

## Score des titrages anti-D (RH1) et anti-c (RH4) en carte-gel sur l'automate IH-500 (Bio-Rad®) : corrélation avec les résultats du dosage pondéral

Cécile TOLY-NDOUR<sup>1</sup>, Jenny BEAUD<sup>1</sup>, Hélène DELABY<sup>1</sup>, Andréa ADIOGO<sup>1</sup>, Stéphanie HUGUET-JACQUOT<sup>1</sup>, Agnès MAILLOUX<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité Fonctionnelle d'expertise en Immuno-Hémobiologie Périnatale, Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP), Pôle de Biologie Médicale et Pathologie, Hôpital St Antoine, Paris, France

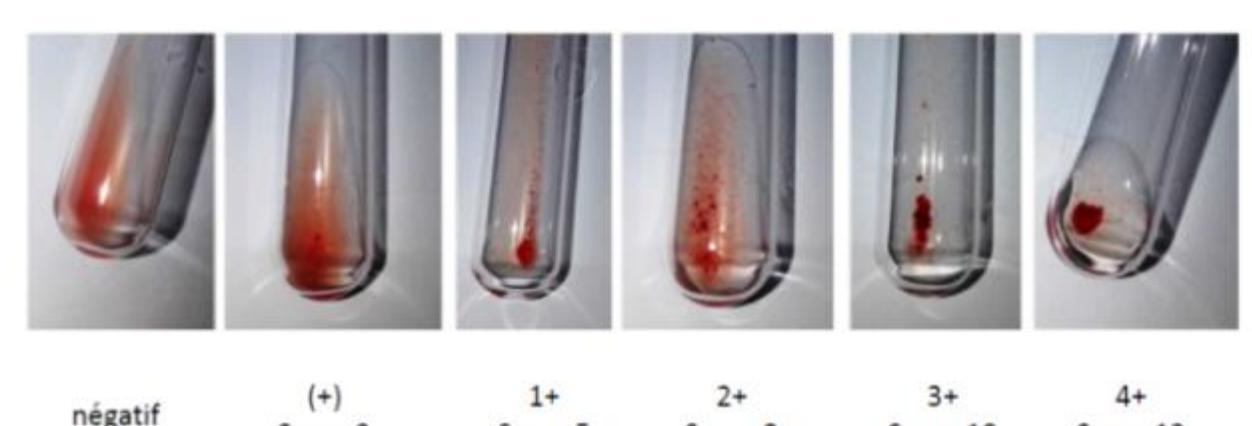
**Contexte:** En France, pour les grossesses compliquées par une allo-immunisation anti-D (RH1) ou anti-c (RH4), la réalisation d'un dosage pondéral est recommandée en complément du titrage en test indirect à l'antiglobuline pour préciser le risque d'atteinte hémolytique foetale et néonatale. Récemment, une méthode de titrage sur carte gel LISS Coombs a été développée sur l'automate IH-500 par la société Bio-Rad®.

**Objectifs:** Les scores de 29 échantillons anti-D (RH1) et de 20 échantillons anti-c (RH4) ont été calculés manuellement d'une part à partir d'une technique de titrage en tube en milieu salin semi-automatisée (technique réalisée en routine au CNRHP) et d'autre part à partir de la technique de titrage en carte gel Liss Coombs IgG sur l'automate IH-500. La concentration des anticorps a également été déterminée pour tous les échantillons par dosage pondéral avec une méthode d'hémagglutination en flux continu sur autoanalyseur (AMS Alliance Evolution III). Nous avons ensuite chercher à déterminer s'il existait une corrélation entre les scores anti-D et anti-c et la concentration en dosage pondéral (2 temps).

### Méthode de titrage en tube semi-automatisée (Tecan Evo Clinical Base) réalisée en routine au CNRHP

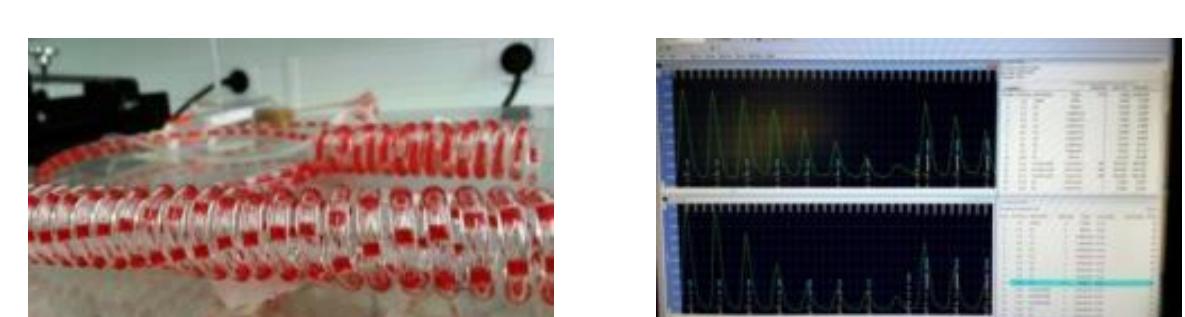
Dilutions automatisées de raison 2 du plasma/serum en NaCl 0,9%  
Ajout de la suspension d'hématies test à 4% dans du NaCl 0,9%  
Incubation (60 min à 37° C) / 3 lavages / Ajout de l'antiglobuline (Anti-IgG) (Diagast AGH Maestria IgG) / Centrifugation et remise en suspension  
Le titre en anticorps est défini comme l'inverse de la dernière dilution de l'échantillon capable d'induire une réaction d'hémagglutination visible macroscopiquement. Lecture en point final (+).

Calcul manuel des scores (Marsh):  
4+ = 12  
3+ = 10  
2+ = 8  
1+ = 5  
(+) = 2



### Dosage pondéral anti-D et anti-c par hémagglutination en flux continu sur autoanalyseur Alliance Evolution III

Méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne.  
Mesure indirecte de l'intensité de l'agglutination des hématies test bromélinées de phénotype RH1,2,3,4,5 induite dans le flux continu de l'autoanalyseur en présence des anticorps anti-D (RH1) ou anti-c (RH4) présents dans le plasma/serum des patients (méthode 2 temps avec de la polyvinyl pyrrolidone comme agent « inducteur de rouleaux »)  
Grâce à une gamme d'étalon international de l'OMS (01/572), la concentration en anti-D peut être déterminée en unités locales arbitraires (UCHP/ml) ou en UI/ml (250 UCHP/ml = 5 UI/ml) et la concentration en anti-c en UCHP/ml (conversion en équivalent UI/ml : 500 UCHP/ml ≈ 7,5 UI/ml)

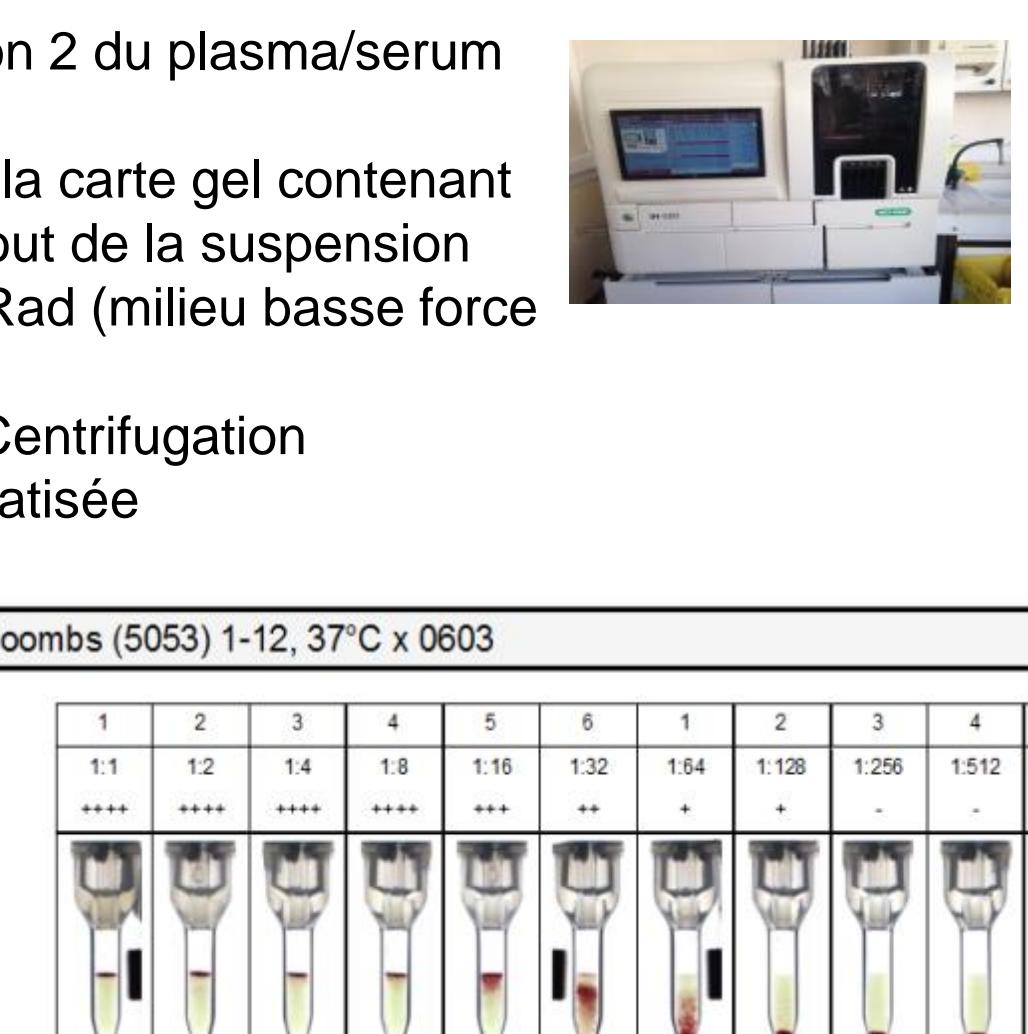


### Méthode de titrage en gel sur IH-500

Dilutions automatisées de raison 2 du plasma/serum en NaCl 0,9%  
Distribution des dilutions dans la carte gel contenant de l'antiglobuline anti-IgG et ajout de la suspension d'hématies test en diluant Bio-Rad (milieu basse force ionique (LISS))  
Incubation (15 min à 37° C) / Centrifugation  
Lecture en point final 1+ automatisée

Calcul manuel des scores (Marsh):

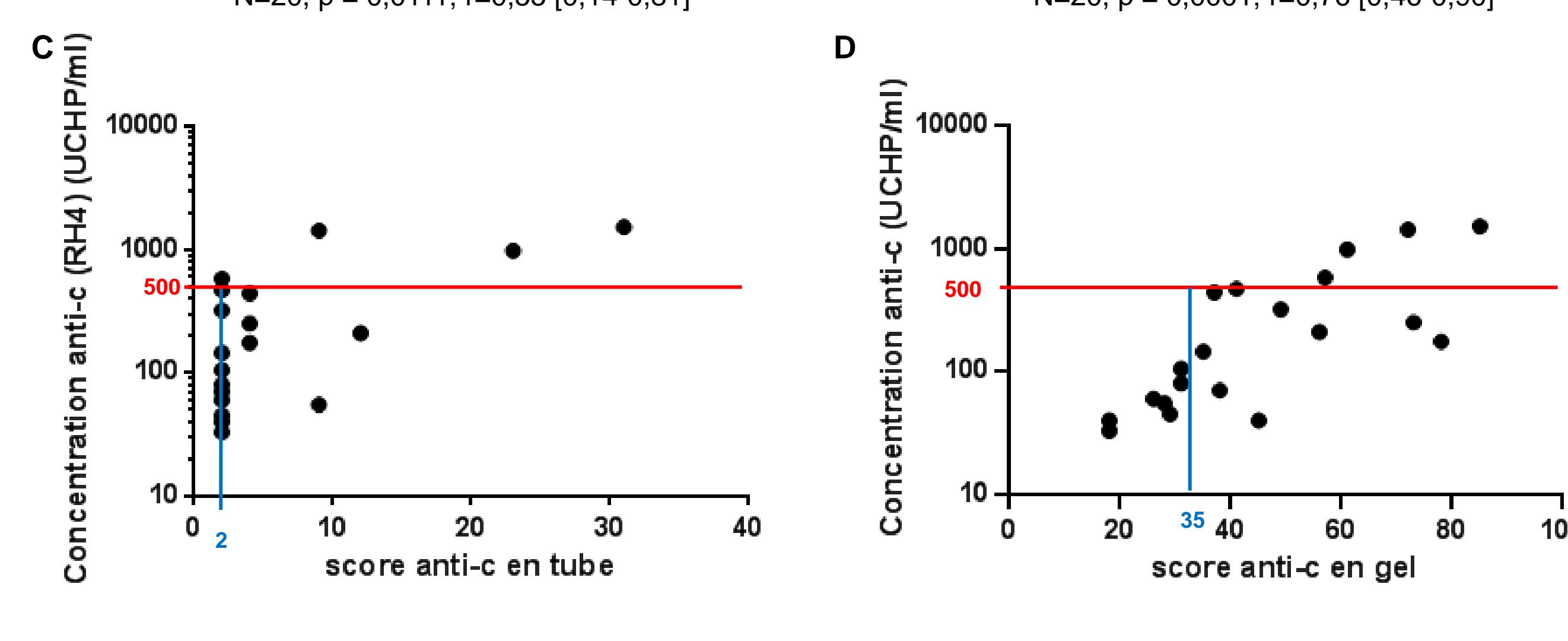
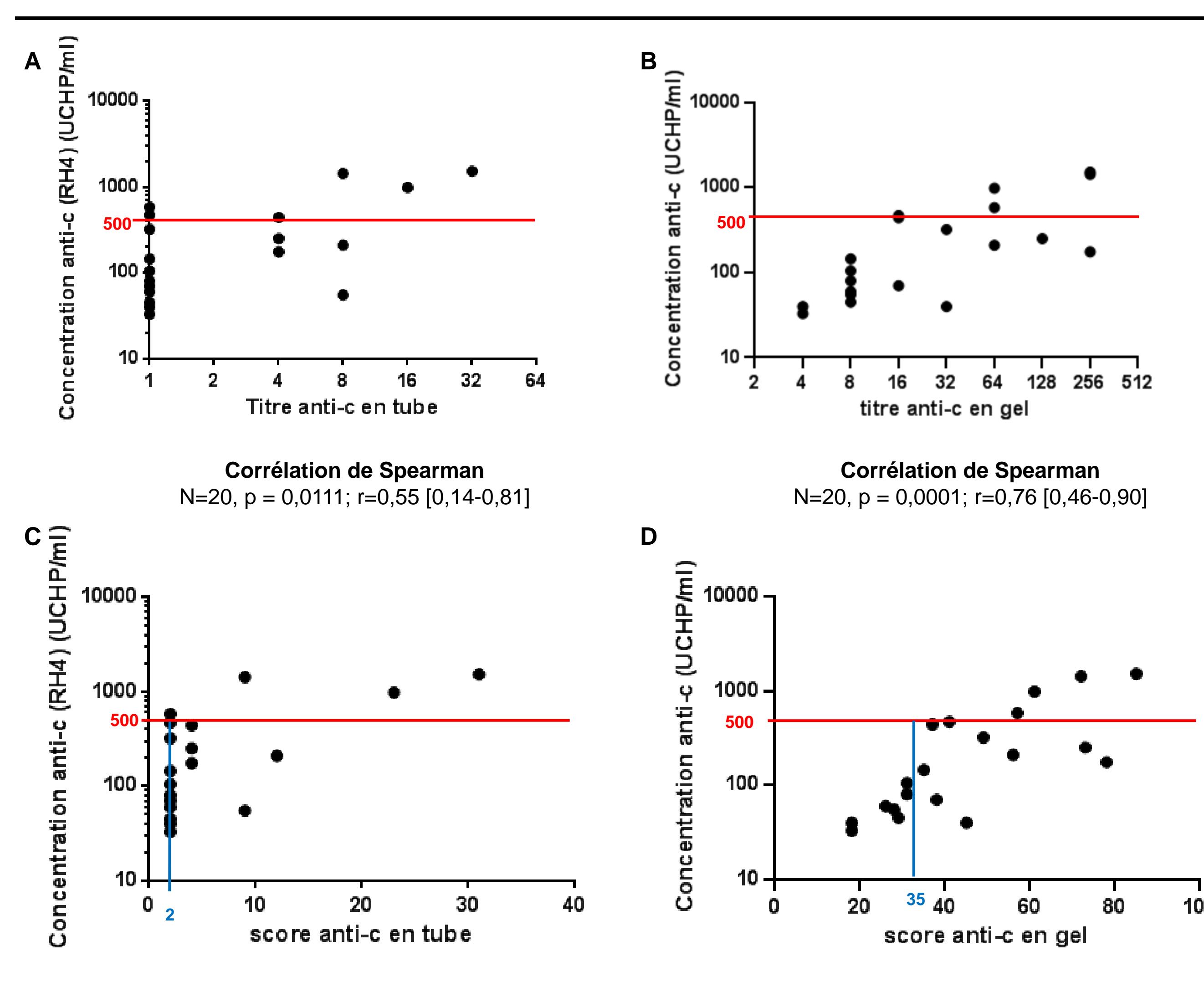
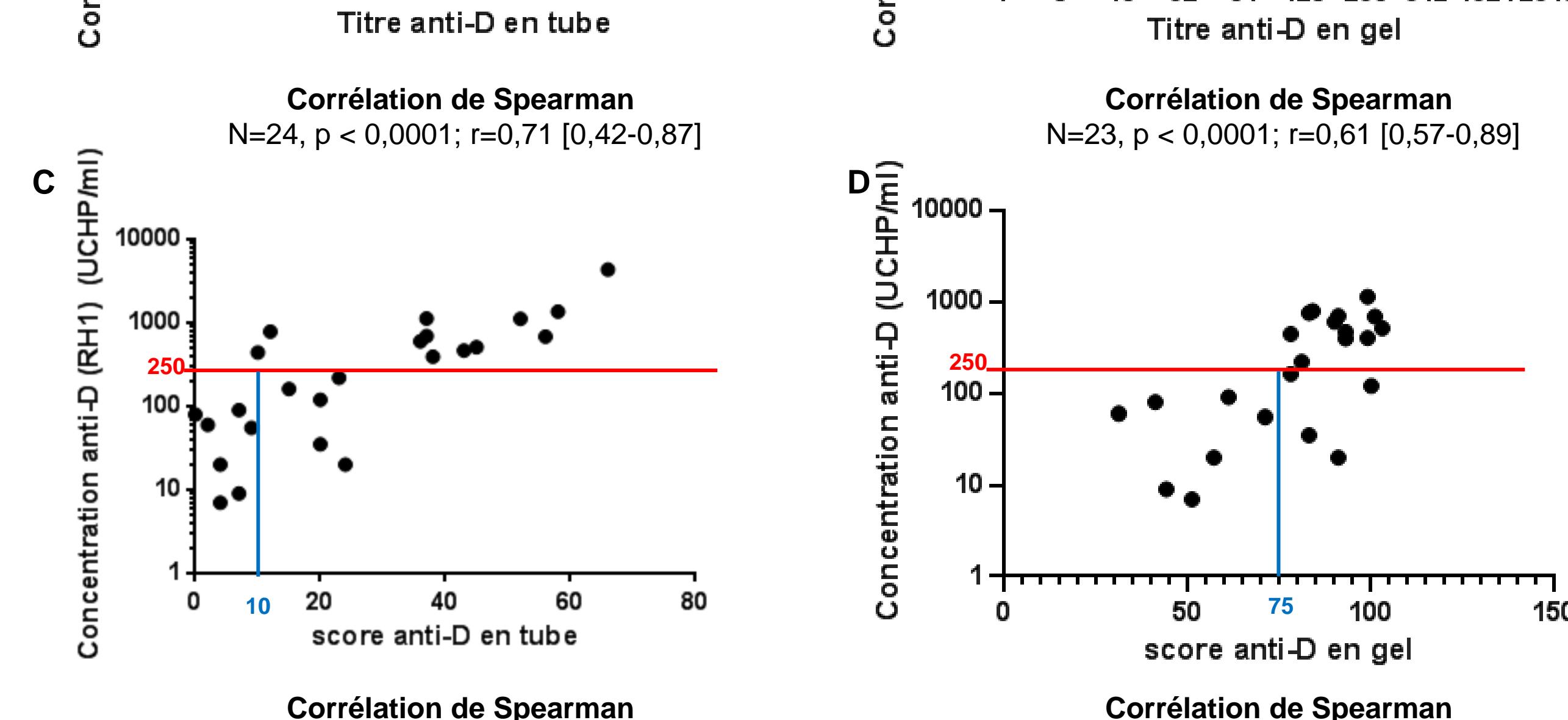
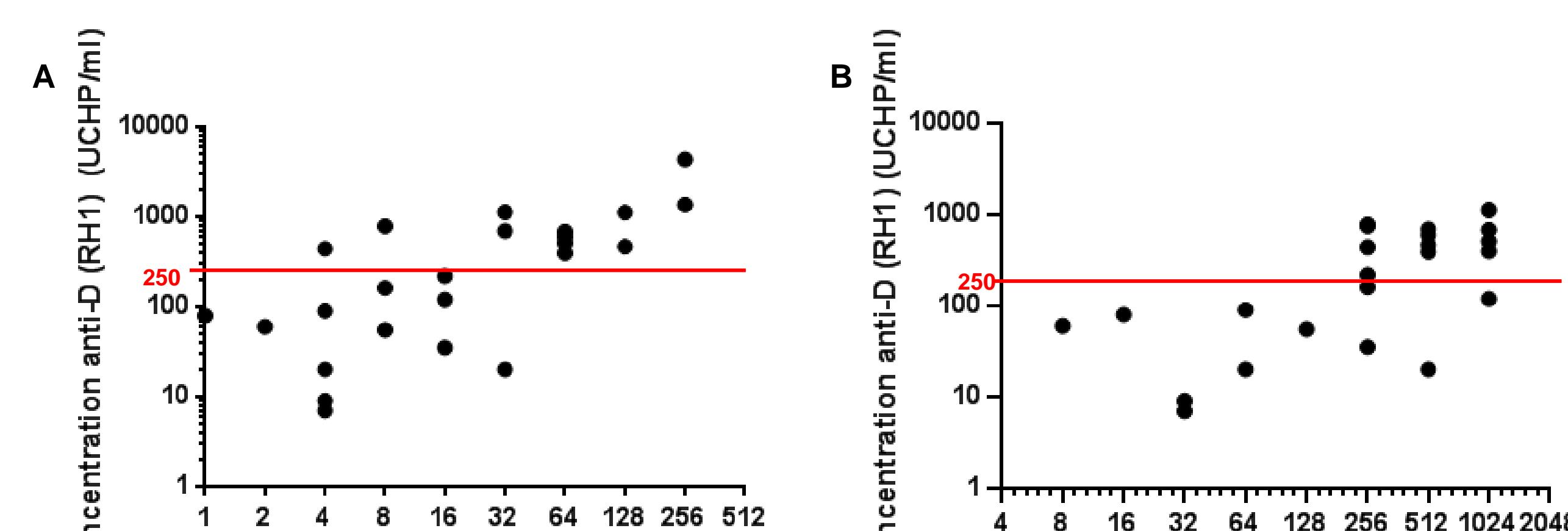
4+ = 12  
3+ = 10  
2+ = 8  
1+ = 5



### Résultats:

**Figure 1:** Corrélation entre les titres en tube [A] ou en gel [B] et entre les scores en tube [C] ou en gel [D] et les concentrations en anti-D (RH1) obtenues par dosage pondéral

Les échantillons avec des titres > 256 (tube) ou > 2048 (gel) n'ont pas été pris en compte



**Figure 2:** Corrélation entre les titres en tube [A] ou en gel [B] et entre les scores en tube [C] ou en gel [D] avec les concentrations en anti-c (RH4) trouvées par dosage pondéral

Les scores en tube et en gel sont corrélés de manière significative avec la concentration en anti-D ( $p < 0.0001$ ,  $r = 0.77$  and  $p < 0.0001$ ,  $r = 0.62$  respectivement).

Les correlations de Spearman entre les titres et les concentrations ont des coefficients "r" similaires ou légèrement plus bas mais il semble plus difficile d'extrapoler des titres seuils que des scores seuils à partir de la concentration seuil de 250 UCHP/ml.

Les scores seuils pour l'anti-D correspondant à la concentration seuil de 250 UCHP/ml (5 UI/ml) sont de respectivement 10 pour la technique tube et 75 pour la technique gel

Les scores en tube et en gel sont également corrélés de manière significative avec la concentration en anti-c ( $p < 0.0001$ ) mais les scores en gel ont un meilleur coefficient de corrélation que les scores en tube ( $r = 0.78$  versus  $0.55$ ).

Les corrélations de Spearman entre les titres et les concentrations montrent également un coefficient "r" plus important pour les titres en gel (0,76 versus 0,55 en tube). Comme pour l'anti-D, il est plus difficile d'extrapoler un titre seuil qu'un score seuil à partir de la concentration seuil en anti-c.

Les scores seuils pour l'anti-c correspondant à la concentration seuil de 500 UCHP/ml (équivalent 7,5 UI/ml) sont respectivement de 2 pour la technique tube et 35 pour la technique gel.

### Conclusion :

Le calcul du score à partir du profil d'hémagglutination fourni par l'IH-500 apporte une valeur ajoutée par rapport à la simple lecture du titre.

Pour les immunisations anti-c, les scores obtenus en technique gel sont plus discriminants que ceux obtenus en tube, et sont mieux corrélés aux valeurs de concentrations trouvées par dosage pondéral. Des scores seuils en gel ont été proposés à la fois pour l'anti-D et l'anti-c mais nécessitent d'être confirmés sur un plus grand nombre d'échantillons et d'être validés par des données de suivi clinique.