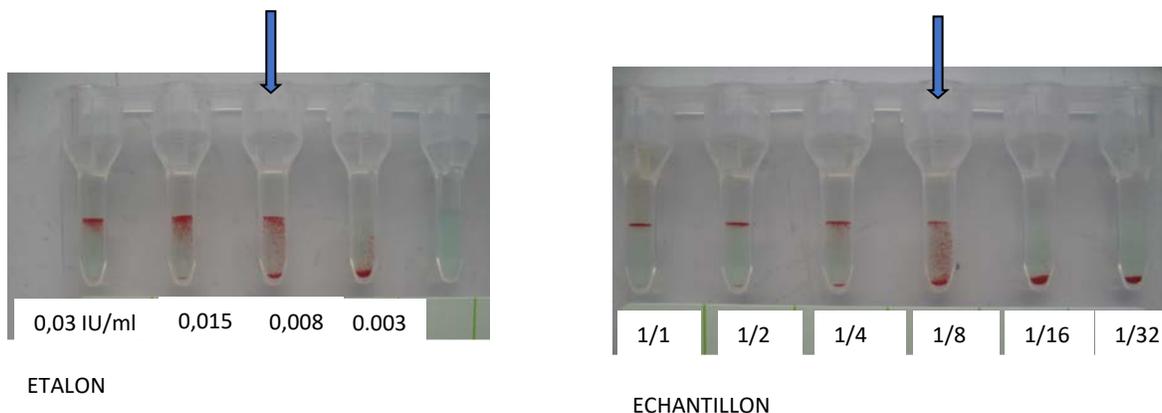


Utile pour des anti-D qui réagissent assez fortement et dont l'approche quantitative est difficile à la RAI/IAI (perte de linéarité)

Peu intéressante pour des anti-D qui réagissent faiblement (mauvaise précision si concentration $<$ à 24 ng/ml)

Détermination de la concentration en anti-D

Microtitrage anti-D (test indirect à l'antiglobuline en gel, milieu BFI) utilisant des hématies D+ papainées et un étalon anti-D polyclonal (fabriqué à partir de Rhophylac et raccordé à l'étalon international anti-D par dosage pondéral)

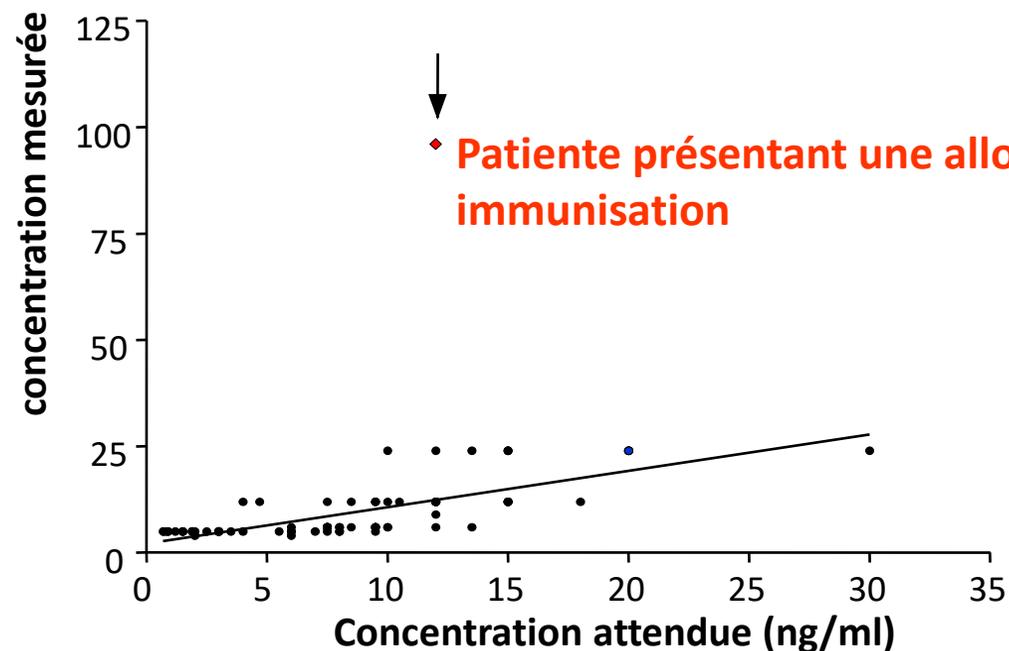


Anti-D concentration = $\frac{\text{Inverse de la dilution de la dernière réaction positive de l'échantillon}}{\text{Concentration de l'étalon dans le puit présentant la même réactivité}}$ X

Brossard Y Feuillet de Biologie 2002

$$8 \times 0,008 = 0.06 \text{ UI/ml} = 12 \text{ ng/ml}$$

Comparaison concentration trouvée avec valeur attendue. Technique la plus précise pour déterminer immédiatement la nature passive ou immune d'un anti-D faible identifié.



Difficulté: demande de disposer d'un étalon anti-D raccordé à l'étalon international

Intérêt: peut aussi être automatisée (étapes de dilutions et distribution automatisée depuis 2007 sur le TECAN au CNRHP)

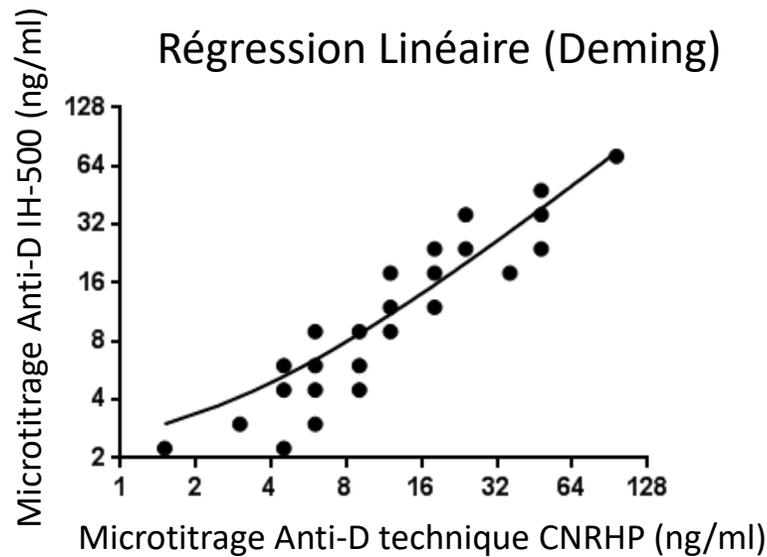
Développement démarré depuis 2018 sur certains automates d'IH des fournisseurs en France qui ont développé le titrage

Technique de microtitrage sur automate IH-500 (Bio-Rad)

Développement d'un étalon par Bio-Rad (Anti-D Reference = mélange de 2 Ac monoclonaux anti-D)

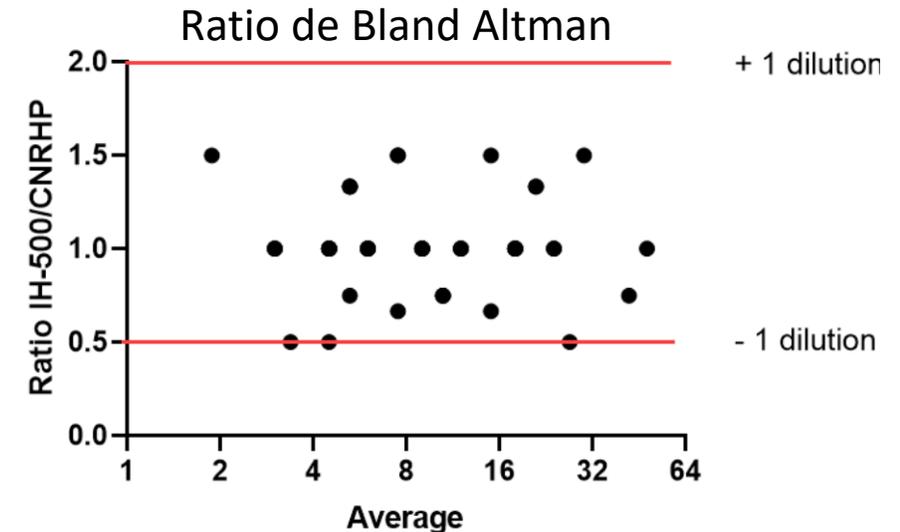
Adaptation du test développé par Bio-Rad pour le titrage des anticorps sur IH-500 à un test de microtitrage sur hématies D+ papainées en carte gel (protocole calqué sur celui décrit par Y Brossard en 2002)

Evaluation du test au CNRHP en 2018-2019 (Dr S HUGUET-JACQUOT et J BEAUD) → 50 échantillons



Droite de Deming : $Y=0.8864*X + 0.7848$; $p<0.0001$

→ très bonne corrélation entre les 2 techniques



Max 1 dilution d'écart entre les résultats obtenus avec les 2 techniques

→ pas de biais majeur entre les 2 méthodes

- Technique utilisée en routine par plusieurs laboratoires en France depuis son lancement en 2020/21.
- Résultats corrects des laboratoires utilisant cette technique aux EEQ microtitrage Asqualab.
- La lecture (comparaison des gels patients avec l'étalon pour déterminer la concentration) reste « manuelle » par l'opérateur. Développement d'un algorithme de calcul dans le logiciel en cours (évaluation au CNRHP – Dr J Beaud)

Adaptation de la technique de microtitrage sur Neo IRIS (Werfen)

Evaluation au CNRHP en 2023 (Dr C TOLY-NDOUR / Véronique ZERR / Annick MONTILLET) d'une technique adaptée à partir de la technique de titrage sur IRIS:

Comparaison des titrages - scores /99 de 36 échantillons avec le titrage-score /99 de l'étalon polyclonal anti-D à 24 ng/ml du CNRHP passé dans la même série → détermination de la valeur du microtitrage IRIS des échantillons (règle de 3).

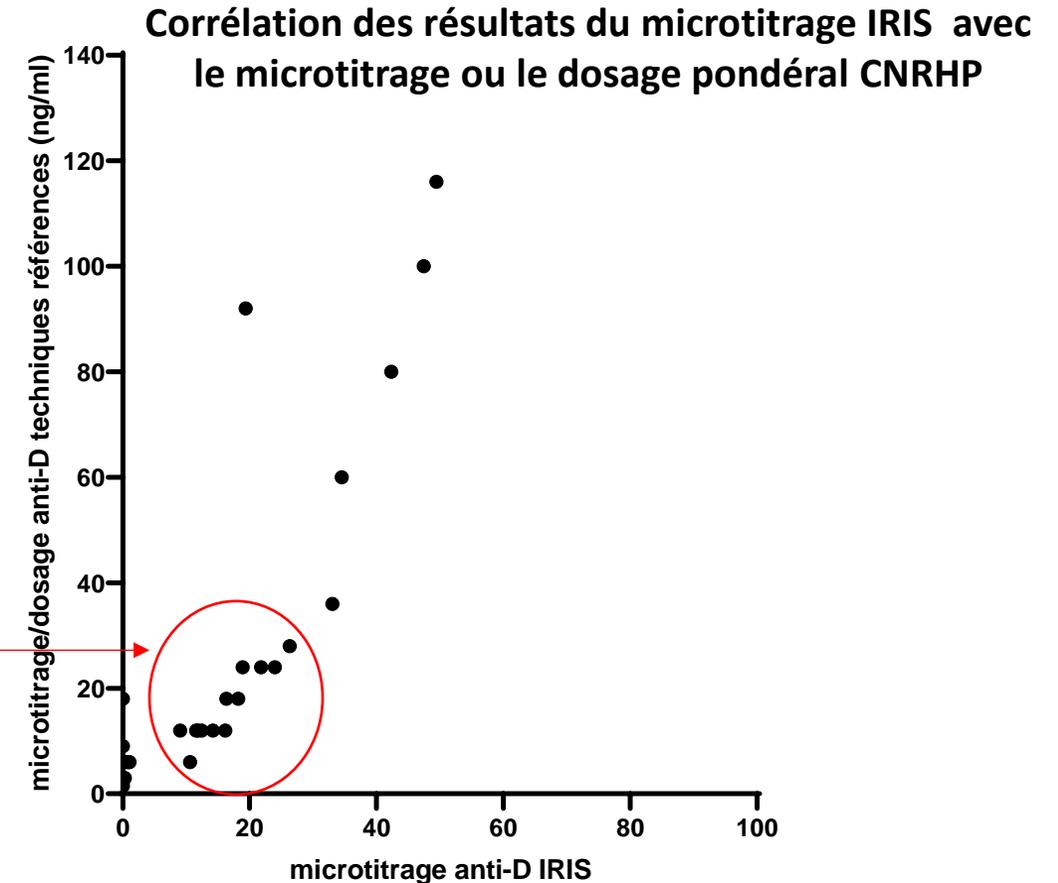
Exemple:

n°ech	puits 1/2	puits 1/4	puits 1/8	puits 1/16	microtitrage gel
6U	99	99	49,6	0	24
3U	80,8	66,9	0	0	12
0.5U	0	0	0	0	2,25
1	86,3	77,2	2,5	0	12
2	11,2	0	0	0	6
3	0	0	0	0	3
4	99	89,5	2,1	0	18
5	0	0	0	0	3
6	0	0	0	0	2,25

score 99 neo	rapport score 99 ech/ 6U	microtitrage rapport99 *24
248	1,00	24,00
147	0,59	14,23
0	0,00	0,00
167	0,67	16,16
11	0,04	1,06
0	0,00	0,00
188	0,76	18,19
0	0,00	0,00
0	0,00	0,00

Zone de concordance entre la technique sur IRIS et les techniques de références : entre 12 et 36 ng/ml.

Développements et études supplémentaires nécessaires.



test de Spearman $p < 0.0001$, $r = 0.9097$ [IC 0,8202 - 0,9557]).

Technique de microtitrage sur Vision MAX (Quidel Ortho)

Evaluation en 2024 avec l'étalon anti-D polyclonal du CNRHP (Dr C TOLY NDOUR / Mathieu REGOUBY / Christelle MARION) : 1ers tests encourageants sur hématies natives – à poursuivre sur plus d'échantillons

Autres automates ?

Laboratoire du CNRHP ouvert à l'évaluation de toutes techniques de quantification automatisées en développement

Développement d'un étalon anti-D polyclonal (Institut de Biotechnologie Jacques Boy)

Permettra la commercialisation à grande échelle d'un étalon polyclonal anti-D raccordé à l'étalon international pour les différentes techniques automatisées.

Actuellement préparation maison des étalons polyclonaux par les laboratoires, à partir de Rhophylac ou de l'étalon international, envoi des lots pour dosage au CNRHP avant utilisation (gestion de lots pouvant être assez lourde pour les laboratoires effectuant des microtitrages)

Conclusion

- Des **développements pour l'automatisation** du microtitrage anti-D (quasi) **aboutis ou en cours** pour plusieurs fournisseurs d'automate d'immuno-hématologie
- **Permet de généraliser le microtitrage anti-D**, qui est un vraie aide pour les biologistes pour conclure rapidement sur la nature des anti-D identifiés chez les femmes enceintes (si renseignements des dates et doses d'injection bien communiquées en amont)
- **Limitera les cas résiduels de mauvaise prise en charge de grossesses** pour lesquelles la présence d'une immunisation anti-D n'est pas détectée, ou est détectée trop tardivement à **cause d'une erreur de conclusion du laboratoire sur la nature de l'anti-D identifié** (suivi inadapté avec conséquences possible sur la morbidité pour le foetus/nouveau-né (cf rapports du SHOT (UK), étude du groupe de travail de la SFTS (France)).

Remerciements

DMU BioGeM (Pr R. LEVY)

LBM EST PARISIEN (Dr M. VAUBOURDOLLE)

Service d'hémobiologie fœtale et périnatale – CNRHP (Dr A. MAILLOUX)

Techniciens / réceptionnistes / secrétaires / ingénieurs /cadre

Equipe des Biologistes : Dr J. BABINET, Dr J. BEAUD, Dr S. HUGUET-JACQUOT, Dr F. KHETTAB, Dr E. MAENULEIN, Dr R. PETERMANN , Dr C. TOLY-NDOUR,

LBU Saint-Antoine : Techniciens et Biologistes

SERVICE DE MEDECINE FŒTALE (Pr J-M. JOUANNIC)

UF clinique du CNRHP (Pr J-M. JOUANNIC)

Permanence médicale du CNRHP

Infirmières

Pédiatres : Dr M-G. GUILLEMIN, Dr N. ABED, Dr B. CARPENTIER, Dr J. WIRTH, Dr A. POTIER

Obstétriciens : Dr P. MAURICE, Dr L. GUILBAUD, Dr F. DHOMBRES, Dr L. FRANCHINARD

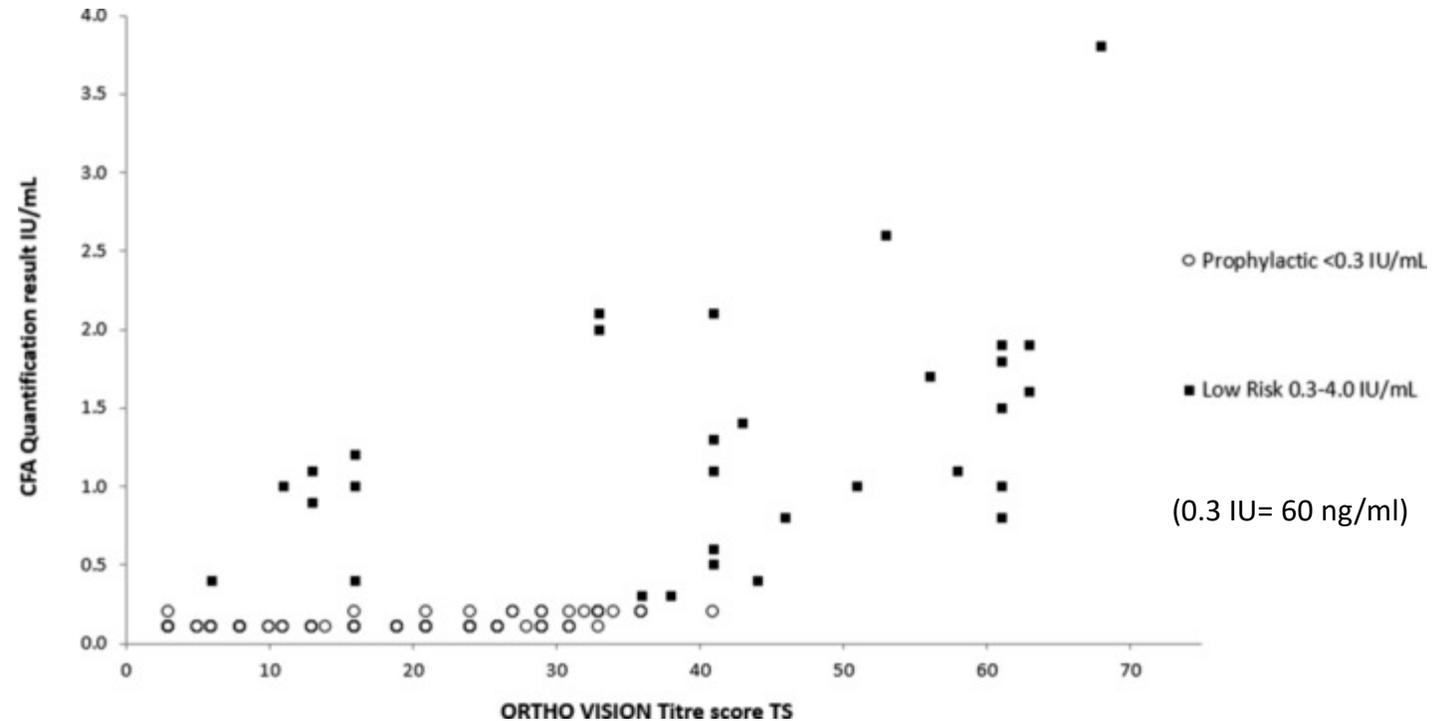
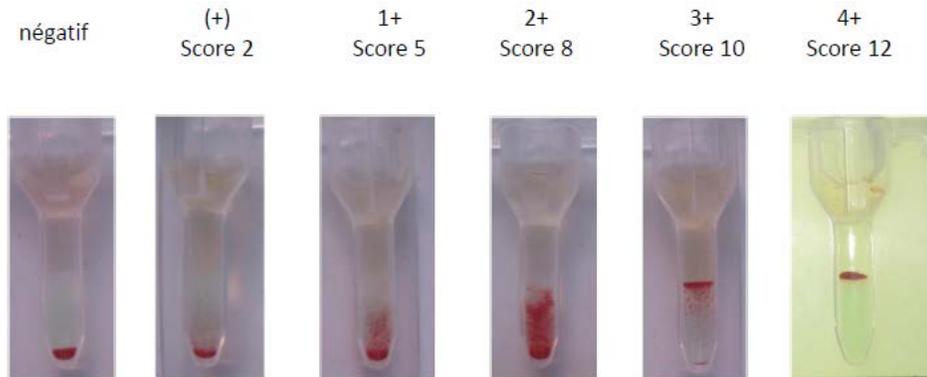
SF coordinateur : B. LAFON, I. REGNIER

Utilisation du titrage - score sur Vision MAX (Quidel Ortho)

Etude publiée:

Transfus Med 2020 Evans ML et al.

Approche anglo-saxonne



5 laboratoires au Royaume Uni: technique de titrage sur cassette ORTHO. 196 échantillon anti-D (128 passifs et 68 immuns). Détermination d'un titre-score seuil à 35 pour distinguer les anti-D passif de les anti-D immun (suivi cinétique si doute en fonction date de l'injection / envois en dosage pondéral si valeur supérieure).