

## Scores des titrages anti-D (RH1) sur l'automate IRIS (Immucor®): corrélation avec les résultats du dosage pondéral

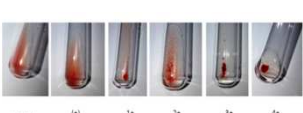
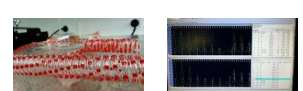
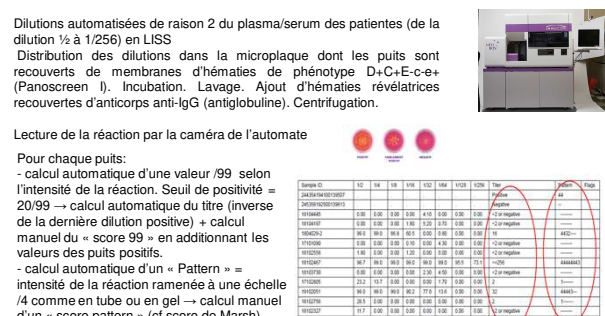
Cécile TOLY-NDOUR<sup>1</sup>, Hélène DELABY<sup>1</sup>, Stéphanie HUGUET-JACQUOT<sup>1</sup>, Jenny BEAUD<sup>1</sup>, Jérôme BABINET<sup>1</sup>, Véronique ZERR<sup>1</sup>, Annick MONTILLET<sup>1</sup>, Agnès MAILLOUX<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Service de hémobiologie fœtale et périnatale (Centre National de Référence en Hémiologie périnatale), Hôpital St Antoine - LBM Est Parisien - DMU BIOGEM - AP-HP. Sorbonne-Université.

**Contexte:** En France, pour les grossesses compliquées par une allo-immunisation anti-D (RH1), la réalisation d'un dosage pondéral est recommandée en complément du titrage en test indirect à l'antiglobuline pour préciser le risque d'atteinte hémolytique foetale et néonatale. Récemment, une méthode de titrage en technique immuno-capture a été développée sur l'automate Neo IRIS (Immucor®).

### Objectifs:

Nous avons cherché à corréler les résultats des scores anti-D (RH1) calculés à partir des patterns (scores de Marsh) et des scores /99 donnés par l'automate IRIS dans sa technique de titrage automatisée sur plaque (immuno-capture), avec les valeurs de dosage pondéral en hémagglutination en flux continu sur auto-analyseurs Astoria (WHS) et Proxima (AMS Alliance) (technique 2 temps). Les coefficients de corrélation trouvés ont été comparés à ceux déterminés pour les scores de Marsh en technique de titrage tube en milieu salin semi-automatisée (technique réalisée en routine au CNRHP).

Méthode de titrage en tube semi-automatisée (Tecan Evo Clinical Base) réalisée en routine au CNRHP	Dosage pondéral anti-D par hémagglutination en flux continu sur auto-analyseur Astoria (WHS) et Proxima (AMS Alliance)	Méthode de titrage en immuno-capture sur IRIS
<p>Dilutions automatisées de raison 2 du plasma/serum en NaCl 0,9%</p> <p>Ajout de la suspension d'hématies test de phénotype D+C+E+c+e+ à 4% dans du NaCl 0,9%</p> <p>Incubation (60 min à 37° C) / 3 lavages / Ajout de l'antiglobuline (Anti-IgG) (Diagast AGH Maestria IgG) / Centrifugation and remise en suspension</p> <p>Le titre en anticorps est défini comme l'inverse de la dernière dilution de l'échantillon capable d'induire une réaction d'hémagglutination visible macroscopiquement. Lecture en point final (+).</p> <p>Calcul manuel des scores (Marsh):</p> <p>4+ = 12 3+ = 10 2+ = 8 1+ = 5 (+) = 2</p> 	<p>Méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne.</p> <p>Mesure indirecte de l'intensité de l'agglutination des hématies test bromélinées de phénotype D+C+E+c+e+ induite dans le flux continu de l'auto-analyseur en présence des anticorps anti-D (RH1) présents dans le plasma/serum des patientes (méthode 2 temps - méthylcellulose)</p> <p>Grâce à une gamme d'étalon international de l'OMS (16/332), la concentration en anti-D peut être déterminée en unités locales arbitraires (UCHP/ml) ou en UI/ml (250 UCHP/ml = 5 UI/ml).</p> 	<p>Dilutions automatisées de raison 2 du plasma/serum des patientes (de la dilution 1/8 à 1/256) en LISS</p> <p>Distribution des dilutions dans la microplaque dont les puits sont recouverts de membranes d'hématies de phénotype D+C+E+c+e+ (Panoscreen I). Incubation. Lavage. Ajout d'hématies révélatrices recouvertes d'anticorps anti-IgG (antiglobuline). Centrifugation.</p> <p>Lecture de la réaction par la caméra de l'automate</p> <p>Pour chaque puits:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- calcul automatique d'une valeur /99 selon l'intensité de la réaction. Seuil de positivité = 20/99 → calcul automatique du titre (inverse de la dernière dilution positive) + calcul manuel du « score 99 » en additionnant les valeurs des puits positifs.</li> <li>- calcul automatique d'un « Pattern » = intensité de la réaction ramenée à une échelle /4 comme en tube ou en gel → calcul manuel d'un « score pattern » (cf score de Marsh)</li> </ul> 

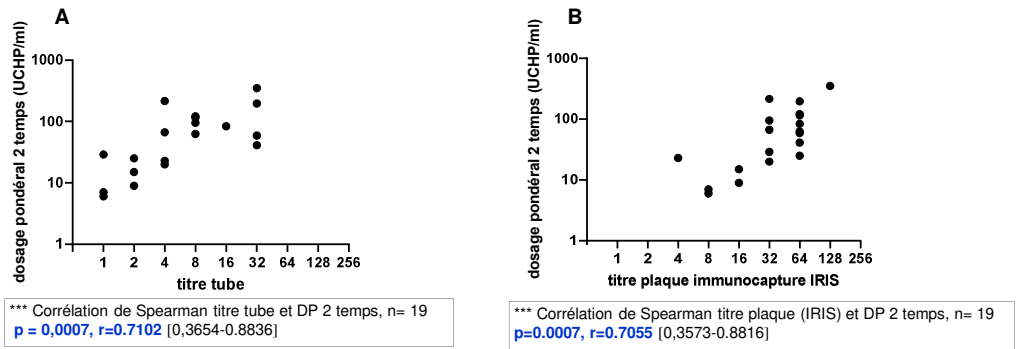
### Seuils biologiques pour déclencher une surveillance échographique fœtale spécifique à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale sévère

L'hémolyse des hématies fœtales causées par les anticorps anti-D maternels ayant traversé le placenta peut induire une anémie fœtale sévère, qui, en l'absence de traitement, peut évoluer vers un état d'anasarque et une mort fœtale *in utero*. Dans les cas d'allo-immunisation anti-D importante, définie par un titre en test indirect à l'antiglobuline supérieur ou égal à 16 en technique tube ou une concentration en anticorps supérieure à 250 UCHP/ml (5 UI/ml) en dosage pondéral, dès 18SA une surveillance échographique fœtale avec mesure du pic systolique de vélocité à l'artère cérébrale moyenne, reflétant indirectement l'anémie, est entreprise de manière hebdomadaire. En cas de valeurs élevées, une transfusion fœtale peut être réalisée.

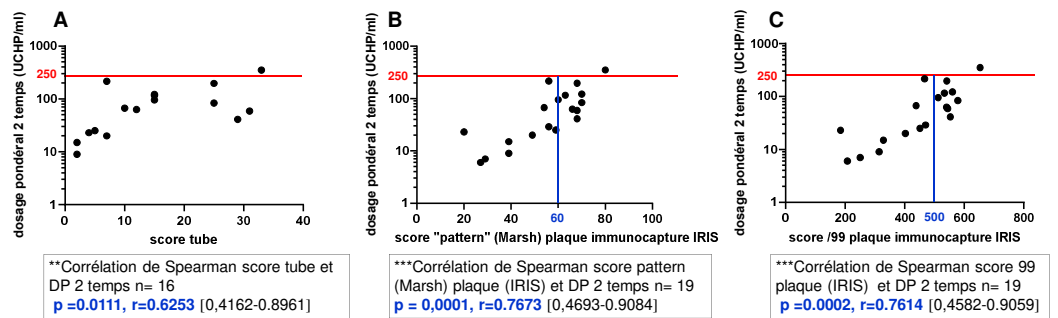


### Résultats:

**Figure 1:** Corrélation entre les titres en tube [A], les titres en plaque immunocapture [B] avec les concentrations en anti-D (RH1) obtenues par dosage pondéral



**Figure 2:** Corrélation entre les scores en tube [A], les scores « patterns » (score de Marsh) en plaque immunocapture [B] et les scores 99 en plaque immunocapture [C] avec les concentrations en anti-D (RH1) obtenues par dosage pondéral



19 échantillons contenant un anti-D ayant un titre compris entre 2 et 256 en techniques plaque et tube ont été testés.

Les scores des patterns (scores de Marsh) et les scores /99 de l'IRIS sont significativement corrélés au dosage pondéral ( $p < 0.0005$ , Spearman) avec un coefficient de corrélation  $r$  de respectivement 0.77 et 0.76 soit une valeur supérieure à celle obtenue pour les scores de Marsh en technique tube (0.63).

Il semble également possible d'extrapoler des scores seuils critiques, corrélés à la concentration seuil critique anti-D de 250 UCHP/ml (5 UI/ml) établie pour déclencher un suivi échographique fœtal à la recherche de signes indirects d'anémie fœtale sévère. Ces scores seuils seraient autour de 60 pour le score pattern et de 500 pour le score /99.

### Conclusion :

Pour l'anti-D, le calcul des scores pattern et des scores /99 à partir des résultats de titrage plaque par immunocapture sur l'automate IRIS apporte une valeur ajoutée par rapport à la seule lecture du titre. Des études complémentaires avec des étalons et sur un plus grand nombre d'échantillons, appuyées sur des données cliniques, sont à envisager pour consolider et valider ces résultats.