

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

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

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

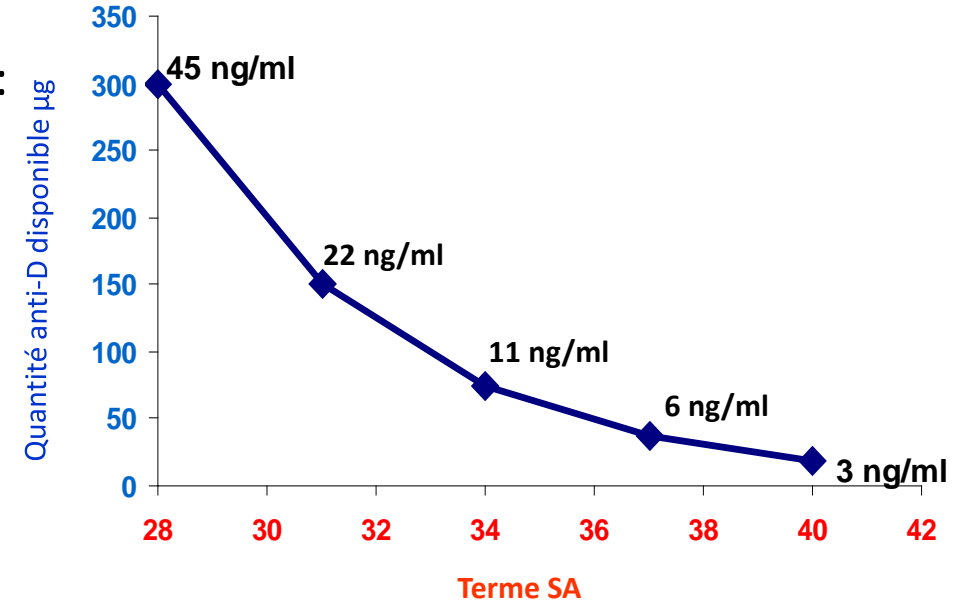


**4<sup>ème</sup> Journée « Yves Brossard »**  
d'hémobiologie fœtale et néonatale  
Vendredi 24 janvier 2025

# Prophylaxie Rh antenatale et positivité de la RAI pendant la grossesse

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

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

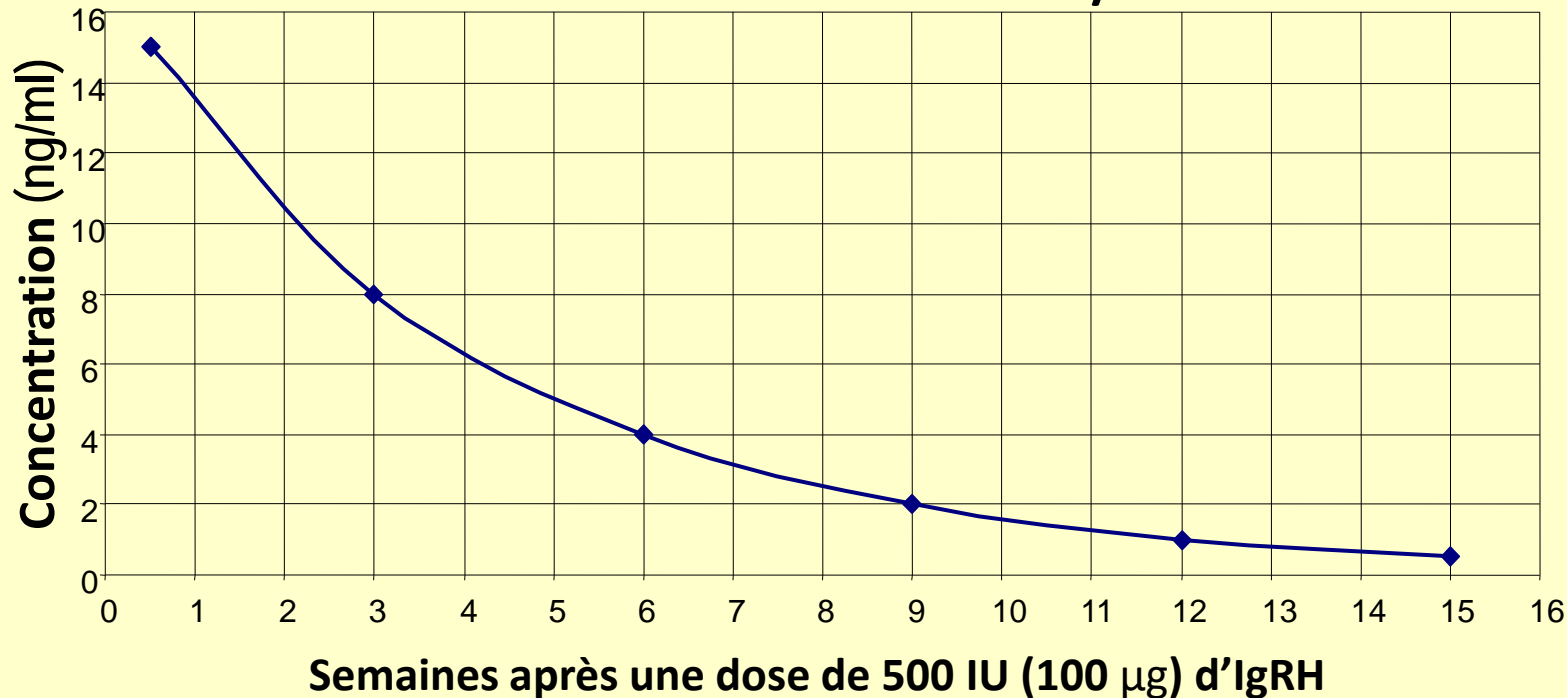


➤ **Malgré l'immunoprophylaxie des patientes peuvent s'allo-immuniser** (injection trop tardive par rapport à l'événement sensibilisant, hémorragie fœto-maternelle chronique de faible volume consommant les IgRH injectées au 3<sup>ème</sup> trimestre, HFM aigue de volume important mais cliniquement silencieuse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

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

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

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



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

# Concentration théorique en anti-D après administration d'IgRh

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

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

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







→ seuil de positivité approximatif sur hématies tests natives

→ seuil de positivité approximatif sur hématies tests papainées

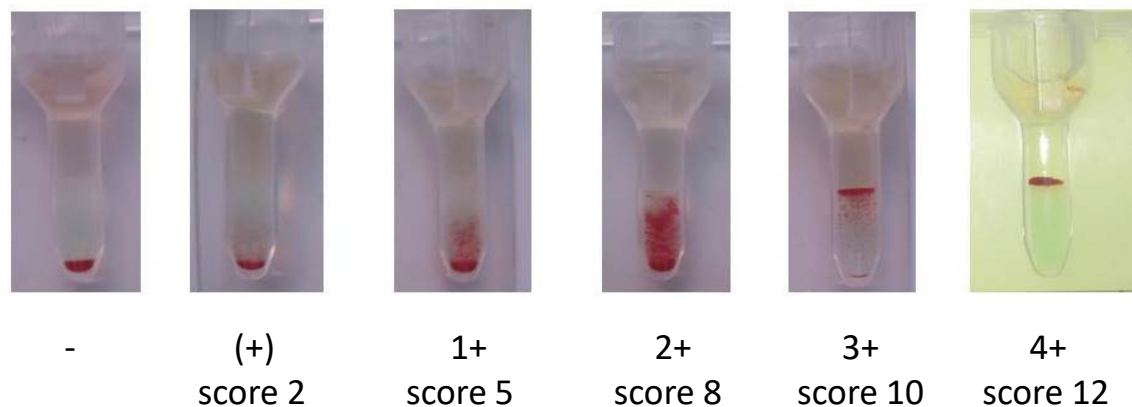
- **Approche quantitative importante dès le stade de l'identification des anticorps (RAI) en fonction du seuil de positivité des techniques et de l'intensité des réactions d'agglutination observées dans chaque puits positif**

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

## Plaques Capture R® (Werfen)

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

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



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

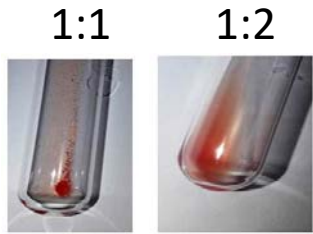


→ A chaque laboratoire de définir dans la technique qu'il utilise les seuils de positivité et les intensités des réactions attendues en fonction de la date et de la dose d'IgRh injectées

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

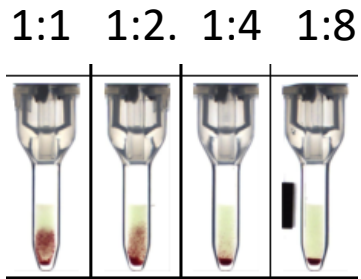
# Tests de quantification des anti-D

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



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

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



Score 8    8    2 = 18 / titre 4

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

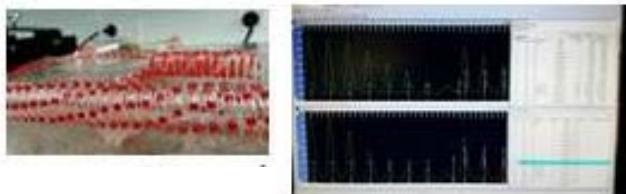
**Apport supplémentaire du score** (4+ = 12, 3+ =10, 2+ =8, 1+=5; (+) = 2)

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

**Intérêt : peut être automatisé.**

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

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



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

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

# Détermination de la concentration en anti-D

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

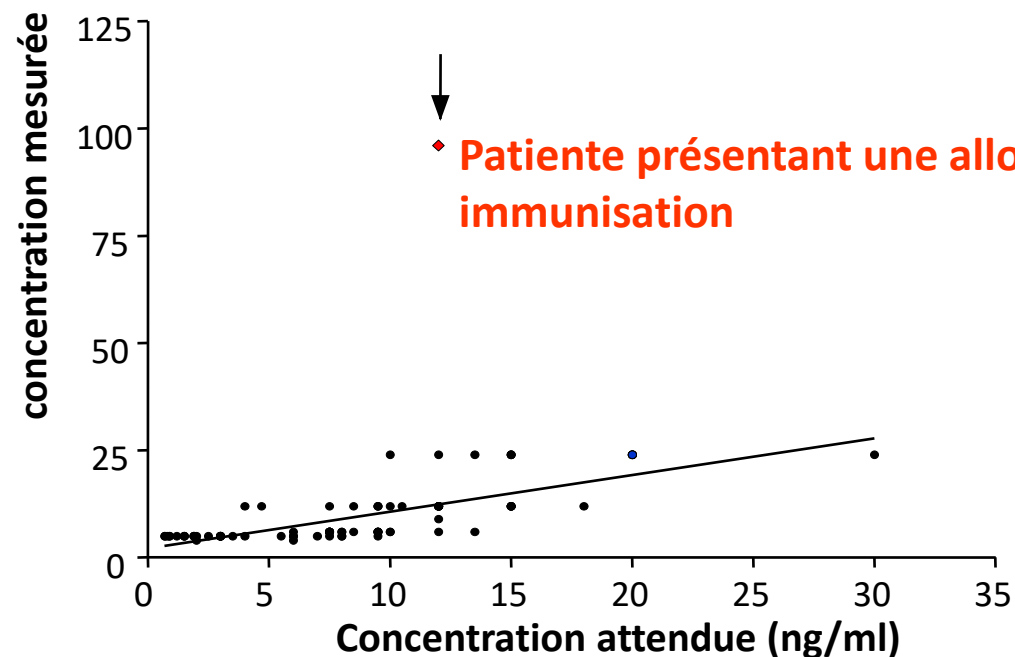


Anti-D concentration =  $\frac{\text{Inverse de la dilution de la dernière réaction positive de l'échantillon}}{\text{Concentration de l'étalon dans le puit présentant la même réactivité}}$  X

*Brossard Y Feuillet de Biologie 2002*

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

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



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

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

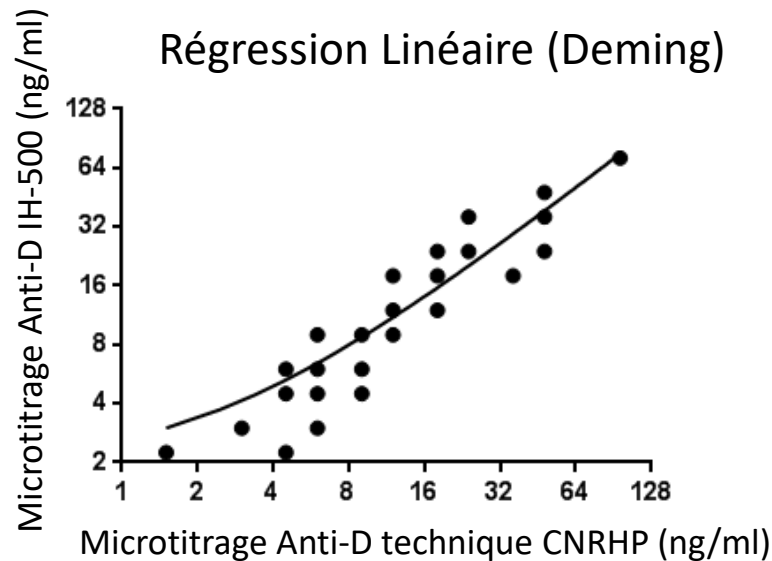
**Développement démarré depuis 2018 sur certains automates d'IH des fournisseurs en France qui ont développé le titrage**

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

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

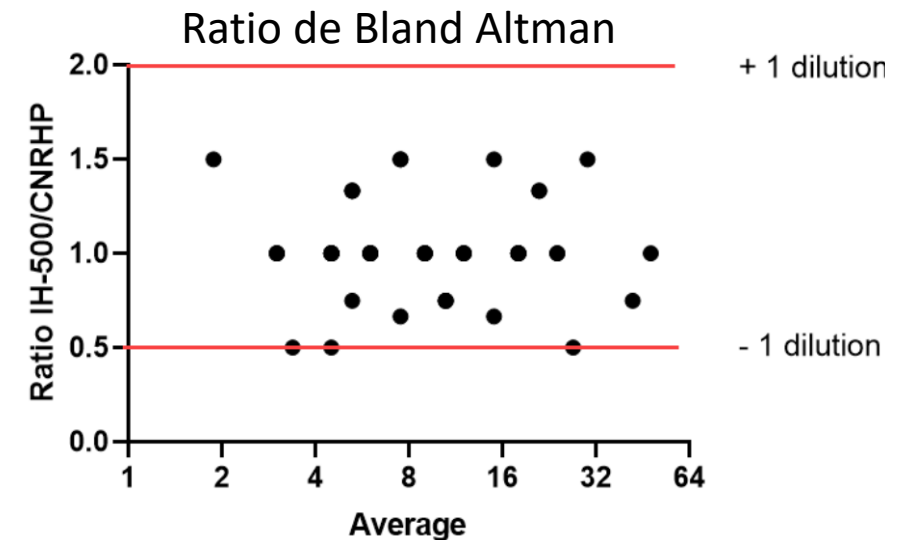
Adaptation du test développé par Bio-Rad pour le titrage des anticorps sur IH-500 à un test de microtitrage sur hématies D+ papainées en carte gel (protocole calqué sur celui décrit par Y Brossard en 2002)

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



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

→ très bonne corrélation entre les 2 techniques



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

→ pas de biais majeur entre les 2 méthodes

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



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

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

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

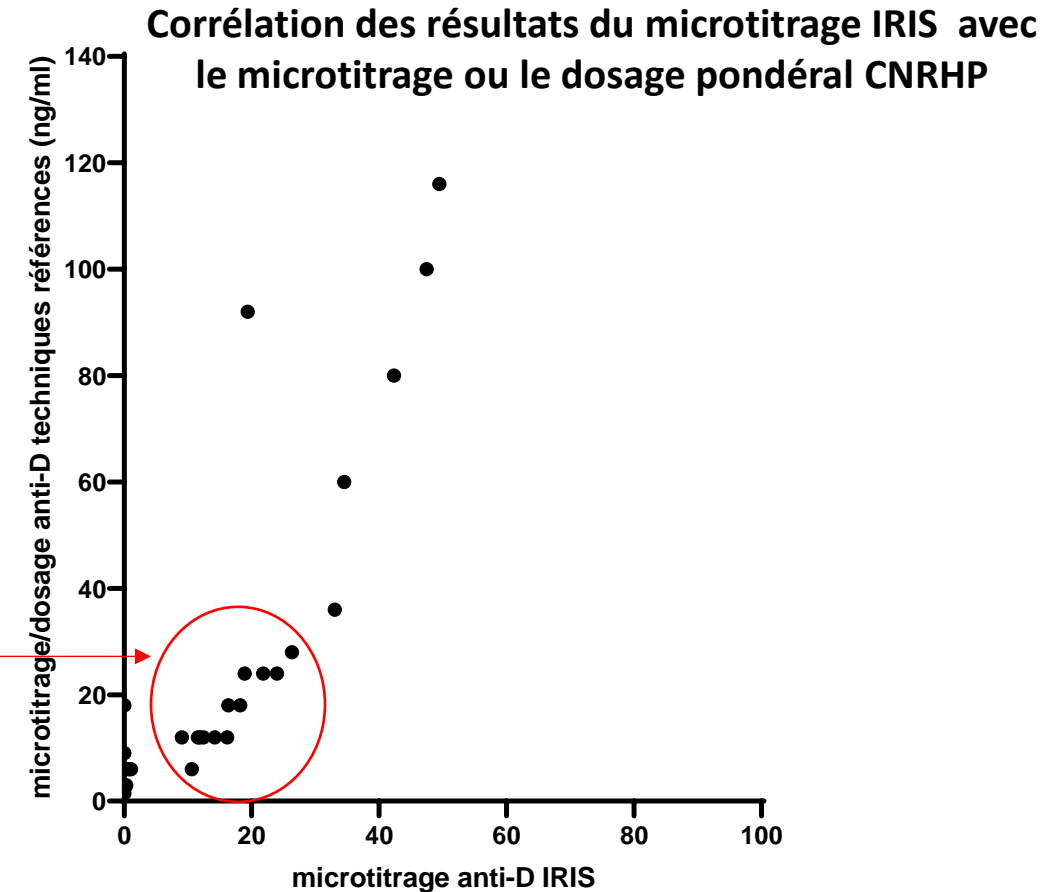
*Exemple:*

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

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

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

Développements et études supplémentaires nécessaires.



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

# Technique de microtitrage sur Vision MAX (Quidel Ortho)

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

## Autres automates ?

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

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

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

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

# Conclusion

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

# Remerciements

**DMU BioGeM (Pr R. LEVY)**

**LBM EST PARISIEN (Dr M. VAUBOURDOLLE)**

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

**Techniciens / réceptionnistes / secrétaires / ingénieurs /cadre**

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

**LBU Saint-Antoine : Techniciens et Biologistes**

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

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

**Permanence médicale du CNRHP**

**Infirmières**

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

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

**SF coordinateur : B. LAFON, I. REGNIER**

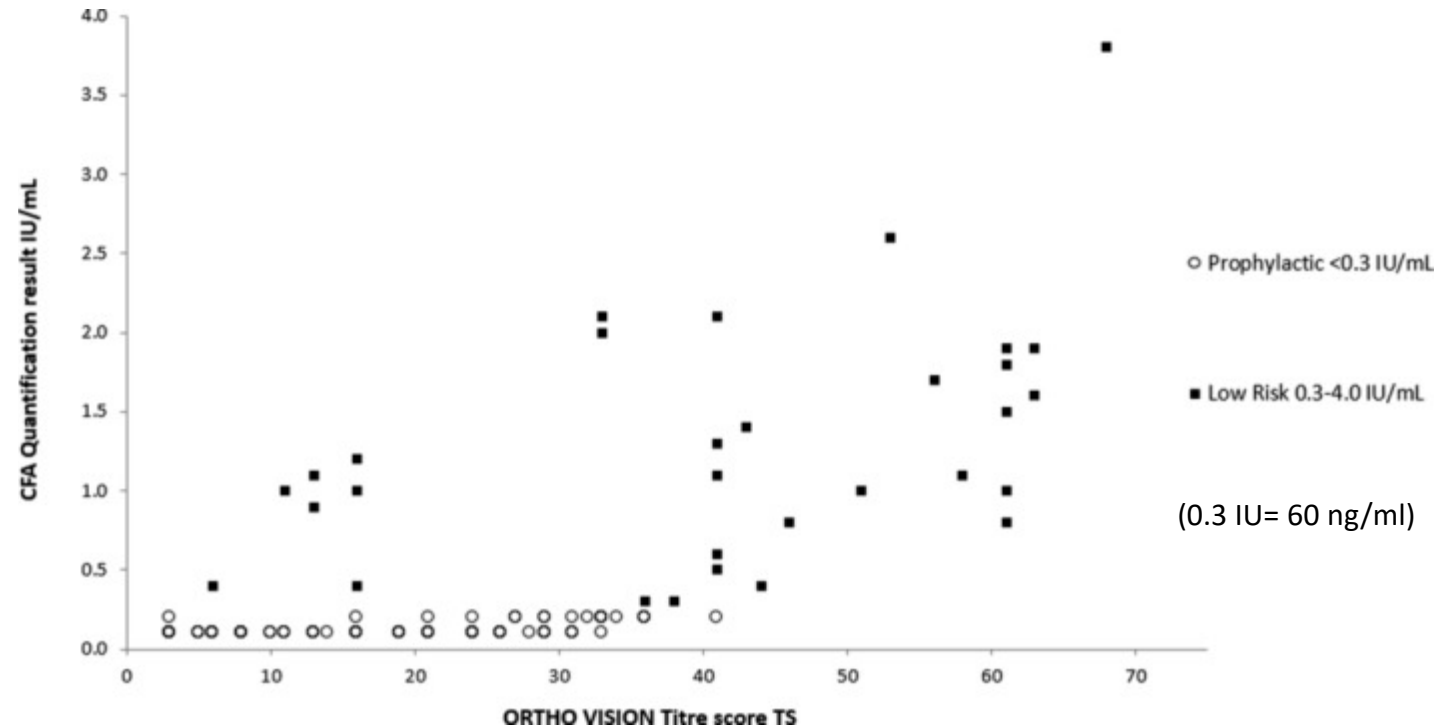


# Utilisation du titrage - score sur Vision MAX (Quidel Ortho)

Etude publiée:

*Transfus Med 2020 Evans ML et al.*

Approche anglo-saxonne



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