



# LE TEST DE COOMBS ET AHAI

## TEST DE COOMBS : DEFINITION

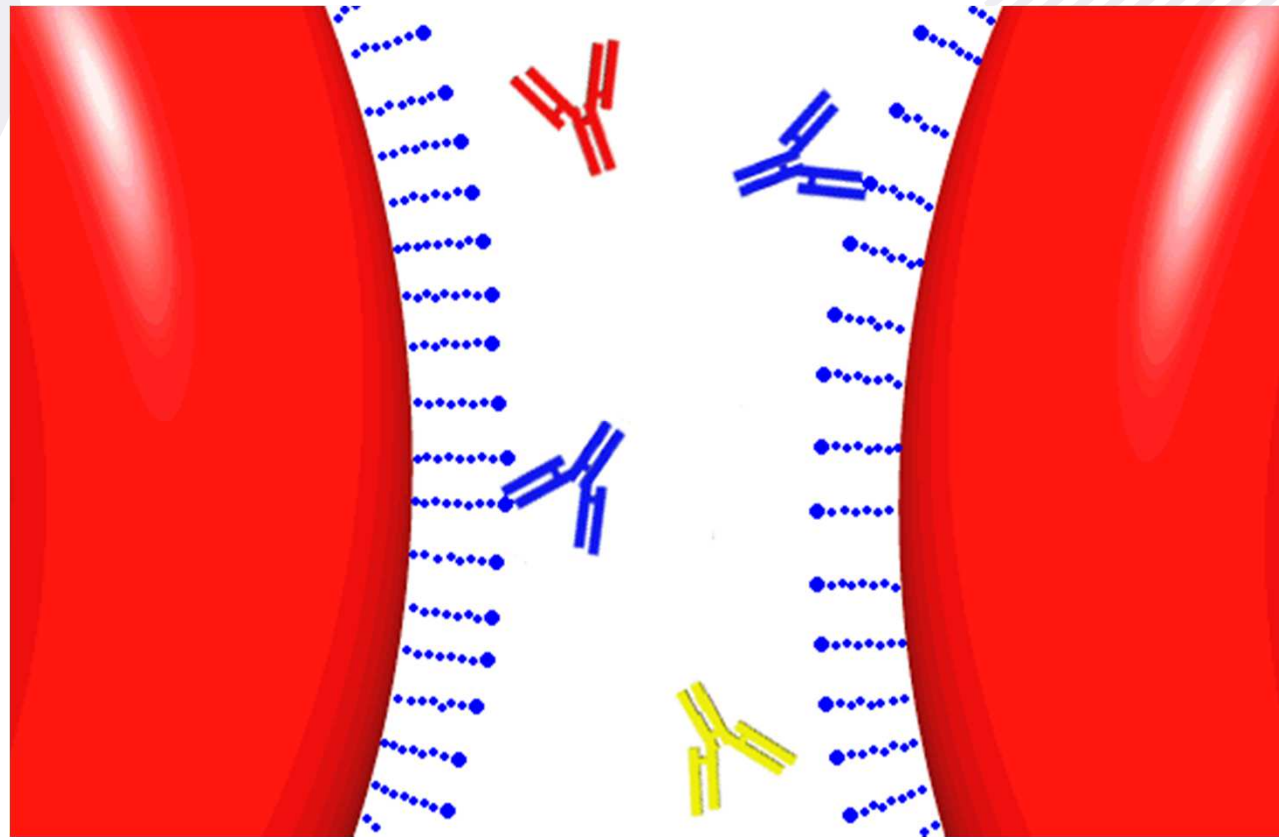
- ✓ Examen Direct à l'Antiglobuline ou Test Direct à l'Antiglobuline
  - ✓ Mise en évidence d'une sensibilisation *in vivo* des hématies par des anticorps de nature IgG et/ou des fractions du complément fixés sur les hématies du patient.
- Si la positivité d'un TDA est le témoin d'une sensibilisation in vivo des hématies, elle ne signifie pas forcément une hémolyse et une anémie chez le patient

→ Pour mémoire : des sujets en parfaite santé peuvent présenter un TDA positif sans diminution de la durée de vie de leurs hématies (0,3 à 15% des patients hospitalisés ou 1/1000 à 1/14000 donneurs)

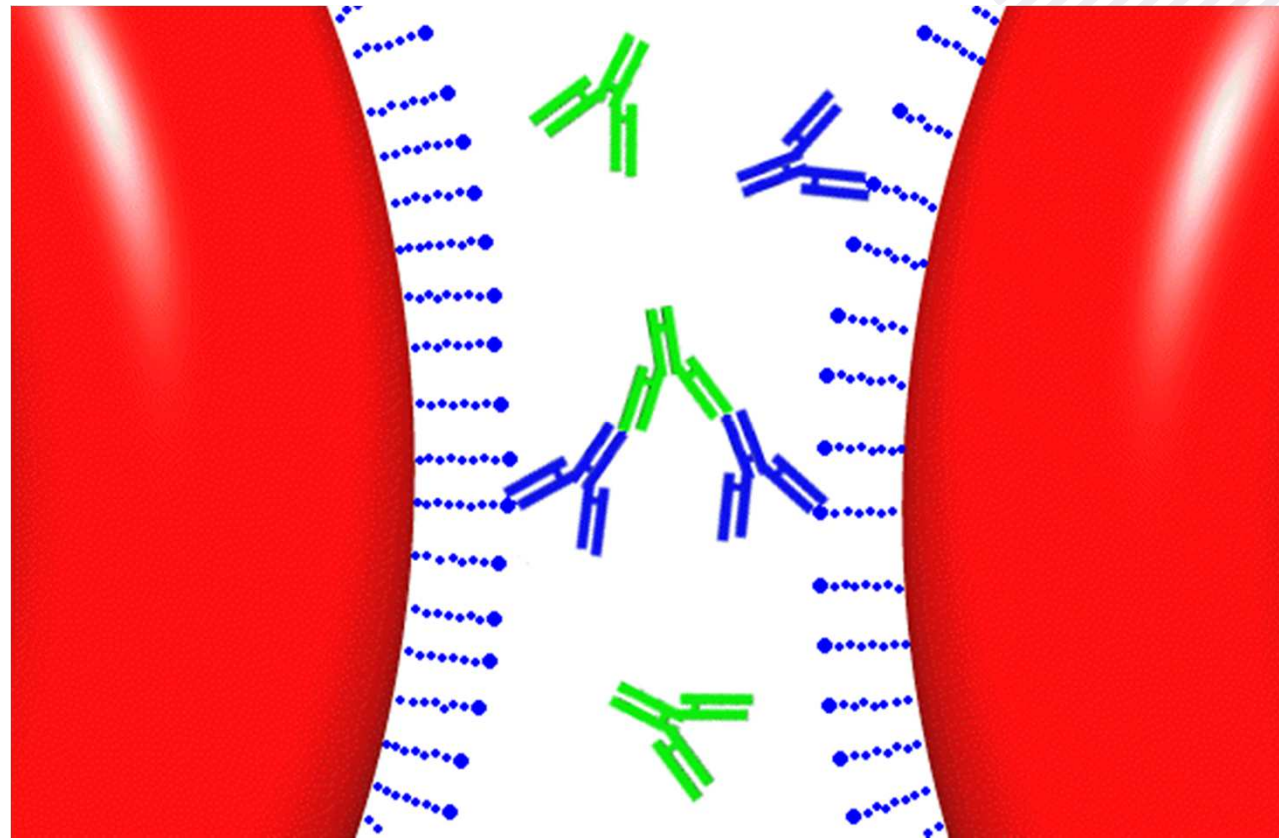
## TEST DE COOMBS : DEFINITION

- ✓ Utilisation d'une **antiglobuline anti-IgG** et d'une **antiglobuline anti-C3d**
- ✓ → les composants anti-Ig G et anti-C3d sont les plus importants
- ✓ (un TDA élargi aux spécificités C3c, IgA, IgM peut être réalisé en accord avec le prescripteur)
- ✓ Réalisé sur demande explicite ou ajouté à l'initiative du biologiste
  - ✓ - contexte clinico-biologique
  - ✓ - positivité du témoin autologue lors de l'étape d'identification RAI
  - ✓ - positivité lors de la réalisation d'un groupe sanguin

# TEST DE COOMBS : TECHNIQUE

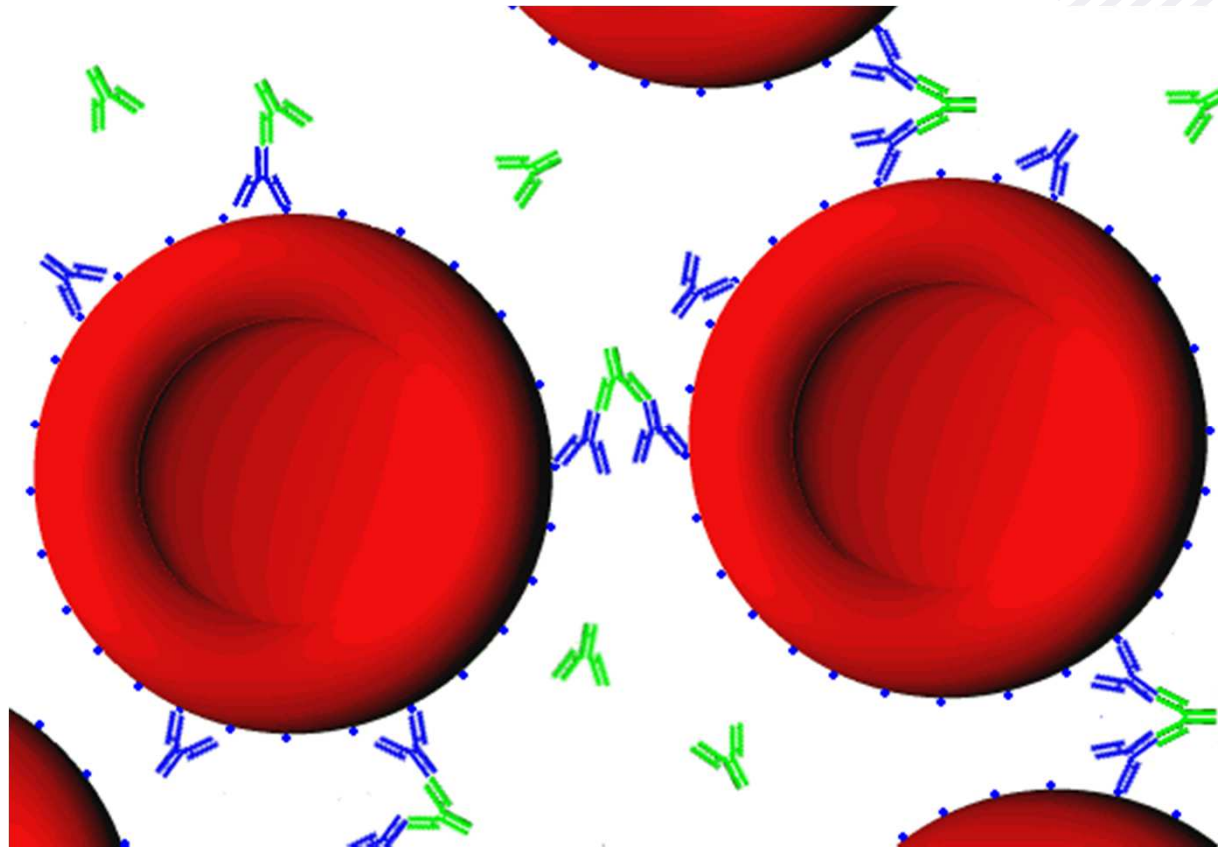


# TEST DE COOMBS : TECHNIQUE

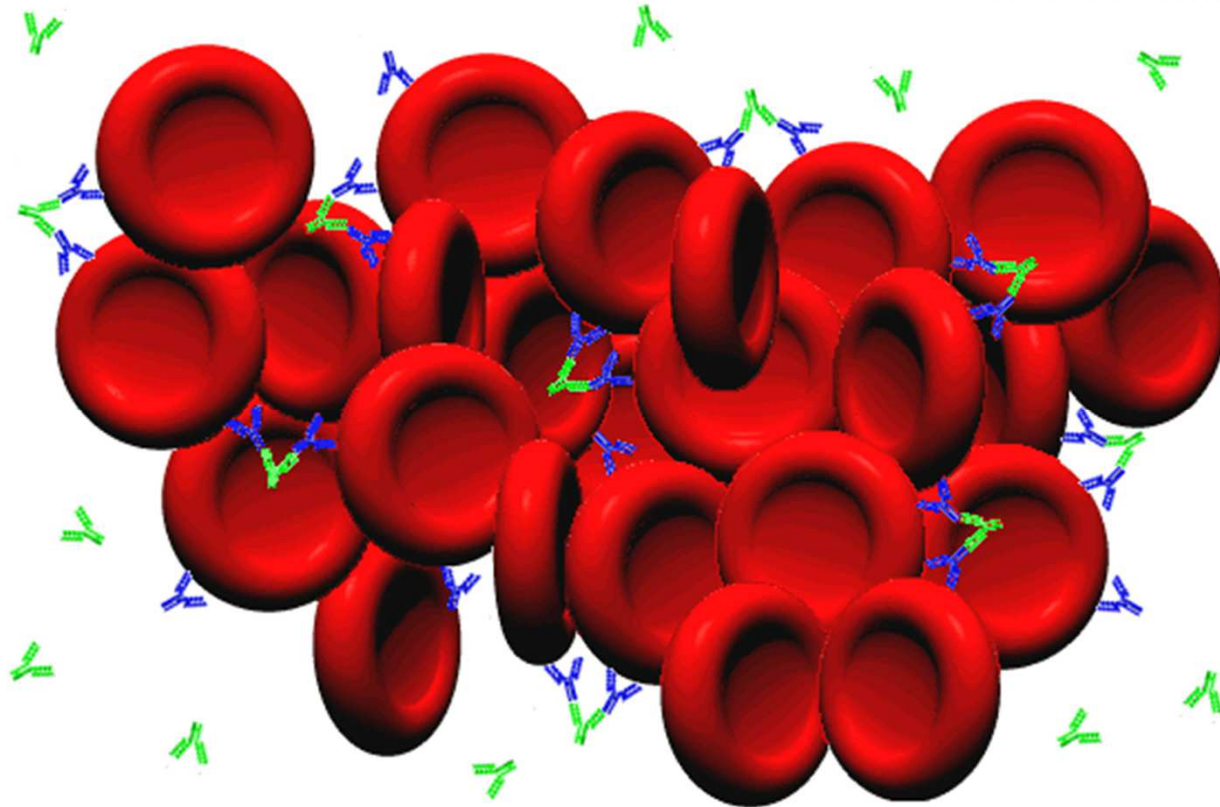


FIXATION DE L'ANTIGLOBULINE HUMAINE PRESENTE  
AU SEIN DU GEL

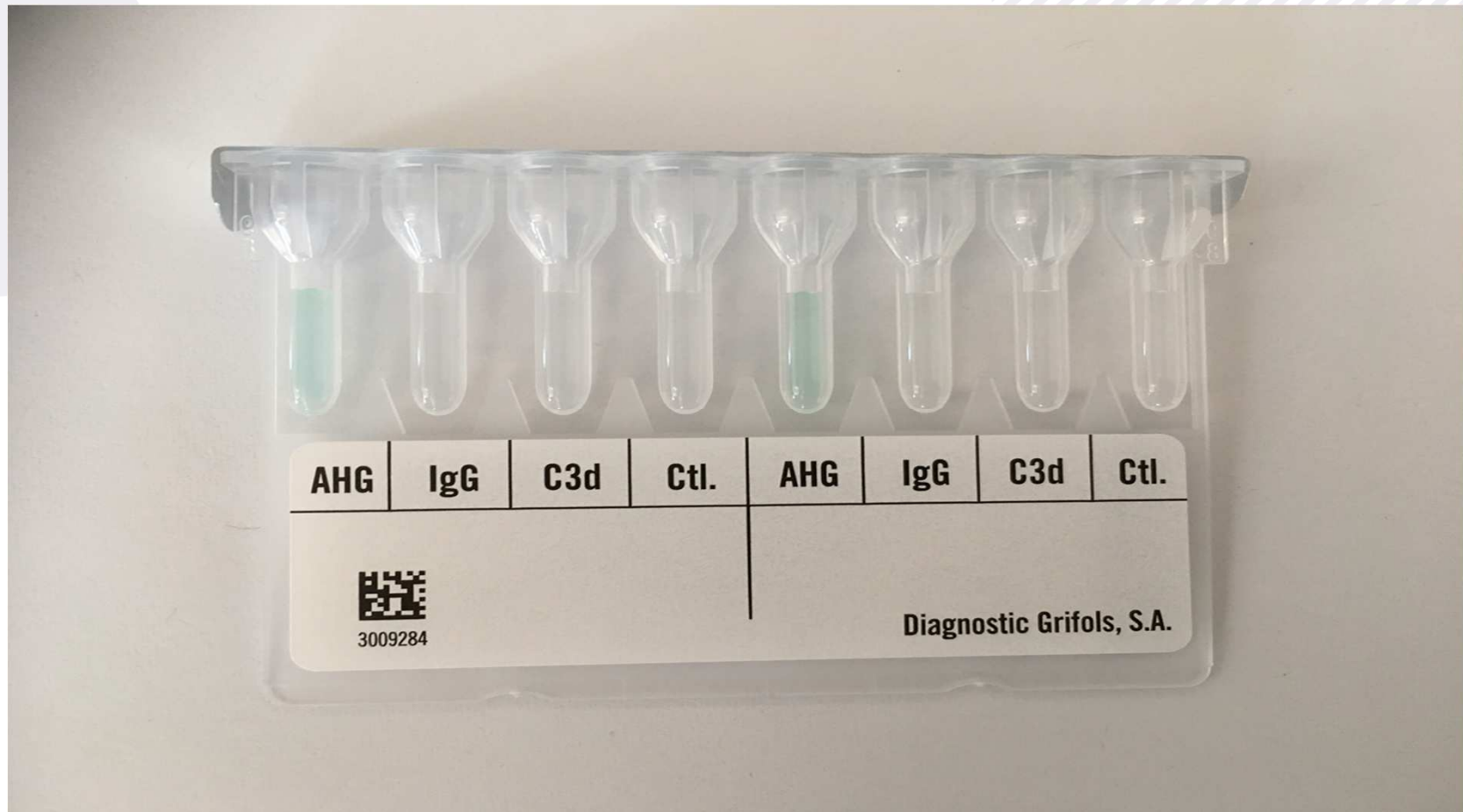
# TEST DE COOMBS : TECHNIQUE



# TEST DE COOMBS : TECHNIQUE



**AGGLUTINATION MACROSCOPIQUE**



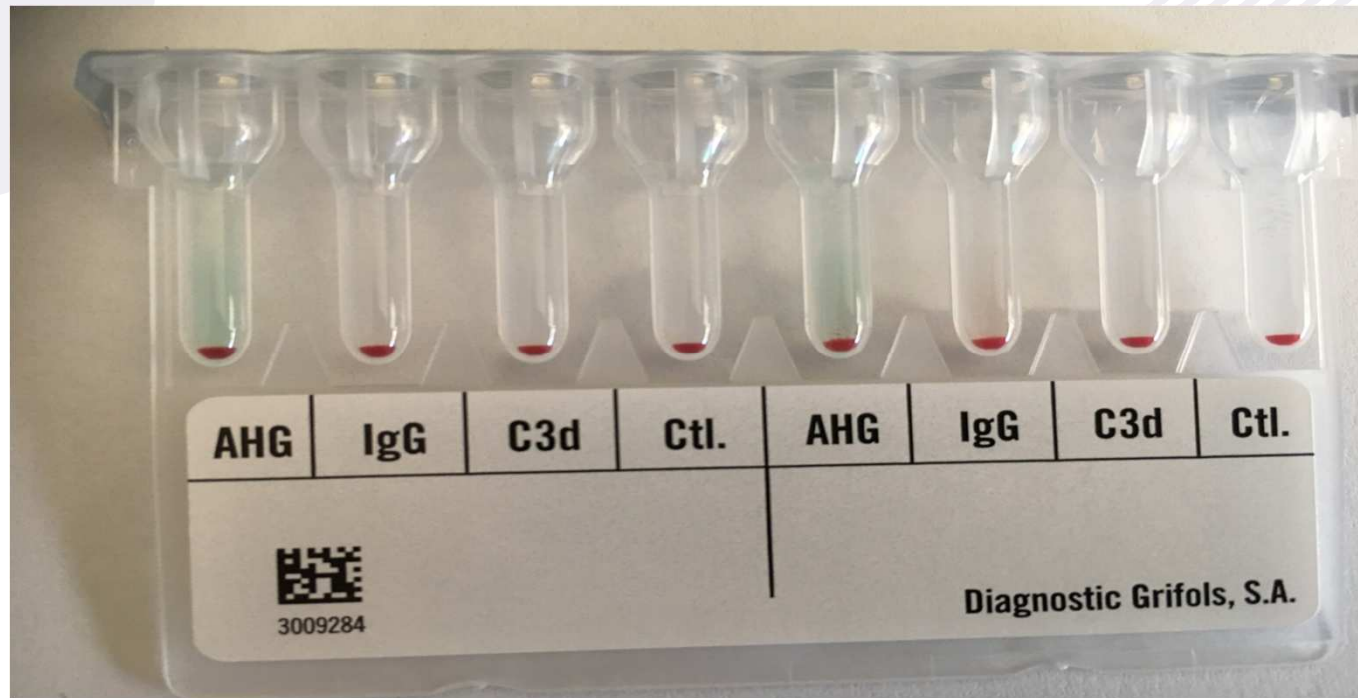
« Cartes gel » : anti globuline dans chaque puits : **sensibilité de 100 à 150 molécules d'anticorps fixées par hématies.**

50  $\mu$ L des hématies du patient (dilution 1%) dans chaque puits,

**Centrifugation carte.**



# TEST DE COOMBS : TECHNIQUE



**ABSENCE D'AGGLUTINATION**

# TEST DE COOMBS : TECHNIQUE

**Profil : 05-TDA**

Date réalisation: 26/09/2018 14:26:19      Statut: En attente de validation  
Réalisé par : 10002180      Modifié par : -      Vérifié par : -  
Erytra (NS) : 0000806      Erytra (name): EFS GRE

**Interprétation du Profil**  
CD:Pos

Commentaire

\*DG-Gel DC Scan      715507190010163871  
LOT\*001.01      2019-07

Direct Coombs Scan 7155

3+	3+	-	-				
AHG	IgG	C3d	CTL				


Incidents

CD AHG:Pos  
CD C3d:Neg  
CD IgG:Pos

AHG	IgG	C3d	Ctl.	AHG	IgG	C3d	Ctl.

## AGGLUTINATION MACROSCOPIQUE

## TEST A L'ANTIGLOBULINE : TECHNIQUE

- ✓ <http://bit.ly/manuel-prelevement-AURA-v9>
- ✓ Réalisation 24H/24 par l'EFS
- ✓ 1 tube EDTA  4 mL (pour éviter la fixation du C4)
- ✓ Transport à température non dirigée
- ✓ Durée de validité de l'échantillon 72H
- ✓ B15 soit 4,05 €

## TEST DE COOMBS : INDICATIONS

- ✓ Etape fondamentale permettant de classer l'hémolyse
  - ✓ - hémolyse immunologique
  - ✓ - hémolyse non immunologique
    - anomalie de l'hématie (Hémoglobine, enzyme ou membrane)
    - anomalies extracorporelles (infectieux, mécaniques ou toxiques)

# TEST DE COOMBS : ANÉMIE HÉMOLYTIQUE IMMUNOLOGIQUE

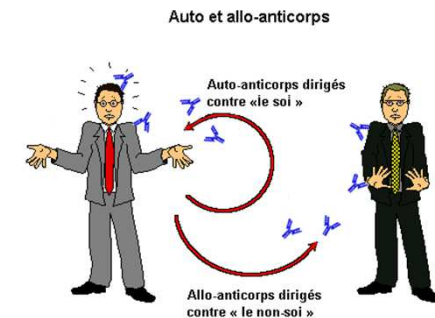
## → Allo-anticorps :

- ✓ Evènement indésirable receveur pouvant évoquer un conflit immunologique post transfusionnel
- ✓ Maladie hémolytique du nouveau-né
- ✓ Hémolyse immunologique ABO (ou autre spécificité) (greffe de CSH, transplantation...) : incompatibilité mineure ou majeure

## → Auto-anticorps

- ✓ Anémie hémolytique auto-immune (auto-anticorps chauds, froids, mixtes)
- ✓ Hémoglobinurie paroxystique *a frigore*

## → Anémie hémolytique d'origine médicamenteuse



## CONDUITE À TENIR EN CAS DE TDA POSITIF

- Si le TDA est positif de type IgG, une épreuve d'élution pourra être réalisée en cas de transfusion dans les 3 mois précédents après avis du biologiste
- Si le TDA est positif >2+ de type C3d , un titrage d' agglutinines froides peut être réalisé après avis du biologiste
- Cas particulier des TDA positifs chez les nouveaux nés : Rechercher les renseignements immuno-hématologiques maternels (ABORHK-RAI). L'épreuve d'élution pourra être réalisée sur avis du biologiste

# ZOOM SUR L'ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE AHAI

- Définition: anémie hémolytique secondaire à une destruction accrue des globules rouges autologues induites par l'action d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes présents à leur surface
- Rupture de tolérance → production d'auto-anticorps
- Triade : **anémie+signes d'hémolyse+TDA positif**
- Pathologie rare : 1 à 4 / 100 000 – tout âge- prédominance féminine
- Forme aiguë ou chronique
- Forme idiopathique ou secondaire
- Évolution variable mais pathologie grave (mortalité 11% variable selon les auteurs)
- Complexité pour la réalisation de la RAI et pour la sécurisation immunologique de la transfusion

# ZOOM SUR L'ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE AHAI

→ Triade : anémie+signes d'hémolyse+TDA positif

→ Anémie

- hémoglobine abaissée
- VGM normal ou augmenté
- Réticulocytes augmentés

→ Hémolytique

- Bilirubine libre augmentée
- Haptoglobine effondrée
- LDH augmentés

→ Auto-immune

- TDA attendu positif
- Phénotype (ou génotype)
- Éléments cliniques



# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE- PHYSIOPATHOLOGIE

→ La rupture de tolérance peut être provoquée par :

- Défaut des lymphocytes T régulateurs
- Défaut d'apoptose des lymphocytes auto-réactifs
- Activation polyclonale des lymphocytes T et B par une infection virale ou une allo-immunisation
- Mimétisme moléculaire des Ag des groupes sanguins (Ii) avec certains Ag infectieux (*mycoplasma pneumoniae*, EBV...)
- Facteurs génétiques
- Anomalies intrinsèques des lymphocytes B (LLC)
- Développement d'un clone tumoral B (IgM monoclonale) à activité agglutinante dans la maladie des agglutinines froides.
- → production d'auto-anticorps plus ou moins destructeurs

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

→ La présence d'un auto Ac n'est pas toujours synonyme de destruction des GR sensibilisés. L'activité hémolytique est dépendante de :

- caractéristiques de l'auto-Ac
- Cible
- Activation des macrophages et des cellules effectrices
- Activation du complément
- État préalable de la membrane du GR

→ 2 types d'hémolyse

→ voie de destruction par le complexe d'attaque membranaire (CAM)

→ → hémolyse intravasculaire (surtout IgM)

→ Voie de destruction par des cellules effectrices via les récepteurs Fc des IgG

→ → hémolyse intratissulaire dans la rate (IgG3, IgG1) avec reconnaissance macrophagique des fragments Fc des IgG

→ → la phagocytose peut n'être que partielle → sphérocytes

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

→ Ce schéma est modulé par de nbx facteurs expliquant les variations obtenues au laboratoire IH (classe, sous classes IgG, intensité du TDA) et la présentation clinique.

- Statut inflammatoire du patient (cytokines pro inflammatoires)
- Facteurs génétiques : polymorphismes des récepteurs Fc
- Membranes du GR : rôle protecteur du CD47, acides sialiques, CD55, CD59 ou rôle destructeur de la phosphatidylsérine
- Cible de l'auto-anticorps (RH ou autres)
- Etat de glycosylation des anticorps (fragments Fc)

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

→ Auto-anticorps froid = C3d

- Formes chroniques, parfois associées à des hémopathies de type B = maladie des agglutinines froides : IgM monoclonale se fixant à 4°C
- Formes transitoires au décours de maladies infectieuses : IgM polyclonale
- Au laboratoire : recherche et titrage d'agglutinines froides dans le sérum du patient à 4°C et à 37°C
- Spécificité : anti Ii
- Titre seuil à 32 et l'amplitude thermique détermine sa pathogénicité

→ Auto-anticorps chaud = IgG

→ Auto-anticorps mixtes = IgG et C3d

→ Hémoglobinurie paroxystique *a frigore*

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

→ Auto-anticorps froid = C3d

→ Auto-anticorps chaud = IgG

- Cible antigénique : RH le plus souvent (e, c, ce, E, D, C) KEL, Ge, SC LU, MNS, JK, band3...
- 70% des AHAI
- au cours des Sd lymphoprolifératifs ou des maladies systémiques (lupus, PR, Sd d'Evans..)
- Le plus souvent idiopathique
- Dans 80% des cas les auto-anticorps sont fixés sur les GR et libres dans le sérum donnant une image de « pan-agglutination » = RAI positive pouvant masquer des allo-anticorps

→ Auto-anticorps mixtes = IgG et C3d

→ Hémoglobinurie paroxystique *a frigore*

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

- Auto-anticorps froid = C3d
- Auto-anticorps chaud = IgG
- Auto-anticorps mixtes = IgG et C3d
  - 7 à 8% des AHAI
  - Amplitude thermique large
  - Maladies systémiques
  - Souvent en lien avec anti-médicaments
- Hémoglobinurie paroxystique *a frigore*

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

- Auto-anticorps froid = C3d
- Auto-anticorps chaud = IgG
- Auto-anticorps mixtes = IgG et C3d
- Hémoglobinurie paroxystique *a frigore* (Donath et Landsteiner)
  - la forme la plus rare chez l'adulte (<2%)
  - Plus fréquente chez l'enfant suite à un sd infectieux
  - Auto-Ac de classe IgG de spécificité P
  - Se fixe à froid et hémolyse à chaud = hémolysine biphasique

# ANEMIE HÉMOLYTIQUE AUTO-IMMUNE = AHAI

Si le tableau est en faveur d'une AHAI avec un TDA négatif



- AHAI à TDA négatif = **penser à l'IgA** : en association ou non avec les IgG ou les IgM, peuvent induire des maladies sévères
- 14% des AHAI à TDA négatif

**TDA négatif ne signifie pas forcément absence d'AHAI**

**- A case series of pediatric patients with direct antiglobulin test negative autoimmune hemolytic anemia**

*Jonathan Miller,1 Wei Cai,2 Jennifer Andrews,3,\* and Anupama Narla, TRANSFUSION 2019;59;2528–2531*

- Prévoir un TDA élargi (IgG, IgA, IgM, C3c) lorsque TDA IgG C3d négatif
- Toutefois 50% des AHAI à TDA négatif sont sans explication



## BILAN IH À VISÉE TRANSFUSIONNELLE

Problème spécifique en cas de AHAI nécessitant une collaboration entre le laboratoire IH et l'équipe médicale en charge du patient

→ antécédents transfusionnels et obstétricaux

→ degré d'urgence et données clinico-biologiques du patient

- **Groupe sanguin ABO RHK** (difficulté en présence d'agglutinines froides 😞)
- **RAI - identification** (pan-agglutination en présence d'auto-Ac chaud ou froids 😞) nécessitant des techniques complémentaires pour éliminer les auto-Ac
- **Détermination du phénotype étendu** 😞 **ininterprétable** en présence d'auto-Ac chaud ou d'auto-Ac froids et **ininterprétable** en post-transfusionnel 😞
- **Génotypage érythrocytaire** 😊

## BILAN IH À VISÉE TRANSFUSIONNELLE

- **RAI - identification** (pan-agglutination en présence d'auto-Ac chaud ou froids ☹️) nécessitant des techniques complémentaires pour éliminer les auto-Ac
- Un allo anticorps peut être masqué par un auto anticorps

Panel d'identification														Sérum patient				
	D	C	c	E	e	Cw	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	S	s	Ech	Ech	Ech	Ech
n1	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+++	+	++	+++
n2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+++	+	++	+++
n3	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+++	+	++	+++
n4	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+++	+	+	0
n5	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+++	+	+	0
n6	0	+	+	0	+	0	0	+		+	+	+	+	+	+++	+	++	+++
n7	0	0	+	+		0	0	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	0
n8	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+++	+	+	0
n9	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+++	+	+	0
n10	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+	+++	+	+	0
Patient															+++	+	+	0

Auto/allo ? Auto Auto + allo allo Ac

- ✓ Dilution du plasma au 1/5 pour détecter des allo-anticorps masqués par les auto Ac (*Oyen et Al 1995: cohorte de 119 patients*)

# BILAN IH À VISÉE TRANSFUSIONNELLE

- ↪ Auto-adsorption des auto-Ac de nature IgG en absence de contexte transfusionnel•

Serum+GR patient v/v, 500 microlitres, 15 à 30 mn

Renouveler 3 à 6 fois, voire plus

- ↪ Allo-adsorption des auto-anticorps

-connaître le phénotype du patient ou adsorber sur des hématies de phénotype connus

- ↪ Problème = techniques longues > à 4 à 6h, sans garantie de succès

- ↪ Ne pourra répondre à une urgence vitale

# ASPECTS CLINIQUES ET TRAITEMENT

Traitement de la cause avec l'objectif de diminuer la production d'auto-anticorps et l'hémolyse induite

La place de la transfusion est limitée,

→ risque d'inefficacité et d'aggravation de l'hémolyse

cependant parfois indispensable :

→ hémolyse fulminante ou installation progressive d'une anémie profonde

→ transfusion sans délai même si les bilans IH sont incomplets

→ CGR Phénotypé RHK

→ Recours à un réchauffeur en présence d'agglutinines froides de titre élevé



→ Transfusion minimale, prescription d'1 seul CGR, débit lent (2ml/mn en début de transfusion) et sous surveillance

→ En dehors de l'urgence : Balance bénéfique/risque

# ASPECTS CLINIQUES ET TRAITEMENT



→ recommandation de la HAS

- ↪ « **L'indication de la transfusion** au cours des anémies hémolytiques auto-immunes doit être pesée en fonction de la possibilité que l'autoanticorps soit responsable d'une durée de vie raccourcie, voire très raccourcie, des globules rouges transfusés et de la **difficulté à en assurer la compatibilité.**
- ↪ L'indication doit être réfléchie en tenant compte de la **sévérité de l'anémie**, de son **retentissement** et de la **rapidité de son installation**. A aucun moment la transfusion ne devra être écartée lorsqu'elle est cliniquement justifiée, même si les produits sont incompatibles au laboratoire,
- ↪ le risque de la non transfusion étant souvent plus important que celui de la transfusion. »

# BIBLIOGRAPHIE

**- Defining a reference range for cold agglutinin titers**

*Brenda J. Bendix,1 Craig D. Tauscher,1 Sandra C. Bryant,2 James R. Stubbs,1 and Eapen K. Jacob1, transfusion 2013*

**- A case series of pediatric patients with direct antiglobulin test negative autoimmune hemolytic anemia**

*Jonathan Miller,1 Wei Cai,2 Jennifer Andrews,3,\* and Anupama Narla, TRANSFUSION 2019;59;2528–2531*

**- simply screening method to evaluate the presence oh alloantibodies with concomittant auto antibodies, Oyen et al.a**  
*immunohématology, 1995 11 85-7*

**- Warm-réactive (igG) auto antibodies and laboratory testing best practices : review of the littérature and survey of current practice**  
*A. Zyman et col, Transfusion, fevrier 2017*

**- Les analyses immuno-hématologiques et leurs applications cliniques, J Chiaroni, F, Roubinet, P. Bailly, L. Mannessier, F. Noizat-Pirenne; John Libbey Eurotext, 2011**

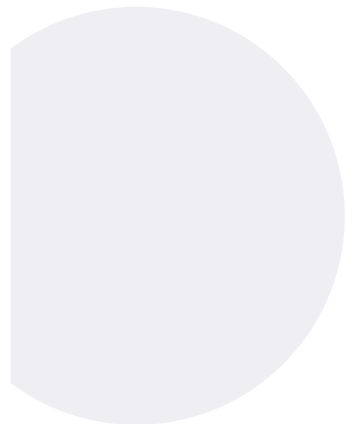


Robert Royston Amos  
(Robin) Coombs

**Merci Mr Coombs 😊**

(Londres, le 9 janvier 1921 – 25 janvier 2006)

Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. Detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins: a new test. Lancet 1945;246:15-6.



merci de votre attention

*Contact : [claudine.giroux-lathuile@efs.sante.fr](mailto:claudine.giroux-lathuile@efs.sante.fr)*