



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur www.sciencedirect.com

 ScienceDirect

Transfusion Clinique et Biologique 14 (2007) 381–385

TRANSFUSION
CLINIQUE ET BIOLOGIQUE

<http://france.elsevier.com/direct/TRACLI/>

Article original

Intérêt de la technique de microtitrage des anticorps anti-RH1 dans le suivi immunohématologique des femmes enceintes

Microtitration of anti-RH1 antibodies: Interest in the follow-up of pregnant women

M. Dupont, J. Gouvitsos, I. Dettori, J. Chiaroni, V. Ferrera*

Service d'immunohématologie clinique, Établissement français du sang Alpes-Méditerranée, site de Marseille-Baille, 149, boulevard Baille, 13005 Marseille, France

Disponible sur Internet le 26 novembre 2007

Résumé

La proposition d'une injection systématique de 300 µg d'IgG anti-RH1 (Rhophylac®) à 28 SA chez les femmes enceintes RH :–1 complique l'interprétation des recherches d'anticorps irréguliers (RAI) au cours de la grossesse ; distinguer le caractère immun ou passif de l'anti-RH1 présent conditionne néanmoins la prise en charge obstétricale et transfusionnelle des patientes. La mise en place d'une technique permettant cette distinction semble donc nécessaire.

Matériel et méthodes. – La technique de microtitrage des anti-RH1 est basée sur un test indirect à l'antiglobuline en support solide Coombs IgG/Diamed®. Deux cents spécimens sont testés en comparaison à un standard de concentration connue préparé à partir d'un étalon anti-RH1 national. Si la concentration en anti-RH1 mesurée est inférieure ou égale à la concentration attendue, un anticorps passif est présent. Si la concentration est largement supérieure, on suspecte une allo-immunisation.

Résultats. – La technique a permis de confirmer 38 alloanti-RH1 et 112 anticorps anti-RH1 passifs. Elle a surtout permis de corriger 25 diagnostics : sept alloanti-RH1 initialement étiquetés passifs et 18 anti-RH1 passifs initialement étiquetés immuns. Quinze échantillons sont ininterprétables, en raison d'un prélèvement trop précoce par rapport à la date d'injection, et dix dossiers sont en attente d'un prélèvement de contrôle.

Discussion. – Le microtitrage trouve toute sa place dans le suivi des femmes enceintes RH :–1 en cas de difficultés d'interprétation des RAI. Il est à proposer en l'absence d'information sur l'injection de Rhophylac®, et lors de toute intensité de réaction incohérente par rapport à la date d'injection annoncée.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

The proposal for a 300 µg anti-RH1 injection at 28 GW by RH:–1 pregnant women complicates the interpretation of the screening for alloantibodies during pregnancy; to distinguish an alloantibody from a passive one is nevertheless important for the care of the patients. Testing a technique allowing this distinction seems thus necessary.

Material and methods. – The technique of microtitration of anti-RH1 antibodies is an indirect antiglobulin test. Two hundred specimens were tested in comparison with a standard prepared from a national anti-RH1 standard. If the anti-RH1 concentration measured is lower or equal to the expected concentration, there is a passive antibody. If the concentration is largely higher, we can suspect an allo-immunization.

Results. – With this technique, 38 alloanti-RH1 and 112 passive anti-RH1 antibodies were confirmed. Twenty-five diagnosis were modified: seven alloanti-RH1 initially labeled passive and 18 passive anti-RH1 previously considered as alloantibodies. 15 cases can not be concluded, because the blood sample was taken away too early after the injection, and 10 cases are on standby, waiting for a control.

Discussion. – The microtitration is an important exam in the follow-up of the RH:–1 pregnant women when an anti-RH1 antibody is found. This exam should be offered each time we have no information about the anti-D injection, or when an incoherent reaction compared to the presumed date of injection is observed.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Incompatibilité fœtomaternelle RH1 ; Suivi des femmes enceintes ; Prophylaxie anti-RH1 ; Microtitrage ; Anticorps anti-RH1

Keywords : RH1 foetomaternal incompatibility; Pregnant women follow-up; Anti-RH1 prophylaxis; Microtitration; Anti-RH1 antibody

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : virginie.ferrera@efs.sante.fr (V. Ferrera).

1. Introduction

L'incompatibilité fœtomaternelle (IFM) est caractérisée par l'existence d'une maladie hémolytique fœtale ou néonatale résultant de la destruction des hématies du fœtus sous l'effet d'anticorps d'origine maternelle. À la suite d'une allo-immunisation, l'organisme maternel développe des anticorps contre un antigène des hématies fœtales, celui-ci étant absent de la surface des cellules maternelles [1]. L'IFM la plus fréquente est de loin l'IFM ABO (5 % des naissances) mais elle n'est pas responsable d'anémies fœtales sévères [2]. L'IFM RH1 arrive en second ; son incidence, comprise entre six à dix pour mille naissances dans les années 1960, s'est effondrée depuis 1970 et la généralisation en France de l'injection prophylactique d'immunoglobulines anti-RH1 [2]. Néanmoins, il persiste encore à l'heure actuelle des cas résiduels d'incompatibilité fœtomaternelle RH1, de l'ordre de 0,9/1 000 naissances [3], avec un risque d'allo-immunisation plus important au troisième trimestre et à l'accouchement [4].

Depuis novembre 2005, le Conseil national des gynécologues et obstétriciens français (CNGOF) recommande chez toute femme enceinte RH :−1 non immunisée contre l'antigène RH1 et dont le fœtus est connu ou présumé RH :+1 une injection prophylactique systématique de 300 µg IM d'IgG anti-RH1 (Rhopylac[®]) à 28 S.A +/- une semaine [5]. Ce changement de protocole induit de nouvelles difficultés dans l'interprétation des recherches d'anticorps irréguliers (RAI) réalisées dans le cadre du suivi immunohématologique des femmes enceintes et dans le cadre de l'anticipation d'éventuels besoins transfusionnels. En effet, le calendrier de surveillance immunohématologique des femmes enceintes demeurant inchangé à ce jour et la réalisation d'une RAI à proximité de l'accouchement étant nécessaire pour anticiper au mieux les difficultés transfusionnelles [6,7], deux types d'erreurs d'interprétation sont possibles chez les femmes enceintes RH :−1 après injection systématique :

- conclure à une allo-immunisation anti-RH1 si l'on n'est pas informé d'une injection de Rhophylac[®], ce qui présente deux conséquences : indiquer un suivi obstétrical rapproché (tous les 15 jours) inutile et générant une angoisse pour la patiente et rendre toute indication ultérieure de Rhophylac[®] caduque, la patiente étant étiquetée immunisée ;
- conclure à un anti-RH1 passif alors que la patiente présente un alloanti-RH1 ignoré par méconnaissance du statut de la RAI avant injection, le risque étant ici de laisser évoluer sans suivi adapté une allo-immunisation pouvant provoquer une atteinte fœtale sévère [2].

Ces difficultés sont à l'origine de la mise en place d'une technique de microtitrage permettant de distinguer, sur leurs concentrations, un anticorps anti-RH1 passif (ACP) d'un alloanticorps anti-RH1.

2. Matériel et méthodes

Cette étude a été conduite au sein du laboratoire d'immunohématologie clinique de l'EFS Alpes-Méditerranée,

site de Marseille-Baille, sur une période d'un an, de juillet 2006 à juillet 2007.

La technique a d'abord été validée au cours de la première partie de l'étude, puis elle a été mise en place en routine au laboratoire, avec pour objectif l'aide au diagnostic.

Pour cette étude, 200 sérums ont été testés. La validation technique a porté sur 130 échantillons sélectionnés sur les critères suivants :

- sérums de femmes enceintes avec présence certaine d'un anticorps anti-RH1 passif (date d'injection et dose injectée précisées) ;
- sérums de patientes connues présentant un alloanticorps anti-RH1.

La mise en œuvre de la technique dans un but d'aide au diagnostic a concerné 70 spécimens de femmes enceintes RH :−1 présentant un anticorps anti-RH1 en test de Coombs indirect à l'antiglobuline et sélectionnés sur les critères suivants :

- absence d'information concernant l'injection potentielle d'IgG anti-RH1 ;
- ou présence d'une intensité de réaction incohérente par rapport à la date d'injection de Rhophylac[®] annoncée, c'est-à-dire absence de diminution d'intensité de l'agglutination entre deux RAI distantes d'un mois environ ou intensité de réaction trop forte par rapport à la date d'injection précisée.

La technique mise en place d'après les données publiées par Y. Brossard et al. [8] consiste en un test indirect à l'antiglobuline en supports Diamed[®]. Les Hématies-tests papainées utilisées sont de groupe O et de phénotype RH :+1, −2, −3, +4, +5 et KEL :−1. Nous avons cependant tenté de simplifier la technique en la testant sur hématies natives (cf. infra en 1.4).

Un étalon standard de concentration connue est traité en parallèle des échantillons dans chaque série. Il est préparé à partir d'un standard anti-RH1 national (code produit 51260), fourni par le CNRGS, [C] : 1,04 µg/ml, lyophilisé et conservé à 4 °C. Ce standard est régénéré dans 1 ml d'eau distillée. Puis il est dilué au 1/37 dans un mélange contenant 10 % de plasma négatif en RAI et acide de sodium en solution phylalbumine à 30 % (référence AXDAY 1100-30) pour obtenir une concentration finale à 28 ng/mL, soit la concentration en anti-RH1 attendue 48 heures après injection de 200 µg de Rhophylac[®]. Six dilutions géométriques de raison 2 des sérums (du pur jusqu'à la dilution 1/32) sont traitées en parallèle avec six dilutions géométriques de raison 2 du standard (de la dilution 1/2 jusqu'à la dilution 1/64). Les intensités d'agglutinations sont cotées (de − à ++++) et comparées aux intensités d'agglutination obtenues avec celles de l'étalon standard. La lecture visuelle des agglutinations permet, par comparaison avec les agglutinations du standard dont la concentration est connue, de calculer les concentrations en anticorps anti-RH1 dans les échantillons. La méthode consiste ensuite à les comparer aux concentrations en anticorps anti-RH1 attendues en fonction de la date d'injection. La concentration en anticorps anti-RH1 dans les échantillons est calculée en multipliant

Tableau 1
Exemples de calcul de la concentration en anti-RH1 dans plusieurs échantillons (vu dans [8])

Dilutions	1/4	1/8	1/16	A	×	B	=	C
<i>Étalon</i> (28 ng/mL)								
Concentration (ng/mL)	7	3,5	1,75	Inverse de la dernière dilution réactive de l'échantillon		Concentration de la dilution étalon avec la même intensité de réaction		Concentration en anti-RH1 de l'échantillon
Résultats	++++	+++	+					
<i>Échantillons</i>								
1	+	–	–	4	×	1,75	=	7 ng/mL
2	++++	++++	+++	16	×	3,5	=	56 ng/mL
3	++++	++++	++++	>16	×	7	=	>112 ng/mL
4	+++	+	–	8	×	1,75	=	14 ng/mL

l'inverse de la dernière dilution réactive de l'échantillon par la concentration de la dilution étalon ayant la même intensité de réaction.

Un exemple de calcul est présenté dans le [Tableau 1](#).

Le taux d'un anticorps passif (ACP) est prévisible ; il dépend du nombre de doses injectées et du délai de prélèvement après injection [8–10]. Les concentrations attendues en anticorps anti-RH1 dans les échantillons en fonction de la date d'injection du Rhophylac[®] sont déterminées par la formule pharmacocinétique suivante [11] :

C (ng/mL) = $n \times 15e^{0,03 t}$, où n est le nombre de doses de 100 µg injectées et t le délai en jours depuis l'injection.

Si la concentration mesurée est très proche ou inférieure à la concentration attendue, on peut conclure à la présence d'un anticorps anti-RH1 passif [8]. Si elle lui est nettement supérieure, une immunisation anti-RH1 peut être présente [8]. Il est alors nécessaire de contrôler le résultat sur un nouveau prélèvement.

3. Résultats

3.1. Validation de la technique

Les caractéristiques des 130 spécimens utilisés pour valider la technique sont reportées dans le [Tableau 2](#). La répétabilité de la technique a été validée en testant chaque échantillon en double. La reproductibilité de la technique a été validée en testant à nouveau, par un technicien différent, 30 sérums congelés.

3.1.1. Validation des concentrations obtenues sur les 32 échantillons présentant un alloanti-RH1

Le caractère « allo » des anticorps a été validé sur l'un des deux critères suivants :

Tableau 2
Profils des échantillons testés en fonction du délai injection de Rhophylac[®] 200 µg - prélèvement

<i>Alloanti-RH1</i>	32
<i>Anti-RH1 Passif</i>	98
Délai d'injection 2 jours	35
Délai d'injection 3–14 jours	19
Délai d'injection 15–30 jours	20
Délai d'injection 30–60 jours	20
Délai d'injection 60–90 jours	4

- concentrations mesurées supérieures aux concentrations attendues après injection de Rhophylac[®] ;
- concentrations mesurées stables entre deux prélèvements, car un anti-RH1 d'immunisation n'a pas tendance à décroître au cours de la grossesse, contrairement à un ACP [8].

Les résultats obtenus sont consignés dans le [Tableau 3](#).

3.1.2. Étude des 35 échantillons prélevés 48 heures après injection de Rhophylac[®]

Les résultats comparant les concentrations en anticorps anti-RH1 attendues et mesurées par la technique de microtitrage sont présentés dans la [Fig. 1](#). Les concentrations mesurées apparaissent nettement plus élevées que les concentrations attendues. L'analyse statistique (loi de Student) des différences observées montre que les concentrations mesurées et attendues sont significativement différentes.

3.1.3. Étude des 63 échantillons prélevés plus de 48 heures après injection de Rhophylac[®]

Les résultats comparant les concentrations en anticorps anti-RH1 attendues et mesurées par la technique de microtitrage sont consignés dans la [Fig. 2](#). Les concentrations mesurées sont similaires aux concentrations attendues. L'analyse statistique (loi de Student) des différences observées montre que les concentrations mesurées et attendues ne sont pas significativement différentes.

3.1.4. Sensibilité de la technique sur hématies natives versus hématies papainées

Parmi les spécimens ayant servi à valider la méthode, cinquante ont été traités parallèlement sur hématies natives et sur hématies papainées de groupe O et de phénotype Rhésus RH : +1, –2, –3, +4, +5. Les résultats obtenus sont présentés dans le [Tableau 4](#). Sur les 50 échantillons testés, 56 % montrent

Tableau 3
Validation du caractère « allo » de 32 anticorps anti-RH1

[C] mesurée > [C] attendue avec un ACP	17/32	53 %
[C] stable entre deux prélèvements	12/32	9 %
Résultats douteux (absence de second prélèvement confirmant la stabilité de la concentration)	3/32	9 %

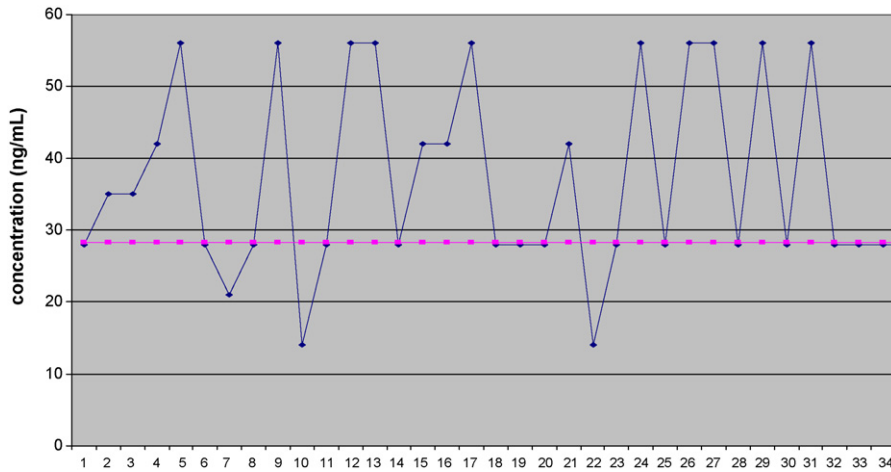


Fig. 1. Prélèvements réalisés 48 heures après injection de Rhophylac®. Comparaison des concentrations en anticorps anti-RH1 mesurées et attendues (n = 32).

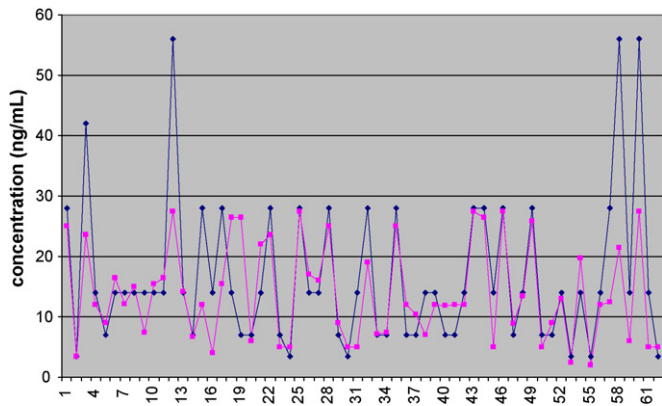


Fig. 2. Prélèvements réalisés plus de 48 heures après injection de Rhophylac®. Comparaison des concentrations en anticorps anti-RH1 mesurées et attendues (n = 63).

une concentration en anti-RH1 identique sur hématies natives ou papainées.

Pour 24 % des échantillons, les concentrations mesurées sont discordantes, d’une dilution maximum et toujours en faveur des hématies papainées, selon que l’on a travaillé sur hématies natives ou papainées.

Tableau 4

Comparaison des résultats obtenus sur hématies natives versus hématies papainées

n = 50 échantillons	[C] identique sur hématies natives et papainées	28/50	56 %
	[C] discordante entre hématies natives et papainées	12/50	24 %
	Anti-RH1 indétectable sur hématies natives	10/50	20 %

Dans 20 % des cas, l’anti-RH1 n’est pas détectable sur hématies natives alors qu’il l’est sur hématies papainées. Seuls des anticorps ayant une concentration inférieure à 7 ng/mL sur hématies papainées sont retrouvés dans cette catégorie.

3.2. Mise en œuvre de la technique : 70 sérums pour 67 patientes

Les résultats sont consignés dans la Fig. 3.

Dans 53 % des cas, la nature de l’anticorps a été confirmée après microtitrage : 40 % ACP (n = 26) et 13 % allo-Ac (n = 9).

Dans 37 % des cas, la nature de l’anticorps a été reconsidérée grâce aux données du microtitrage : dans 27 % des cas (n = 18),

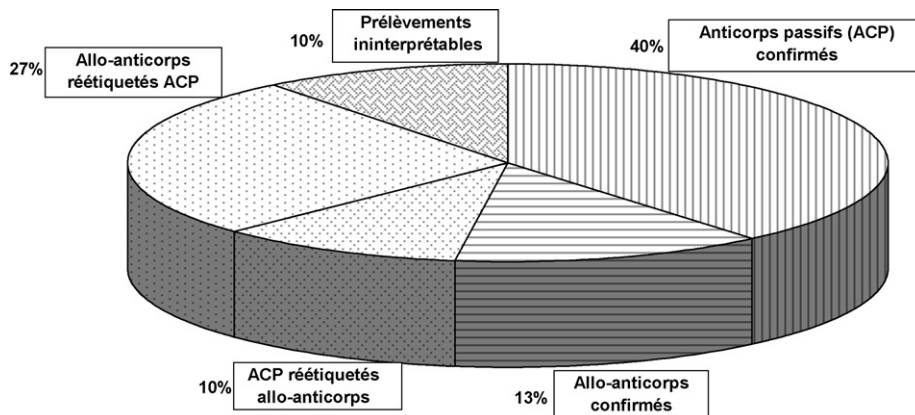


Fig. 3. Caractérisation des anticorps anti-RH1 après utilisation de la technique de microtitrage. n = 67 patientes.

les alloanti RH1 ont été réétiquetés ACP, et dans 10 % des cas ($n = 7$) les ACP ont été réétiquetés alloanticorps.

Dans 10 % des cas ($n = 7$), les dossiers sont en attente d'une conclusion sur la nature de l'anticorps anti-RH1 : les concentrations mesurées sont en faveur d'un ACP, mais aucune information sur l'injection d'IgG anti-RH1 n'a été transmise, et aucun prélèvement de contrôle n'a été envoyé.

4. Discussion

L'étude des échantillons présentant un anticorps anti-RH1 passif a montré que dans le cas où les échantillons sont prélevés moins de 48 heures après une injection d'IgG anti-RH1, les concentrations mesurées sont nettement supérieures aux concentrations attendues ; le microtitrage ne permet donc pas de différencier un alloanti-RH1 d'un anticorps passif dans cette situation. Au-delà des 48 heures, les concentrations en anti-RH1 mesurées sont similaires aux concentrations attendues estimées par la formule de décroissance des IgG anti-RH1 et la technique présente un intérêt pour confirmer la présence d'un anticorps passif ou pour alerter le prescripteur sur la présence possible d'une allo-immunisation.

La comparaison des résultats obtenus sur hématies natives ou papainées montre qu'en dessous de 7 ng/mL un anti-RH1 risque de ne pas être détecté sur hématies natives ; ces données confirment celles observées par l'équipe de Y. Brossard [8] pour qui un anti-RH1 est décelable sur hématies-tests normales dès que son taux est supérieur à 5 ng/mL. Néanmoins, l'utilisation d'une technique simplifiée étant plus confortable, la mise en œuvre d'une étude sur un plus grand échantillonnage serait souhaitable.

La validation technique des 32 alloanticorps a permis de confirmer le caractère allo de tous les anticorps sauf dans trois cas où un second prélèvement permettant de montrer la stabilité de l'anticorps était nécessaire et n'a pas été envoyé.

Lors de la mise en œuvre de la technique dans un but d'aide au diagnostic, le caractère passif ou allo de l'anti-RH1 a été confirmé dans 53 % des cas. Sept Ac anti-RH1 (10 %) initialement étiquetés ACP ont été caractérisés comme des allo-Ac : les concentrations mesurées étaient largement supérieures aux concentrations attendues pour quatre d'entre eux, et les prélèvements de contrôle demandés ont montré une absence de diminution de la concentration en anticorps anti-RH1 pour les trois autres. Les femmes enceintes ont pu alors bénéficier d'un suivi immunohématologique approprié.

Dix-huit Ac anti-RH1 (27 %) initialement étiquetés comme des allo-Ac ont été réétiquetés ACP : la date d'injection du Rhophylac[®] transmise a posteriori est cohérente avec la concentration mesurée. Le microtitrage a permis d'éviter le suivi bimensuel des RAI, les EDCL en cas de transfusion, et les patientes bénéficieront d'une injection prophylactique ultérieure dans le cas d'une nouvelle situation à risque hémorragique.

Notre étude a permis de valider l'utilisation de la technique de microtitrage pour définir la nature de l'anticorps anti-RH1

mis en évidence lors d'une RAI. Cependant, cette technique ne permet pas de s'assurer que les patientes sont correctement protégées vis-à-vis d'une allo-immunisation. Si des études font état de la dose résiduelle protectrice après injection de Rhophylac[®] [10], il serait intéressant de définir par microtitrage la concentration résiduelle d'anticorps anti-RH1 qui assurerait encore la protection de la patiente. Ce critère biologique pourrait alors autoriser de s'abstenir d'injecter une nouvelle dose de Rhophylac[®] si la couverture de la patiente est toujours suffisante [12]. Une étude complémentaire pourrait ainsi définir si le microtitrage a sa place dans l'arsenal permettant de savoir si l'immunoprophylaxie de la patiente est encore efficace.

D'un point de vue économique, le microtitrage est une technique simple et rapide qui permet de ne pas multiplier les contrôles de RAI positives chez les femmes enceintes RH :–1. Cette étude montre que le microtitrage est une technique qui prend toute sa place dans le suivi immunohématologique des femmes enceintes RH :–1.

Il est à proposer chez toute femme enceinte RH :–1 présentant un anticorps anti-RH1, en l'absence d'information concernant l'injection potentielle d'IgG anti-RH1, ou en présence d'une intensité de réaction incohérente par rapport à la date d'injection des IgG anti-RH1 annoncée.

Références

- [1] Boubli L, d'Ercole C, Robert V. Incompatibilités fœtomaternelles. In: Sébahoun G, editor. *Hématologie Clinique et Biologique*. Arnette; 2005. p. 83–9.
- [2] MH Poissonnier, et al. Incompatibilité fœtomaternelle érythrocytaire. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Gynécologie/Obstétrique*, 5-020-A-20, pédiatrie, 4-002-R-25, 1998, 12 p.
- [3] Poissonnier MH. *Real Gynécobstet* 2006;107:1–7.
- [4] Mannessier L, Alie-Daram S, Roubinet F, et al. La prévention de la maladie hémolytique du fœtus et du nouveau-né : il faut agir ! *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2000;29:441–4.
- [5] Cortey A, Brossard Y. Prevention of fetomaternal rhesus-D allo-immunization. Practical aspects. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2006;35(S1): 1S123–30.
- [6] Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale paru au J.O n° 104 du 4 mai 2002 page 8375 texte n° 80.
- [7] Décret n° 92-143 du 14 février 1992 relatif aux examens obligatoires prénuptial, pré- et postnatal paru au J.O n° 40 du 16 février 1992.
- [8] Brossard Y, Parnet-Mathieu F, Larsen M. Diagnostic et suivi prénatals des allo-immunisations érythrocytaires. *Feuill Biol* 2002;43(245):11–7.
- [9] Witter FR, Shirey RS, Nicol SL, Ness PM. Postinjection kinetics of antepartum Rh immune globulin. *Am J Obstet Gynecol* 1990 Sep;163(3):784–6.
- [10] Bichler J, Schondorfer G, Pabst G, Andresen I. Pharmacokinetics of anti-D IgG in pregnant RhD-negative women. *BJOG* 2003 Jan;110(1): 39–45.
- [11] Brossard Y, Parnet-Mathieu F, Larsen M. Incompatibilités fœtomaternelles érythrocytaires. In: Lefrere JJ, et al., editors. *Transfusion sanguine : une approche sécuritaire*. Ed John Libbey; 2000. p. 300–17.
- [12] Brossard Y. Les recommandations 2006 sur l'immunoprophylaxie RH périnatale. Impact sur le suivi immunohématologique mère–enfant. *Transfus Clin Biol* 2007;14:197.