

Performance de la méthode de titrage automatisée des anticorps anti-érythrocytaires en technique plaque immuno-capture sur automate IRIS (Immucor®)

Cécile TOLY-NDOUR¹, Hélène DELABY¹, Stéphanie HUGUET-JACQUOT¹, Jenny BEAUD¹, Jérôme BABINET¹, Véronique ZERR¹, Annick MONTILLET¹, Agnès MAILLOUX¹

¹Service d'hématologie fœtale et périnatale, Centre National de Référence en Hématologie Périnatale, Hôpital Saint-Antoine, Paris

L'arrêté IH du 15 mai 2018 ouvre la voie à l'utilisation d'autres techniques de titrage d'anticorps que la technique tube, qui peuvent être automatisées. Nous avons évalué les performances de la méthode de titrage en plaque immuno-capture sur l'automate IRIS (Immucor®). Une comparaison avec la méthode de titrage en tube a également été réalisée.

Méthode de titrage en plaque immuno-capture sur IRIS



Dilutions automatisées de raison 2 du plasma/sérum des patientes (de la dilution 1/2 à 1/256) en LISS.

Distribution des dilutions dans la microplaquette dont les puits sont recouverts de membranes d'hématies exprimant l'antigène correspondant (voir phénotypes ci-dessous). Incubation. Lavage. Ajout d'hématies révélatrices recouvertes d'anticorps anti-IgG (antiglobuline). Centrifugation.

Lecture de la réaction par la caméra de l'automate



Phénotypes des hématies-tests utilisées:
Titrage anti-D: K+K- (Panoscreen Extend I)
Titrage anti-E: D- C- E- C+ (Panoscreen Extend II)
Titrage anti-K: K+ (Panoscreen Extend III)
Titrage anti-M: M+ N- (Panoscreen I.II ou III selon lot)

Dilutions de l'échantillon: du 1/2 au 1/256

Durée analyse: 1 plaque (11 patients + 1 contrôle): 87 min.
Prise d'essai / volume d'échantillon requis: 50µl / 500 µl

Exemple de résultats :

Sample ID	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	Title	Score	Flags
24435194100139907									Positive	44	
245351250139613									Negative	—	
18104484	0.00	0.00	0.00	0.00	4.10	0.00	0.00	0.00	>2 negative	—	
18104485	0.00	0.00	0.00	0.00	4.10	0.00	0.00	0.00	>2 positive	—	
18104491	0.00	0.00	0.00	0.00	4.10	0.00	0.00	0.00	>2 negative	—	
18104492	99.0	99.0	99.0	99.0	10.15	0.00	0.00	0.00	>2 positive	4420	
17710100	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	4.30	0.00	0.00	>2 negative	—	
18102558	1.00	0.00	0.00	1.20	0.00	0.00	0.00	0.00	>2 negative	—	
18102487	98.7	99.0	99.0	99.0	96.0	99.0	95.5	73.1	>256	44444441	
18103730	0.00	0.00	0.00	0.00	1.20	4.90	0.00	0.00	>2 negative	—	
17710205	23.2	13.7	0.00	0.00	0.00	1.70	0.00	0.00	2	—	
19100291	99.0	99.0	99.0	99.0	92.0	77.0	13.0	0.00	32	44444444	
18102302	26.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	—	—	
18102322	11.7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	>2 negative	—	

Pour chaque puits:

- calcul automatique d'une valeur /99 selon l'intensité de la réaction (caméra embarquée sur l'automate). Seuil de positivité = 20 → calcul automatique du titre (inverse de la dernière dilution positive) + calcul manuel du « score 99 » en additionnant les valeurs des puits positifs.
- calcul automatique d'un « Pattern » = intensité de la réaction ramenée à une échelle /4 comme en tube ou en gel → calcul manuel d'un « score pattern » (cf score de Marsh)

Méthode de titrage en tube utilisée au CNRHP

Dilutions automatisées de raison 2 des échantillons (Tecan Freedom Clinical Base)

(dilution de départ: 100 µl d'échantillon + 100 µl de NaCl 0,9%)

Titrages anti-D, anti-c et anti-E: Hématies test provenant d'un CGR phénotypé RH1,2,3,4,5 (D+e+C+e+e+) datant de moins de 15 jours. Titrages anti-K: hématie K+k+ panel CNGRS.

Titrages anti-M: pool de 3 hématies M+N- du panel CNGRS

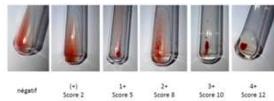
Concentration de la suspension d'hématies test: 4% dans du NaCl 0,9%

Incubation de 50 µl d'hématies tests + 100 µl de la dilution de l'échantillon à 37 +/- 2 ° C pendant 60 +/- 15 min

3 lavages

Ajout à température ambiante (22 +/- 3° C) de l'antiglobuline (anti-IgG) (Diagast AGH Maestria IgG) diluée au 1/3.

Centrifugation et observation macroscopique des agglutinats : lecture en point final (+) par l'opérateur (titrage réalisé en double en l'absence de sérothèque) et calcul manuel du score de Marsh global en additionnant les scores de chaque dilution positive selon l'abaque ci-dessous.



Résultats: Un contrôle de qualité interne anti-D (RH1) maison (CQI), préparé et calibré par rapport à l'étoile international 16/332 a été utilisé pour déterminer les performances de répétabilité et de reproductibilité des différentes méthodes, pour les résultats du titre et du score. Les coefficients de variation (CV) obtenus sur l'automate IRIS sont proches de 5%, soit meilleurs que ceux établis pour la méthode de titrage tube manuelle (10-15%).

Figure 1: Performance de répétabilité et de reproductibilité de différentes méthodes de titrage

Valeurs cibles du CQI en tube : titre 32, score 30
En gél: titre 512, score 90
En immuno-capture: titre > 256

Les coefficients de variation (CV) pour les titres ont été calculés à partir des rangs de dilutions selon la correspondance suivante titre 2 = rang de dilution 1, titre 4 = rang de dilution 2, titre 8 = rang de dilution 3, titre 16 = rang de dilution 4, titre 32 = rang de dilutions 5, titre 64 = rang de dilution 6, titre 128 = rang de dilution 7, titre 256 = rang de dilution 8, titre 512 = rang de dilution 9, titre 1024 = rang de dilution 10, titre 2048 = rang de dilution 11

Méthode de titrage	Répétabilité CQI titrage				Reproductibilité CQI titrage			
	N=	Moyenne du titre	Titre* (CV %)	Score* (CV %)	N=	Titre* (CV %)	Score* (CV %)	
Tube dilution manuelle	19	32	9,2	11,5	29	10,3	20,9	
Tube Dilution automatisée	26	32	0	6,1	30	3,7	6,4	
Gel Dilution manuelle	19	512	6,3	6,4	8	10,1	7,9	
Gel Dilution automatisée	20	512	0	1,25	9	0	1,9	
Immuno-capture: technique automatisée	7	> 256	9**	4	5	9**	5	

* Calcul en fonction des rangs de dilutions

** Du fait d'une valeur maximale de 256 en technique immuno-capture, la valeur du CV du titre n'est qu'approximative

Le nombre de valeurs est faible et la valeur du CQI non optimum car souvent > 256. Une confirmation sur un plus grand nombre de valeurs et avec d'autres niveaux de CQI est en cours

76 échantillons de patientes ont été sélectionnés et testés sur une période d'évaluation de deux mois, en fonction de la spécificité des anticorps et du titre trouvé en tube, afin de couvrir une étendue de mesure la plus large possible. Les résultats obtenus en technique tube semi-automatisée au CNRHP et immuno-capture sur IRIS ont été comparés.

Spécificité de l'anticorps	n (total)	n avec titre inférieur en plaque	n avec titre égal en plaque	n avec titre supérieur en plaque	moyenne des différences de titre (plaque/tube (en nombre de dilutions))	écart-types des différences de titre (plaque/tube (en nombre de dilutions))
anti-D	37	0	4	33	2,32	1,27
anti-c	10	3	3	4	0,5	1,35
anti-E	10	1	2	8	1,4	1,35
anti-K	10	2	4	4	0,3	0,95
anti-M	10	9	1	0	-2,2	1,14

Figure 2: Comparaison des résultats de titres obtenus sur les 76 échantillons testés en technique tube semi-automatisée au CNRHP et en technique immuno-capture sur IRIS

Pour l'anti-D (n=37) et l'anti-E (n=10), les titres étaient en moyenne respectivement 2,3 et 1,4 fois supérieurs en technique plaque par rapport à la technique tube.

Pour l'anti-c (n=10) et l'anti-K (n=10), les différences de titres étaient moins marquées, en moyenne inférieure à 1 dilution.

Pour l'anti-M (n=9), les titres en plaque étaient inférieurs de plus de 2 dilutions par rapport au tube, phénomène probablement expliqué par la présence de fractions IgM non détectées en immuno-capture.

Conclusion :

La méthode de titrage en plaque sur IRIS montre de bonnes performances. Les valeurs de titres trouvées étaient sensiblement différentes, avec une disparité selon les échantillons et selon les spécificités d'anticorps.

Pour pouvoir établir plus précisément des titres seuils en technique plaque, liés à un risque de maladie hémolytique fœtale ou néonatale sévère, des études complémentaires sur un plus grand nombre d'échantillons sont à envisager. Elles nécessiteront d'être validées avec les données cliniques des issues de grossesses.

A Anti-D n=37	titre plaque immunocapture NEO IRIS									
	titre tube	<2	2	4	8	16	32	64	128	256
	<2	1		3	3		1			
	2						2			
	4							3		
	8							1	3	
	16								1	
	32								3	1
	64									2
	128									2
	256									2
	> 256									

B Anti-K n=10	titre plaque immunocapture NEO IRIS									
	titre tube	<2	2	4	8	16	32	64	128	256
	<2	1		1						
	2									
	4			1	1					
	8					1	1			
	16									
	32							1		
	64								1	
	128								1	
	256									1
	> 256									

Figure 3: Comparaison des résultats de titre obtenus en technique tube et en technique immuno-capture pour chaque échantillon contenant un anti-D (RH1) [A] ou un anti-K (KEL1) [B] et détermination des titres seuils pour le déclenchement d'un suivi échographique fœtal à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale sévère

Pour les échantillons contenant un anti-D, le titre seuil de 16 en tube défini dans notre laboratoire semble correspondre à un titre d'au moins 2 dilutions de plus en immuno-capture, soit autour de 64.

Pour les échantillons contenant un anti-K, le titre seuil de 16 en tube utilisé dans notre laboratoire semble pouvoir être également utilisé comme titre seuil en immuno-capture.

Pour les autres spécificités (anti-c et anti-E), des titrages sur un plus grand nombre d'échantillons sont actuellement en cours pour mieux cibler la valeur seuil.