

EVALUATION DU STANDARD ANTI-D DE L'INSTITUT DE BIOTECHNOLOGIES JACQUES BOY (IBJB) POUR LA TECHNIQUE DE MICROTITRAGE ANTI-D CHEZ LA FEMME ENCEINTE

Jenny BEAUD¹, Stéphanie HUGUET-JACQUOT¹, Cécile TOLY-NDOUR¹, Elodie MAENULEIN¹, Alamouta MACALOU¹, Agnès MAILLOUX¹.

¹Service d'hémiobiologie fœtale et périnatale (CNRHP) - DMU BioGeM - AP-HP - Sorbonne Université Site Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg St Antoine 75012 PARIS

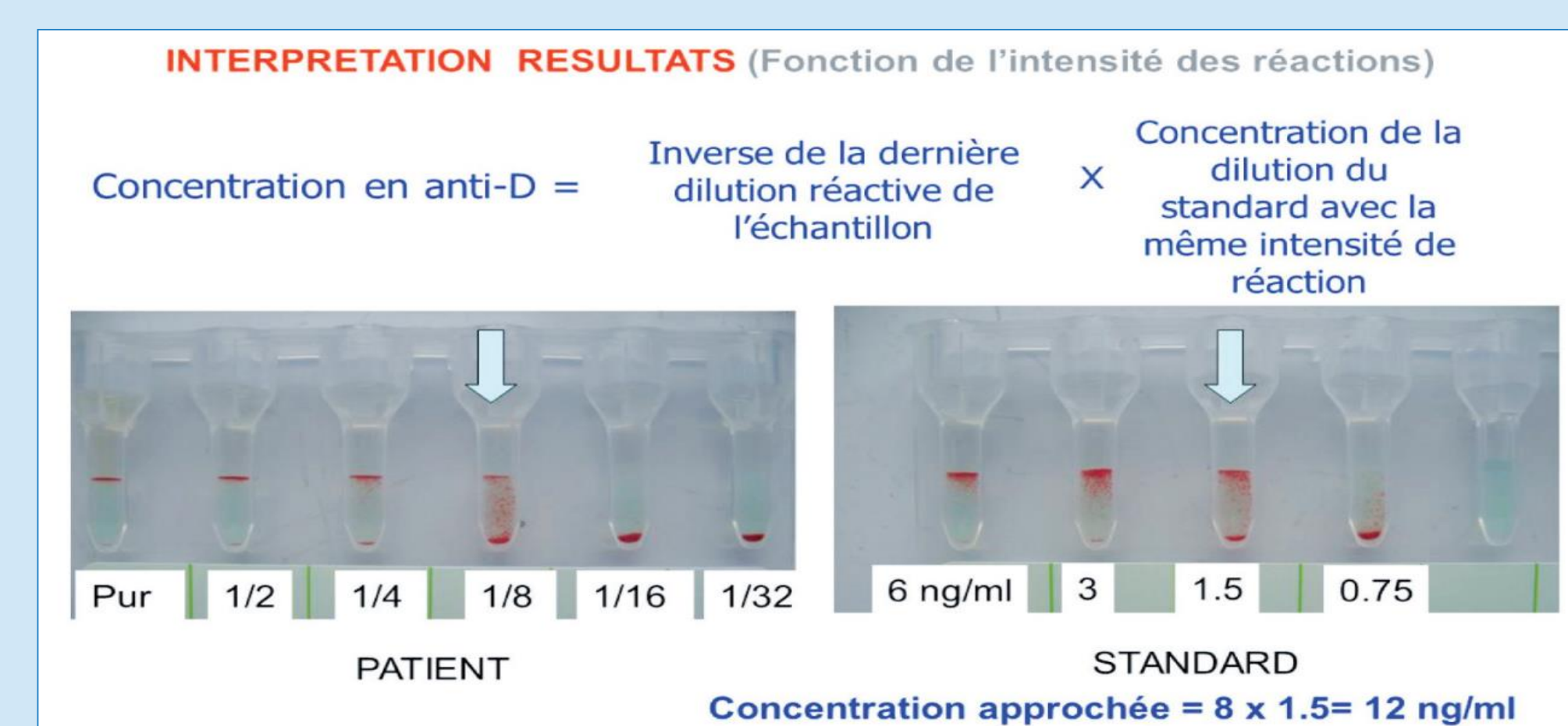
Contexte : Le microtitrage anti-D (MT) est un titrage en test indirect à l'antiglobuline (TIA) en support gel sur hématies-tests papainées RH:1,-2,-3,4,5 (R0r). Il permet de quantifier les faibles taux d'anti-D grâce à une gamme de standard anti-D polyclonal (STD CNRHP) préparé à partir de Rhophylac® et remis à la concentration de 24ng/ml (6UCHP/ml) dans du sérum AB (concentration raccordée au standard anti-D international de l'OMS 16-332).

Chez la femme enceinte RH:-1, en cas de prophylaxie par injection de gammaglobulines anti-D (IgRH), le MT est la seule technique qui distingue de manière précise, en comparant la concentration obtenue à celle attendue, la nature passive résiduelle de la nature immune d'un anti-D faible. C'est également un outil indispensable d'aide au conseil d'adaptation posologique des IgRH dans le cadre de la prophylaxie ciblée au cours de la grossesse (en cas d'hémorragie fœto-maternelle) et à l'accouchement.

L'Institut de Biotechnologies Jacques Boy a développé un standard anti-D polyclonal (STD IBJB). L'objectif de l'étude était d'évaluer l'utilisation de ce standard dans la technique de MT du CNRHP. Le STD IBJB nous a été fourni sous forme lyophilisée. Sa concentration après reconstitution dans 1 ml d'eau PPI était de 1µg/ml.

Technique de MT réalisée au CNRHP

- TIA en carte gel Bio-Rad® LISS/Coombs anti-IgG+C3d
- Semi-automatisée sur Evo Clinical Base TECAN (dilutions et distributions)
- Standard et échantillons techniques en parallèle :
 1. Gammes de dilutions géométriques de raison 2 dans du NaCl 0,9% :
 - 4 dilutions pour le STD (du 1/4 au 1/32)
 - 6 dilutions des plasmas de patientes (du pur au 1/32)
 2. 25µL de chaque dilution mis en contact avec 50µL d'hématies-tests papainées R0r 0,8%
 3. Incubation, centrifugation
 4. Lecture macroscopique des intensités de réactions d'hémagglutination
 5. Calcul de la concentration en anti-D



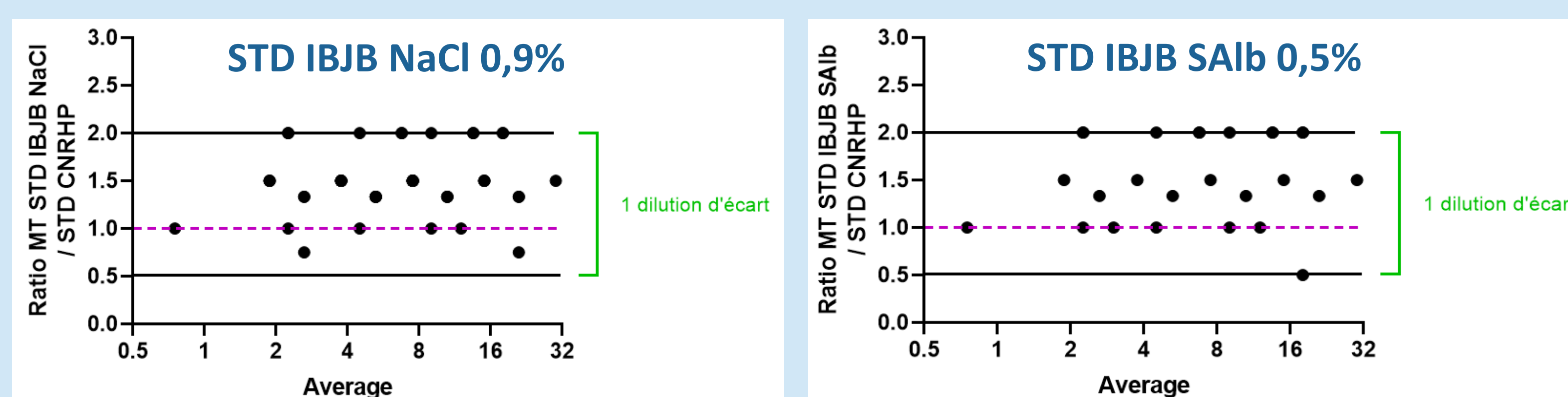
D'après Stéphanie Huguet-Jacquot et al, Diagnostic et suivi biologiques des allo-immunisations anti-érythrocytaires chez la femme enceinte, Revue Francophone des Laboratoires, 2015.

Comparaison des MT selon le STD utilisé :

Le STD IBJB a été ramené à 24ng/ml dans 2 milieux tests: **NaCl 0.9%** et **sérum-albumine 0.5%** (SAIb).

53 plasmas avec un anti-D (MT allant de <1.5 à 36ng/ml) ont été testés vis-à-vis des STD CNRHP (lot 25-04), IBJB NaCl, IBJB SAIb.

- Différence statistiquement significative entre les MT obtenus avec les STD IBJB et ceux obtenus avec le STD CNRHP (Wilcoxon test $p < 0.0001$). Cependant cette différence n'était **cliniquement pas significative** (cf ci-contre).
- Pas de différence statistiquement significative entre les MT obtenus à partir des 2 CQI du CNRHP (Test de reproductibilité sur 6 passages, Wilcoxon test $p > 0.05$).
- Pas de différence de MT entre les STD IBJB NaCl et SAIb (Bland Altman des ratios: moy=1.01, ET=0.10).

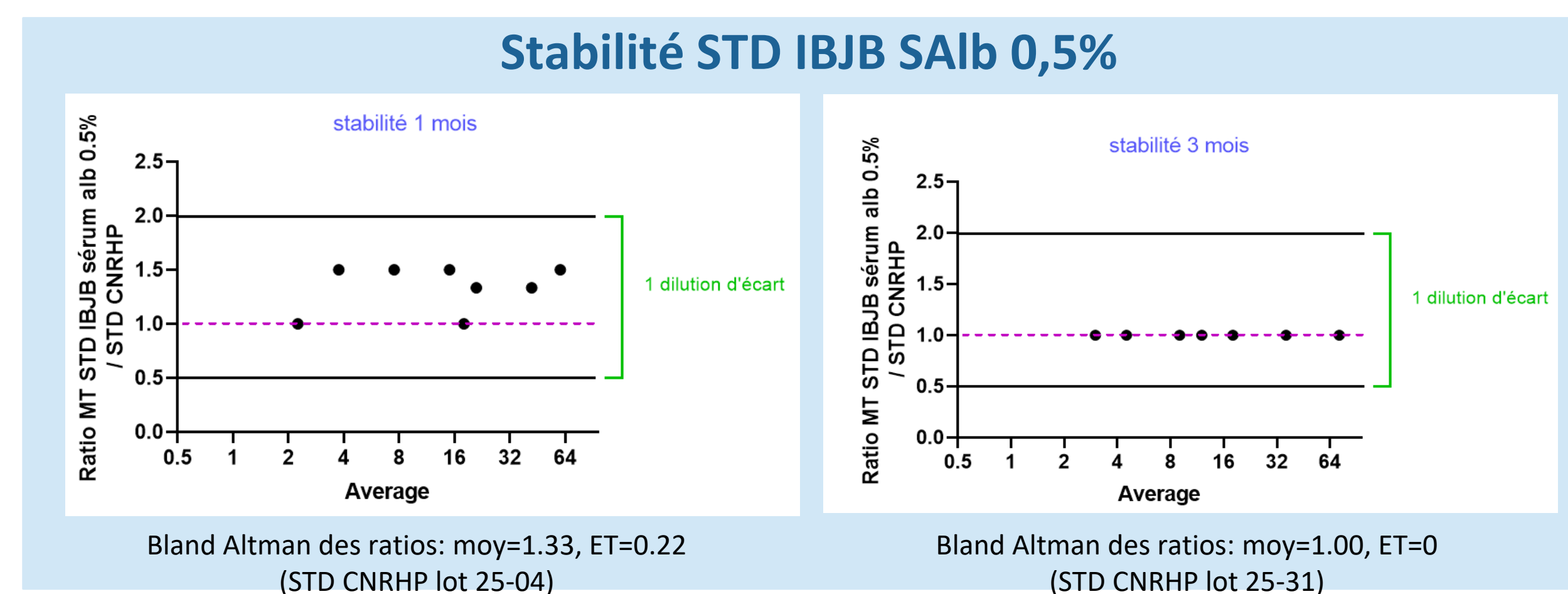
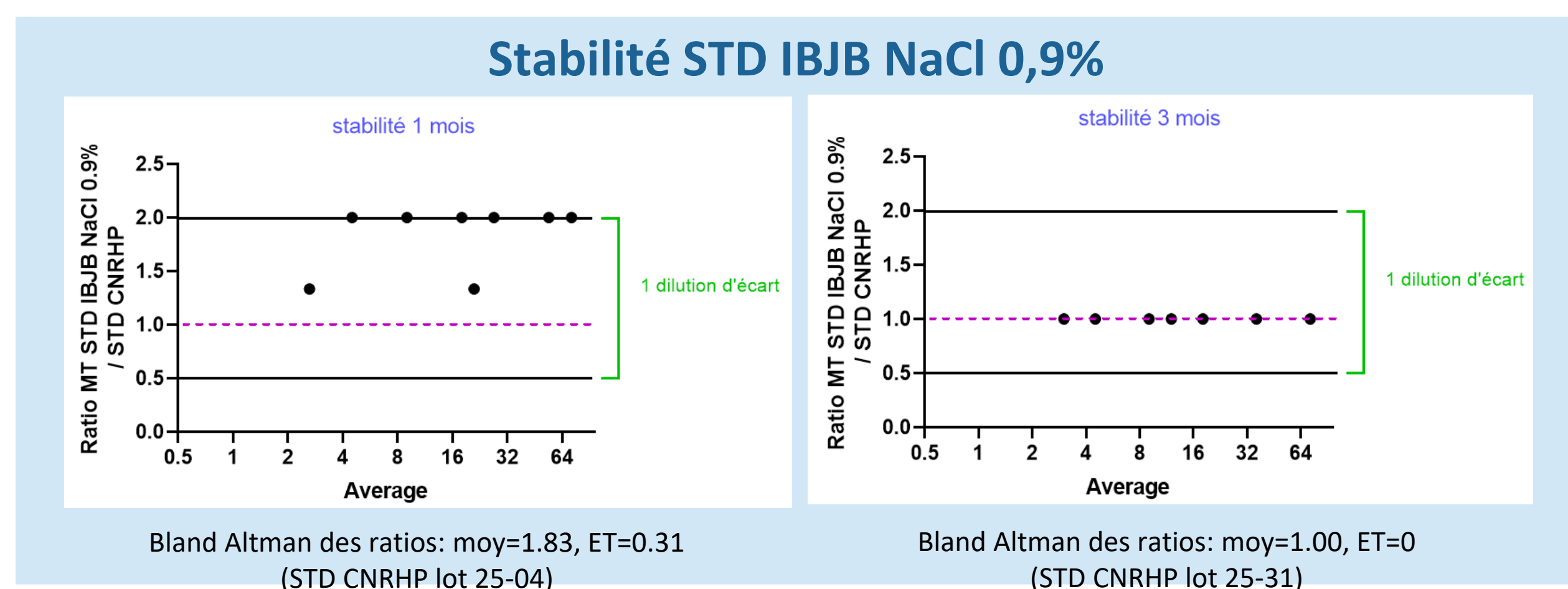


Légère surestimation des MT obtenus avec les STD IBJB chez les patientes (Wilcoxon test $p < 0.0001$) : **non cliniquement significative** car \leq à l'incertitude de mesure d'1 dilution d'écart.

Bland Altman des ratios MT : STD IBJB NaCl / STD CNRHP : moy=1,47, ET=0.33 et STD IBJB SAIb / STD CNRHP : moy=1,46, ET=0.34

Stabilité : Le STD IBJB dilué à 24 ng/ml en NaCl et SAIb a été congelé à -20°C. Des tests de stabilité ont été réalisés après décongélation à 1 et 3 mois (stabilité à 6 mois prévue en février 2026). La concentration de 24ng des STD IBJB a d'abord été contrôlée par MT vis-à-vis du STD CNRHP et a été trouvée \leq à l'incertitude de mesure d'1 dilution d'écart. Les STD IBJB ont ensuite été testés pour le MT des 2 CQI CNRHP et de 6 patientes (à 1 mois) et 5 patientes (à 3 mois):

- à 1 mois : surestimation des MT obtenus avec les STD IBJB chez les patientes (Wilcoxon test $p < 0.0001$) : **non cliniquement significative** (\leq 1 dilution d'écart).
- à 3 mois : MT identiques quel que soit le STD IBJB à ceux obtenus avec STD CNRHP (lot 25-31).



Des tests de stabilité ont également été réalisés à partir du STD IBJB à 1µg/ml en PPI congelé à -20°C. La décongélation a eu lieu à 2 et 6 mois avec remise à concentration de 24ng/ml dans NaCl 0.9% et SAIb 0.5%. Contrôle de la concentration par MT vis-à-vis du STD CNRHP \leq 1 dilution d'écart. Les STD IBJB ont ensuite été testés pour le MT des 2 CQI CNRHP et de 4 patientes (à 2 mois) et 5 patientes (à 6 mois).

- STD IBJB NaCl : surestimation des MT obtenus avec les STD IBJB chez les patientes (Wilcoxon test $p < 0.05$) : **non cliniquement significative** (\leq 1 dilution d'écart).
- STD SAIb : MT identiques à ceux obtenus avec STD CNRHP.

Conclusion : Qu'il soit dilué en NaCl 0,9% ou SAIb 0,5%, le STD IBJB surestime légèrement les MT comparativement au STD CNRHP mais de manière non cliniquement significative. Cette différence peut être expliquée par la précision de la remise à concentration de 24ng/ml, qui reste l'étape critique quelque soit le STD utilisé. La congélation à -20°C du STD IBJB dilué ne semble pas altérer les résultats de microtitrages réalisés jusqu'à 3 mois après. Des tests de stabilité à plus long terme doivent être envisagés. Pour des raisons pratiques, une congélation d'aliquots du STD dilué à 24 ng/ml est recommandée pour une utilisation en routine.