

## Titrage anti-D (RH1) en technique tube : Paramètres influençant les résultats du titre et du score

A. Adiogo<sup>1</sup>, S Huguet-Jacquot<sup>1</sup>, H Delaby<sup>1</sup>, A Mailloux<sup>1</sup> C Toly-Ndour<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

Le titrage par la méthode en tube en milieu salin (technique de référence) reste actuellement la méthode la plus utilisée en France pour quantifier les anticorps anti-érythrocytaires dans un contexte de grossesse. Des titres seuils ont pu être définis pour chaque spécificité d'anticorps pour déclencher un suivi échographique fœtal spécifique, à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale sévère. Cependant, cette méthode de titrage est assujettie à des variabilités intra- et interlaboratoires importantes.

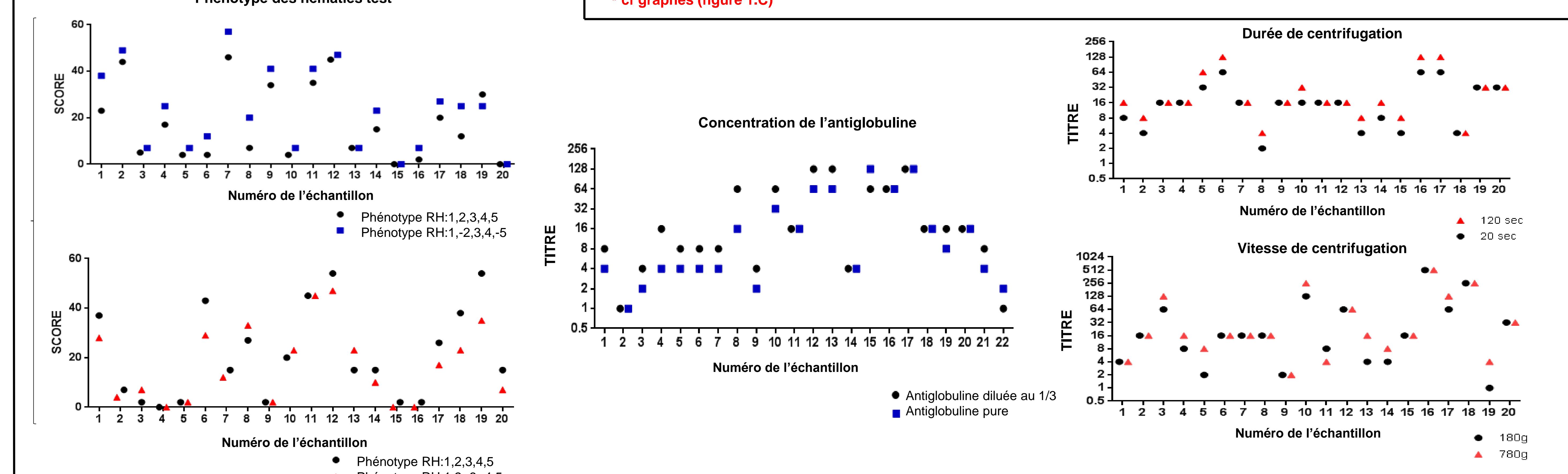
Le but de notre étude était de déterminer les facteurs qui pouvaient être à l'origine de ces variabilités, pour le titrage anti-D, tant au niveau des résultats du titre que du score. Nous avons réalisé des titrages en tube en faisant varier différents paramètres de manière unilatérale. L'impact de la concentration des hématies tests, de leur phénotype et de l'utilisation ou non d'un mélange, ainsi que l'impact de la concentration en antiglobuline, du temps d'incubation, de la vitesse de centrifugation, du délai de lecture après centrifugation et de la lecture du titre et du score par différents opérateurs ont été évalués.

**Figure 1: Impact de différents paramètres techniques sur les valeurs du titre et du score** A) méthode de titrage-score B) analyse statistique C) représentation graphique des résultats significatifs

A Méthode utilisée au laboratoire du CNRHP pour les titrages anti-D (RH1) en tube (paramètres en gras dans le tableau B)	
Dilutions automatisées de raison 2 des échantillons (Tecan Freedom Clinical Base) (dilution de départ : 100 µl d'échantillon + 100 µl de NaCl 0,9%)	
Hématies tests provenant d'un CGR phénotypé RH:1,2,3,4,5 (R1R2) datant de moins de 15 jours.	
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 (+)) :	
Score de Marsh :	
4+ = 12	
3+ = 10	
2+ = 8	
1+ = 5	
(+) = 2	

Paramètre testé	Test statistique apparié utilisé	Différence statistiquement significative des titres ( $\alpha=0,05$ )	Différence statistiquement significative des scores ( $\alpha=0,05$ )	Différence cliniquement significative des titres (différence de la moyenne supérieure à 1 dilution)	Conclusion
Concentration de la suspension d'hématies test : 2%/4%/6%	Friedman N=20	Oui * ( $p = 0,006$ )	Oui ( $p = 0,035$ )	Non	Les titres et les scores sont plus bas avec une suspension à 6%
Phénotype des hématies test RH:1,2,3,4,5 / RH:1,2,-3,-4,5	Wilcoxon N=20	Non ( $p = 0,06$ )	Oui * ( $p = 0,043$ )	Non	Les scores sont plus élevés avec les hématies test RH:1,2,3,4,5 (qui expriment plus d'antigène D)
Phénotype des hématies test RH:1,2,3,4,5 / RH:1,-2,3,4,-5	Wilcoxon N=20	Non ( $p = 0,07$ )	Oui * ( $p = 0,0002$ )	Non	Les scores sont plus élevés avec les hématies test RH:1,-2,3,4,-5 (qui expriment plus d'antigène D)
Pool de 3 hématies tests / Hématies test d'un seul donneur	Wilcoxon N=20	Non ( $p = 0,75$ )	Non ( $p = 0,63$ )	Non	Pas de différences
Temps d'incubation 45/60/75 min	Friedman N=20	Non ( $p = 0,12$ )	Oui ( $p = 0,045$ )	Non	Les scores sont légèrement plus élevés avec 75 min d'incubation
Concentration de l'antiglobuline Diluée au 1/3 / pure	Wilcoxon N=22	Oui * ( $p = 0,008$ )	Oui ( $p = 0,009$ )	Non	Les titres et les scores sont plus élevés avec l'antiglobuline diluée au 1/3.
Vitesse de centrifugation 180/500g	Wilcoxon N=20	Non ( $p = 0,13$ )	Oui ( $p = 0,014$ )	Non	Les scores augmentent avec la vitesse de centrifugation
Vitesse de centrifugation 180/780g	Wilcoxon N=20	Oui * ( $p = 0,016$ )	Oui ( $p = 0,003$ )	Non	Les titres et les scores augmentent avec la vitesse de centrifugation
Durée de centrifugation 20/60sec (180g)	Wilcoxon N=21	Oui * ( $p = 0,002$ )	Oui ( $p = 0,023$ )	Non	Les titres et les scores augmentent avec la durée de centrifugation
Durée de centrifugation 20/120 sec (180g)	Wilcoxon N=21	Oui ( $p = 0,001$ )	Oui ( $p = 0,004$ )	Non	Les titres et les scores augmentent avec la durée de centrifugation
Délai avant la lecture : 0/5/10 min	Friedman N=20	Non ( $p = 0,88$ )	Non ( $p = 0,62$ )	Non	Pas de différence

\* cf graphes (figure 1.C)



**Figure 2. Détermination de la variabilité interopérateur du titrage. A) Protocole B) Analyse statistique C) Graphique**

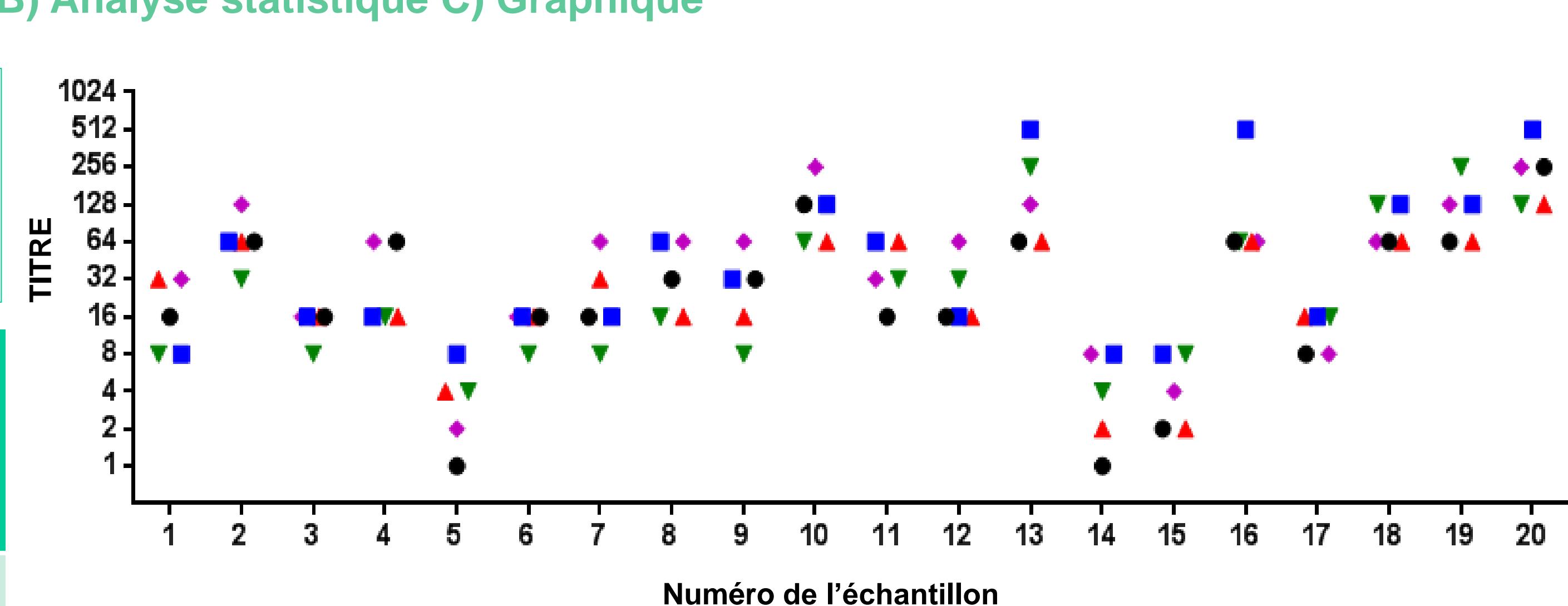
**A Protocole d'évaluation de la variabilité interopérateur :**

2 séries de 10 échantillons ont été testées par 5 opérateurs différents le même jour avec les mêmes hématies test suivant le protocole de titrage décrit ci-dessus.  
Pour chaque opérateur la codification des échantillons était différente. Les titres et les scores trouvés pour chaque échantillon par chaque opérateur ont été relevés.

	Test statistique apparié utilisé	Différence statistiquement significative dans la lecture des titres ( $\alpha=0,05$ )	Différence statistiquement significative dans la lecture des scores ( $\alpha=0,05$ )	Différence cliniquement significative dans la lecture des titres (moyenne s > 1 dilution)
Variabilité inter-opérateur	Friedman ( $p = 0,0006$ )	Oui ( $p = 0,01$ )	Oui	Non*

\* Pas de différence significative de la moyenne selon les opérateurs, mais pour un échantillon donné les titres peuvent différer de plus d'une dilution.

Dans ce contexte, au CNRHP, en l'absence de sérothèque, les titrages sont systématiquement effectués et lus par 2 opérateurs différents. En cas d'écart > 1 dilution entre les opérateurs, une 3<sup>ème</sup> lecture est effectuée par un 3<sup>ème</sup> opérateur.



**Réultats:** Les valeurs des titres et des scores anti-D étaient significativement impactés par 1) les concentrations de l'antiglobuline et de la suspension d'hématies test 2) le phénotype des hématies test, 3) le temps d'incubation, 4) la durée et la vitesse de la centrifugation et 5) la lecture par l'opérateur. L'impact de ces paramètres est faible, les différences sont souvent inférieures à 1 dilution et donc non significative cliniquement au vu de l'incertitude de mesure de la technique. L'usage d'hématies test poolées, et le délai de lecture après centrifugation ne semblent pas avoir d'impact sur les résultats des titrages anti-D.

**Conclusion:** Si plusieurs paramètres ont un impact mineur sur les résultats de titrage anti-D, leur effet cumulé pourrait induire des variations cliniquement significatives. Certains paramètres pourraient également avoir un impact plus marqué pour le titrage d'autres spécificités d'anticorps. L'utilisation d'une procédure détaillée, standardisée et une harmonisation de l'étape de lecture pourraient permettre de réduire les variabilités intra- et interlaboratoires.