

Quantification des anticorps anti-érythrocytaires chez la femme enceinte

C. TOLY-NDOUR^{1*}, S. HUGUET-JACQUOT¹, H. DELABY¹, E. MAISONNEUVE²,
A. CORTEY³, A. MAILLOUX¹

RÉSUMÉ

Le suivi immuno-hématologique de la femme enceinte inclut la recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (agglutinines irrégulières) à des temps précis, selon un calendrier défini par la Haute Autorité de Santé, tout au long de la grossesse. En cas de présence d'anticorps anti-érythrocytaires dans le sang maternel, une identification de leur spécificité est indispensable. Si l'anticorps est associé à un risque de maladie hémolytique fœtale et/ou néonatale (anticorps dit « à risque obstétrical »), sa quantification est obligatoire et, selon sa nature, différents tests d'intérêt variable sont disponibles. Ces tests de quantification permettent d'apprécier le risque d'une atteinte hémolytique sévère du fœtus et/ou du nouveau-né, de prendre les dispositions adéquates de suivi biologique et échographique de la grossesse et d'anticiper la conduite à tenir à la naissance.

MOTS-CLÉS : maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né, allo-immunisation fœto-maternelle, anticorps anti-érythrocytaires, agglutinines irrégulières.

I. - INTRODUCTION

La maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né survient lorsque des anticorps anti-érythrocytaires d'origine maternelle traversent la barrière placentaire et, par reconnaissance d'antigènes spécifiques exprimés à la surface des hématies fœtales, induisent une hémolyse d'intensité variable. Si celle-ci est intense et survient dès le stade fœtal, une anémie sévère avec des épanchements dans les séreuses pouvant aller jusqu'à un état d'anasarque – souvent mortel si une thérapeutique n'est pas instaurée – peut se développer chez le fœtus. Après l'accouchement, en plus de l'anémie évolutive potentiellement sévère, présente d'emblée ou plus tardive, l'hémolyse

entraîne une accumulation de bilirubine ; elle peut se manifester par un ictère clinique précoce et de progression rapide, susceptible de se compliquer, en l'absence de prise en charge adaptée, par une atteinte neurologique grave : l'ictère nucléaire.

¹ Unité fonctionnelle biologique et d'expertise en immuno-hématologie périnatale, Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, Hôpital Saint-Antoine, Paris XII.

² Service de médecine fœtale, Hôpital Trousseau.

³ Unité fonctionnelle de soins et expertise des incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires et des ictères néonataux, Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, Hôpital Trousseau, Paris XII.

* Auteur principal : cecile.toly-ndour@aphp.fr

Les recommandations nationales de la Haute Autorité de Santé pour le suivi biologique de la femme enceinte implique la recherche systématique d'agglutinines irrégulières (ou recherche d'anticorps anti-érythrocytaires) lors du premier trimestre de la grossesse (1) : elle permet le dépistage des grossesses à risque. Si ces anticorps sont décelés, l'identification de leur spécificité est obligatoire (2) et leur quantification est nécessaire s'ils sont susceptibles d'induire une maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né. Cette quantification doit être régulière tout au long de la grossesse car les taux d'anticorps peuvent augmenter en cas de grossesse incompatible.

Les autres éléments du suivi biologique à mettre en place dans ce contexte visent à apprécier la probabilité d'une grossesse incompatible en phénotypant le procréateur (recherche de la possibilité d'une transmission par le père à son enfant des antigènes correspondant aux anticorps maternels) et /ou en réalisant un génotypage fœtal (3) (examen pouvant être effectué sur du sang maternel, en cas d'immunisation anti-D (RH1), anti-Kell (KEL1), anti-c (RH4) ou anti-E (RH3)).

Lorsque les taux d'anticorps maternels sont élevés, un suivi échographique du fœtus doit être entrepris hebdomadairement avec des mesures du pic systolique de vélocité à l'artère cérébrale moyenne qui, en cas de valeurs élevées (> 1,5 multiples de la médiane), signent indirectement l'existence d'une anémie fœtale modérée à sévère (4, 5). Si les mesures sont élevées à plusieurs reprises et/ou en cas d'épanchement dans les séreuses constatés lors de l'échographie, une ponction de sang fœtal sera réalisée, suivie le cas échéant d'une transfusion fœtale.

Après la naissance, en cas d'incompatibilité, des signes de maladie hémolytique néonatale plus ou moins sévères sont immédiatement présents ou peuvent se développer : hyperbilirubinémie dès les premières heures de vie, anémie d'emblée ou d'apparition plus tardive, au cours des 6 premières semaines de vie. La photothérapie intensive, les transfusions sanguines voire les exsanguino-transfusions, associées à des traitements médicamenteux (administration d'albumine, d'immunoglobulines...), permettent souvent de contenir l'évolution de la maladie hémolytique (6). De nos jours, les cas graves d'ictère nucléaire dû à l'accumulation de bilirubine libre au niveau des noyaux gris centraux entraînant des séquelles neurologiques sont de plus en plus rares chez l'enfant, quand le diagnostic de l'allo-immunisation a été préalablement établi et la maladie hémolytique bien anticipée.

Après un rappel des principales spécificités des anticorps à risque, nous décrirons les différentes techniques de quantification des anticorps anti-éry-

throcytaires disponibles et discuterons de l'interprétation des résultats de ces tests, de leur place et de leur intérêt dans le suivi de la femme enceinte.

II. - DANGEROUSITÉ DES ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES SELON LEUR SPÉCIFICITÉ

La détermination de la spécificité des anticorps présents dans le sang maternel, grâce aux techniques d'identification des agglutinines irrégulières, est primordiale car la dangerosité des anticorps n'est pas la même selon l'antigène cible (**Tableau I**).

On distingue ainsi :

- Les anticorps dits à risque anténatal, c'est-à-dire capables d'induire une anémie fœtale sévère, dont les trois principaux sont, par ordre de fréquence décroissante, l'anti-D (RH1) (80 % des cas), l'anti-Kell (K, KEL1) (13 % des cas) et l'anti-c (RH4) (2 % des cas) (7). Ils peuvent déclencher une anémie fœtale dès la quinzième-seizième semaine d'aménorrhée pour l'anti-D et l'anti-Kell, et dès la vingtième pour l'anti-c. L'anti-D et l'anti-c sont responsables d'une hémolyse essentiellement périphérique. L'anti-Kell a, de plus, une action centrale, détruisant les progéniteurs érythroïdes (8, 9).
- Les anticorps à risque essentiellement post-natal, représentés par les anticorps dirigés contre les antigènes du système ABO, les autres antigènes des systèmes RH et KEL, les antigènes des systèmes FY, JK et MNS, ainsi que d'autres anticorps plus rares dirigés contre d'autres antigènes de groupe sanguin, qui touchent parfois une partie restreinte de la population (par exemple anti-Mur en Asie du Sud-Est, ou anti-Dia chez les Hispaniques). Parmi cette catégorie d'anticorps, on retrouve dans la littérature des cas exceptionnels d'atteinte anténatale, essentiellement au troisième trimestre de la grossesse et le plus souvent en présence de taux élevés d'anticorps maternels circulants (10-32) (**Tableau I**). Les cas d'anémie fœtale décrits avec l'anti-M (MNS1) suggèrent également que cet anticorps pourrait agir par un mécanisme d'action centrale, similaire à celui des anticorps anti-Kell (20).
- Enfin, il existe des anticorps dits « sans risque obstétrical », en général parce que l'antigène correspondant n'est pas ou est très peu exprimé à la surface des globules rouges fœtaux (sang de cordon). C'est le cas par exemple de ceux dirigés contre les antigènes des systèmes LE ou LU, des anticorps anti-P1 (P1PK1) ou encore des anti-HI. Parfois l'expression de l'antigène n'est pas res-

Tableau I - Principales spécificités des anticorps anti-érythrocytaires et risque obstétrical (d'après l'expérience du Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale et les données de la littérature internationale publiée depuis 2000).

Groupe sanguin	Spécificité de l'anticorps	Risque d'anémie fœtale sévère (Hb < 6 g/dL avant terme)	Risque de maladie hémolytique néonatale (7)	Techniques de quantification disponibles en France
Système RH	Anti-D (RH1)	Oui (fréquent - dès 15SA) (7)	Oui	Titration / dosage pondéral / microtitration
	Anti-C (RH2)	Non	Oui	Titration / dosage pondéral
	Anti-E (RH3)	Oui (rare) (10)	Oui	Titration / dosage pondéral
	Anti-c (RH4)	Oui (dès 20SA) (7)	Oui	Titration / dosage pondéral
	Anti-e (RH5)	Oui (exceptionnel) (11)	Oui	Titration / dosage pondéral
	Anti-Cw (RH8)	Oui (exceptionnel) (12)	Oui	Titration
	Anti-G (RH12)	Oui (exceptionnel) (13)	Oui	Titration / dosage pondéral
	Autres anti RH dont « anti-public et anti-privé », anti-antigènes liés...	Oui (exceptionnel) (14, 15)	Oui	Titration ± dosage pondéral
Système KEL	Anti-Kell (KEL1)	Oui (fréquent - dès 15SA) (7)	Oui	Titration
	Anti-Kpa (KEL3)	Oui (exceptionnel) (7)	Oui	Titration
	Autres anti-KEL dont « anti-public »	Oui (exceptionnel) (16-19)	Oui	(Titration si hématies-test informatives)
Système MNS	Anti-M (MNS1)	Oui (rare) (20)	Oui	Titration
	Anti-N (MNS2)	Non	Non	/
	Anti-S (MNS3)	Oui (exceptionnel) (21)	Oui	Titration
	Anti-s (MNS4)	Non	Oui	Titration
	Anti-U (MNS5)	Oui (exceptionnel) (22)	Oui	Titration / dosage pondéral
	Autres anti-MNS dont « anti-privé »	Anti-Vw (exceptionnel) (23) Anti-Mur (exceptionnel) (24)	Oui	Titration (si hématies-test informatives)
Système FY	Anti-Fya (FY1)	Oui (exceptionnel) (32)	Oui	Titration
	Anti-Fyb (FY2)	Non	Oui	Titration
	Autres anti-FY dont « anti-public »	Non	Oui	Titration (si hématies-test informatives)
Système JK	Anti-Jka (JK1)	Oui (exceptionnel) (7)	Oui	Titration
	Anti-Jkb (JK2)	Non	Oui	Titration
	Autres anti-JK dont « anti-public »	Non	Oui	Titration (si hématies-test informatives)
Système P1PK1	Anti-P1 (P1PK1)	Non	Non	/
Système LU	Anti-Lua (LU1) et Lub (LU2)	Non	Non	/
Système LE	Anti-Lea (LE1), -Leb (LE2), autres	Non	Non	/
Autres systèmes de groupes sanguins		Anti-Vel (exceptionnel) (25) Anti-LAN (exceptionnel) (26) Anti-Jra (JR1) (rare) (27) Anti-Dia (exceptionnel) (29) Anti-Coa (exceptionnel) (30)	Oui Anti-Ge3 (28)	Titration (si hématies-test informatives)
Systèmes H et I	Anti-H, anti-HI	Non	Non	/
Système ABO	Anti-A (ABO1)	Non	Oui	(Titration)
	Anti-B (ABO2)	Oui (exceptionnel) (31)	Oui	(Titration)
Auto-anticorps & auto-papaine	Auto-anticorps & auto-papaine	Non	Non	/

treinte aux érythrocytes (cas de l'anti-H). Les auto-anticorps, tout comme l'anti-N (MNS2) (exceptionnellement identifié chez les Caucasiens, assimilable à un auto-anticorps du fait de la présence de cet antigène sur la glycophorine B), sont également sans risque pour l'enfant car très peu d'entre eux arrivent à franchir le placenta. S'ils se fixent parfois sur les hématies de l'enfant, ils n'induisent pas généralement d'hémolyse franche.

III. - TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DES ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES

Lorsqu'un anticorps « à risque » est identifié, il est primordial et obligatoire de le quantifier (1, 2). En effet, la quantité et l'affinité des anticorps circulants (c'est-à-dire leur capacité à reconnaître l'antigène cible) dans le sang maternel conditionnent la gravité de l'atteinte fœtale et néonatale. Les anticorps anti-érythrocytaires peuvent être quantifiés par différentes méthodes, dont la plus répandue reste le titrage par le test indirect à l'antiglobuline (test de Coombs indirect). Le dosage pondéral permet de doser plus précisément les anticorps dirigés contre les cinq principaux antigènes du système RH et contre les antigènes de fréquence élevée (anticorps dit « anti-public »), en déterminant une concentration calculée à partir d'un étalon international. D'autres techniques, non utilisées en routine, existent également comme l'évaluation du pouvoir d'activation, par les anticorps maternels, des récepteurs Fc présents à la surface des monocytes/macrophages.

Par ailleurs, la physiopathologie de la maladie hémolytique du nouveau-né est complexe et il est important de considérer que la quantité d'anticorps maternels n'est qu'un paramètre parmi de nombreux autres (autres facteurs maternels, facteurs placentaires et fœtaux) qui peut influencer sur la maladie hémolytique fœtale et néonatale. Ainsi, pour un titre ou une concentration en anticorps donné, les symptômes observés pourront être complètement différents d'un fœtus ou d'un enfant à l'autre. On ne peut donc raisonner que par la notion de « seuil critique », c'est-à-dire la quantité d'anticorps à partir de laquelle on considère qu'il y a un risque qu'une anémie fœtale ou une maladie hémolytique néonatale grave se développe.

La quantification des anticorps doit être répétée tout au long de la grossesse car, en cas de grossesse incompatible, l'immunité de la mère peut être stimulée suite à des passages minimes d'hématies fœtales dans sa circulation sanguine, et les taux d'anticorps peuvent augmenter parfois de manière très importante. C'est notamment le cas pour l'anti-D pour lequel une hausse des taux est observée dans près de

50 % des grossesses incompatibles, quel que soit le terme de la grossesse, même si ces « réactivations » sont plus fréquentes au troisième trimestre (33). Il en est de même, bien que plus rarement, avec les autres anticorps du système RH, en particulier l'anti-c et exceptionnellement avec les anti-Kell. La fréquence optimale des quantifications dépendra, non seulement de la spécificité de l'anticorps, mais aussi de son taux de base et du terme de la grossesse. Le **tableau II** présente les fréquences de quantification recommandées par le Centre National de Référence en Hématologie Périnatale.

A) Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires

Le titrage par le test indirect à l'antiglobuline permet la quantification de tous les anticorps anti-érythrocytaires, quelle que soit leur spécificité, à partir du moment où l'on dispose d'hématies tests exprimant l'antigène correspondant. Elle repose sur le principe d'hémagglutination.

Les IgG, monomériques, autrefois appelées « anticorps incomplets » par opposition aux IgM pentamériques, ne peuvent induire une agglutination spontanée des globules rouges en milieu salin. En effet la force de répulsion entre les hématies en solution (potentiel zeta) est telle que la distance minimale entre deux hématies est supérieure à la distance maximale possible entre les deux bras de la molécule d'IgG. Dans la technique de titrage, l'utilisation d'une antiglobuline (anti-IgG), de nature IgM et /ou IgG, permet, en « pontant » plusieurs molécules d'IgG fixées sur une hématie, d'induire une hémagglutination.

1) Le titrage en milieu liquide, dit « en tube », par le test indirect à l'antiglobuline

Indications

Cette technique reste la plus utilisée car sa mise en œuvre est simple : elle consiste à établir un « titre », reflet à la fois de la concentration et de l'affinité de l'anticorps, en déterminant la dilution maximale de l'échantillon qui induit encore une réaction d'hémagglutination visible à l'œil nu. Elle est utilisable pour tous les types d'anticorps, du moment que l'on possède au moins une hématie-test porteuse de l'antigène correspondant.

Méthode

Lors du suivi d'une femme enceinte, son sérum doit toujours être analysé en parallèle avec un sérum recueilli antérieurement. Dans la technique de référence, des séries de dilution (de raison 2) du sérum dans du chlorure de sodium isotonique sont réalisées

Tableau II. - Seuils critiques préconisés par le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale pour la mise en place d'un suivi échographique et clinique anténatal et fréquence des titrages/dosages recommandée.

Spécificité de l'anticorps	Test de quantification	Fréquence des titrages/dosages*	Seuil de mise en place d'un suivi échographique fœtal (risque d'anémie fœtale sévère)
Anti-D (RH1)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis toutes les 2 semaines à partir de 18SA	16 (dès 18SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral	Au premier trimestre, puis toutes les 2 semaines à partir de 18SA	5 UI/mL = 1 µg/mL = 250 UCHP/mL (dès 18SA)
Anti-c (RH4)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 18SA, puis toutes les 2 semaines à partir de 28SA	4 (dès 18SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 18SA, puis toutes les 2 semaines à partir de 28SA	500 UCHP/mL ≈ 7,5 UI/mL (dès 18SA)
Anti-E (RH3)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	8 (dès 28SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	700 UCHP/mL (troisième trimestre)
Autres anti-RH	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	Anti-e (RH5) et « anti-publics » : 8 (dès 28SA) mais pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral Autres anticorps : 16 (dès 28SA) mais, selon la spécificité, pouvant être adapté en fonction du dosage pondéral
	Dosage pondéral (pour anti-C (RH2), anti-G (RH12), anti-e (RH5) et anti-public)	Au premier trimestre, puis tous les mois à partir de 28SA	Anti-e (RH5) et « anti-publics » : 700 UCHP/mL (dès 28SA) Anti-C (RH2) et anti-G (RH12) : 1 000 UCHP/mL (dès 28SA)
Anti-Kell (KEL1)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis tous les mois dès 16SA	16 (dès 16SA)
Anti-Jra (JR1)	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis toutes les 2 semaines à partir de 18SA	16 (dès 18SA) Dosage pondéral recommandé en supplément pour préciser le risque
Autres spécificités à risque obstétrical	Titration (tube)	Au premier trimestre, puis à 37SA, si titre initial < 4 ou à 32 et 37SA, si titre initial = 4 ou à 28, 32 et 37SA, si titre initial > 4	64 (dès 28SA) Cas particulier anti-M : titre global 64 / titre des IgG seules 16 (dès 28SA)

SA = semaine d'aménorrhée.

* Fréquence des titrages/dosages pouvant être rapprochée en cas de taux de base élevé ou d'une réactivation de l'immunisation.

dans des tubes en verre. Chaque dilution (100 µl) est mise au contact d'une suspension à 4 ± 1 % d'hématies-test (50 µl) porteuses de l'antigène correspondant. Il est recommandé d'utiliser un mélange d'au moins trois hématies-test d'expression hétérozygote pour l'antigène afin de limiter les variations de titre dues à une expression non uniforme de l'antigène selon les donneurs, qui est parfois observée pour les systèmes dits à « fort effet dose » que sont les systèmes MNS, FY et JK (2).

Après une incubation de 60 ± 15 min à $37 \pm 2^\circ$ C et une centrifugation du milieu réactionnel, une première lecture du titre, avant l'ajout de l'antiglobuline, est effectuée par certains laboratoires. En cas de positivité, il reflète souvent la présence dans le sérum d'IgM spécifiques de l'antigène. Les hématies sont ensuite lavées plusieurs fois avec du chlorure de sodium isotonique. Le culot d'hématies est remis en suspension dans 100 µl d'une solution d'antiglobuline anti-IgG humaine. La réaction d'agglutination

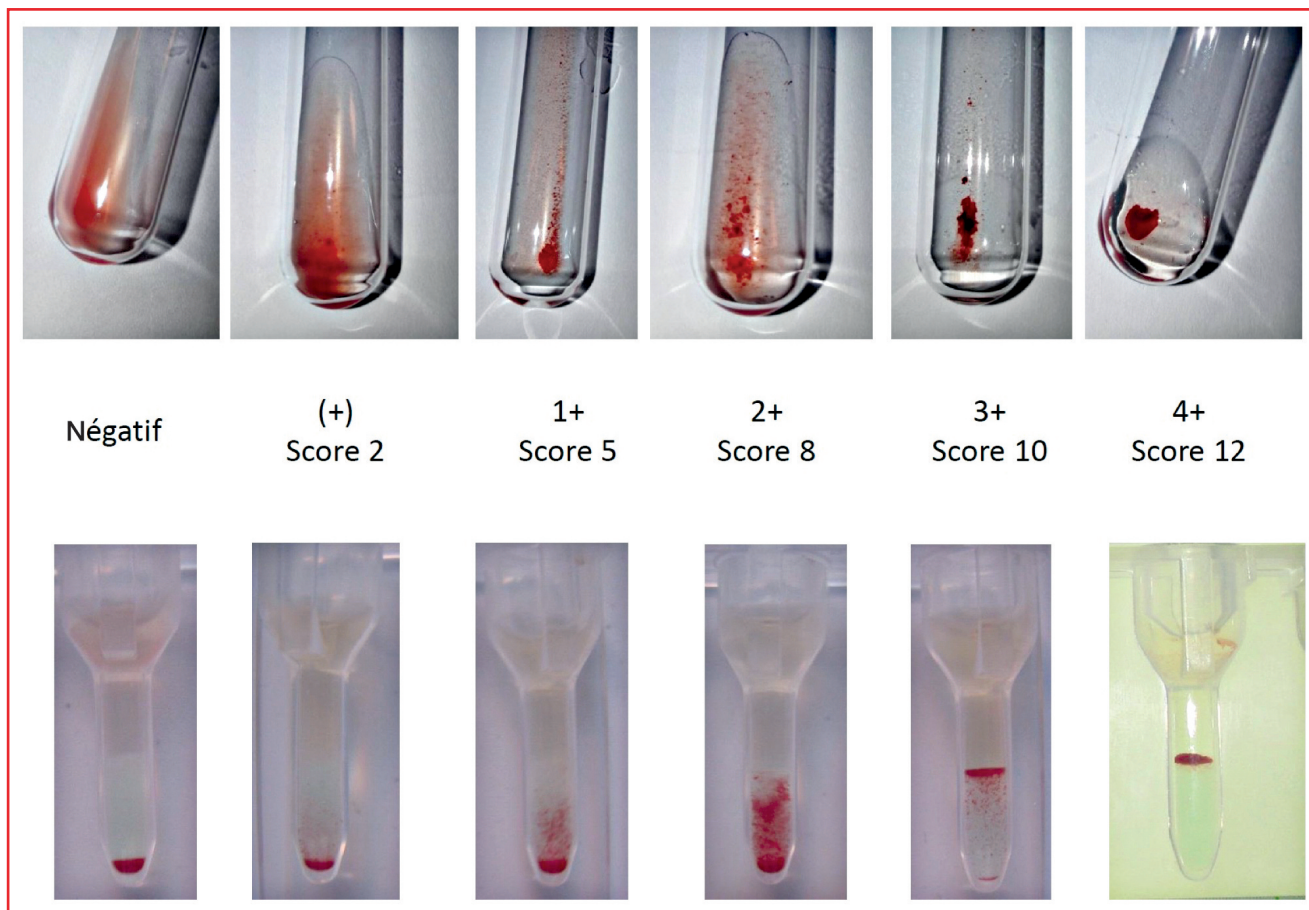


Fig. 1 - Titrage des anticorps anti-érythrocytaires : intensité d'hémagglutination et scores de Marsh, selon les techniques en tube (haut) et en gel (bas).

est ensuite observée après une courte et lente centrifugation et une douce remise en suspension des hématies. Le titre en anticorps correspond à l'inverse de la dernière dilution du sérum permettant une agglutination macroscopiquement visible à l'œil nu. Le point final de lecture en milieu liquide correspond à l'intensité d'agglutination (+) (Figure 1).

Certains laboratoires utilisent en plus le score de Marsh évaluant plus finement l'affinité des anticorps. Il se calcule en additionnant les aspects d'agglutination observés pour chaque dilution de l'échantillon sérique (Figure 1). Ainsi, un aspect (+) est associé au score 2, 1+ au score 5, 2+ au score 8, 3+ au score 10, et 4+ au score 12. Pour un titre donné, plus le score est élevé, plus l'affinité des anticorps est importante et plus l'anticorps est donc dangereux.

Exemple 1 : si la dernière dilution du sérum A pour laquelle une réaction d'hémagglutination est observée est celle au 1/8, le titre du sérum sera de 8. Si l'aspect de l'hémagglutination est noté 3+ avec le sérum non dilué, 2+ avec la dilution 1/2, 1+ avec la dilution 1/4 et (+) avec la dilution 1/8, le score de Marsh est de (10+8+5+2) 25.

Exemple 2 : si l'aspect de l'hémagglutination est noté 1+ avec le sérum B non dilué, 1+ avec la dilution 1/2, (+) avec la dilution 1/4 et (+) avec la dilution 1/8, le sérum a également un titre de 8 mais un score plus faible (5+5+2+2 = 14). Cet anticorps sera considéré comme moins dangereux que celui pour lequel le score est égal à 25.

Interprétation

Plus le titre des anticorps sériques maternels est élevé et plus le score de Marsh est grand, plus le risque de survenue d'une maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né sévère est important. Si le titre du sérum diffère de deux dilutions ou plus par rapport à un sérum précédent, l'augmentation du titre est considérée comme significative. On considérera alors que l'immunisation est en progression (notion de réactivation).

Des titres « seuils », à partir desquels on estime qu'il y a un risque d'anémie fœtale sévère, ont été établis. Ils varient selon les pays et la nature des anticorps (3, 34, 35). Pour l'anti-D, le titre de 16 est communément admis comme critique, mais d'une institution à

l'autre, la valeur seuil peut varier de 8 à 32 (34). Pour l'anti-Kell, les données sont moins précises. Si certains affirmaient dans les publications antérieures à 1995 que des cas graves de maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né survenaient avec des titres bas, des études plus récentes (36) et les données de notre centre n'en observent pas avec des titres < 16. Pour l'anti-c, il n'y a pas à proprement parler de titre critique décrit dans la littérature. Les titres seuils utilisés pour l'anti-D sont en général extrapolés pour l'anti-c. L'anti-c est souvent peu affiné et les titres trouvés sont, la plupart du temps, faibles à modérés. Selon l'expérience du Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale, des cas de maladie hémolytique néonatale, parfois sévère, ont été observés avec des titres de 8 et le dosage pondéral des anticorps, dès le titre de 4, est une vraie valeur ajoutée pour pouvoir mieux apprécier ce risque. Pour les autres anticorps, peu de renseignements sont disponibles dans la littérature. Il n'a toutefois pas été décrit d'anémie fœtale sévère pour des titres ≤ 32 (35). Le seuil critique utilisé au Centre National de Référence est de 64, avec une exception pour l'anti-E et l'anti-Jra.

Comme pour l'anti-c, la détermination de la concentration des anti-E par dosage pondéral, dès le titre de 8, permet de mieux estimer le risque. L'anti-Jra (JR1) est un anticorps dirigé contre un antigène de forte fréquence (« anti-public »). Sa prévalence est faible mais un certain nombre de cas d'anémie fœtale sévère ont été décrits avec cet anticorps qui semble particulièrement dangereux d'un point de vue obstétrical. Pour cet anticorps, le Centre National de Référence recommande un suivi échographique fœtal spécifique dès le titre de 16 (27).

L'anti-M a la particularité de souvent associer des IgG et des IgM respectivement capables et incapables de franchir la barrière placentaire. Le titrage de la fraction IgG seule est conseillé à partir d'un titre global de l'anticorps égal à 32 : il nécessite au préalable d'inactiver le pouvoir hémagglutinant des IgM en traitant le sérum avec du dithiothréitol (DTT) qui casse les ponts disulfure et donc les pentamères. Un titre global de l'anti-M ≥ 64 , avec un titre de la fraction IgG seule ≥ 16 est considéré comme à risque.

L'ensemble des titres seuils pour la technique de titrage, utilisés au Centre National de Référence, est répertorié dans le **tableau II**.

Le titrage des IgG anti-A et anti-B présente un intérêt très controversé pour prédire le risque de maladie hémolytique fœtale et néonatale sévère par incompatibilité ABO. Il nécessite de traiter au préalable le sérum avec du DTT pour inactiver les IgM et ne titrer que la seule fraction IgG. Les IgG anti-A et anti-B comprennent parfois une forte proportion

d'IgG2 dont le pouvoir hémolytique est faible car cette sous-classe d'IgG est moins bien reconnue par les récepteurs Fc sur les monocytes et active moins bien le complément que les IgG1 ou les IgG3. De plus, l'expression des antigènes A et B n'est pas restreinte aux érythrocytes et n'est pas intégrale chez le nouveau-né. Pour ces raisons, le titre des IgG totales maternelles n'est pas forcément un bon reflet du risque hémolytique néonatal. Ce titrage n'est donc pas réalisé de manière systématique chez toutes les femmes de groupe sanguin O, enceinte d'un conjoint d'un autre groupe. Cependant, il peut présenter un intérêt, surtout au troisième trimestre de grossesse, chez les femmes dont un enfant précédent a développé une maladie hémolytique néonatale sévère par incompatibilité ABO. En effet, dans ce cas, le titre des IgG maternelles semble associé à la gravité de l'atteinte néonatale, mais sans valeur seuil clairement établie (37).

Avantages et inconvénients

La technique de titrage en tube présente l'avantage d'être réalisable assez facilement et rapidement par de nombreux laboratoires. Par ailleurs, elle reste très performante et très informative. En effet, elle est très sensible à l'affinité des anticorps vis-à-vis de leur antigène cible et donc à leur pouvoir hémolytique. Un anticorps très affiné, de faible concentration, peut avoir un titre plus élevé qu'un anticorps peu affiné mais dont la concentration est élevée. Le titrage et le dosage pondéral d'un anticorps sont donc des mesures complémentaires. Ainsi, à concentration égale, un anticorps dont le titre est élevé sera beaucoup plus à risque d'induire une maladie hémolytique sévère chez le fœtus ou le nouveau-né qu'un anticorps dont le titre est modéré.

Toutefois, le titrage des anticorps anti-érythrocytaires par le test indirect à l'antiglobuline en tube est peu reproductible et les résultats intra- et inter-laboratoires varient considérablement. Ceci est dû à une lecture discontinue des valeurs, source d'imprécision, et à un point final d'hémagglutination dépendant de nombreuses variables (hématies-test, nature et concentration de l'antiglobuline...) difficiles à standardiser (38). Une autre source importante de variation des résultats est la fluctuation de la lecture du test d'un opérateur à l'autre. Pour un échantillon donné, les titres trouvés peuvent être distants de quatre dilutions (données du Centre National de Référence). Pour limiter ce problème de reproductibilité et ses conséquences, la législation française recommande d'analyser simultanément un sérum et un sérum collecté précédemment et conservé congelé. Par ailleurs, l'introduction d'un contrôle de qualité interne de titre connu lors de chaque série d'analyses est impérative (2).

2) Titrage en gel

Indications

Se développant depuis plusieurs années sur des supports de type colonne-filtration, les indications du titrage en gel sont les mêmes que pour la technique en tube.

Méthode

Le principe de la technique est similaire à la précédente sauf que la distribution des hématies-test et les dilutions de plasma/sérum sont réalisées dans les micropuits d'un support et que l'antiglobuline est incluse dans celui-ci. Le milieu dans lequel les hématies sont déposées peut être du chlorure de sodium isotonique ou un milieu de basse force ionique (BFI), tel que celui utilisé pour la recherche/identification des anticorps anti-érythrocytaires. Ce milieu accélère la réaction de fixation des anticorps sur les antigènes et permet la liaison des anticorps de faible affinité.

On distingue deux types de support :

- Des microbilles sur lesquelles est fixée l'anti-globuline qui peut être de type polyvalente (anti-IgG + anti-C3d), permettant de mettre en évidence à la fois les IgG et les IgM, ou de type anti-IgG pure. Elles baignent dans un tampon à base d'albumine bovine contenant également des potentialisateurs macromoléculaires.
- Une matrice gel au sein duquel baigne une solution d'antiglobuline polyvalente ou d'anti-IgG, dans un tampon BFI comportant différentes molécules potentialisatrices.

Une autre différence avec la technique tube est que la lecture du titre se fait en général en point final 1+.

Interprétation

En raison de la présence de molécules potentialisatrices dans les supports colonne/filtration, les résultats observés sont souvent différents de ceux obtenus par la technique en milieu liquide. Ils peuvent l'être également d'un type de support à l'autre selon la nature de l'antiglobuline ou de la composition du tampon dans lequel baigne le support. Par ailleurs, comme pour la technique en tube, les hématies-test peuvent être d'expression hétérozygote ou homozygote pour l'antigène et faire ou non l'objet de mélange, ce qui peut être une source de variation des résultats. Les hématies-test peuvent être mises en suspension dans un milieu salin ou BFI, une condition qui influe également sur le résultat de l'analyse.

Si les résultats paraissent en général surestimés pour les anticorps du système RH, cette tendance est moins manifeste pour ceux dirigés contre d'autres systèmes de groupe sanguin, notamment pour l'anti-

Kell dont le titre sérique est parfois sous-estimé (39, 40). De plus, il semblerait que des échantillons, ayant un même titre par la technique en tube, puissent avoir des titres variant jusqu'à cinq dilutions d'écart par cette technique.

À ce jour, aucun titre critique corrélé avec des données cliniques n'a été établi. Les laboratoires étant passés à la technique de titrage en gel utilisent souvent les mêmes titres seuil qu'avec l'autre technique pour l'anti-D et l'anti-c ; en revanche, pour l'anti-Kell, ils n'ont souvent pas de titre seuil : pour chaque patiente présentant une allo-immunisation anti-Kell, quel que soit le titre sérique, est programmé un suivi échographique fœtal hebdomadaire avec une mesure de la vitesse systolique maximale au niveau de l'artère cérébrale moyenne fœtale.

Avantages et inconvénients

L'avantage de ces techniques est la possibilité de les automatiser, depuis la dilution du sérum jusqu'à la lecture de la réaction : on peut donc préjuger d'une diminution de la variabilité inter-opérateur et ainsi d'une meilleure reproductibilité des résultats des analyses. De plus en plus de pays les utilisent donc en routine. En France, si la technique de référence en tube restait préconisée jusqu'à l'arrêté du 15 mai 2018, aujourd'hui il n'y a plus aucune recommandation quant à la technique à exécuter (2). Cet arrêté ouvre donc la voie au développement de techniques colonne/filtration automatisables, mais il soulève le problème de l'interprétation des résultats au vu de l'absence de seuils critiques cliniquement éprouvés.

La prise en compte des résultats de titrage des anticorps par cette nouvelle technique sera probablement initialement prudente et risque d'induire une augmentation importante du nombre de grossesses considérées comme à risque, avec des suivis cliniques pas toujours nécessaires pour les patientes. Si des seuils plus précis sont ensuite établis avec l'expérience et le recul, ils risqueront de différer de ceux de la technique en tube, ce qui impliquera une bonne communication de la part des biologistes pour ne pas induire de confusion chez les gynécologues-obstétriciens et les pédiatres habitués depuis des décennies aux valeurs seuils de la technique en tube.

3) Autres techniques de titrage

Avec l'automatisation, d'autres techniques de titrage se développent actuellement : en microplaque, par des techniques d'immunocapture. Ces techniques pourraient connaître un essor dans les années à venir. Comme les techniques colonnes/filtration, elles devront être éprouvées cliniquement pour pouvoir définir des seuils critiques qui sont susceptibles d'être également distincts des valeurs seuils

établies par les techniques en tube et en gel. Les laboratoires les utilisant auront un rôle primordial de conseil auprès des cliniciens lors de la remise des résultats d'analyse.

B) La concentration des anticorps

1) Le dosage pondéral des anticorps anti-érythrocytaires par hémagglutination en flux continu

Indication

Cette technique décrite dans la pharmacopée européenne reste celle de référence pour l'estimation de la concentration des anticorps anti-D. Comme le titrage, elle repose sur le principe de l'hémagglutination, mais celle-ci se fait dans un flux continu, au sein d'un auto-analyseur.

La technique de dosage pondéral est assez laborieuse mais elle permet d'établir assez précisément la concentration des anticorps et s'avère très utile dans la prise en charge des patientes présentant une allo-immunisation dirigée contre les cinq principaux antigènes du système RH (anti-D [RH1], anti-C [RH2], anti-E [RH3], anti-c [RH4] et anti-e [RH5]).

Méthode

Les dilutions de sérum et la suspension de globules rouges portant l'antigène correspondant à l'anticorps à doser (les hématies utilisées sont de phénotype D+C+E+c+e+ (RH:1,2,3,4,5)) sont propulsées par des pompes dans un long circuit constitué de tubulures souples et de tubes en verre, horizontaux ou enroulés en spires de façon à assurer leur mélange en permanence (Figure 2). Le mélange est segmenté par de

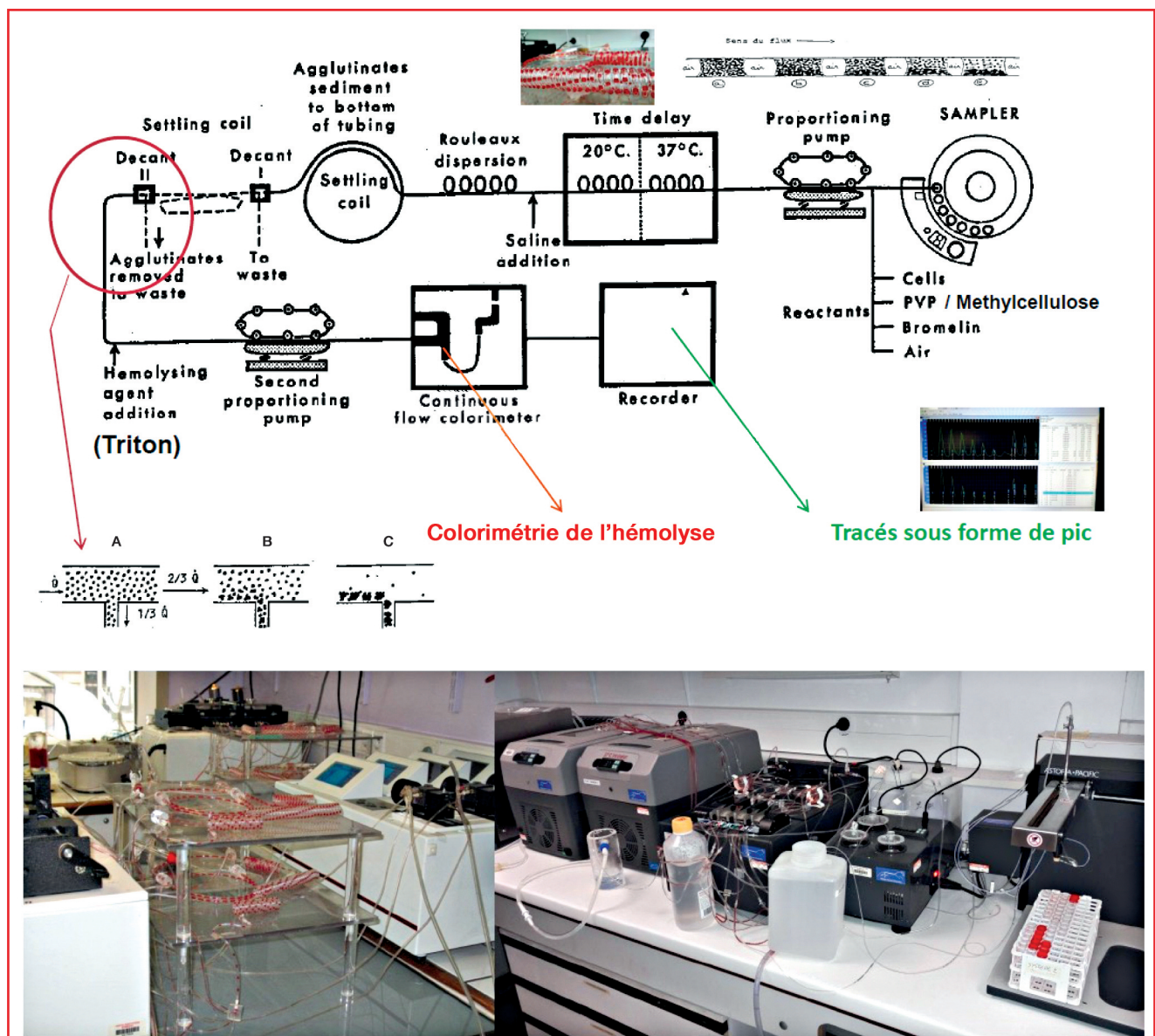


Fig. 2 - Schéma d'un circuit de dosage pondéral par hémagglutination en flux continu (adapté de (41)) et photos d'auto-analyseurs.

l'air dans le but de bien séparer les différentes dilutions de sérum qui, sans ce procédé, auraient tendance à se chevaucher les unes sur les autres.

Pour induire l'agglutination des hématies sensibilisées dans le circuit, il existe plusieurs alternatives. Dans tous les cas, ce n'est pas l'ajout d'une antiglobuline mais l'addition d'une solution de macromolécules qui va permettre l'hémagglutination. En effet, cette solution a pour effet d'augmenter la constante diélectrique du milieu, donc de diminuer le potentiel zêta ; ceci facilite le rapprochement physique des hématies à une distance telle que les molécules d'IgG deviennent capables de fixer une hématie sur chacun de leurs bras et donc d'induire une agglutination. Les pentamères d'IgM peuvent toujours induire une agglutination et cette méthode ne permet pas de distinguer la part d'hémagglutination due aux IgG de celle due aux IgM dans le cas où ces deux classes d'immunoglobulines seraient présentes.

La technique de Rosenfield met en jeu des hématies bromélinées avec une solution de polyvinylpyrrolidone. La broméline est, comme la papaïne, une enzyme protéolytique qui, en détruisant notamment les glycophorines porteuses de nombreux acides sialiques, diminue la charge négative globale des hématies et donc le potentiel zêta. En éliminant un certain nombre de protéines de surface, la broméline favorise aussi l'accessibilité et donc la reconnaissance des antigènes du système RH par les anticorps, y compris ceux de faible affinité. La technique de Gunson, dont le principe est similaire à celui de la technique Rosenfield, recourt à une autre macromolécule, la méthylcellulose.

La bromélation des hématies peut être réalisée dans le circuit, la broméline étant introduite avec le sérum et les hématies « natives » dès le début du circuit (technique dite « 1 temps »). Ou bien elle est effectuée d'abord hors circuit selon les modalités habituelles, et ensuite les hématies bromélinées sont incorporées dans le circuit (technique dite « 2 temps »). Afin de permettre leur bonne conservation avant et pendant l'analyse, les hématies sont mises en solution dans du Ficoll ou du sérum AB, évitant ainsi une hémolyse consécutive à l'agitation magnétique.

Le circuit est composé de trois parties :

- Une partie où a lieu la fixation des anticorps et l'agglutination, dans des spires formant des bobines de différentes tailles, mises bout à bout. Les macromolécules (polyvinylpyrrolidone ou méthylcellulose) induisent un rapprochement physique des hématies : c'est la formation des « rouleaux ». Les anticorps présents dans le sérum peuvent alors se fixer sur les hématies et les agglutiner.

- Une partie permettant la sédimentation et le piégeage des agglutinats. Une solution isotonique de chlorure de sodium arrive dans le circuit juste avant une bobine qui permet un bon mélange et une bonne dilution de la suspension de globules rouges. Cela a pour conséquence la disparition des rouleaux, tout en préservant les agglutinats immunologiques. La suspension circule ensuite dans des arcs horizontaux de façon à sédimenter préférentiellement les agglutinats qui sont ensuite éliminés du circuit grâce à un couple de « pièges ».
- Une partie consacrée à l'hémolyse et à la lecture. Les hématies restées libres dans le circuit sont hémolysées par un détergent (Triton X100). L'hémolysat est alors acheminé vers l'unité de lecture constituée d'un spectrophotomètre mesurant la densité optique de la solution à 540 nm. Le calcul des concentrations est réalisé grâce à une gamme issue du standard international anti-D 01/572 de l'OMS, qui est repositionnée régulièrement pour réajuster les valeurs en fonction des modifications de celui-ci avec le temps.

Interprétation

L'incertitude de mesure de ces techniques est telle qu'on considère qu'une concentration en anticorps varie significativement si elle diffère de plus de 30 % par rapport à l'antécédent. En cas d'une augmentation > 30 %, on considérera alors que l'immunisation est en phase de réactivation.

La technique en 2 temps est réalisée dans des conditions réactionnelles qui permettent de doser l'ensemble des anticorps spécifiques de l'antigène étudié. Elle est très sensible et tous les anticorps deviennent « agglutinants », quelle que soit leur affinité initiale (38).

L'étalon anti-D de l'OMS est une solution d'immunoglobulines polyclonales préparées à partir d'un très grand nombre de sujets immunisés contre l'antigène correspondant. Lorsque la solution d'anticorps à doser a la même composition que l'étalon, les particularités fonctionnelles des anticorps (affinité, aptitude à former des complexes immuns, polymorphisme isotypique, allotypique et idiotypique) sont similaires ; le dosage pondéral est alors le reflet de la concentration réelle en anticorps. Si la solution d'anticorps à doser est différente – ce qui est souvent le cas puisque la réponse polyclonale d'un individu, dont le système immunitaire a ses propres particularités, est comparée à celle de nombreux donneurs – le dosage pondéral exprime alors une concentration « apparente », dont la valeur dépend des paramètres propres à chaque technique. Les valeurs obtenues

avec les différentes techniques peuvent donc être discordantes. Des variations peuvent être observées, non seulement selon la nature de la macromolécule choisie mais aussi en fonction du type d'auto-analyseur utilisé. Si la variabilité inter-laboratoire des résultats est moindre que pour le titrage, elle reste tout de même non négligeable et il est donc préférable que le suivi d'une grossesse soit toujours effectué dans le même laboratoire.

Par ailleurs, les conditions analytiques de la technique de dosage « 1 temps » diffère sensiblement de celles de la technique « 2 temps » et, par conséquent, les résultats obtenus sont fréquemment distincts. La technique « 1 temps » est particulièrement sensible à l'affinité des anticorps et à la nature des isotypes. Elle dose essentiellement les IgG1 car les IgG3 sont détruites par la broméline introduite dans le circuit. L'action de la broméline est par ailleurs moindre que dans la technique « 2 temps » car elle est réalisée dans le circuit durant un laps de temps court ; elle n'est donc pas aussi franche que lorsque les hématies sont pré-bromélinées. En conséquence, la concentration en anticorps trouvée par cette technique est essentiellement le reflet des IgG1 de haute affinité (42). Il s'agit de la sous-classe d'anticorps la plus dangereuse en période anténatale car elle traverse précocement le placenta, dès la treizième semaine d'aménorrhée (43, 44). Pour un sérum contenant une forte proportion d'IgG1 anti-D de haute affinité, une valeur élevée sera donc obtenue avec cette technique. La concentration « apparente » trouvée sera même parfois plus élevée que celle fournie en recourant à la technique « 2 temps ». À l'inverse, pour un sérum contenant majoritairement des IgG3, une valeur plus basse sera obtenue avec la technique « 1 temps ». Ces discordances de résultats observés, pour un sérum donné, avec les deux techniques ne sont pas un inconvénient. Au contraire la comparaison des deux valeurs permet de préciser le risque hémolytique des anticorps et, complétée avec le résultat du titrage, de mieux apprécier leur dangerosité globale. Ainsi, plus le ratio concentration par le dosage « 1 temps » / concentration par le dosage « 2 temps » est élevé (proche, voire > 1), plus le potentiel hémolytique de l'anticorps durant la période anténatale est important et plus le risque qu'une anémie fœtale sévère se développe augmente (33).

Historiquement, la concentration seuil établie avec les auto-analyseurs utilisés en Angleterre (selon la technique de Gunson) pour l'anti-D était fixée à 4 UI/mL (45). Elle a ensuite été réhaussée à 15 UI/mL (46) ; toutefois, les deux valeurs sont toujours en vigueur. Les recommandations britanniques distinguent un seuil de risque modéré à 4 UI/mL, nécessitant de référer la patiente vers un centre spécialisé pour un suivi échographique fœtal avec mesure de la véloci-

métrie à l'artère cérébrale moyenne, et un seuil de risque élevé à 15 UI/mL (35). En France, historiquement, un seuil de 5 UI/mL (ou 250 UCHP/mL) avait été proposé (technique de Rosenfield) (42), et sa véracité a récemment été confirmée sur une cohorte de patientes suivie par le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (33).

Pour l'anti-c, les recommandations anglaises distinguent également des seuils de risque modéré à 7,5 UI/mL, et élevé à 20 UI/mL (35). Au Royaume-Uni, l'étalon international anti-c (référence OMS 84/628) est employé pour doser cet anticorps dont la concentration est donc exprimée en UI/mL ; toutefois, le dosage pondéral n'est effectué que pour les anti-D et anti-c. En France, le choix a été différent : les cinq anticorps principaux du système RH sont dosés, tous par la même technique, en utilisant l'étalon international anti-D comme référence. Ainsi, seule l'expression de l'anti-D est en UI/mL. Pour tous les autres anticorps, le résultat est rendu en unité arbitraire locale : les UCHP/mL. Des seuils de risque ont été établis par l'expérience : 500 UCHP/mL pour l'anti-c (correspondant à la valeur de 7,5 UI/mL utilisée en Angleterre), 700 UCHP/mL pour l'anti-E et l'anti-e et 1000 UCHP/mL pour l'anti-C (**Tableau II**).

Avantages et inconvénients

La technique de dosage pondéral nécessite de disposer d'un auto-analyseur à flux continu, automate de moins en moins commercialisé devant un nombre devenu restreint d'applications de cette technique autrefois beaucoup plus utilisée. L'entretien de l'appareillage est primordial et son utilisation requiert une certaine expertise pour la gestion des fuites, casses, encrassements ou tout autre bouchage de tubulures ou de spires de verre.

Comme nous l'avons vu, les résultats obtenus d'un type d'auto-analyseur à un autre ne sont pas complètement corrélés et il est important de toujours effectuer les dosages dans le même laboratoire. La fidélité intermédiaire de la technique, bien que nettement meilleure que celle des titrages, montre un coefficient de variation qui reste toutefois assez élevé (entre 5 à 20 % selon les études) (7) : les résultats restent en effet influencés par un certain nombre de facteurs : fraîcheur des hématies, précision des dilutions, température d'incubation, conditions environnementales...

Cette technique n'est pas applicable à la quantification des anti-Kell. En effet, les essais de dosage de ces anticorps par hémagglutination en flux continu ne se sont pas révélés probants : problème de reproductibilité, manque de corrélation avec les données cliniques. Ceci est probablement dû aux caractéris-

tiques intrinsèques des anticorps anti-Kell. Ces anticorps forment de fins agglutinats, qui se délitent facilement et qui sont parfois difficilement quantifiés par un œil non exercé, ce qui explique probablement la notion parfois rapportée que les anti-Kell peuvent être dangereux, quel que soit leur titre. Cette caractéristique un peu particulière des agglutinats induits par les anti-Kell est sans doute aussi à l'origine du manque de robustesse de la technique de dosage pondéral de ces anticorps par hémagglutination en flux continu.

En revanche, pour les anticorps du système RH, le dosage pondéral apporte une vraie valeur ajoutée en plus du titrage. Il détecte plus précocement les réactivations de l'immunisation (33). Il a également été montré que la concentration des anticorps maternels anti-D est corrélée à la bilirubinémie des premières heures de vie chez les nouveau-nés (33). Le dosage anti-D selon la technique « 1 temps » a, de plus, une tendance à être corrélé à la précocité de la survenue de l'anémie fœtale (33).

Concernant les anticorps anti-c, qui présentent en général un titre modéré du fait de leur affinité initiale souvent peu importante, la concentration établie par le dosage pondéral par la technique « 2 temps » permet de mieux apprécier le risque hémolytique post-natal. Pour un titre donné, plus la concentration en anticorps est élevée plus le risque d'une atteinte néonatale sévère augmente. De même, si le titre dépasse 4, le risque de développement d'une anémie fœtale sévère sera d'autant plus grand que la concentration en anticorps est élevée (données non publiées du Centre National de Référence).

Pour les anticorps anti-E, anti-e et anti-C, le dosage pondéral associé au titrage permet également une évaluation plus précise du risque de maladie hémolytique.

2) Les autres techniques de dosage pondéral et de détermination de la concentration des anticorps anti-érythrocytaires

Indications

À notre connaissance, elles ne sont pas actuellement utilisées en France. Elles ne mettent pas en jeu un processus d'hémagglutination. Leurs indications sont les mêmes que pour le dosage pondéral. Ces techniques peuvent toutefois être généralisées à d'autres spécificités d'anticorps, dont l'anti-Kell, du moment que l'on dispose d'hématies-test informatives. Des étalons internationaux n'existent que pour les anti-D et anti-c et les concentrations de ces anticorps peuvent être ainsi exprimées en UI/mL.

Méthodes

Les techniques ELISA

Il s'agit d'un dosage immuno-enzymatique sur un support solide (microplaque de 96 puits le plus souvent), dont il existe plusieurs variantes :

- Des hématies entières ou des bouts de membrane « intègres » sont fixés au fond des puits d'une microplaque. Le sérum des patientes, après une éventuelle dilution, est incubé directement dans la plaque à $37 \pm 2^\circ \text{C}$. L'ajout d'une antiglobuline liée à une enzyme (ELISA indirect) ou d'un autre anticorps spécifique de l'antigène lié à une enzyme (ELISA compétitif) permet, après addition du substrat, le développement d'une réaction enzymatique. Le substrat chromogène se transforme alors en un produit coloré dont il est aisé d'estimer, par colorimétrie, la concentration par comparaison avec une gamme étalon (47).
- D'autres techniques impliquant des étapes manuelles supplémentaires ont aussi été développées, comme le SOL-ELISA. Dans cet essai, qui a montré son intérêt pour les dosages de l'anti-D (48) et de l'anti-Kell (49), le sérum de la patiente est préalablement incubé à $37 \pm 2^\circ \text{C}$ avec une suspension d'hématies porteuses de l'antigène considéré. Après plusieurs lavages, la membrane des globules rouges sensibilisés est solubilisée par ajout de Triton X100 ou par élution acide. Les IgG (totales ou sous-classes) dans le lysat ou dans l'éluat sont ensuite dosées par ELISA indirect.

Les techniques en cytométrie de flux

Les hématies porteuses de l'antigène sont préalablement incubées à $37 \pm 2^\circ \text{C}$ en phase liquide (tube) en présence du sérum de la patiente. Une antiglobuline de type anti-IgG couplée à un fluorochrome est alors ajoutée au mélange réactionnel et il ne faut pas que celle-ci conduise à une hémagglutination. À cette fin, l'antiglobuline n'est pas le plus souvent une immunoglobuline complète mais du fragment Fab qui comprend les paratopes et porte donc la spécificité de l'anticorps. Le fragment Fc, duquel dépendent les caractéristiques fonctionnelles des anticorps dont la capacité à induire une agglutination, est absent. Grâce au flux, les hématies passent ensuite, l'une après l'autre, devant un laser qui excite le fluorochrome et induit l'émission d'une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle au nombre de molécules d'IgG fixées sur les globules rouges. Cette technique apporte ainsi plusieurs informations : non seulement le pourcentage d'hématies reconnues par les anticorps sériques de la patiente, mais aussi le

nombre moyen de molécules d'IgG fixées par globule rouge (50).

Interprétation des résultats

Comme pour l'hémagglutination en flux continu, une concentration peut être établie à l'aide d'une gamme et exprimée soit en UI/mL pour l'anti-D et l'anti-c si l'étalon international correspondant est utilisé, soit en unités arbitraires pour les autres spécificités d'anticorps. Les seuils critiques pour l'anti-D et l'anti-c sont similaires à ceux définis pour l'hémagglutination en flux continu. Pour les autres anticorps, les valeurs seuils restent à déterminer par chaque laboratoire selon son expérience.

Avantages et inconvénients

Les techniques ELISA comportent beaucoup d'étapes manuelles et sont assez laborieuses. Il semble très difficile d'arriver à conserver la conformation des antigènes membranaires dans les techniques indirectes et par compétition. Pour l'anti-D, les résultats obtenus par ELISA et hémagglutination en flux continu semblent corrélés, et les coefficients de variation sont similaires (48).

Les techniques de dosage par cytométrie de flux sont difficiles à mettre au point du fait de la difficulté à choisir l'anticorps secondaire marqué par le fluorochrome afin qu'il ne provoque pas une hémagglutination lors de la phase d'incubation. Elles sont également difficiles à standardiser car, selon les dilutions de sérum et la concentration de la suspension d'hématies utilisées, les résultats peuvent être très variables (50).

Les techniques ELISA et de cytométrie de flux ont toutefois l'avantage, par rapport à la technique d'hémagglutination en flux continu, de pouvoir doser de nombreuses spécificités d'anticorps et de différencier la proportion des sous-classes d'IgG. Une étude multicentrique (20 laboratoires) a comparé les résultats obtenus pour neuf sérums contenant un anti-D par dosage pondéral sur auto-analyseur, ELISA (par compétition) et cytométrie de flux : les concentrations trouvées étaient globalement bien corrélées et aucun test ne semblait supérieur à un autre (51).

3) Cas particulier du microtitrage anti-D

Indications

Le microtitrage est une technique mise en place en France à la fin des années 1990 à la suite de la généralisation de l'immunoprophylaxie Rh anténatale (ciblée en cas d'actes invasifs ou de traumatismes ; systématique à la vingt-huitième semaine d'aménor-

rhée) (7). Cette technique n'est applicable que pour l'anti-D et ne quantifie que des basses concentrations d'anticorps (en raison d'une perte de linéarité au-dessus de 24 ng/mL [6 UCHP/mL ou 0,12 UI/mL]). Elle permet de s'assurer du caractère « passif » des anti-D en comparant la concentration trouvée avec une concentration attendue, à l'aide d'abaques fondés sur la pharmacocinétique du médicament ou, au contraire, de dépister un début d'immunisation faible chez une patiente.

Méthode

Reposant sur le principe de l'hémagglutination, cette technique met en jeu des supports de type colonne/filtration et des hématies de phénotype D+C-E-c+e+ (RH:1,-2,-3,4,5) traitées par la papaine (« papainées »). Une alternative avec des hématies natives reste possible, notamment en cas d'auto-papaine pouvant induire une surestimation du résultat. Le phénotype des hématies-test est choisi de manière à ce qu'elles soient compatibles avec d'autres anticorps parfois associés à l'anti-D, comme l'anti-C ou l'anti-E. De cette manière ces anticorps (si on excepte l'anti-G) ne peuvent pas interférer dans le titrage.

Une solution de standard d'immunoglobulines anti-D (6 ng/mL [1,5 UCHP/mL ou 0,03 UI/mL]) si la technique utilise des hématies tests papainées ou 24 ng/mL [6 UCHP/mL ou 0,12 UI/mL] si elle recourt à des hématies-test natives) est diluée en série de raison deux dans les six puits du support colonne/filtration. Les sérums sont dilués de la même manière, dans une solution isotonique de chlorure de sodium, et les intensités de l'hémagglutination sont comparées. La concentration en anti-D est calculée en multipliant l'inverse de la dernière dilution réactive de l'échantillon avec la concentration de la dilution du standard ayant la même intensité de réaction (Figure 3).

Interprétation des résultats

Si la concentration en anti-D trouvée est inférieure ou égale à celle attendue d'après les abaques établis au vu de la pharmacocinétique des IgRh (7), il s'agit d'un anti-D « passif ». Si elle est supérieure, la présence d'une immunisation anti-D peut être évoquée ; l'évolution des concentrations sériques en anticorps permettra de le confirmer. Dans ce cas, il reste également important de prêter une attention particulière à l'identification des anticorps pour s'assurer de l'absence de potentielles interférences sur le résultat (présence d'une « auto-papaine » ou d'un autre anticorps). Cette technique a montré tout son intérêt pour les patientes de phénotype D négatif (RH:-1) en l'absence d'informations sur une éventuelle injection de

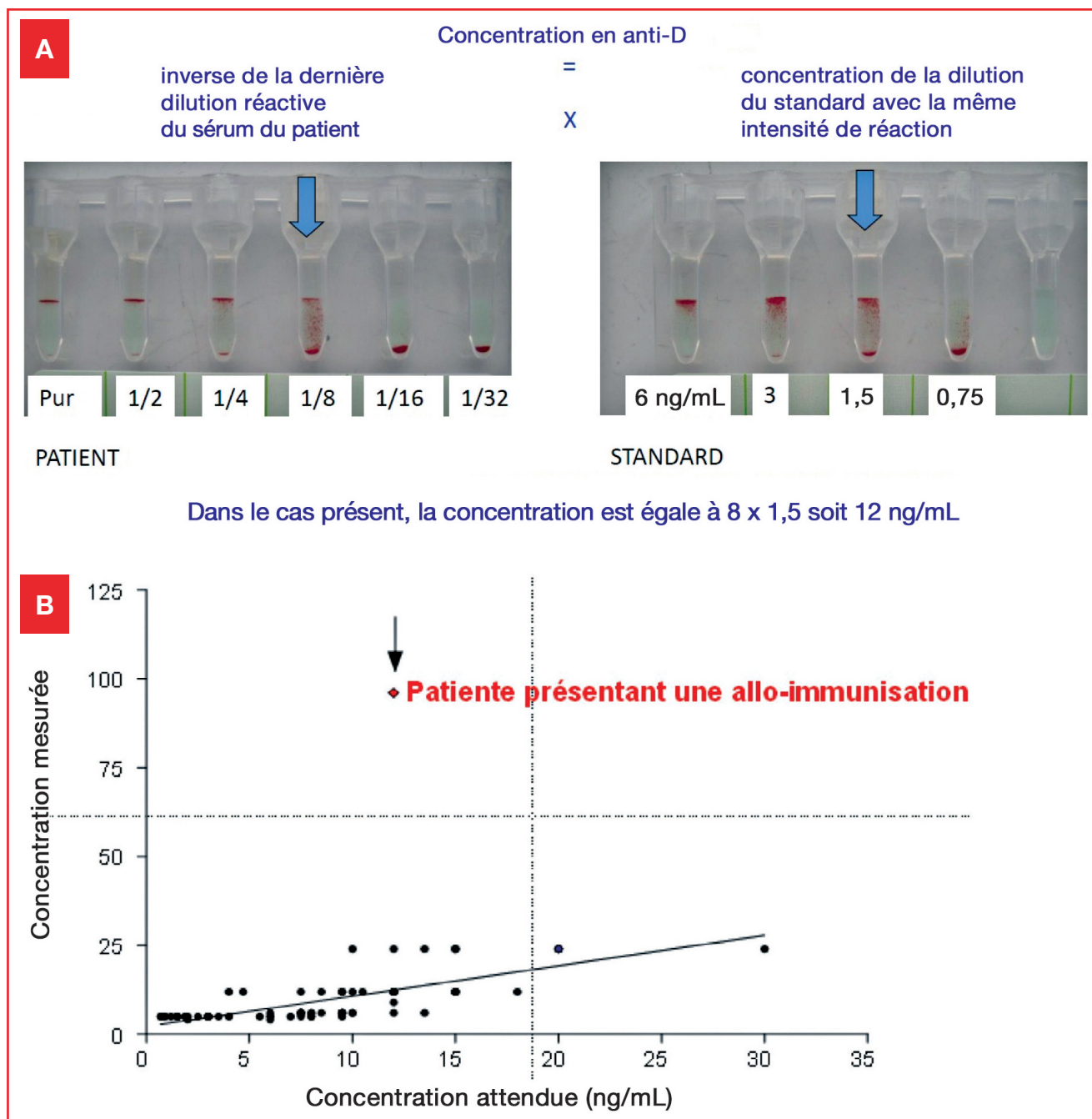


Fig. 3 - Microtitrage des anticorps anti-D : méthode de calcul de la concentration (A) et interprétation des résultats (B).

Rhophylac (immunoglobuline anti-D), et pour toute intensité de réaction incohérente par rapport à la date d'injection annoncée. Elle peut permettre de corriger des faux diagnostics d'« anticorps passifs » ou, plus rarement, des faux diagnostics d'immunisation (52).

Avantages et inconvénients

Cette technique présente peu d'inconvénients par rapport à sa valeur ajoutée car elle est facile à mettre en œuvre pour tout laboratoire d'immuno-hématologie et est automatisable, au moins pour la dilution et distribution des sérums et des hématies. Elle nécessite toutefois de disposer d'un étalon raccordé à l'étalon internatio-

nal, ce qui peut être l'élément limitant. Il reste recommandé, pour toute valeur trouvée ≥ 24 ng/ml, de compléter le microtitrage par un dosage pondéral pour avoir une valeur plus précise de la concentration (perte de linéarité).

C) Les tests fonctionnels cellulaires

1) Indications

Ces tests ont été développés dans les années 1980-1990 mais, du fait de leur pénibilité technique, ils ne sont quasiment plus utilisés dans un contexte de pré-

diction du risque de maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né, hormis en Hollande où le test de cytotoxicité, historique, est exécuté en première intention. Ils visent à mettre en évidence la capacité fonctionnelle des IgG maternelles ayant reconnu leurs antigènes sur les érythrocytes, à activer les monocytes/macrophages lors de leur fixation sur les récepteurs Fc. Différents types de tests existent, mesurant la cytotoxicité exercée par les monocytes vis-à-vis des globules rouges sensibilisés (ADCC – *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (53), la réponse métabolique des monocytes activés par production de dérivés de l'oxygène (CLT - *Chemiluminescence test*) (54) ou la phagocytose des hématies par les monocytes (MMA - *Monocyte monolayer assay*) (55) (Figure 4).

Méthodes

Le sérum de la patiente est mis au contact d'hématies porteuses de l'antigène correspondant à l'anticorps recherché et de monocytes isolés du sang de donneurs ou provenant d'une culture cellulaire (lignées). Dans le test ADCC, les hématies sont marquées par un radioélément (^{51}Cr) et l'intensité de la lyse cellulaire est appréciée par une mesure de la radioactivité libérée grâce à un compteur gamma. Le pourcentage de lyse est exprimé par rapport à une lyse maximale des hématies réalisée par un détergent (Triton X100). Dans le test CLT, les radicaux oxygénés résultant de l'activation des macrophages vont,

en présence de luminol, émettre une lumière mesurée à l'aide d'un luminomètre. La réponse lumineuse générée par les « puits échantillons » est divisée par la réponse lumineuse émise par les « puits contrôles négatifs » : le ratio ainsi obtenu est appelé index opsonique. Ce ratio peut être rapporté en pourcentage s'il est comparé au ratio du témoin positif, ce qui permet de limiter la variabilité des résultats inter-essais. Dans le test MMA, la proportion de monocytes ayant phagocyté des hématies est déterminée par microscopie : l'index phagocytaire correspond au nombre de globules rouges ingérés pour 100 monocytes.

Interprétation

Dans le cas du test ADCC, une lyse $> 3 \%$ est considérée comme positive ; $> 10 \%$, elle est associée à un risque hémolytique modéré et sévère à 20% . Dans le cas du test CLT, un index opsonique > 2 est associé à un risque de maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né. Un pourcentage de 5% est associé à un risque modéré et de 10% , à un risque sévère (54). Enfin, dans le test MMA, un index phagocytaire > 4 est considéré comme le seuil critique associé à un risque de développement d'une maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né sévère. Un pourcentage $> 20 \%$ de monocytes ayant phagocyté au moins un érythrocyte est également associé à un risque élevé de maladie hémolytique (56).

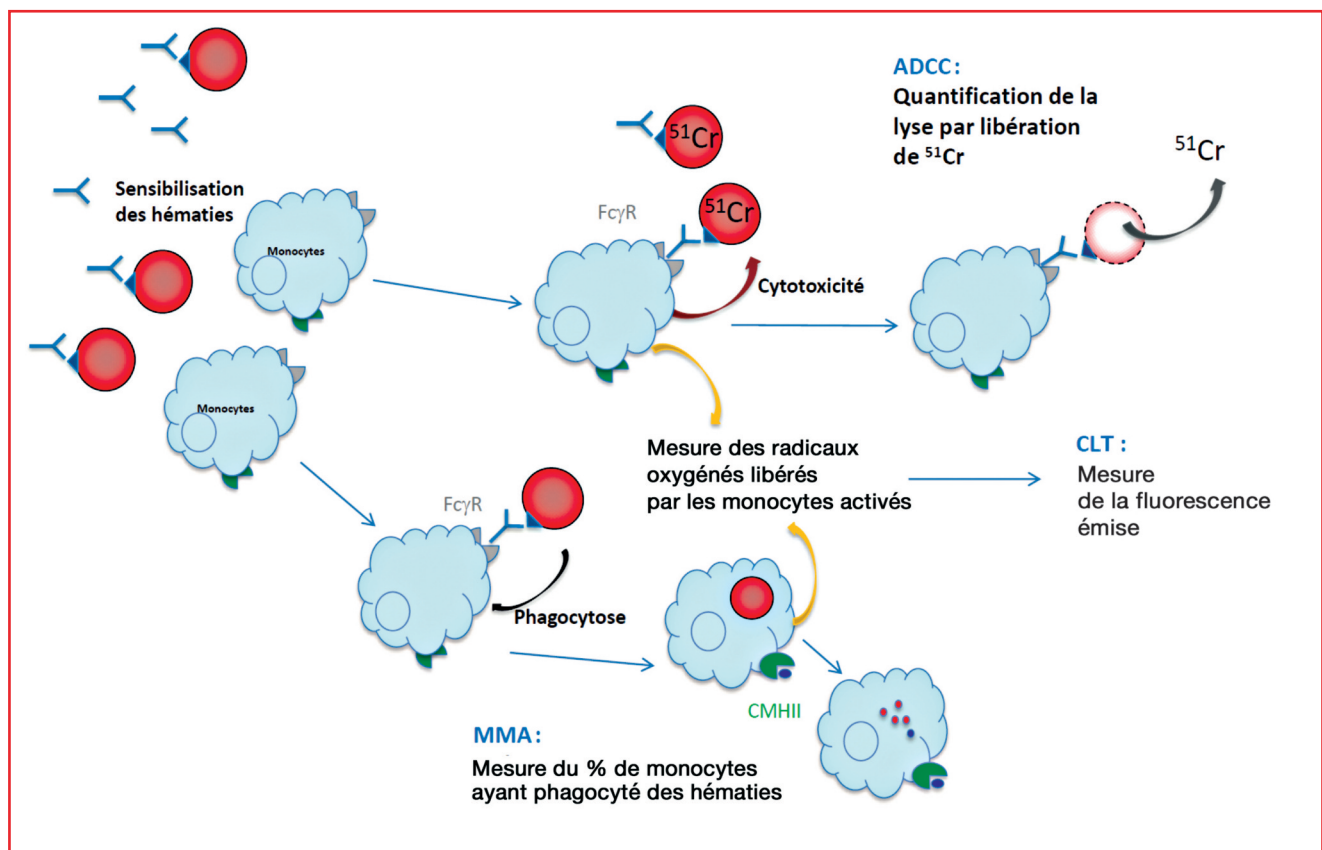


Fig. 4 - Principe des tests cellulaires ADCC, MMA et CLT.

Avantages et inconvénients

Les tests ADCC semblent les mieux corrélés à l'atteinte fœtale et néonatale (57). En effet, ils évaluent la capacité fonctionnelle des anticorps à induire la destruction des hématies par les monocytes/macrophages, ce qui permet une évaluation de plusieurs facteurs pouvant intervenir dans la physiopathologie de la maladie, contrairement à la simple quantification des anticorps. Le test CLT est une bonne alternative car il dispense de l'utilisation de radio-isotopes. Le test MMA semble un peu moins bien corrélé à l'atteinte fœtale et néonatale car il semble dépendre essentiellement des IgG3 et moins des IgG1 dont l'implication dans la physiopathologie de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né semble pourtant prépondérante (44).

On avait plus fréquemment recours à ces tests dans les années 80-90 car la surveillance clinique des cas « à risque » impliquait la réalisation d'actes invasifs, avec menace de perte fœtale et de réactivation de l'immunisation (amniocentèse et détermination de la bilirubinémie et de l'indice de Liley : ponction de sang fœtal et mesure du taux d'hémoglobine fœtale). On recherchait donc les tests biologiques les plus prédictifs du risque réel d'anémie fœtale sévère afin de limiter les actes invasifs aux patientes les plus à risque. Depuis les années 2000 et l'avènement du dépistage échographique de l'anémie fœtale sévère par des mesures hebdomadaires de la vitesse systolique maximale au niveau de l'artère cérébrale moyenne fœtale par échographie Doppler (4), ces tests cellulaires ont été progressivement abandonnés au profit du titrage, plus facile à mettre en œuvre.

IV. - CONCLUSION

De nombreux tests de quantification existent mais il n'y a pas de test biologique idéal permettant de prédire la sévérité de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né en raison de la complexité de sa physiopathologie impliquant des paramètres à la fois maternels, placentaires et fœtaux. Les tests de quantification ne sont informatifs que d'une partie du mécanisme, ce qui explique la très grande variabilité des tableaux cliniques observés pour un résultat donné. Ils ne peuvent être interprétés que par rapport à un seuil pour définir le risque d'anémie fœtale sévère, instaurer éventuellement une surveillance clinique et échographique spécifique de la grossesse et/ou orienter la patiente pour qu'elle accouche dans un établissement permettant une prise en charge adaptée de la maladie hémolytique du nouveau-né.

Les différentes techniques de quantification sont toutefois complémentaires ; comme nous l'avons vu, les résultats des titrages, des dosages pondéraux voire

des tests fonctionnels cellulaires, donnent des informations différentes qui, cumulées, permettent de mieux appréhender le risque global de maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né et sa sévérité.

Nous avons également évoqué le fait que, suite à la mise en place dans les années 2000 du dépistage non invasif de l'anémie fœtale sévère par mesure de la vitesse systolique maximale au niveau de l'artère cérébrale moyenne fœtale, par échographie Doppler, certains laboratoires avaient abandonné des techniques laborieuses (tests cellulaires mais aussi dosage pondéral par hémagglutination en flux continu) malgré leur intérêt (limitation du suivi par échographie Doppler aux seules patientes réellement à risque, détection plus rapide des réactivations d'immunisation et anticipation des transfusions fœtales ou de l'accouchement). Ainsi, aucun laboratoire français n'effectue aujourd'hui de test cellulaire et le nombre de laboratoires réalisant la technique de dosage pondéral par hémagglutination en flux continu est passé de 5 en 1991 à 2 après les années 2000.

Le titrage reste la technique de prédilection de par le monde en raison de la simplicité de son exécution et parce qu'elle permet de quantifier rapidement les anticorps anti-érythrocytaires, quelles que soient leurs spécificités, si l'on possède au moins une hématie-test informative, porteuse de l'antigène. Elle est également en pleine évolution avec l'arrivée de techniques automatisables, que ce soit sur support colonne/filtration ou par d'autres méthodes. Ces nouvelles techniques, encore peu éprouvées cliniquement, poseront tout de même la problématique des nouveaux seuils de risque à établir.

Au Royaume-Uni et en France, le dosage pondéral des anticorps anti-érythrocytaires par hémagglutination en flux continu reste utilisé. S'il se substitue complètement au titrage pour l'anti-D et l'anti-c au Royaume Uni, en France, il est effectué en complément du titrage afin de préciser le risque d'atteinte fœtale et néonatale (2). Cette technique n'est pas réalisée systématiquement, certains laboratoires ne l'envisageant que lorsque le titre de l'anticorps dépasse un certain seuil (8 pour l'anti-D et l'anti-E, 4 pour l'anti-c). L'arrêté de mai 2018 reste peu précis quant aux modalités du suivi immuno-hématologique de la femme enceinte. Si des recommandations ont été émises par le Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (3), il n'y a pas de titres seuils nationalement définis, ni de fréquence de titrage/dosage officiellement établie selon la spécificité de l'anticorps identifié, comme cela peut être le cas au Royaume-Uni. Un groupe de travail au sein de la Société Française de Transfusion Sanguine s'est récemment constitué et œuvre à harmoniser les pratiques et à établir des recommandations plus précises à ce sujet, au vu des données de l'expérience nationale et de la littérature.

Les dosages d'anticorps par ELISA et cytométrie de flux ne sont pas actuellement effectués en France. Ils se sont développés dans certains pays, comme ceux de Scandinavie qui n'utilisaient pas la technique d'héماغglutination en flux continu. À notre connaissance, seule la Hollande continue à effectuer des tests fonctionnels cellulaires « en routine » dans un contexte obstétrical. Ces tests restent toutefois intéressants et on pourra y avoir recours pour comprendre un tableau clinique non corrélé au titre de l'anticorps trouvé (maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né sévère et associée à un titre bas des anticorps maternels ou au contraire peu sévère et associée à un titre élevé).

Dans leur ensemble, ces tests de quantification restent incontournables pour le suivi des grossesses compliquées par une allo-immunisation anti-érythrocytaire. Ils doivent rapidement être mis en œuvre, dès

qu'un anticorps à risque est identifié chez une femme enceinte. Leurs résultats doivent être accompagnés d'une interprétation décrivant le risque fœtal et néonatal associé (2). De plus, des conseils pour le suivi clinico-biologique de la grossesse (fréquence des quantifications d'anticorps, nécessité ou non de mesurer la vitesse systolique maximale au niveau de l'artère cérébrale moyenne fœtale) et pour la prise en charge du nouveau-né (bilan d'incompatibilité à faire à la naissance, risque d'avoir recours à de la photothérapie intensive ou à des actes transfusionnels) doivent être formulés. Ils doivent être transmis, dans les plus brefs délais, à l'obstétricien qui suit la patiente, en fin de grossesse au pédiatre qui sera amené à prendre l'enfant en charge, et également à tous les intervenants de la chaîne transfusionnelle (2).

CONFLIT D'INTÉRÊT : aucun.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Haute Autorité de Santé. Recommandations professionnelles – Suivi et orientation des femmes enceintes en fonction des situations à risque identifiées – 2007 mise à jour 2016.
https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/suivi_des_femmes_enceintes_-_recommandations_23-04-2008.pdf
- (2) Arrêté du 15 mai 2018 fixant les conditions de réalisation des examens de biologie médicale d'immuno-hématologie érythrocytaire. *JORF* n°0116 du 23 mai 2018.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000036932278>
- (3) Huguet-Jacquot S, Toly-Ndour C, Cortey A, Carbonne B, Mailloux A. Diagnostic et suivi biologiques des allo-immunisations anti-érythrocytaires chez la femme enceinte. *Rev Fr Lab* 2015 ; **2015** (470) : 73-80.
- (4) Mari G, Deter RL, Carpenter RL, Rahman F, Zimmerman R, Moise KJ Jr, et al. Noninvasive diagnosis by Doppler ultrasonography of fetal anemia due to maternal red-cell alloimmunization. Collaborative Group for Doppler Assessment of the Blood Velocity in Anemic Fetuses. *N Engl J Med* 2000 ; **342** (1) : 9-14.
- (5) Carbonne B, Castaigne V, Cynober E, Levy R, Cortey A, Mailloux A, et al. Le point sur le suivi des allo-immunisations érythrocytaires. *Gynecol Obstet Fertil* 2010 ; **38** (3) : 205-13.
- (6) Cortey A, Mailloux A, Huguet-Jacquot S, Castaigne-Meary V, Macé G, N'Guyen A, et al. Incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires. *EMC Pédiatrie* 2012 ; **7** (3) : 1-22 [Article 4-002-R-25].
- (7) Brossard Y, Parnet-Mathieu F, Larsen M. Diagnostic et suivi prénatals des allo-immunisations anti-érythrocytaires. *Feuilles de Biologie* 2002 ; **XXXXIII** : 11-7.
- (8) Weiner CP, Widness JA. Decreased fetal erythropoiesis and hemolysis in Kell hemolytic anemia. *Am J Obstet Gynecol* 1996 ; **174** (2) : 547-51.
- (9) Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA, Roberts IA. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med* 1998 ; **338** (12) : 798-803.
- (10) Joy SD, Rossi KQ, Krugh D, O'Shaughnessy RW. Management of pregnancies complicated by anti-E alloimmunization. *Obstet Gynecol* 2005 ; **105** (1) : 24-8.
- (11) McAdams RM, Dotzler SA, Winter LW, Kerecman JD. Severe hemolytic disease of the newborn from anti-e. *J. Perinatol* 2008 ; **28** (3) : 230-2.
- (12) Macher S, Wagner T, Roskopf K, Reiterer F, Csapo B, Schlenke P, et al. Severe case of fetal hemolytic disease caused by anti-C(w) requiring serial intrauterine transfusions complicated by pancytopenia and cholestasis. *Transfusion* 2016 ; **56** (1) : 80-3.
- (13) Trevett TN Jr, Moise KJ Jr. Twin pregnancy complicated by severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-G and anti-C. *Obstet Gynecol* 2005 ; **106** (5) : 1178-80.
- (14) Hirose M, Nakanishi K, Kaku S, Moro H, Hodohara K, Aotani H, et al. Fetal hemolytic disease due to anti-Rh17 alloimmunization. *Fetal Diagn Ther* 2004 ; **19** (2) : 182-6.
- (15) Ranasinghe E, Goodyear E, Burgess G. Anti-Ce complicating two consecutive pregnancies with increasing severity of haemolytic disease of the newborn. *Transfus Med* 2003 ; **13** (1) : 53-5.
- (16) Bleile MJ, Rijhsinghani A, Dwyre DM, Raife TJ. Successful use of maternal blood in the management of severe hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Kp^b. *Transfus Apher Sci* 2010 ; **43** (3) : 281-3.
- (17) Al Riyami AZ, Al Salmani M, Al Hashami S, Al Mahrooqi S, Al Hinai S, Al Balushi H, et al. Successful management of severe hemolytic disease of the fetus due to anti-Jsb using intrauterine transfusions with serial maternal blood donations: a case report and a review of the literature. *Transfusion* 2014 ; **54** (1) : 238-43.
- (18) Lydaki E, Nikoloudi I, Kaminopetros P, Bolonaki I, Sifakis S, Kikidi K, et al. Serial blood donations for intrauterine transfusions of severe hemolytic disease of the newborn with the use of recombinant erythropoietin in a pregnant woman alloimmunized with anti-Ku. *Transfusion* 2005 ; **45** (11) : 1791-5.
- (19) Stanworth S, Fleetwood P, de Silva M. Severe haemolytic disease of the newborn due to anti-Js^b. *Vox Sang* 2001 ; **81** (2) : 134-5.
- (20) Li L, Huang L, Luo G, Luo Y, Fang Q. Prenatal treatment of severe fetal hemolytic disease due to anti-M alloimmunization by serial intrauterine transfusions. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2017 ; **56** (3) : 379-81.
- (21) Pitan C, Syed A, Murphy W, Akinlabi O, Finan A. Anti-S antibodies: an unusual

- cause of haemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). *BMJ Case Rep* 2013 ; **2013** : pii: bcr2012006547.
- (22) Adam S, Lombaard H. Autologous intrauterine transfusion in a case of anti-U. *Transfusion* 2016 ; **56** (12) : 3029-32.
- (23) Moncharmont P, Buclet D, Trouilloud C, Peyrard T, Rigal D. Severe hemolytic disease of the fetus and the newborn associated with anti-Vw (Vw). *J Matern Fetal Neonatal Med* 2010 ; **23** (9) : 1066-8.
- (24) Wu KH, Chang JG, Lin M, Shih MC, Lin H, Lee CC, *et al.* Hydrops foetalis caused by anti-Mur in first pregnancy - a case report. *Transfus Med* 2002 ; **12** (5) : 325-7.
- (25) Moise KJ Jr, Morales Y, Bertholf MF, Rossmann SN, Bai Y. Anti-Vel alloimmunization and severe hemolytic disease of the fetus and newborn. *Immunohematology* 2017 ; **33** (4) : 151-4.
- (26) Brooks S, Squires JE. Hemolytic disease of the fetus and newborn caused by anti-Lan. *Transfusion* 2014 ; **54** (5) : 1317-20.
- (27) Peyrard T, Pham BN, Arnaud L, Fleutiaux S, Brossard Y, Guérin B, *et al.* Fatal hemolytic disease of the fetus and newborn associated with anti-Jr^a. *Transfusion* 2008 ; **48** (9) : 1906-11.
- (28) Blackall DP, Pesek GD, Montgomery MM, Oza KK, Arndt PA, Garratty G, *et al.* Hemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Ge3: combined antibody-dependent hemolysis and erythroid precursor cell growth inhibition. *Am J Perinatol* 2008 ; **25** (9) : 541-5.
- (29) Ting JY, Ma ES, Wong KY. A case of severe haemolytic disease of the newborn due to anti-Di^a antibody. *Hong Kong Med J* 2004 ; **10** (5) : 347-9.
- (30) Michalewska B, Wielgos M, Zupanska B, Bartkowiak R. Anti-Co^a implicated in severe haemolytic disease of the foetus and newborn. *Transfus Med* 2008 ; **18** (1) : 71-3.
- (31) Ziprin JH, Payne E, Hamidi L, Roberts I, Regan F. ABO incompatibility due to immunoglobulin G anti-B antibodies presenting with severe fetal anaemia. *Transfus Med* 2005 ; **15** (1) : 57-60.
- (32) Goodrick MJ, Hadley AG, Poole G. Haemolytic disease of the fetus and newborn due to anti-Fy^a and the potential clinical value of Duffy genotyping in pregnancies at risk. *Transfus Med* 1997 ; **7** (4) : 301-4.
- (33) Toly-Ndour C, Mourtada H, Huguët-Jacquot S, Maisonneuve E, Friszer S, Pernot F, *et al.* Clinical input of anti-D quantitation by continuous-flow analysis on autoanalyzer in the management of high-titer anti-D maternal alloimmunization. *Transfusion* 2018 ; **58** (2) : 294-305.
- (34) Judd WJ ; Scientific Section Coordinating Committee of the AABB. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. *Transfusion* 2001 ; **41** (11) : 1445-52.
- (35) White J, Qureshi H, Massey E, Needs M, Byrne G, Daniels G, *et al.* Guideline for blood grouping and red cell antibody testing in pregnancy. *Transfus Med* 2016 ; **26** (4) : 246-63.
- (36) McKenna DS, Nagaraja HN, O'Shaughnessy R. Management of pregnancies complicated by anti-Kell isoimmunisation. *Obstet Gynecol* 1999 ; **93** (5) : 667-73.
- (37) Li P, Pang LH, Liang HF, Chen HY, Fan XJ. Maternal IgG anti-A and anti-B titer levels screening in predicting ABO hemolytic disease of the newborn: a meta-analysis. *Fetal Pediatr Pathol* 2015 ; **34** (6) : 341-50.
- (38) AuBuchon JP, de Wildt-Eggen J, Dumont LJ ; Biomedical Excellence for Safer Transfusion Collaborative ; Transfusion Medicine Resource Committee of the College of American Pathologists. Reducing the variation in performance of antibody titrations. *Arch Pathol Lab Med* 2008 ; **132** (7) : 1194-201.
- (39) Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, Bonifacio SL, Dorlhiac-Llacer PE, Chamone DA. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. *J Clin Lab Anal* 2004 ; **18** (5) : 255-8.
- (40) Finck R, Lui-Deguzman C, Teng SM, Davis R, Yuan S. Comparison of a gel microcolumn assay with the conventional tube test for red blood cell alloantibody titration. *Transfusion* 2013 ; **53** (4) : 811-5.
- (41) Moore BP. Automation in the blood transfusion laboratory: I. Antibody detection and quantitation in the technicon autoanalyzer. *Can Med Assoc J* 1969 ; **100** (8) : 381-7.
- (42) Brossard Y, Gosset M. Dosage pondéral des anticorps IgG anti-D. *Feuilles de Biologie* 1988 ; **XXIX** : 17-26.
- (43) Alie-Daran SJ, Dugoujon JM, Fournié A. Gm typing, IgG subclasses of anti-Rh(D) and severity of hemolytic disease of the newborn. *Vox Sang* 1992 ; **62** (2) : 127-8.
- (44) Garner SF, Gorick BD, Lai WY, Brown D, Taverner J, Hughes-Jones NC, *et al.* Prediction of the severity of haemolytic disease of the newborn. Quantitative IgG anti-D subclass determinations explain the correlation with functional assay results. *Vox Sang* 1995 ; **68** (3) : 169-76.
- (45) Howell P, Wainscoat JS, Peto TE, Gunson HH. Maternal anti-D concentrations and outcome in rhesus haemolytic disease of the newborn. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1982 ; **285** (6338) : 327-9.
- (46) Nicolaides KH, Rodeck CH. Maternal serum anti-D antibody concentration and assessment of rhesus isoimmunisation. *BMJ* 1992 ; **304** (6835) : 1155-6.
- (47) Thorpe SJ, Turner CE, Heath AC, Sands D. A competitive enzyme-linked immunoassay using erythrocytes fixed to microtitre plates for anti-D quantitation in immunoglobulin products. *Vox Sang* 2000 ; **79** (2) : 100-7.
- (48) Lambin P, Ahaded A, Debbia M, Lauroua P, Rouger P. An enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of IgG anti-D and IgG subclasses in the sera of alloimmunized patients. *Transfusion* 1998 ; **38** (3) : 252-61.
- (49) Ahaded A, Brossard Y, Debbia M, Lambin P. Quantitative determination of anti-K (KEL1) IgG and IgG subclasses in the serum of severely alloimmunized pregnant women by ELISA. *Transfusion* 2000 ; **40** (10) : 1239-45.
- (50) Austin EB, McIntosh Y. Anti-D quantification by flow cytometry: a comparison of five methods. *Transfusion* 2000 ; **40** (1) : 77-83.
- (51) Thorpe S J, Sands D, Rautmann G, Schöffner G. International collaborative study to evaluate methods for quantification of anti-D in immunoglobulin preparations. *Vox Sang* 2002 ; **83** (1) : 42-50.
- (52) Dupont M, Gouvitsos J, Dettori I, Chironi J, Ferrera V. Microtitration of anti-RH1 antibodies: interest in the follow-up of pregnant women. *Transfus Clin Biol* 2007 ; **14** (4) : 381-5. (Article en français).
- (53) Engelfriet CP, Overbeeke MA, Dooren MC, Ouwehand WH, von dem Borne AE. Bioassays to determine the clinical significance of red cell alloantibodies based on Fc receptor-induced destruction of red cells sensitized by IgG. *Transfusion* 1994 ; **34** (7) : 617-26.
- (54) Hadley AG, Kumpel BM, Leader KA, Poole GD, Fraser ID. Correlation of serological, quantitative and cell-mediated functional assays of maternal alloantibodies with the severity of haemolytic disease of the newborn. *Br J Haematol* 1991 ; **77** (2) : 221-8.
- (55) Nance SJ, Nelson JM, Horenstein J, Arndt PA, Platt LD, Garratty G. Monocyte monolayer assay: an efficient noninvasive technique for predicting the severity of hemolytic disease of the newborn. *Am J Clin Pathol* 1989 ; **92** (1) : 89-92.
- (56) Hadley AG. A comparison of *in vitro* tests for predicting the severity of haemolytic disease of the fetus and newborn. *Vox Sang* 1998 ; **74** (Suppl 2) : 375-83.
- (57) Oepkes D, van Kamp IL, Simon MJ, Mesman J, Overbeeke MA, Kanhai HH. Clinical value of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assay in the management of Rh D alloimmunization. *Am J Obstet Gynecol* 2001 ; **184** (5) : 1015-20.