

TITRAGE DE L'ANTICORPS ANTI-RH1 CHEZ LA FEMME ENCEINTE : COMPARAISON DE DEUX TECHNIQUES

TITRATION OF ANTI-RH1 ANTIBODY IN PREGNANCY : COMPARISON OF TWO METHODS

T. LOUKIL^{1,2}, I. BEN AMOR^{1,2}, H. MNIF^{1,2}, J. GARGOURI^{1,2}

1 : Centre Régional de transfusion sanguine de Sfax-Tunisie

2 : Faculté de médecine, Université de Sfax-Tunisie

*e-mail de l'auteur correspondant : taicir.loukil@gmail.com

Résumé

Le titrage des anticorps permet d'estimer la concentration de l'Ac et de surveiller l'évolution du titre au cours de la grossesse. La technique de référence du titrage est le Coombs indirect en tube, en milieu salin avec des hématies non traitées par les enzymes. Mais la technique actuellement utilisée pour l'identification des anticorps est la technique en carte en gel en milieu à basse force ionique. Pour cela, nous nous sommes proposés de comparer les résultats du titrage de l'Ac anti-RH1 en Coombs indirect sur en utilisant deux supports : tube et carte en gel. Le titrage de l'anti-RH1 a été réalisé sur 59 échantillons sériques de 54 femmes RH:-1 chez lesquelles nous avons identifié un anti-RH1. Les titres ont été plus élevés par la technique en gel avec un nombre de dilution d'écart variant de 1 à 6. Seuls les anti-RH1 de titre égal ou supérieur à 1/32 en gel, ont été titrés en tube avec des titres plus bas qu'en gel.

Mots clés : Titrage ; Test de Coombs indirect ; Anticorps anti-RH1 ; Tube ; Carte en gel.

Abstract

The titration of antibodies allows to estimate their concentration and to follow the evolution of the title during pregnancy. The reference technique of the titration is indirect Coombs in tube, in salt environment with red blood cells not treated by enzymes. But the method used for antibody identification is the one in gel card with low ionic strength solution. We compared the results of the titration of anti-RH1 with indirect Coombs of frozen samples by using: tube and gel card. The titration of anti-RH1 was realized on 59 serum samples of 54 women RH1 having anti-RH1. The titles were higher by the technique with gel card with a number of dilutions varying from 1 to 6. Only anti-RH1 antibodies of title equal or upper to 1/32 in gel card were titled in tube with titles lower than in gel card.

Key words: Titration ; Coombs indirect test ; Anti-RH1 antibodies ; Tube ; Gel card.

ملخص

قيس الأجسام المضادة يبين تركيزها وتطورها أثناء الحمل الطريقة المعتمدة هي الكومبس غير المباشر في أنبوب في وسط مالح مع كريات الدم الحمراء خال من الانزيمات ولكن الأسلوب الذي يستخدم حاليا هو بطاقات الجل في وسط منخفض القوة في هذا الإطار قارنا نتائج قيس المضادات بإستعمال الأنبوب و بطاقة الجل. قمنا بقيس مضادات 59 امرأة زمرة فصيلة دمها سالبة وتملك مضادات ضد الزمرة الموجبة التركيز كان أقوى في البطاقات مقارنة بالأنبوب مع فرق يصل الى 6 أضعاف. علما وأن المضادات ذات تركيز أكثر من 32 مرة وقع رصدها بالطريقتين مع أفضلية للبطاقات

الكلمات المفاتيح: قيس ; الكومبس غير المباشر ; مضادات ضد الزمرة الموجبة ; الأنبوب ; بطاقات الجل.

1- INTRODUCTION

La présence, chez la femme enceinte, d'anticorps (Ac) anti-érythrocytaires d'importance obstétricale nécessite une évaluation du risque hémolytique in utero par un suivi immuno-hématologique rapproché comportant la réalisation répétée du titrage et/ou du dosage pondéral. Le titrage des Ac est une méthode semi-quantitative qui permet d'estimer la concentration de l'Ac et de surveiller l'évolution du titre au cours de la grossesse afin de détecter une réactivité de l'allo-immunisation par passage des hématies fœtales dans la circulation maternelle.

La technique de référence du titrage est le test de Coombs indirect en tube, en milieu salin avec des hématies non traitées par les enzymes [1]. D'ailleurs, le titre critique des Ac au-delà duquel il existe un risque d'anémie fœtale a été déterminé en utilisant la technique en tube. Or, la technique actuellement utilisée par la majorité des laboratoires pour l'identification des Ac est la technique en carte en gel en milieu à basse force ionique (BFI). Ces deux supports sont différents au niveau de l'exécution technique, de la réactivité de l'antiglobuline utilisée et du mode de lecture. Le titrage réalisé par cette technique, réputée plus sensible que la technique en tube, peut surestimer le titre de l'Ac et, par voie de conséquence, entraîner des gestes invasifs dangereux pour le fœtus [2]. Pour cela, nous nous sommes proposés de comparer les résultats du titrage d'Ac anti-RH1 en Coombs indirect sur des échantillons sériques congelés en utilisant deux supports : tube et carte en gel.

2- MATERIEL ET METHODES

Notre étude a été réalisée au centre régional de transfusion sanguine de Sfax. Elle a consisté à titrer les Ac anti-RH1 chez des femmes RH:-1 suivies en milieu obstétrical, par deux techniques différentes.

2-1 Matériel :

Le titrage de l'Ac anti-RH1 a été réalisé sur 59 échantillons sériques de 54 femmes RH:-1 chez lesquelles nous avons identifié un anti-RH1 lors d'une recherche d'anticorps irréguliers (RAI) antérieure. Les sérums étudiés ont été congelés à -80°C dans la sérothèque « RAI positive » depuis Janvier 2009 jusqu'à Avril 2012.

Les indications de la RAI chez ces femmes ont été :

- Suivi immuno-hématologique d'une grossesse normale (22 cas) ou après injection d'anti-RH1

au décours d'une complication obstétricale (18 cas)

- Maladie hémolytique du nouveau-né (8 cas)
- Suivi de l'immunoprophylaxie par les immunoglobulines anti-RH1 injectées suite à un avortement (7 cas) ou à une grossesse extra-utérine (1 cas)
- Bilan étiologique d'avortements à répétition (1 cas) ou de mort fœtale in-Utéro (2 cas)

Pour chaque femme, nous avons relevé le titre initial de l'anti-RH1 ainsi que sa date de réalisation. Il est à noter que le titrage initial de l'anti-RH1 a été réalisé par la technique de Coombs indirect en solution de basse force ionique (TCI-BFI) en carte en gel (Carte BFI/Coombs, Diamed).

2.2 Méthodes :

Le titrage des Ac anti-RH1 a été réalisé par le TCI-BFI en testant une série de dilutions en cascade, de raison 2, du sérum de la femme en solution isotonique avec des hématies-tests de groupe O et de phénotype RH:1,-2,-3,4,5 KEL:-1. Il est à noter que nous avons apporté quelques modifications à la technique de référence. En effet, les hématies-tests ont été mises en suspension en solution BFI et non pas en solution saline de force ionique normale, le but étant de diminuer la période d'incubation de la réaction du fait d'une accélération de la vitesse et de la force de fixation de l'Ac sur son Ag spécifique.

Pour chaque sérum, le titrage a été réalisé sur deux supports différents: tube à hémolyse et carte en gel (Carte BFI/Coombs, Diamed). Le titre de l'Ac correspond à l'inverse de la plus forte dilution du sérum entraînant une agglutination visible des hématies.

3- RESULTATS

Pour les 59 sérums étudiés, les titres obtenus ont varié :

- de 0 à 1/1024 par la technique en tube
- et du titre pur à 1/4096 par la technique en gel

Les titres obtenus en tube et en gel sont représentés dans le tableau N°I.

Pour la totalité des sérums testés, nous avons obtenu des titres plus élevés par le support gel par rapport au support tube. Dans 41 cas, les anti-RH1 de titre inférieur ou égal à 1/16 en gel n'ont pas été détectés en tube. À partir du titre 1/32 en gel, on a commencé à détecter les anti-RH1 en tube avec des dilutions d'écart qui s'échelonnent entre 2 et 6.

TITRAGE DE L'ANTICORPS ANTI-RH1 CHEZ LA FEMME ENCEINTE : COMPARAISON DE 2 TECHNIQUES

Dans 23 cas des sérums étudiés, l'anti-RH1 présent est le plus probablement d'origine passive suite à l'injection d'immunoglobuline anti-RH1.

Ces Ac n'ont pas été détectés par le titrage en tube. Par la technique en gel, les titres ont été faibles ne dépassant pas 4 (tableau N°II).

Tableau N°I : Comparaison des titres de l'anti-RH1 en tube et en gel.

Nombre d'échantillons	Titre en gel	Titre en tube	Nombre de dilution d'écart pour la technique en gel par rapport à la technique en tube
14	Pur	N	-
7	2	N	-
12	4	N	-
5	8	N	-
3	16	N	-
1	32	N	-
2	32	Pur	5
1	64	8	3
1	128	4	5
1	256	4	6
1	256	16	4
1	256	64	2
1	512	8	6
1	512	16	5
1	1024	32	5
3	1024	64	4
2	2048	64	5
1	2048	128	4
1	4096	1024	2

N : négatif

Tableau N°II : Comparaison des titres des anti-RH1 résiduels en tube et en gel.

Nombre d'échantillons	Titre en gel	Titre en tube
13	Pur	Négatif
4	4	Négatif
6	2	Négatif

4- DISCUSSION

Les titres obtenus avec les deux supports pour un même sérum ont été différents. En effet, les titres ont été plus élevés par la technique en gel avec un nombre de dilution d'écart variant de 1 à 6. De plus, 41 cas d'Ac anti-RH1 de titre inférieur ou égal à 1/16 en gel n'ont pas été détectés en tube. Seuls les Ac anti-RH1 de titre égal ou supérieur à 1/32 en gel, ont été titrés en tube avec des titres plus bas qu'en gel. Ces constatations sont attendues du fait de la meilleure sensibilité du TCI en gel comparé à celle de la technique en tube [4]. Le titrage en tube dépend de nombreux paramètres dont la qualité de l'antiglobuline, la qualité de la centrifugation et la lecture de l'agglutination qui reste opérateur dépendante. Dans notre laboratoire, un contrôle de qualité régulier est pratiqué pour chaque lot d'antiglobuline et la lecture du titrage est toujours vérifiée au microscope. Sur le plan pratique, ce défaut de sensibilité du tube pourrait être à l'origine d'une sous-estimation du titre des Ac et, par conséquent, d'une surveillance insuffisante de la grossesse.

En plus, les cartes en gel apportent le bénéfice de la grande rapidité, la facilité d'exécution et la standardisation de la lecture. En effet, elles apportent une simplification essentielle au niveau du TCI par la suppression des lavages préalables à la phase antiglobuline et l'addition même de l'antiglobuline [5].

Nos résultats concordent avec ceux d'une étude française ayant pour objectif d'évaluer la technique de titrage en support gel par rapport à la technique de référence en tube. Les auteurs de cette étude ont testé 65 échantillons comportant 13 spécificités d'Ac avec des titres variant du pur à 1/2048 et ont montré que, pour les Ac anti-RH1, l'utilisation du support en gel a augmenté de façon peu reproductible le titre des Ac [6].

Par ailleurs, dans 23 cas de notre étude, les Ac anti-RH1 faibles en gel n'ont pas été détectés par la technique en tube. Selon les renseignements cliniques, ces Ac correspondent très probablement à des anti-RH1 passifs résultant de l'injection récente d'immunoglobuline anti-RH1.

Toutefois, il est important de repérer l'existence associée d'une immunisation anti-RH1 faiblement productive. Le titrage classique en Coombs indirect ne permet pas de distinguer entre un anti-RH1 passif et celui d'immunisation. Il faut avoir recours à des techniques quantitatives plus précises : dosage pondéral et technique de microtitrage comparatif de l'Ac avec une solution standard anti-

RH1 [7]. En pratique, ces méthodes n'étant pas encore mises en place dans notre laboratoire, on se base sur la surveillance de l'évolution des Ac dans le temps par la pratique d'une nouvelle RAI et, éventuellement, d'un nouveau titrage sur un autre prélèvement à un mois d'intervalle. En effet, après injection d'immunoglobuline anti-RH1, le délai de disparition de l'anti-RH1 passif est de 1 à 4 mois en fonction de la dose reçue d'anti-RH1 [8, 9, 10].

Il est à noter que la valeur du TCI, quant à l'évaluation du pronostic fœtal, est largement débattue et la notion de seuil critique est discutée. Il est généralement admis qu'un titre inférieur ou égal à 1/16 met à l'abri d'une atteinte hémolytique gravissime en cours de grossesse. Cependant, la technique de titrage comporte une relative imprécision et elle est mal corrélée au risque réel d'anémie fœtale. En effet, le titre en Coombs indirect est très sensible à l'affinité des Ac vis-à-vis de leurs Ag cibles. Le dosage pondéral est plus précis et plus reproductible dans l'évaluation du risque d'anémie.

5- CONCLUSION

Le titrage de l'anti-RH1 par la technique en gel est plus sensible, plus rapide, d'exécution plus simple et de lecture plus objective. Cependant, elle est plus coûteuse. La notion d'injection d'anti-RH1 ne suffit pas pour distinguer les Ac d'allo-immunisation de ceux résiduels. Ceci est possible grâce au dosage pondéral et au micro-titrage qui n'est pas pratiqué dans notre laboratoire [11].

Des études plus élargies sont nécessaires afin de déterminer la relation entre le titre des Ac et le risque d'anémie fœtale afin de déterminer les titres critiques des principaux Ac à risque fœtal.

6- REFERENCES

- [1] Miquel E, Cavelier B, Bonneau J.C, Rouger P. Incompatibilités fœto-maternelles érythrocytaires (IFME) : de la surveillance immunohématologique des femmes enceintes à la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN). *Transfus Clin Biol.* 2005;12:45-55.
- [2] Mannessier L, Ferrera V. Titrage des anticorps anti-érythrocytaires. In: Mannassier L, les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. Paris, John Libbey EUROTEXT. 2011; 99-103.
- [3] Carbonne B, Castaigne V, Cynober E, Levy R, Cortey B, A. Mailloux et al. Le point sur le suivi des allo-immunisations érythrocytaires. *Gynecol Obstet Fertil* . 2010 ; 38 : 205-213.
- [4] Cheng D, Hao Y. Comparative evaluation of the microcolumn gel card test and the conventional tube test for measurement of titres of immunoglobulin G antibodies to blood group A and blood group B. *J Int Med Res.* 2011;39:934-43.

TITRAGE DE L'ANTICORPS ANTI-RH1 CHEZ LA FEMME ENCEINTE : COMPARAISON DE 2 TECHNIQUES

[5] Mannessier L, Chiaroni J. Etude comparative de différents procédés de filtration : application aux recherches des anticorps irréguliers anti-érythrocytaires (RAI). RFL.2000 ; 325 : 33-36.

[6] Mailloux A, Dufaux M, Zorayan V, Huguet-Jacquot S, Larsen M, Carbonne B, Cortey A. Tentative de corrélation de deux techniques de titrage des anticorps anti-érythrocytaires chez la femme enceinte immunisée. Transfus Clin Biol .2011 ; 18 :370.

[7] Brossard Y. La maladie hémolytique du nouveau-né par incompatibilité fœto-maternelle. RFL. 2001 ; 329 : 7-10.

[8] Cotey A, Brossard Y. Prévention de l'allo-immunisation rhésus D fœto-maternelle : Aspects pratiques. J Gynecol Obstet Biol Reprod. 2006 ; 35 : 1S123-1S130.

[9] Howard H, Martlew V, Mcfadyen I, Clarke C, Duguid J. Consequences for fetus and neonate of maternal red cell allo-immunization. Arch Dis child fetal neonatal. 1998 ; 78: F62-6.

[10] Hensley JG, Coughlin KP, Klein LL. A curious case of anti-D antibody titer. J Midwifery Womens Health. 2009 ; 54 : 497-502.

[11] Dupont M, Gouvisos J, Dettori I, Chiaroni J, Ferrera V. Intérêt de la technique de microtitrage des anticorps anti-Rh1 dans le suivi immunohématologique des femmes enceintes. Transfus Clin Biol. 2007;14:381-5.