

# Performance de la méthode de titrage des anticorps anti-érythrocytaires en technique automatisée sur colonnes à microbilles de verre

Cécile TOLY-NDOUR<sup>1</sup>, Stéphanie HUGUET-JACQUOT<sup>1</sup>, Jenny BEAUD<sup>1</sup>, Jérôme BABINET<sup>1</sup>, Elodie MAENULEIN<sup>1</sup>, Christelle MARION<sup>1</sup>, Mathieu REGOUBY<sup>1</sup>, Agnès MAILLOUX<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Service d'hémiologie fœtale et périnatale, Centre National de Référence en Hémiologie Périnatale, Hôpital Saint-Antoine, Paris

Nous avons évalué les performances de la méthode de titrage sur colonne à microbilles de verre sur l'automate QuidelOrtho® VISION MAX.

## Méthode de titrage sur VISION MAX

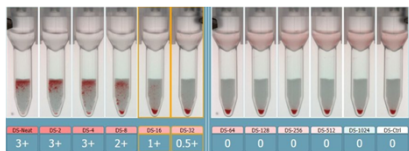
Dilutions sérielles automatisées de raison 2 du plasma/sérum des patientes (du pur (1/1) à la dilution 1/1024).

Réactifs : hématies RH:1,2,3,4,5 (D+C+E+c+e+) KEL:1,2 (K+k+) commercialisées par l'UPR (EFS) (ref MPO02) mise à la concentration de 0,9% en Red Cell Diluent Biovue)).

Incubation des dilutions du serum/plasma avec la suspension d'hématies pendant 15 min à 37° C au niveau de la chambre réactionnelle des cassettes Biovue anti-human globulin anti-IgG.

Centrifugation et lecture de la réaction par la caméra de l'automate

Exemple de résultats :



Titre 16 score 43

Prise d'essai minimum d'échantillon: 320 µl

Temps de rendu du 1<sup>er</sup> test : 28 min

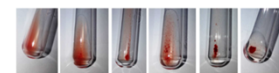
Puis un résultat toutes les 10 minutes environ.

Cadence estimée sur une journée : environ 50 tests

Pour chaque échantillon : lecture automatisée des intensités de réaction de chaque puits  
Détermination manuelle du titre en lecture en point final 1+, et calcul manuel du score de Marsh (4+=12, 3+=10, 2+=8, 1+=5)

## Méthode de titrage en tube utilisée au CNRHP

Dilutions automatisées de raison 2 des échantillons (Tecan Freedom Clinical Base) (dilution de départ :100 µl d'échantillon + 100 µl de NaCl 0,9%)  
Titrages anti-D, anti-c et anti-E: Hématies test provenant d'un CGR phénotypé RH:1,2,3,4,5 (D+C+E+c+e+) datant de moins de 15 jours.  
Titrages anti-K: hématie K+k+ panel CNGRS. Concentration de la suspension d'hématies test :4% dans du NaCl 0,9%  
Incubation de 50µl 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 (+) par l'opérateur (titrage réalisé en double en l'absence de sérothèque) et calcul manuel du score de Marsh global en additionnant les scores de chaque dilution positive selon l'abaque ci-dessous.



## Résultats:

Les tests de répétabilité (n=10) et de reproductibilité (n=7), effectués à partir du CQI anti-D préparé au CNRHP montrent des coefficients de variation (CV) de titres sur l'automate autour de respectivement 5 % et 6% (lecture en point final 1+) et des CV de score à respectivement 2 et 3%. Ces résultats sont meilleurs que les CV établis pour les techniques de titrage manuelles.

## Figure 1: Performance de répétabilité et de reproductibilité de différentes méthodes de titrage

Valeurs cibles du CQI en tube : titre 32 +/- 1 dilution, score 30 +/-5  
En gel: titre 512 +/-1 dilution, score 90 +/-10  
En immuno-capture: titre > 256  
En microbilles de verre : 512 +/- 1 dilution, score 85 +/-10

Les coefficients de variation (CV) pour les titres ont été calculés à partir des rangs de dilutions selon la correspondance suivante titre 2 = rang de dilution 1, titre 4 = rang de dilution 2, titre 8 = rang de dilution 3, titre 16 = rang de dilution 4, titre 32 = rang de dilutions 5, titre 64 = rang de dilution 6, titre 128 = rang de dilution 7, titre 256 = rang de dilution 8, titre 512 = rang de dilution 9, titre 1024 = rang de dilution 10, titre 2048 = rang de dilution 11

\* Calcul en fonction des rangs de dilutions  
\*\* Du fait d'une valeur maximale de 256 en technique immuno-capture, la valeur du CV du titre n'est qu'approximative

Méthode de titrage	Répétabilité CQI titrage				Reproductibilité CQI titrage		
	N=	Moyenne du titre	Titre* (CV %)	Score* (CV %)	N=	Titre* (CV %)	Score* (CV %)
Tube dilution manuelle	19	32	9,2	11,5	29	10,3	20,9
Tube Dilution automatisée	26	32	0	6,1	30	3,7	6,4
Gel Dilution manuelle	19	512	6,3	6,4	8	10,1	7,9
Gel Dilution automatisée	20	512	0	1,25	9	0	1,9
Immuno-capture: technique automatisée	7	> 256	9**	4	5	9**	5
Microbilles de verre automatisée	10	512	5	2	7	6	3

NB : Le nombre de valeurs n'est pas comparable entre les différentes méthodes. Ce nombre est faible pour les techniques immunocapture et microbilles de verre ce qui peut entraîner une moindre précision des résultats.  
Une confirmation sur un plus grand nombre de valeurs et avec d'autres niveaux de CQI est à prévoir.

Les titres obtenus par les méthodes tubes (point final (+) et colonnes microbilles (point final 1+)) ont été comparés pour 116 échantillons de femmes enceintes contenant des anticorps de signification clinique : 27 anti-D, 28 anti-c, 29 anti-E et 32 anti-K.

Pour les titrages anti-D et anti-K, les différences étaient statistiquement significatives avec des résultats en moyenne plus élevés de respectivement 1.8 et 0.7 dilutions en technique colonne microbilles automatisée (Wilcoxon, p<0.0001). Pour les titrages anti-c et anti-E, les écarts étaient moindres et les différences statistiquement non significatives.

Spécificité de l'anticorps	n (total)	n avec titre inférieur en cassette ORTHO	n avec titre égal en cassette ORTHO	n avec titre supérieur en cassette ORTHO	moyenne des différences de titre (cassette - tube) en nombre de dilutions	écart-types des différences de titre (cassette - tube) en nombre de dilutions
anti-D	27	0	5	22	1.8*	1.1
anti-c	28	1	17	10	0,5	0.8
anti-E	28	2	21	5	0.2	1.2
anti-K	31	2	11	18	0,7*	1

\* Statistiquement significatif

Figure 2: Comparaison des résultats de titres obtenus sur les échantillons testés en technique tube semi-automatisée au CNRHP et en technique automatisée sur colonnes à microbilles de verre

## A Anti-D n=27

titre tube	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
<2		3	1	7									
2													
4					1	1	1						
8							2						
16							2	1					
32							1		2				
64										1			
128									1				
256											1		
> 256												1	

## B Anti-K n=31

titre tube	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
<2	4	1	2	2									
2					1								
4							1						
8			1										
16						1	2						
32						1	1	2	1				
64								1	2				
128									1	1	2		
256										1	1	1	3
> 256													1

## C Anti-c n=28

titre tube	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
<2	9	5	3			1							
2						1							
4				1	1	1							
8						2							
16							1						
32							1						
64								1					
128									1				
256										1			
> 256													

Figure 3: Comparaison des résultats de titre obtenus en technique tube et en technique sur microbilles de verre pour chaque échantillon contenant un anti-D (RH1) [A], un anti-K (KEL1) [B] ou un anti-c (RH4) [C] et détermination des titres seuils pour le déclenchement d'un suivi échographique fœtal à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale sévère

Pour les échantillons contenant un anti-D, le titre seuil de 16 en tube défini dans notre laboratoire semble correspondre à un titre autour de 64 en technique colonne microbilles automatisée.  
Pour les échantillons contenant un anti-K, le titre seuil de 16 en tube utilisé dans notre laboratoire semble pouvoir être également utilisé comme titre seuil en technique colonne microbilles automatisée.  
Pour les échantillons contenant un anti-c, le titre seuil de 4 en tube utilisé dans notre laboratoire semble pouvoir être également utilisé comme titre seuil en technique colonne microbilles automatisée.  
Pour l'anti-E, du fait d'une trop grande variabilité de résultat nous n'avons pas pu établir de correspondance de titre seuil entre les 2 techniques.

**Conclusion :** La méthode de titrage en technique automatisée sur colonnes à microbilles de verre montre de bonnes performances. Les valeurs de titres trouvées étaient sensiblement différentes de la technique tube, avec une disparité observée selon les échantillons et selon les spécificités d'anticorps. Pour pouvoir établir des titres seuils dans cette technique, liés à un risque de maladie hémolytique fœtale ou néonatale sévère, des études complémentaires sur un plus grand nombre d'échantillons et avec les données cliniques des issues de grossesses doivent être envisagées.