



TECHNIQUE DE MICROTITRAGE DES ANTICORPS ANTI-D

ETUDE COMPARATIVE INTER-LABORATOIRES



INTRODUCTION

- **Technique de microtitrage** en gels au CNRHP mise en place en 1999

FEUILLETS DE BIOLOGIE , 2002 –Vol.XXXVIII-N°245, 11-17

- **Intérêt** : Déterminer si l'Anti-D dosé est uniquement un Anti-D passif (résiduel) consécutif à une injection d'Ig anti-D connaissant la posologie et la date d'injection.
- **Domaine d'application** : Prélèvements de femmes de 15 à 45 ans avec titre d'anti-D en technique tube $\leq 1/8$

INTRODUCTION

TECHNIQUE DE MICROTITRAGE (1)

FEUILLETS DE BIOLOGIE , 2002 –Vol.XXXVIII-N°245, 11-17.

Dilution du standard Anti D

Standard ANTI-D 6 U CHP/ml (24 ng/ml) fait et congelé au CNRHP dilué en NaCl à 0,9 % au $\frac{1}{4}$ (6 ng/ml) , $\frac{1}{8}$ (3 ng/ml), $\frac{1}{16}$ (1.5 ng/ml) et au $\frac{1}{32}$ (0.75 ng/ml).

Dilution du patient

Echantillon testé du pur au $\frac{1}{32}$ ^{ème}

Distribution

Distribution des hématies test (Hématies R₀r papainées à 0.8% en diluant 2 (Diamed) dans les gels (Gels DIAMED Liss/ Coombs), 50 µl par puits.

Distribution des dilutions de standard et des patients, 25 µl par puits .

INTRODUCTION

TECHNIQUE DE MICROTITRAGE (2)

1- Méthode princeps : distribution par alternance

Standard 1/4	Patient pur	Standard 1/8	Patient 1/2	Standard 1/16	Patient 1/4	Standard 1/32	Patient 1/8
-----------------	----------------	-----------------	----------------	------------------	----------------	------------------	----------------

Incubation gel à 37°C pendant 15 minutes

Centrifugation 10 minutes

Réaction interprétable uniquement quand puits échantillon négatif

2- Méthode simplifiée : Série de 10 patients encadrée par une gamme

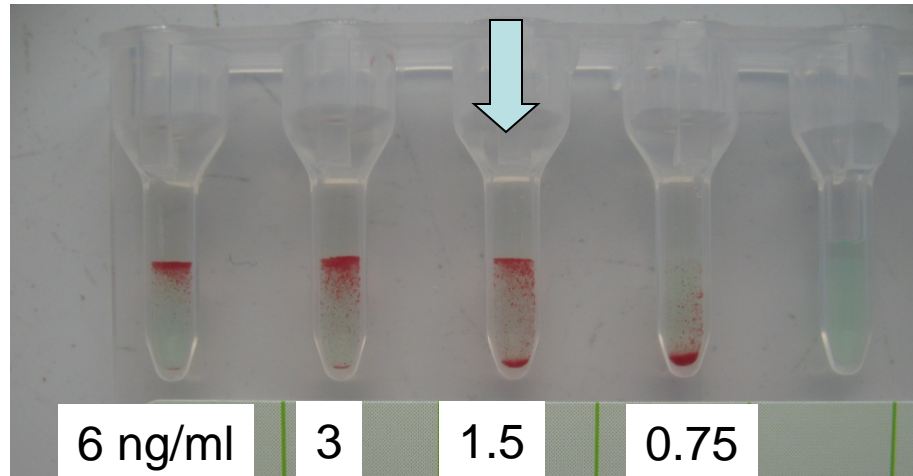
Standard 1/4	Standard 1/8	Standard 1/16	Standard 1/32		
Patient pur	Patient 1/2	Patient 1/4	Patient 1/8	Patient 1/16	Patient 1/32

INTRODUCTION

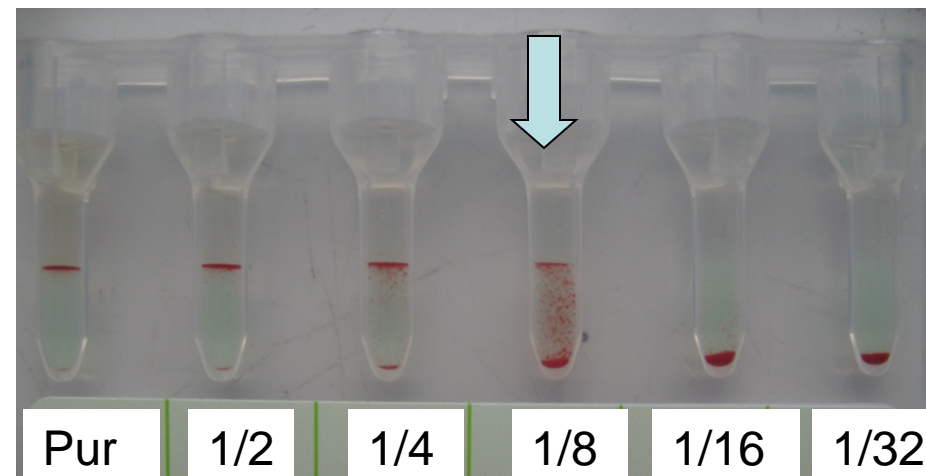
TECHNIQUE DE MICROTITRAGE (3)

INTERPRETATION RESULTATS (Fonction de l'intensité des réactions)

Concentration en anti-D = $\frac{\text{Inverse de la dernière dilution réactive de l'échantillon}}{\text{Concentration de la dilution du standard avec la même intensité de réaction}}$



STANDARD



PATIENT

Concentration approchée = 8 x 1.5 = 12 ng/ml

OBJECTIF

ETUDE COMPARATIVE INTER-LABORATOIRES

- **Diffusion de la technique de microtitrage anti-D au delà du CNRHP**
- **Mise en place d'un groupe de travail avec plusieurs EFS pour tester la méthode dans 8 centres différents sur des échantillons communs**
- **Comparaison des résultats obtenus**
- **Etude de stabilité du standard**
Déterminer les conditions de conservation et la stabilité du standard anti-D utilisé pour réaliser la technique de microtitrage.

MATERIEL ET METHODE

PARTICIPANTS

8 centres

- **CNRHP** (*Hôpital Saint-Antoine, Y. Brossard, M. Larsen, A. Cortey*)
- **EFS Rhône-Alpes** (*Lyon, M. Raba*)
- **EFS Franche-Comté** (*Dijon Bocage, C. Krause*)
- **EFS Bretagne** (*Rennes, M. Delamaire*)
- **EFS Nord** (*Lille, L. Mannessier*)
- **EFS Centre-Atlantique** (*Tours, Poitiers, F. Roubinet*)
- **EFS Ile de France** (*Versailles, A. Lejealle*)
- **EFS PACA** (*Marseille Baille, J. Chiaroni*)

MATERIEL ET METHODE

ECHANTILLONS

Nombre 10

- Panel de 10 sérums contenant un anti-D passif de concentration $>$ à 6 ng/ml (0.5 ml par sérum). Informations précises sur le(s) injections anténatales d'IgRH (dates et doses)
- Sérums aliquotés et congelés à $- 80^{\circ}\text{C}$ au CNRHP
- Distribution des échantillons : EFS Marseille

MATERIEL ET METHODE FABRICATION DU STANDARD

- **Protocole d'enrichissement**

Poche de diluant (EFS de Marseille)

Flacon de Natead (LFB)

Seringue de 10 ml

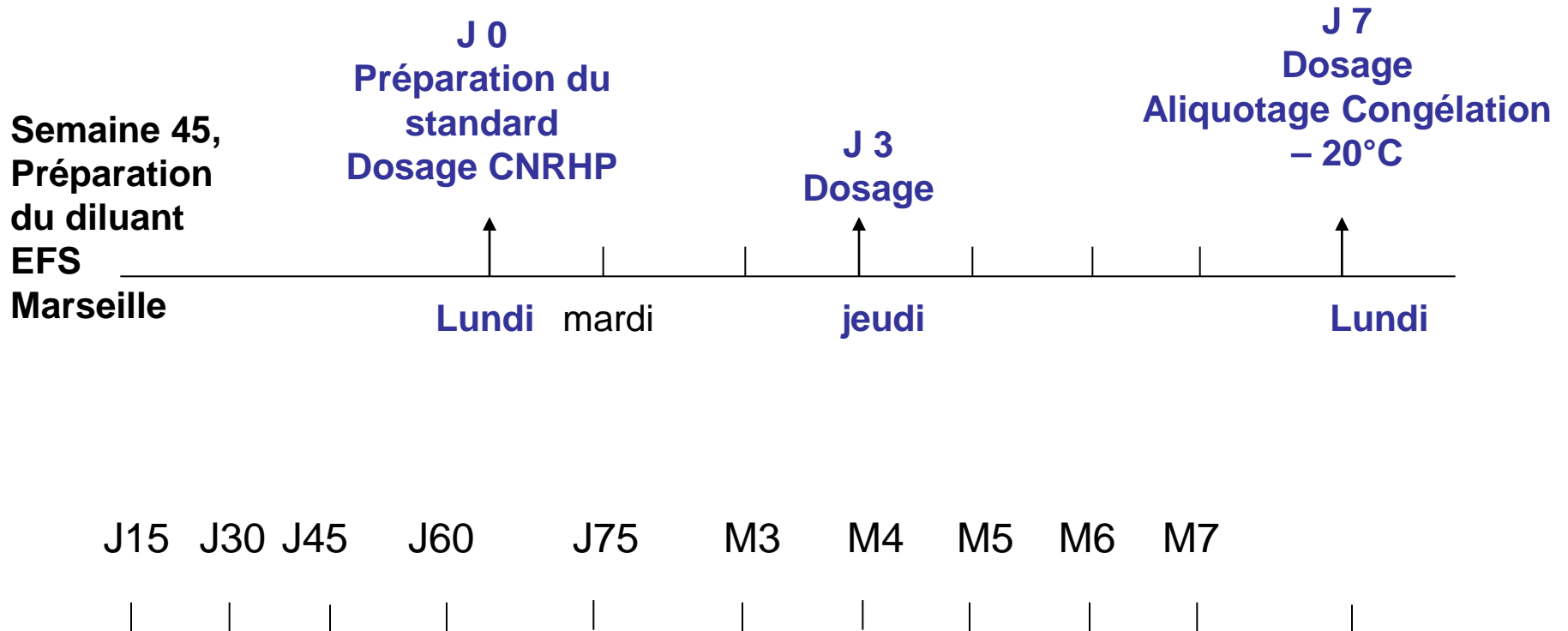
Seringue de 2 ml

Robinet à 3 voies



MATERIEL ET METHODE STABILITE DU STANDARD

Calendrier de dosage du standard



MATERIEL ET METHODE

REACTIFS

STANDARD : 28 ng/ml (distribué par l'EFS Marseille), testé au pur, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32

GELS

Gels Diamed : CNRHP, Lyon, Dijon, Rennes (2cartes coombs testées : gel polyvalent anti-IgG + anti-C3d et gel anti IgG), Lille, Marseille,

Gels Biorad : EFS Poitiers

Gels Ortho : Versailles, Marseille

HEMATIES

R₀r natives : CNRHP, Lyon, Dijon, Rennes, Lille, Marseille, Poitiers, Versailles

R₀r papainées : CNRHP, Lyon, Lille, Marseille

ETUDE MICROTITRAGE

ETE 2006

Anti-D standard lot 63019
Date de préparation: 21.06.06
concentration : 28 ng/ml

Laboratoire

IHE site de Rennes
 EFS BRETAGNE

Gels supports utilisés :

Fournisseur : DIAMED carte **coombs IgG**
 Lot : 50540.48.08
 Date de péremption : .08.2007

Technicienne : Sylvie Flageul

Date de réalisation : 01.08.2006

- **Collecte des résultats**

Vérification du calcul des concentrations

Echantillon Patient	Hématie Ror papainée						Concentration ng/ml	Hématie Ror native						Concentration ng/ml
	Dilution sérum patient							Dilution sérum patient						
	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32		Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
A								+++	+++	++	+	-	-	28
B								+++	++	+	(+)	-	-	14
C								+++	++	+	(+)	-	-	14
D								+++	++	+	(+)	-	-	14
E								+++	++	++	+	(+)	-	28
F								+	(+)	-	-	-	-	3,5
G								++	++	+	(+)	-	-	14
H								+	(+)	-	-	-	-	3,5
I								+	(+)	-	-	-	-	3,5
J								+++	+++	++	+	-	-	28
	Dilution anti D standard							Dilution anti-D standard						
	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32		pur	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
Concentration anti D ng/ml	28	14	7	3.5	1.75	0.87		28	14	7	3.5	1.75	0.87	
Dilution 1								+++	+++	++	+	(+)	-	
Dilution 2														

Concentrations théoriques en anti-D

$$C \text{ ng/ml} = n \times 15/e^{0.03t}$$

Concentration maximale :

tenant compte

- d'un poids

- d'un catabolisme à 3 %

- sans consommation par hématies foetales t = délai en jours depuis l'injection

n = nombre de doses injectées de 100 µg

15 = concentration extrapolée au temps 0 après injection intraveineuse de 100 µg d'IgG ANTI D (après équilibre intra et extra-vasculaire)

0.03 = fraction quotidienne IgG catabolisée

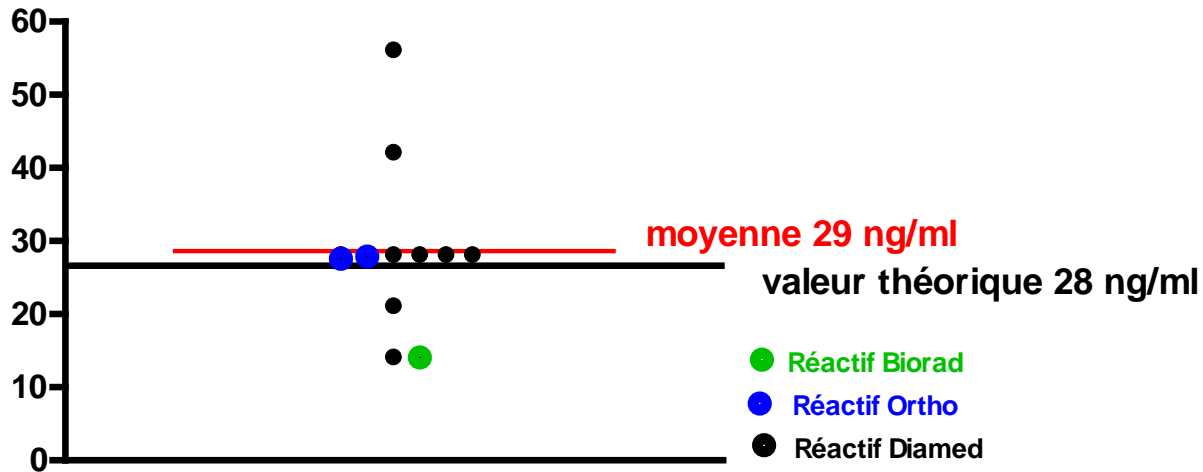
PATIENTE	PRELEVEMENT	DOSES	INJECTION	DELAI	CONCENTRATION THEORIQUE
A	28/05/2006	200 µg	25/05/2006	3 jours	27 ng/ml
B	28/05/2006	200 µg	23/05/2006	5 jours	26 ng/ml
C	30/05/2006	200 µg	10/05/2006	20 jours	16 ng/ml
D	31/05/2006	300 µg	10/05/2006	21 jours	24 ng/ml
E	31/05/2006	200 µg	29/05/2006	2 jours	28 ng/ml
F	02/06/2006	200 µg	25/04/2006	5 semaines	11 ng/ml
G	06/06/2006	300 µg	11/05/2006	3 semaines 1/2	22 ng/ml
H	06/06/2006	300 µg	28/04/2006	5 semaines 1/2	14 ng/ml
I	08/06/2006	200 µg	28/04/2006	6 semaines	9 ng/ml
J	15/06/2006	200 µg	07/06/2006	1 semaine	24 ng/ml

RESULTATS

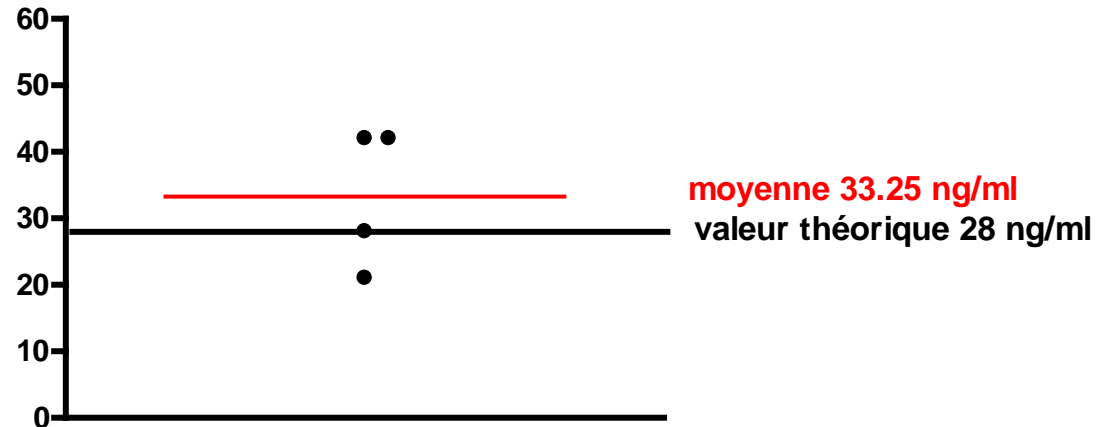
Distribution des résultats

Sérum E

Sérum E 28 ng/ml - Hématies Ror natives



Sérum E 28 ng/ml - Hématies Ror papaïnées

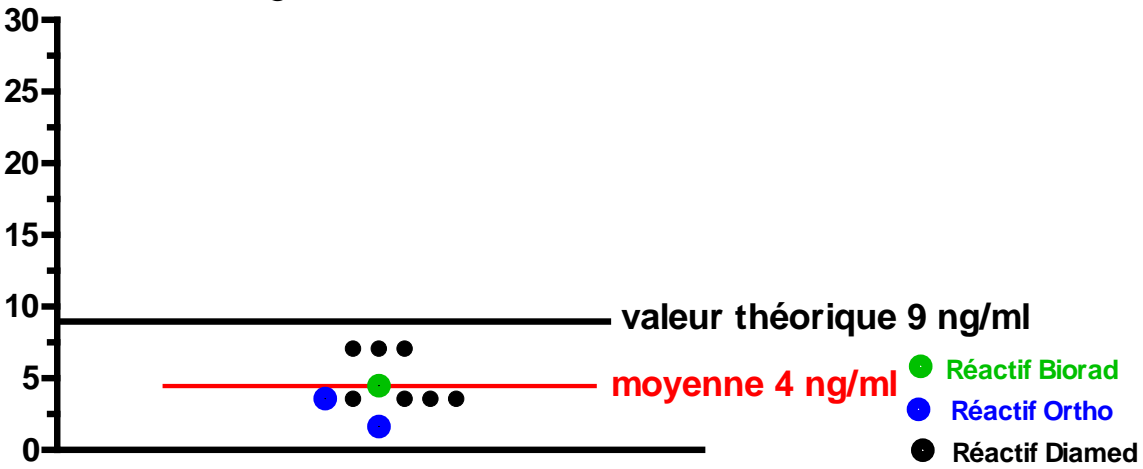


RESULTATS

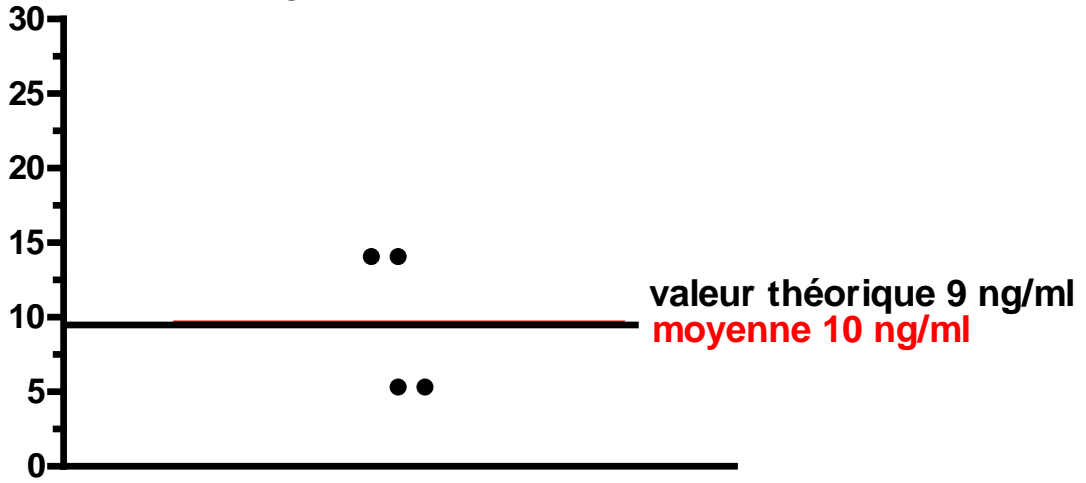
Distribution des résultats

Sérum I

Sérum I 9 ng/ml - Hématies Ror natives



Sérum I 9 ng/ml - Hématies Ror papainées

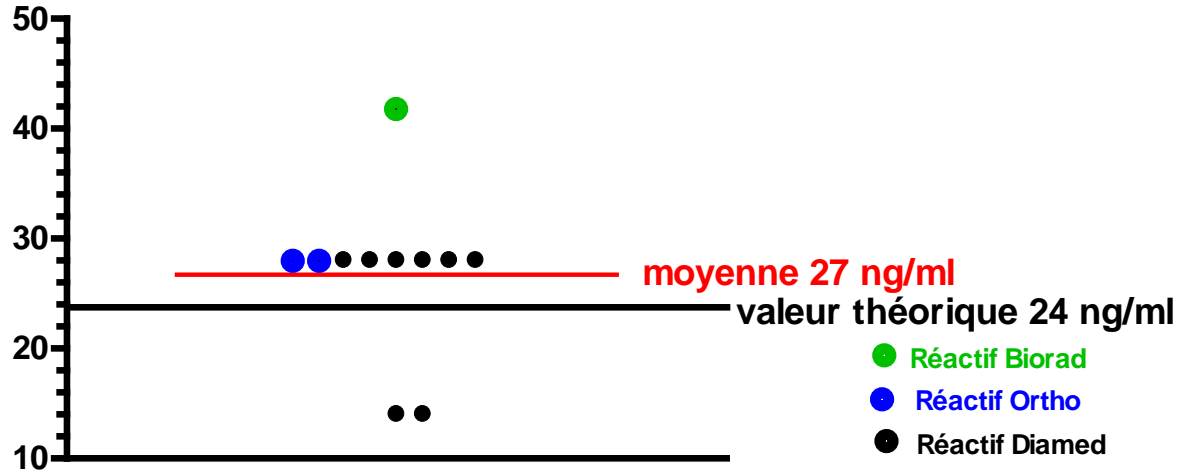


RESULTATS

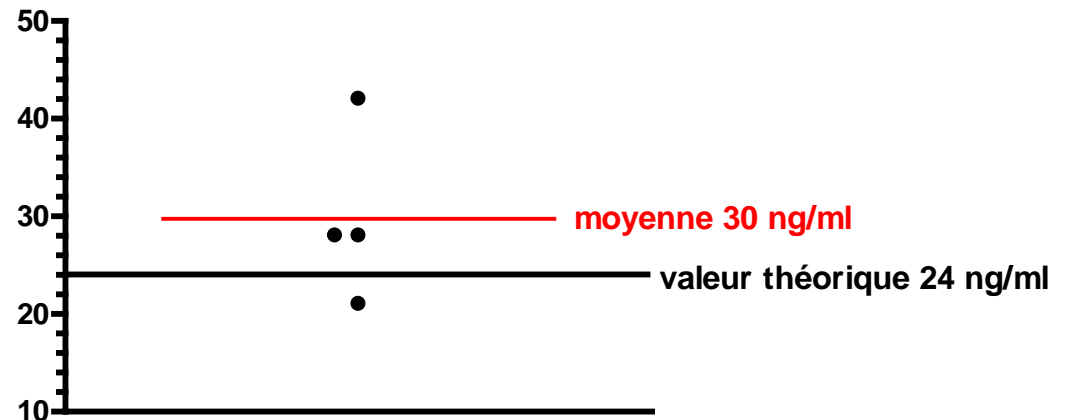
Distribution des résultats

Sérum J

Sérum J 24 ng/ml - Hématies Ror natives



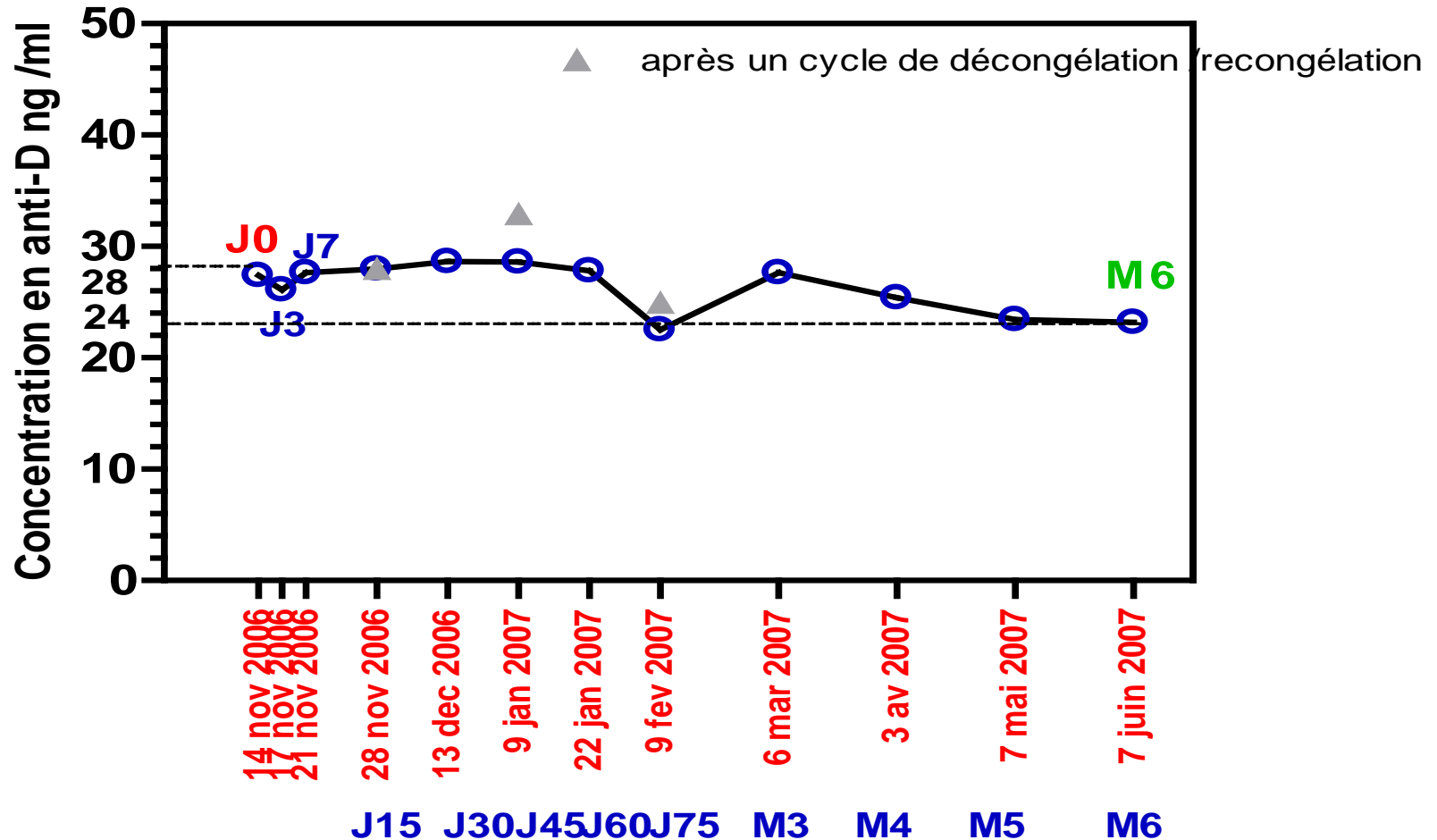
Sérum J 24 ng/ml - Hématies Ror papainées



RESULTATS

STABILITE STANDARD

Dosage pondéral du standard : technique autoanalyseur



DISCUSSION

- **Résultats préliminaires tout à fait satisfaisants (bonne corrélation des résultats)**
- **Questions pratiques :**
 - Difficultés techniques ?
 - Charge de travail ?
 - Difficulté de lecture ?
 - Entraînement préalable ?
- **Etude préliminaire**
 - Pas à l'aveugle (tous les échantillons n'ont pas été traités en même temps, les résultats ont été transmis)
 - Uniquement des laboratoires très entraînés

PERSPECTIVES

Proposer un standard national (nouveau , CNRGS)?

Proposer un protocole de préparation locale d'un standard « maison » ?

Proposer un CQE (plusieurs échantillons de concentrations différentes) ?