

Automatisation de la technique de microtirage des anti-RH1

Evaluation de l'Evo Clinical Base de la société TECAN

Agnès Mailloux, Veronique Zerr, Marc Larsen, Yves Brossard, Bruno Carbonne, Anne Cortey

agnes.mailloux@sat.aphp.fr

Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP), AP-HP St Antoine, PARIS, FRANCE

Introduction

La technique de microtirage s'applique au dosage de l'anti-RH1 dans le serum de femmes de 15 à 45 ans ayant un titre d'anticorps anti-RH1 faible ($< 1/4$) en technique tube coombs indirect à 37°C. L'intérêt de ce dosage semi-quantitatif est de déterminer si l'Anti-RH1 quantifié est uniquement un Anti-RH1 passif (résiduel) consécutif à une injection d'IgRH, connaissant la posologie et la date d'injection.

Cette technique est réalisée manuellement au CNRHP depuis 1999. Depuis les recommandations de 2005 concernant l'injection systématique d'IgRH à la 28^{ème} semaines d'aménorrhées, les demandes concernant cette analyse sont en constante augmentation (6866 dosages en 2005, 10286 en 2006, 14951 en 2007 ; 15090 en 2008)

Objectif

l'objet de ce travail est d'automatisation de la technique de microtirage sur l'Evo Clinical Base société TECAN (en collaboration avec la société Diamed).

Matériel et méthode

Réactifs

Hématies : R0r papainées
 Carte de gel : Liss Coombs Diamed
 Standard anti-RH1 : préparé au CNRHP à partir du Standard NISBT
 NaCl 0,9 %
 Liquide système pour lavage : eau désionisée + 0.5 % de decon

Automate

Le Freedom Evo Clinical est un dispositif pour la distribution d'échantillons d'origine humaine conformément aux spécifications du dispositif s'appliquant aux diagnostics in vitro. Il est équipé de portoirs spécifiques pour la distribution en cartes de gel Diamed, d'un scanner permettant l'identification positive des échantillons et des cartes de gel,

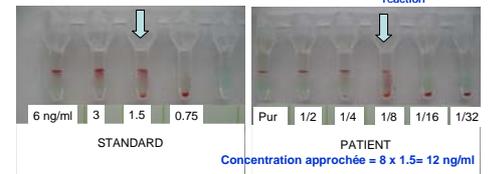
Méthode

Les 3 premières étapes ont été automatisées

- 1- Dilution du standard et des échantillons au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 en plaque 96 puits dans du NaCl 0.9 %
- 2- Distribution de 50 µl d'hématies test R0r papainées à 0.8 % en Cell Stab
- 3- Distribution de 25 µl de sérums et de l'anti-RH1 standard dilués en carte de gel
- 4- Après centrifugation l'intensité des réactions d'agglutination reste appréciée visuellement.

INTERPRETATION RESULTATS (Fonction de l'intensité des réactions)

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

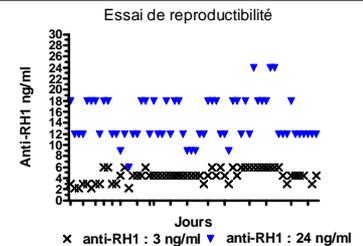


Résultats

1) Etude de répétabilité

2 niveaux de concentration en anti-RH1 (3 ng/ml et 24 ng/ml) ont été passés 15 fois dans une série

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Anti-RH1 3ng/ml	Anti-RH1 24ng/ml	Anti-RH1 3ng/ml	Anti-RH1 24ng/ml
Nombre de valeurs	15	15	61	62
Minimum	3	18	3	12
Médiane	3	18	4.5	12
Maximum	3	24	6	24
Moyenne	3	18.8	4.5	14.37
Dévation standard	0	2.111	1.193	3.96
Erreur standard	0	0.5451	0.1528	0.5029
Coefficient de variation	0.00%	11.23%	26.67%	27.55%



2) Etude de reproductibilité

Ces 2 mêmes niveaux en anti-RH1 ont été passés dans différentes séries durant 15 jours

3) Etude de contamination croisée

Le pipetage est assuré par 4 aiguilles fonctionnant en parallèle. Nous avons vérifié l'efficacité du lavage en testant dans une même série des échantillons de concentrations connues de la façon suivante : le standard anti-RH1, puis 6 échantillons aux concentrations suivantes : 0,4 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2 µg/ml, <1,5 ng/ml, 3 ng/ml, 6 ng/ml puis de nouveau le standard.

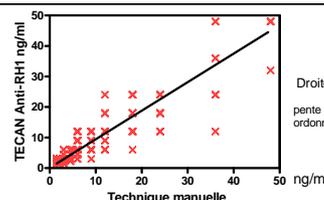
Séquence testée	Standard anti-RH1	Anti-RH1 0.4 µg/ml	Anti-RH1 1.5 µg/ml	Anti-RH1 2 µg/ml	Anti-RH1 <1.5 ng/ml	Anti-RH1 3 ng/ml	Anti-RH1 6 ng/ml	Standard anti-RH1
Aiguille utilisée pour le pipetage	Aiguille 1	Aiguille 2	Aiguille 3	Aiguille 4	Aiguille 1	Aiguille 2	Aiguille 3	Aiguille 4
Risque de contamination					Par standard	Par Anti-RH1 0.4 µg/ml	Par Anti-RH1 1.5 µg/ml	Par Anti-RH1 2 µg/ml
Concentration trouvée avec TECAN		>96 ng/ml	>96 ng/ml	>96 ng/ml	<1,5 ng/ml	3 ng/ml	6 -12 ng/ml	6 ng/ml

Pas de contamination des échantillons (essai répété 3 fois)

4) Corrélation

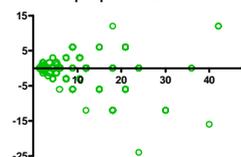
avec la technique manuelle réalisée sur 300 échantillon cliniques

Nombre de couples	300
Coefficient r de Pearson	0.906
Intervalle de confiance 95%	0.8834 to 0.9245
Valeur de P	P<0.0001
Valeur corrélées	OUI
R 2	0.8209



Droite de Deming
 pente : 0.88 à 0.98
 ordonnée à l'origine : -0.45 à 0.83

Graphique Des Différences



Conclusion

L'automatisation de la technique de microtirage des anti-RH1 a le double avantage de supprimer des tâches manuelles fastidieuses de dilution- distribution et de standardiser ces étapes qui sont critiques pour la fiabilité des dosages. Elle est désormais appliquée en routine dans notre laboratoire.

Remerciements à La Société DIAMED