

Performance de la méthode de titrage des anticorps anti-érythrocytaires sur carte gel LISS Coombs IgG sur l'automate IH-500 (Bio-Rad®)

Jenny BEAUD¹, Andréa ADIOGO¹, Stéphanie HUGUET-JACQUOT¹, Hélène DELABY¹, Agnès MAILLOUX¹, Cécile TOLY-NDOUR¹

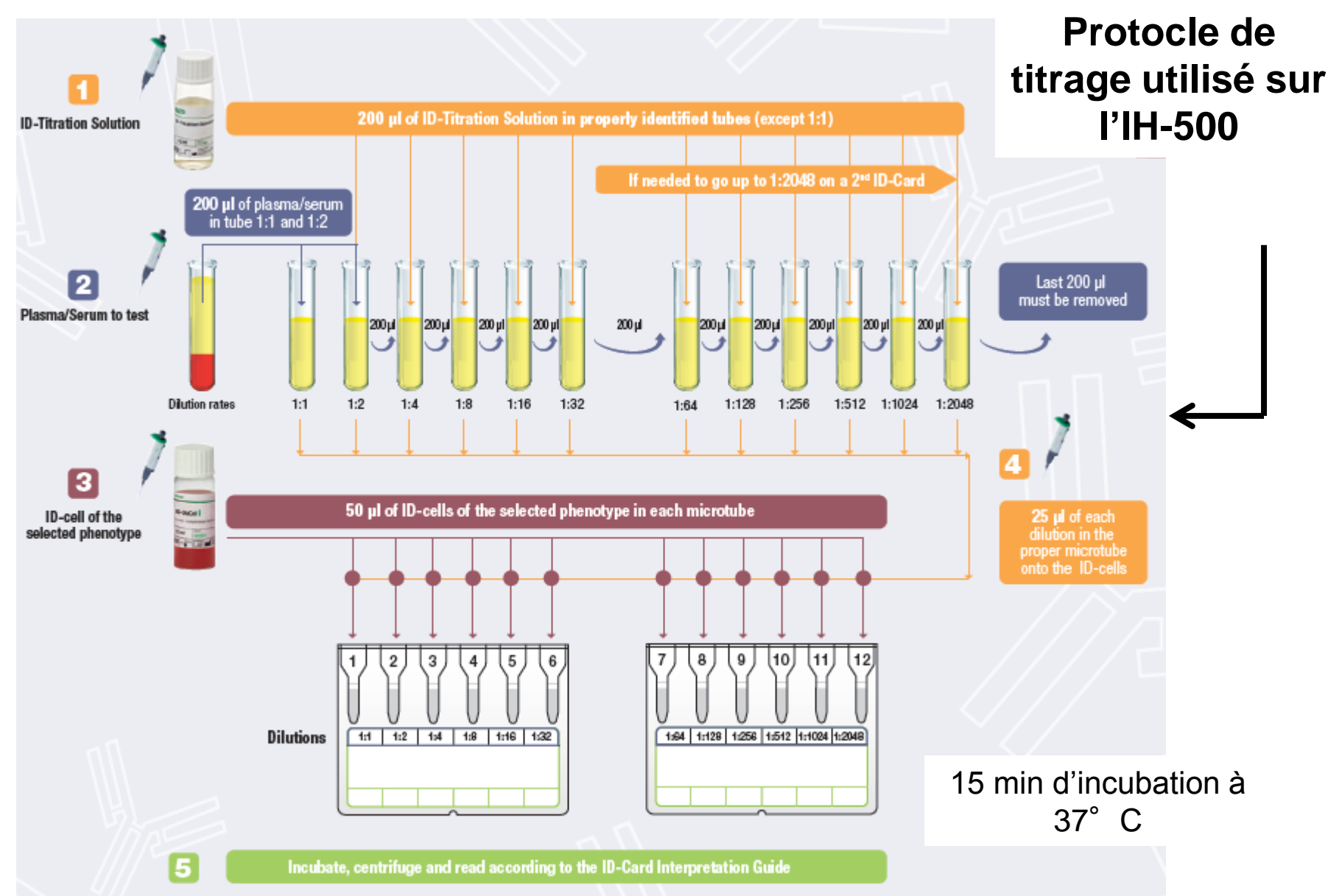
¹ Unité Fonctionnelle d'expertise en Immuno-Hémobiologie Périnatale, Centre National de Référence en Hémobiologie Périnatale (CNRHP), Pôle de Biologie Médicale et Pathologie, Hôpital St Antoine, Paris, France

L'arrêté du 15 mai 2018 relatif aux examens d'immuno-hématologie érythrocytaire ouvre la voie à l'utilisation de méthodes de titrage d'anticorps en carte-gel, qui ont l'avantage de pouvoir être automatisées jusqu'à l'étape de lecture.

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer les performances de la méthode de titrage en carte-gel LISS Coombs IgG sur l'automate IH-500. Une comparaison avec la méthode de titrage en tube a également été réalisée, afin de définir des valeurs seuils pour le déclenchement d'une surveillance échographique fœtale adaptée.

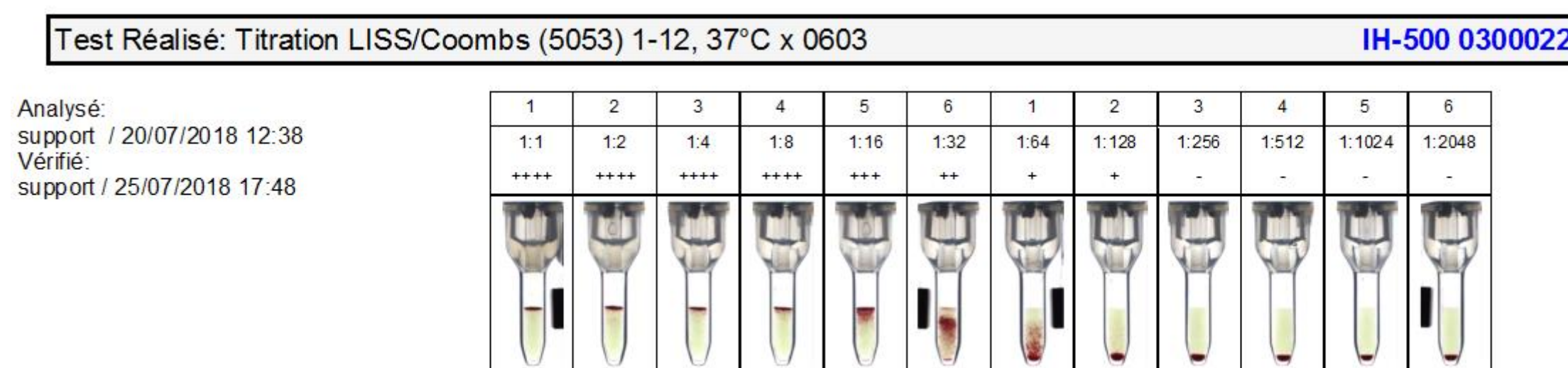
Méthode: Le titre des anticorps est défini comme étant l'inverse de la dernière dilution de l'échantillon capable d'induire une hémagglutination visible macroscopiquement

Méthode de titrage en gel sur IH-500



Lecture automatisée des titres sur gel en point final 1+ avec validation manuelle de l'interprétation de l'automate par l'opérateur (scan d'images)

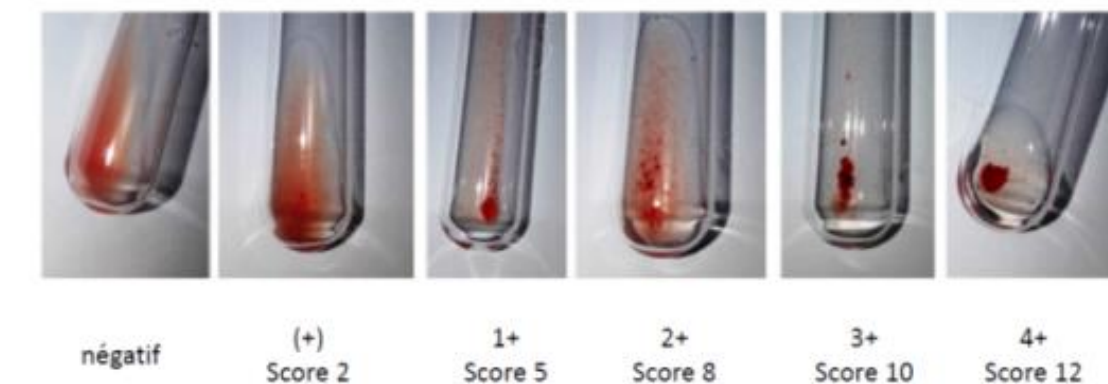
Score (Marsh) calculé manuellement par l'opérateur:
4+ = 12
3+ = 10
2+ = 8
1+ = 5



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%)
Hématies test provenant d'un CGR phénotypé RH:1,2,3,4,5 (R1R2) datant de moins de 15 jours.
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):

Score (Marsh) calculé manuellement par l'opérateur:
4+ = 12
3+ = 10
2+ = 8
1+ = 5
(+) = 2



Resultats: Un contrôle de qualité interne anti-D (RH1) maison (CQI), préparé et calibré par rapport à l'étalon international 01/572 a été utilisé pour déterminer les performances de répétabilité et de reproductibilité des différentes méthodes, pour les résultats du titre et du score.

Figure 1: Performance de répétabilité et de reproductibilité des méthodes de titrage manuelles et automatisées, en carte gel LISS Coombs et en tube, établie à partir du CQI anti-D maison

Valeurs cibles du CQI en tube : titre 32, score 30
En gel: titre 512, score 90

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

Méthode de titrage	N=	Répétabilité		Reproductibilité		
		CV du titre (%)	CV du score (%)	N=	CV du titre (%)	CV du score (%)
Tube Dilutions manuelles	19	9,2	11,5	29	10,3	20,9
Tube Dilutions automatisées	26	0	6,1	30	3,7	6,4
Gel Dilutions manuelles	19	6,3	6,4	8	10,1	7,9
Gel Dilutions automatisées (IH-500)	20	0	1,25	9	0	1,9

Les tests de répétabilité et de reproductibilité, effectués sur le CQI anti-D montrent des CV proche de 2% sur l'IH-500, comparativement aux valeurs de 6% à 20% établies pour la méthode manuelle de titrage en gel ou les méthodes de titrage en tube.

122 échantillons de patients testés ont été sélectionnés sur une période d'évaluation de deux mois, en fonction de la spécificité des anticorps et du titre trouvé en tube, afin de couvrir une étendue de mesure la plus large possible. Les résultats obtenus en technique tube CNRHP et gel sur IH-500 ont été comparés.

	n total	n avec titre identique	n avec titre supérieur en tube	n avec titre supérieur en gel	moyenne des différences de titre (gel-tube) (en nb de dilutions)
Anti-D (RH1)	26	0	0	26	3,96
Anti-C (RH2)	3	1	0	2	1,33
Anti-E (RH3)	11	1	0	10	2,27
Anti-c (RH4)	21	2	0	19	3,29
Anti-e (RH5)	2	0	0	2	3,5
Anti-Cw (RH8)	3	0	0	3	1,67
Anti-Kell (KEL1)	16	2	1	13	1,81
Anti-Kpa (KEL3)	1	0	0	1	2
Anti-Jka (JK1)	8	1	0	7	1,38
Anti-Jkb (JK2)	3	1	0	2	1
Anti-Fya (FY1)	2	0	0	2	2,5
Anti-Fyb (FY2)	2	1	0	1	1
Anti-M (MNS1)	15	5	1	9	1,13
Anti-S (MNS3)	4	1	0	3	1,75
Anti-s (MNS4)	2	0	0	2	2
Anti-U (MNS5)	3	0	0	3	3,33
TOTAL	122	15	2	105	

Figure 2: Comparaison des résultats de titres obtenus sur les 122 échantillons testés en technique tube semi-automatisée au CNRHP et en technique gel automatisée sur IH-500.

105 échantillons avaient des valeurs supérieures en technique gel, 15 des titres identiques et 2 des titres inférieurs.

Les écarts de titre les plus importants (en moyenne supérieurs de 2 à 3 dilutions) concernaient les anticorps du système RH. Les spécificités anti-KEL1 et anti-MNS1 comptaient le plus d'échantillons ayant des titres égaux, voire inférieurs d'une dilution, en technique gel.

A Anti-D (RH1) n=26

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

B Anti-K (KEL1) n=16

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

Figure 3: Comparaison des résultats de titre obtenus en technique tube et en technique gel sur IH-500 pour chaque échantillon contenant un anti-D (RH1) [A] ou un anti-K (KEL1) [B] 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 (ligne jaune) défini dans notre laboratoire semble correspondre à un titre d'au moins 3 dilutions de plus en gel, soit 128 en prenant en compte l'incertitude de mesure de cet examen (1 dilution).

Pour les échantillons contenant un anti-K (KEL1), le titre seuil de 16 en tube (ligne jaune) utilisé dans notre laboratoire semble pouvoir être également utilisé comme titre seuil en gel.

Conclusion :

Le titrage des anticorps anti-érythrocytaires automatisés en carte gel LISS Coombs sur IH-500 montre de meilleures performances de répétabilité et de reproductibilité que la technique semi automatisée en tube actuellement utilisée au CNRHP. Les résultats des titres en gel sont dans 86% des cas (105/122) supérieurs à ceux de la technique tube. Ainsi, il semble possible d'extrapoler en toute sécurité les titres seuils définis pour la technique tube à la technique gel. Cependant, il sera probablement nécessaire, pour certaines spécificités, de revoir ces seuils à la hausse, sous couvert d'études avec des données cliniques, afin d'éviter d'induire un suivi de grossesse lourd, anxiogène et inutile, pour un certain nombre de patientes.