



ÉTABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG - NORD DE FRANCE

DOSAGE PONDERAL DES ANTICORPS ANTI-RH

Anne DELSALLE

oct 2013 TACT

Définition



Examen qui permet de mesurer la quantité d'anticorps anti-RH présent dans un échantillon biologique et de l'exprimer en poids ($\mu\text{g/ml}$) ou encore en UI/ml.

$$1 \mu\text{g} = 5 \text{ U.I}$$

Contexte



2 contextes

LFB: dosage des anti-D sur les plasmas de départ, produits intermédiaires et finis du process de fabrication des Ig anti-D (NATEAD) jusque 2005
→ respect des spécifications

Description de la méthode à la pharmacopée Européenne chapitre 2.7.13

LBM: dosage des anti-RH(D,C,c,E,e) dans les plasmas/sérums des femmes enceintes immunisées → évaluation du risque foetal potentiel

Maladie hémolytique du Nouveau-Né



- Transport actif des Ig de la circulation maternelle vers le fœtus bénéfique = transfert à l'enfant d'une immunité passive
- Par contre, en cas d'allo-immunisation maternelle
 - Risque foetal dominé par l'apparition d'une anémie hémolytique, parfois sévère (Hb <6g/dl)
 - Risque néonatal d'anémie associée à une hyperbilirubinémie libre de toxicité neurologique

consécutif à la destruction des hématies incompatibles de l'enfant par les Ig anti-RH d'origine maternelle

Anémies fœtales sévères par IFM sont causées

- 90% anti-RH1
- 8% anti-KEL1 et anti-RH4
- 2% Ac autres spécificités

Avant l'application en 2005, de la prévention anténatale systématique à 28SA par injection d'Ig anti-D, il persiste encore 750 cas d'allo-immunisation anti-D par an en France (0,9/1000 naissances)

- Ig G site de traversée placentaire
- Mécanisme actif en place 15/17 SA (μendocytose)
- Antigènes RH matures dès 30/40 jours de vie
- Sous classes IgG1 et/ou IgG3

Role des sous classes



Ig

IgG1	IgG3
20 SA [anti-D] foetus \geq [anti-D] maman	28-32 SA [anti-D] foetus = [anti-D] maman
ANEMIE SEVERE+++ (durée d'exposition à l'AC plus longue in utéro puisque passage précoce) Risque accru in utéro	BILIRUBINE +++ (destruction accrue des GR sensibilisés par IgG3 car affinité RFcY IgG3>IgG1) Risque accru chez le NN

Suivi biologique



Arrêté du 19 avril 1985 – Décret du 14 février 1992

Chez la femme enceinte immunisée

- RAI dépistage et identification (Ac additionnel(s))
- Titrage
- **Dosage pondéral si anti-RH**
 - Bonne corrélation entre le taux d' Ac et le risque d'hémolyse in utéro chez un fœtus incompatible**
- Génotypage RHD foetal sur plasma maternel

2 méthodes de quantification



TITRAGE	DOSAGE PONDERAL
<p>Test Indirect à l' Antiglobuline en milieu salin 0,9%</p> <p>Manuelle tube</p>	<p>Agglutination directe en Broméline-Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)</p> <p>Auto-analyseur flux continu</p>
<p>Dilutions de raison 2 par entrainement</p>	<p>Dilutions intermédiaires</p> <p>2 séries de dilutions indépendantes</p>
<p>Lecture macroscopique</p>	<p>Lecture D.O</p>
<p>Titre= dernière dilution où l'agglutination est encore visible</p> <p>1 titre d'écart = variation de la Q d'AC du simple au double</p> <p>Titrage en avec prélèvement précédent</p>	<p>Concentration: moyenne calculée à partir de X dosages /à une gamme étalon</p> <p>Meilleure reproductibilité</p> <p>CV 5 à max 20 %</p>
<p>Q d'AC fixée dépend de son affinité pour la cible</p> <p>Toutes spécificités</p>	<p>Q d'Ac dosée= Q totale d'Ac</p> <p>Anti-RH</p>

Principe du dosage



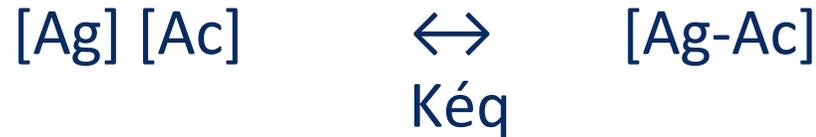
- Les Ac sont quantifiables par l'intermédiaire des complexes immuns Ag-Ac
- L'intensité d'agglutination varie de façon proportionnelle avec la concentration de l'Ac à l'intérieur d'une zone étroite de concentrations → définir la zone de linéarité
- Calcul de l'échantillon à doser par comparaison à un étalon (Préparation internationale de référence du National Institute of Biological Standards and Control)

Conditions du

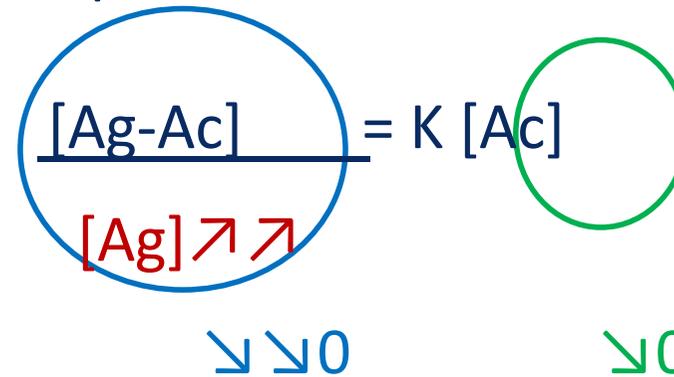


dosage

Loi d'action de masse



$$\frac{[Ag-Ac]}{[Ag] [Ac]} = K$$



$$[Ac \text{ totale}] = [Ac] + [Ac-Ag] \quad K \neq 0$$

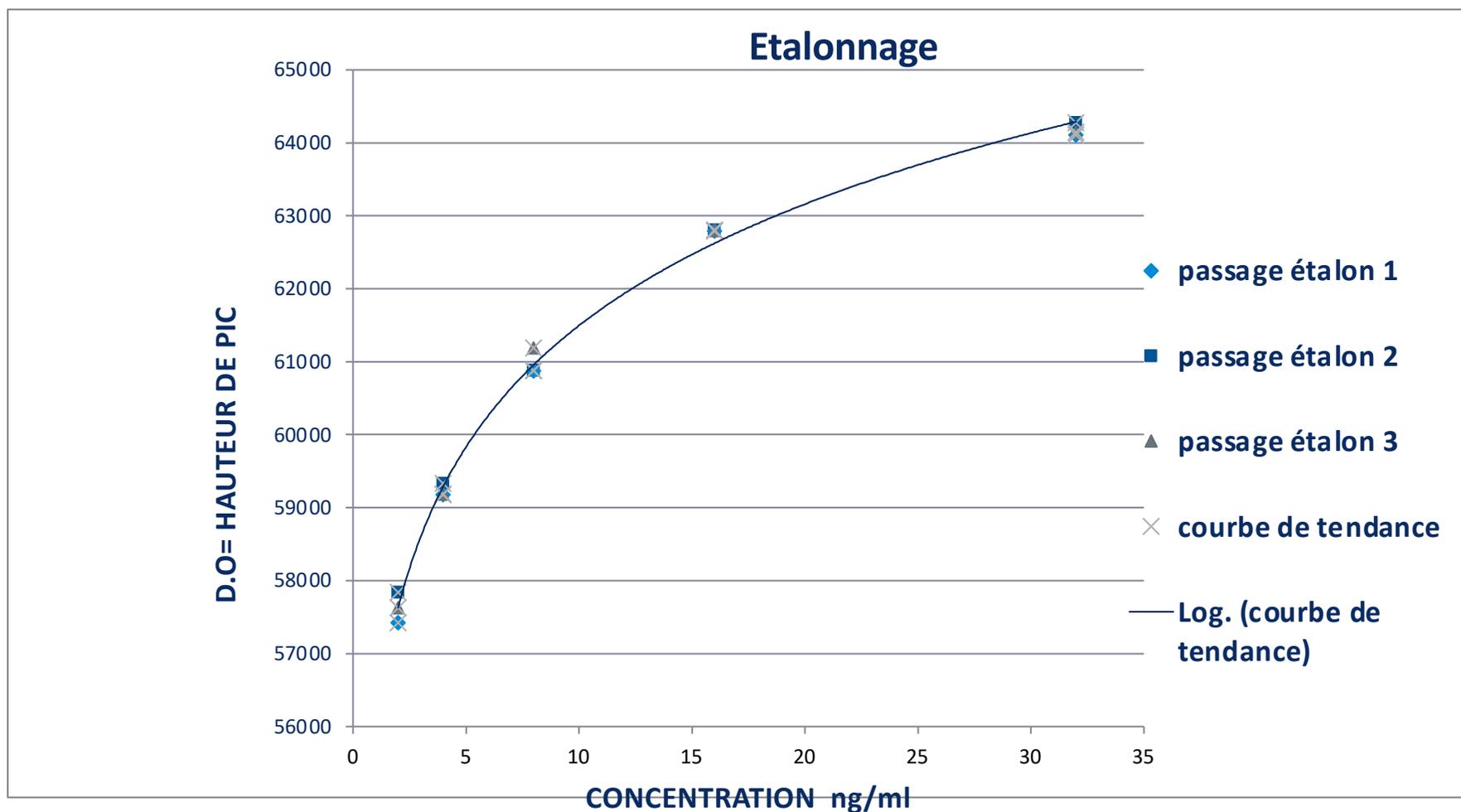
$$[Ac \text{ totale}] = [Ac-Ag]$$

En excès d'antigènes , la quantité d'Ac dosée [Ac-Ag] correspond à la quantité totale d'Ac présente dans l'échantillon.

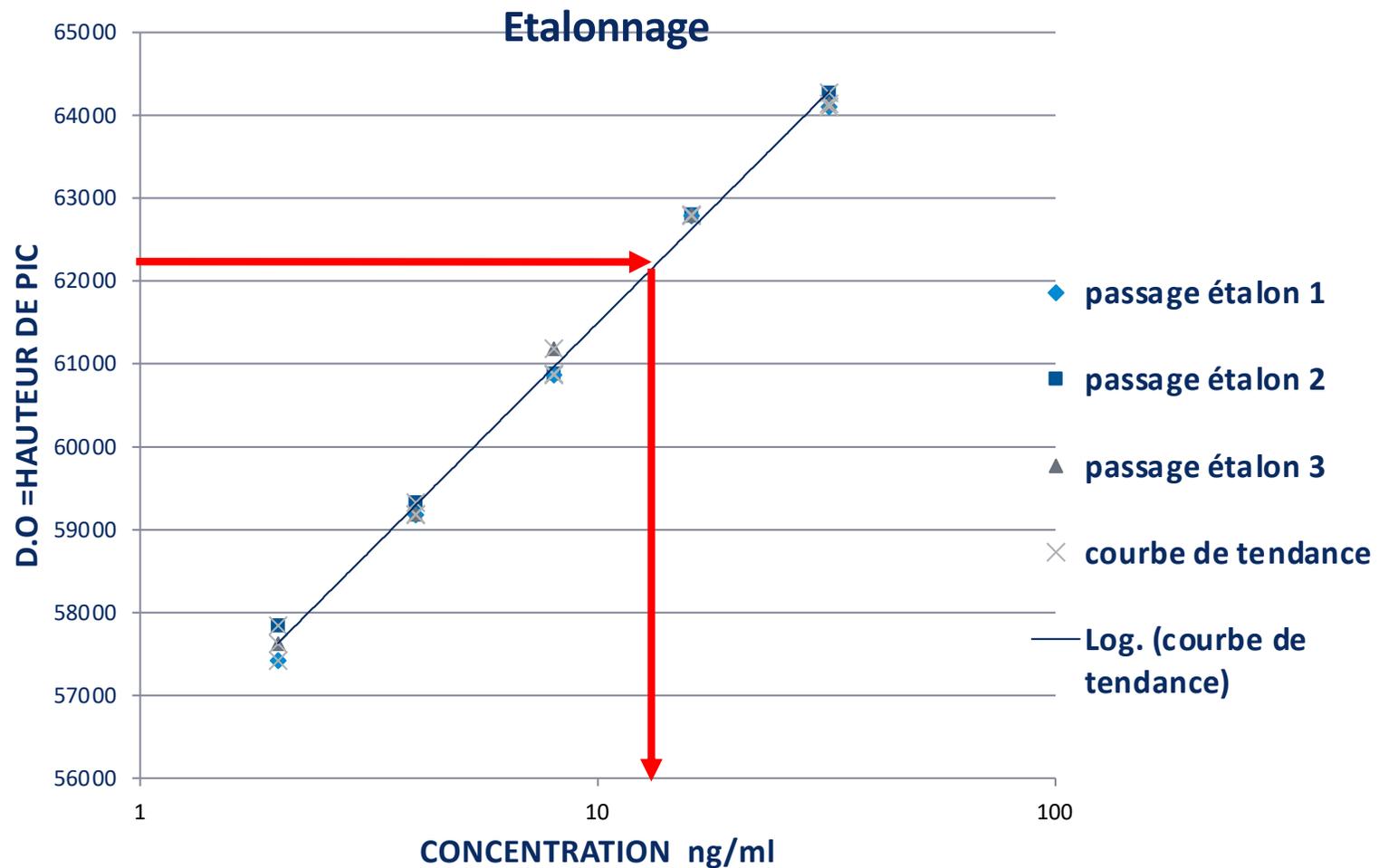
Conditions du dosage



$$DO = a(\text{Log } C) + b$$



Conditions du dosage



**TACT 2013
EFS NORD DE FRANCE
SITE DE LILLE**



Interprétation des



résultats

Résultat= 2 valeurs dosage en 2 temps/1temps

Interprétation : établir le lien entre les caractéristiques de l'Ac et le risque d'anémie foetale

Spécificité, titre, concentration, évolution, en fonction du terme de la grossesse

Objectif: formuler un conseil adapté au suivi biologique de la grossesse

Interprétation des



résultats

Définition de valeurs de concentration en Ac correspondant à des seuils de risque \neq selon spécificité (étalon anti-D/ dosage anti-c)

Risque= anémie sévère Hb <6g/Dl

Risque d'anémie est fonction du temps d'exposition à l'Ac et plus l'Ac est puissant, plus le risque survient rapidement dans la grossesse.

Interprétation des résultats



	CONCENTRATION ($\mu\text{g/ml}$)		INTERPRETATION
ANTI-RH1 (2,3)	$\geq 0,01$	$< 0,3$	FAIBLE
	$\geq 0,3$	$< 0,7$	MODEREE
	$\geq 0,7$	< 3	ELEVEE
	≥ 3		TRES ELEVEE
ANTI-RH4(3)	$\geq 0,01$	$< 0,8$	FAIBLE
	$\geq 0,8$	$< 1,5$	MODEREE
	$\geq 1,5$	< 4	ELEVEE
	≥ 4		TRES ELEVEE
ANTI-RH2, RH3, RH5 isolés	$\geq 0,01$	$< 0,8$	FAIBLE
	$\geq 0,8$	< 2	MODEREE
	≥ 2	< 3	ELEVEE

Interpretation des résultats



- Concentration faible ou modérée → poursuite de la surveillance biologique

- Concentration élevée → poursuite de la surveillance biologique

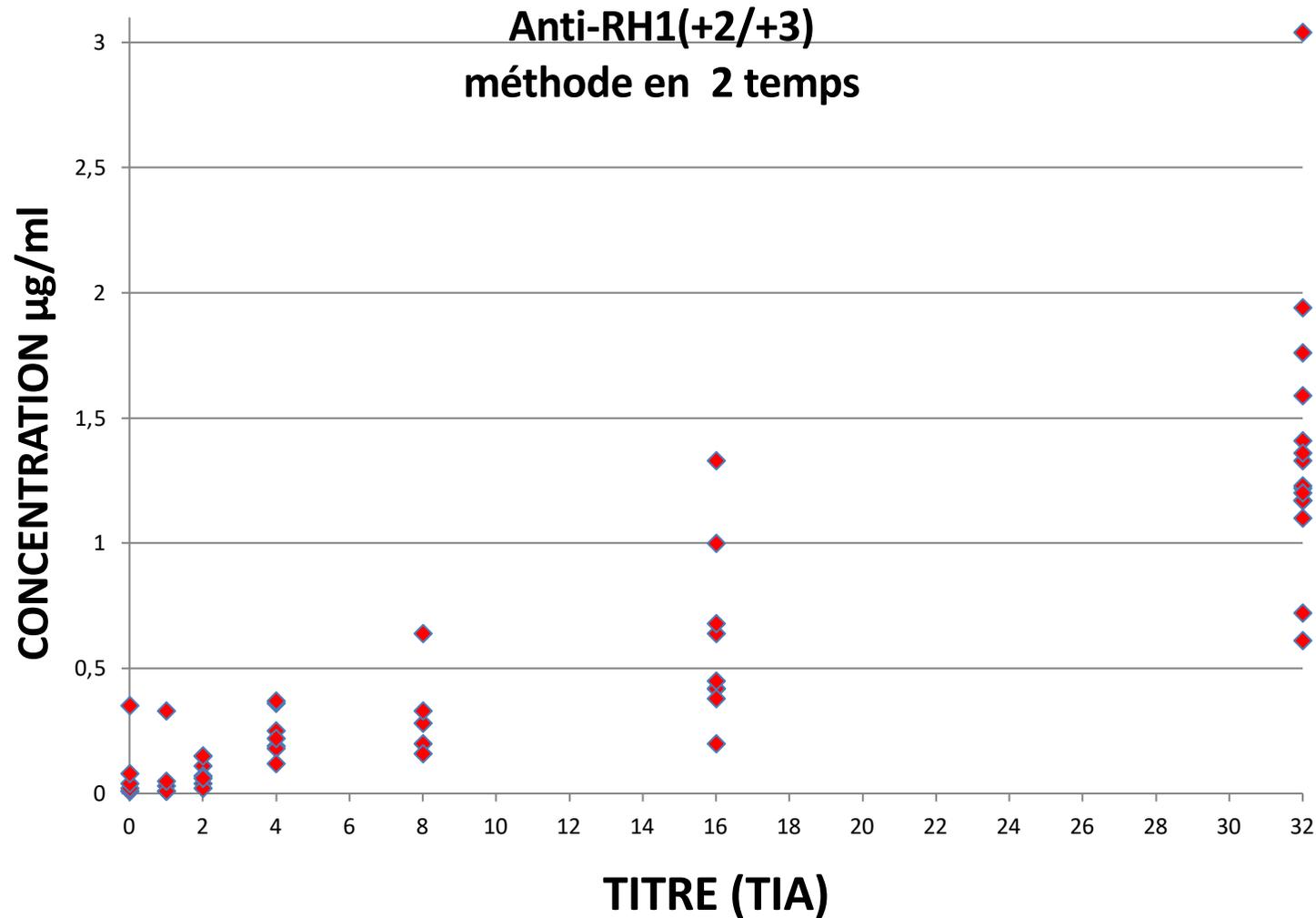
+ nécessité de prise en charge par un service d'obstétrique spécialisé dans l'identification des signes d'anémie foetale et dans la réalisation d'actes thérapeutiques TIU

Relation



titre/concentration

Données issues de 53 patientes immunisées différentes



Relation



titre/concentration

Pas de corrélation étroite entre titre et concentration

TITRE	1	16
DP µg/ml	0,3	0,3
	Ac de faible affinité	Ac de forte affinité

A concentration équivalente, un Ac de haute affinité présentera un risque plus important d'anémie sévère qu'un Ac de faible affinité.

Relation



titre/concentration

Immunisation anti-RH1

Femmes immunisées différentes n=28/classe de titre

Répartition des valeurs de dosage pondéral en fonction du seuil critique 0,7 $\mu\text{g/ml}$

TITRE	4	8	16	32	64	128	256
DP < 0,3 $\mu\text{g/ml}$	89,3%	92%	64,2%	10,7%	0%	0%	0%
0,3 \leq DP < 0,7 $\mu\text{g/ml}$	10,7%	8%	21,5%	50%	25%	7%	3,5%
DP \geq 0,7 $\mu\text{g/ml}$	0%	0%	14,3%	39,3%	75%	89,3%	92,8%

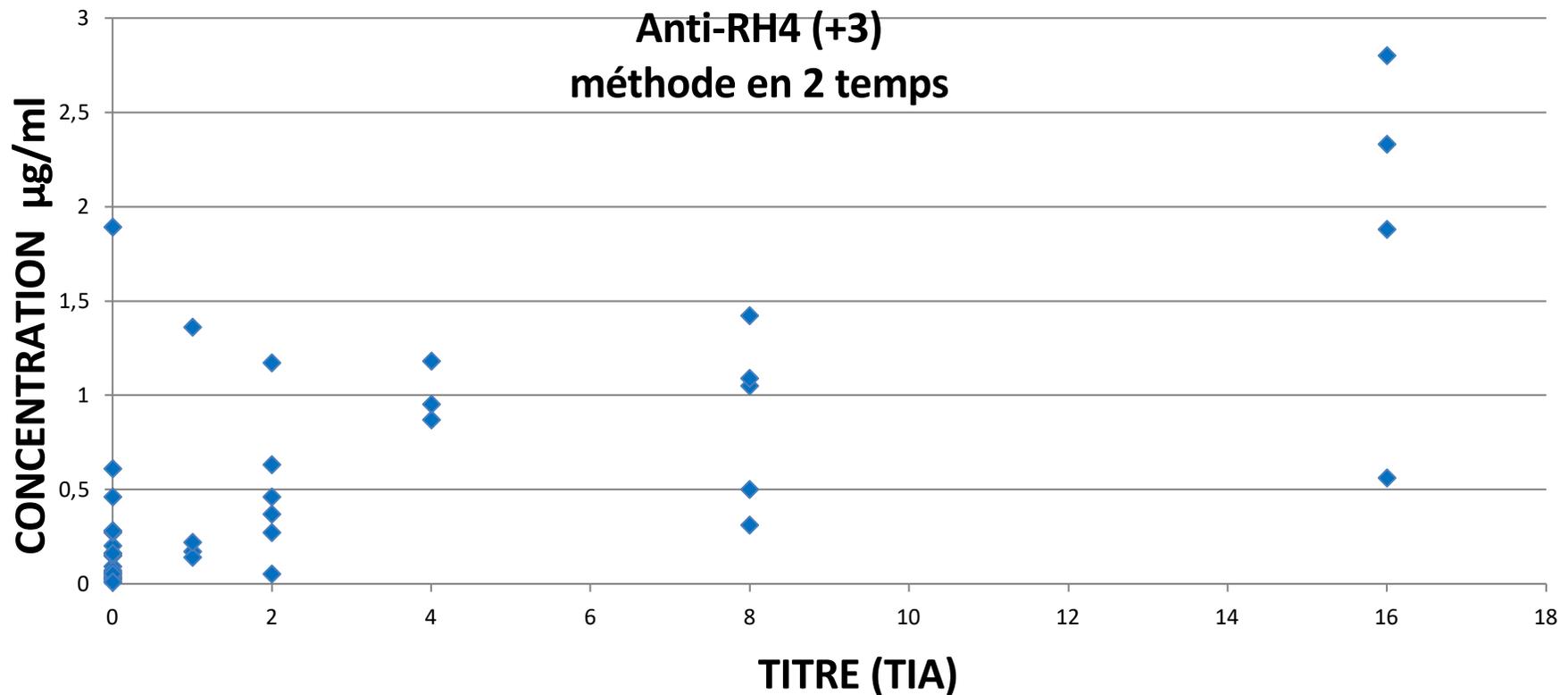
Dosage pondéral est indispensable pour les anti-RH1 de titre ≥ 16

Relation



titre/concentration

Données issues de 47 patientes immunisées différentes



Dosage pondéral des anti-RH4 quel que soit leur titre

Interpretation des résultats

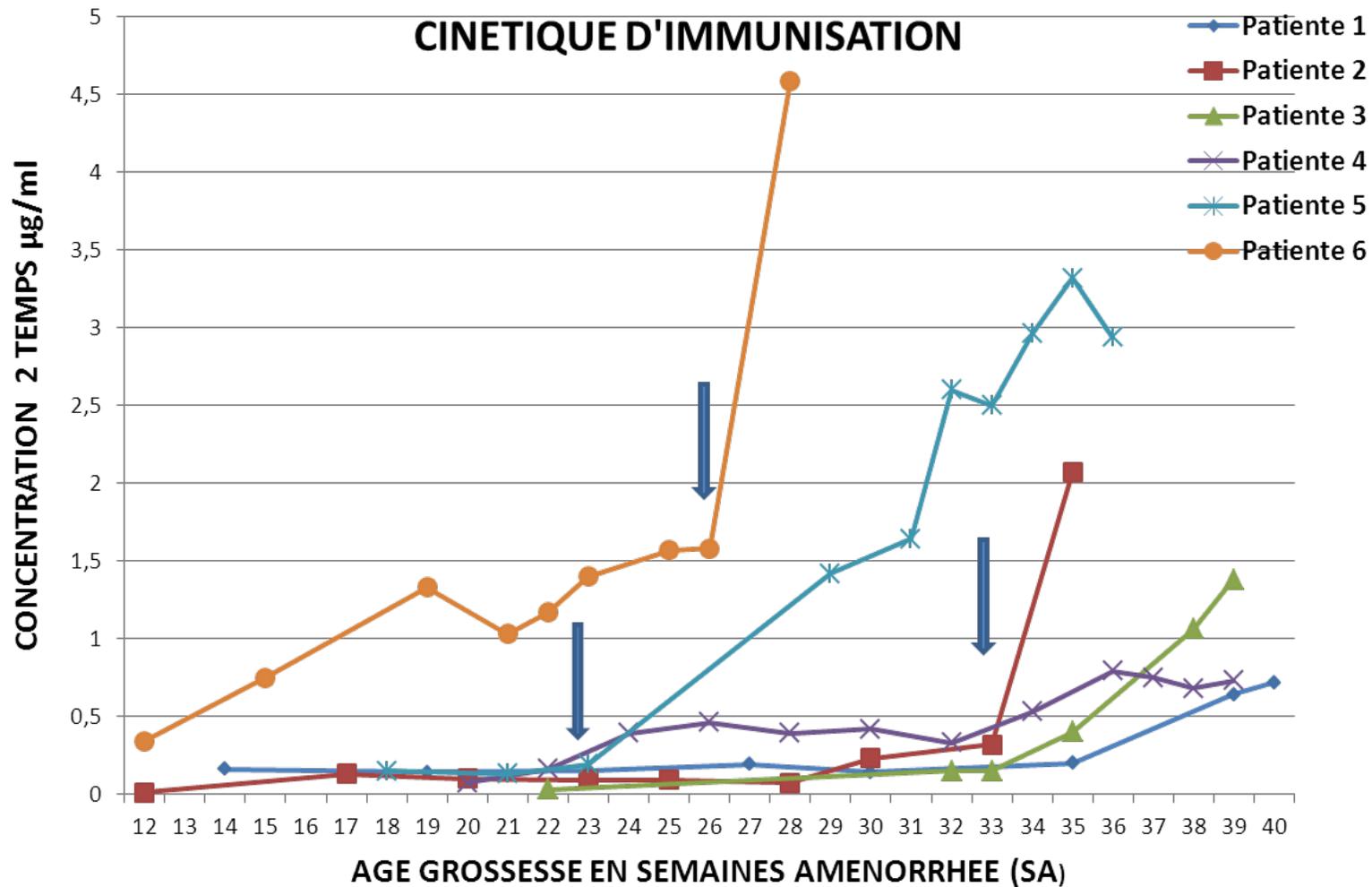


2 temps \approx 1 temps	2 temps \ggg 1 temps	2 temps \lll 1 temps
IgG1 passage précoce	IgG3 passage plus tardif	IgG de forte affinité ou encore IgM → titrage +DTT

Evolution



6 patientes allo-immunisées (RH1/RH4) à l'occasion d'une grossesse antérieure, sans TIU



Evolution



Risque d'hémorragie foeto-maternelle ↗ avec le terme de la grossesse

3 % au 1^{er} trimestre (possible dès 6 SA)

12% au 2nd trimestre

45% au 3^{ème} trimestre

Elévation de la concentration si le nouveau taux est > ancien taux d'au moins 50%

→ surveillance accrue en diminuant le délai entre 2 dosages

Evolution



Anti-RH1(+2/+3) et anti-RH4(+3)

<20 SA: en raison du passage limité des Ig, même si la concentration de l'Ac est élevée une surveillance mensuelle suffit

≥ 20 SA: surveillance toutes les 2 semaines, même si taux faible en raison du risque de réactivation de l'Ac et d'anémie brutale

Evolution



Autres spécificités RH

<28 SA: en raison du seuil d'alerte plus élevé

≥ 28 SA: surveillance toutes les 2 semaines, même si taux faible en raison du risque de réactivation de l'Ac et d'anémie brutale

Conclusion



Bien que la méthode soit relativement lourde, le dosage pondéral, plus que le titrage, est un examen utile dans le suivi biologique des femmes enceintes immunisées, permettant de cibler les immunisations à haut risque d'anémie foetale, pour en assurer la prise en charge obstétricale.

Il appartient au biologiste d'interpréter les résultats et d'assurer le conseil médical