

Examen Direct à l'Antiglobuline

Les règles et les difficultés

Rencontre TACT
Arles
21 mars 2024

Professeur Jacques Chiaroni

2-4. Examen direct à l'antiglobuline

a) Définition

L'examen direct à l'antiglobuline (anciennement appelé « test direct à l'antiglobuline ») permet la mise en évidence de la sensibilisation *in vivo* des hématies humaines avec un anticorps anti-IgG et un anticorps anti-C3d. Ce test est réalisé sur un échantillon anticoagulé.

b) Modalités de mise en œuvre

Principe :

La mise en évidence de la sensibilisation *in vivo* des hématies repose sur l'utilisation d'antiglobuline(s) humaine(s) dont la portion Fab reconnaît les marqueurs isotypiques d'immunoglobulines ou des fractions du complément spécifiquement fixées sur l'hématie. La réalisation de cette analyse impose d'utiliser, de façon simultanée et indépendante, un anticorps anti-IgG et un anticorps anti-C3d ainsi que des témoins réactifs appropriés.

Contrôles internes de qualité (CIQ) :

Le système analytique est contrôlé en utilisant des hématies préalablement sensibilisées *in vitro* par des IgG et des hématies sensibilisées *in vitro* par du complément.

Validation et interprétation des résultats :

La validation analytique repose sur les résultats conformes du CIQ et la réaction négative obtenue avec le témoin réactif.

un service de pédiatrie prescrit un TDA pour exploration d'une anémie sévère chez un nouveau né de 2 jours
Le service vous adresse un prélèvement de l'enfant et un prélèvement maternel avec la mention « recherche d'une IFM »
Les résultats que vous obtenez sont les suivants

- Mère : A, D+C+E-c-e+, K- / RAI négative
- Enfant : O, D+C+E-c-e+, K- / EDA : IgG+, C3d- / Elution : négative

Quelle est votre première hypothèse ?

MHNN par IFM lié à un allo anticorps reconnaissant un antigène de faible fréquence (anti-Privé)

Comment allez vous confirmer votre hypothèse ?

Tester les hématies du géniteur afin de voir si l'anticorps présent chez la mère reconnaît un antigène transmis par le géniteur

Le géniteur est de groupe B, quelle est votre conduite pour confirmer votre hypothèse ?

Compte tenu de l'incompatibilité ABO entre le géniteur et la mère, on testera les hématies vis à vis de l'éluat de l'enfant

L'éluat pratiqué à partir des hématies de l'enfant ne reconnaît pas les hématies du géniteur. Quelle est votre conduite ?

Appel du prescripteur pour info

- stigmates d'hémolyse ?
- autre pathologie, médicament ?

Le prescripteur vous donne les éléments suivants :

- augmentation des LDH et de la bilirubine libre
- précise que cet enfant s'alimente mal et présente une staphylococcie pleuro pulmonaire traitée par antibiotiques (pénicilines)

Quelle est votre hypothèse ?

Anticorps anti-péniciline présent chez la mère, transmis à l'enfant et aboutissant à une hémolyse par l'ajout d'antibiotique

L'examen direct à l'antiglobuline

permet de détecter la **sensibilisation in vivo** des hématies humaines

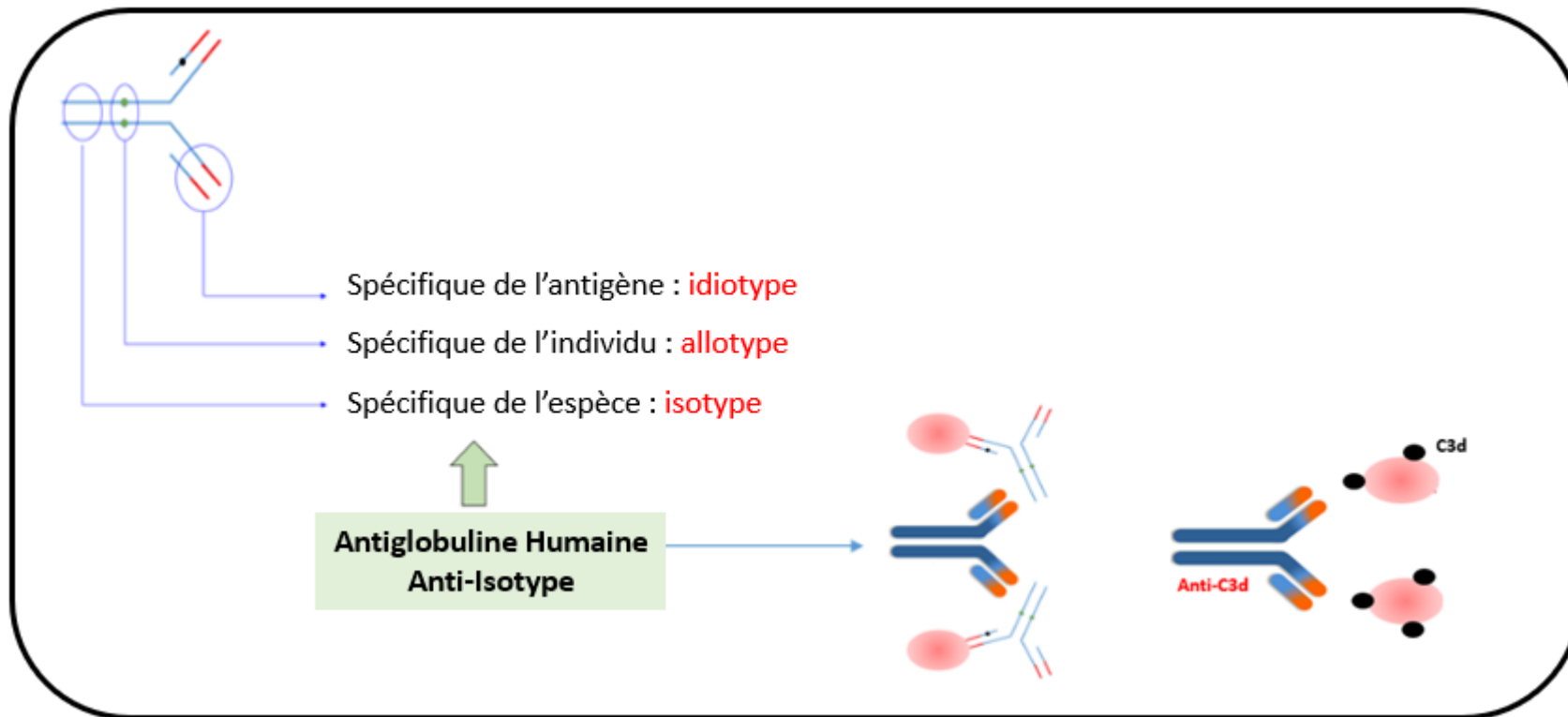
Par un **anticorps ou du complément**

Grâce à une antiglobuline humaine (**anti-Isotype**) **anti-IgG** et une **anti-C3d**

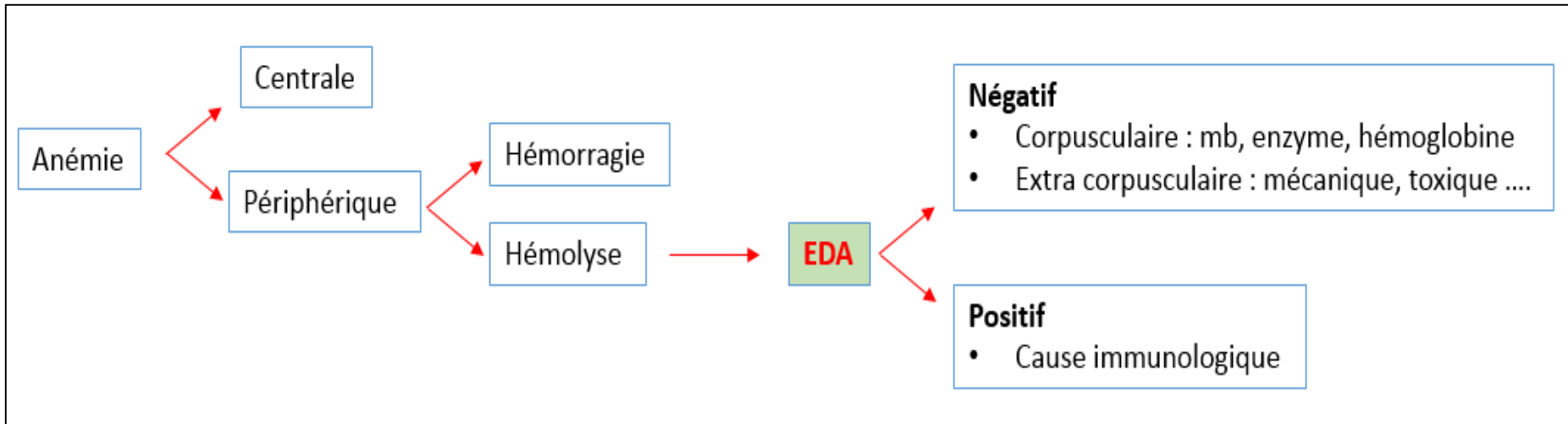
Anti-C3b ?
Anti-C4 ?

Ce test est réalisé sur un échantillon **anticoagulé**

EDTA (évite la fixation de C in vitro)



Permet de préciser l'origine immunologique d'une anémie hémolytique



Champ d'application de l'EDA

- Mise en évidence **d'auto anticorps**
 - Anémie Hémolytique Auto Immune (AHAI) de type C3d, IgG/Mixte, IgA...
- Mise en évidence **d'allo anticorps**
 - Maladie hémolytique du nouveau né par incompatibilité foeto maternelle
 - Accident transfusionnel immuno hémolytique (image DP)
 - Contexte greffe et transplantation
 - *EDA signale la sensibilisation, c'est l'élution qui donne le nom de l'anticorps coupable du conflit*
- Mise en évidence **d'hétéro anticorps**
 - Anémie hémolytique médicamenteuse

La réalisation du EDA (*arrêté 15 mai 2018*)



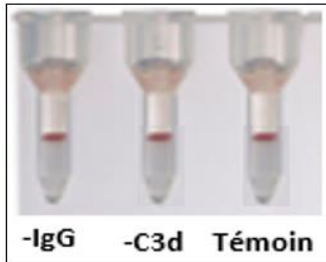
En Filtration : pas de lavages nécessaires

En tube : lavages obligatoires (risque inhibition AGH)

Les règles de validation

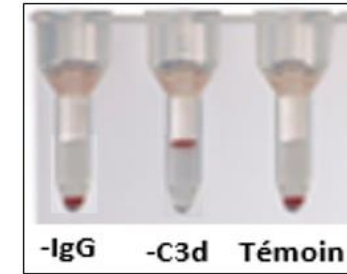
- Résultats attendus des CQI Quotidiens :
 - 1 échantillon de GR sensibilisés par IgG
 - 1 échantillon de GR sensibilisé par C3d
- Réactions non ambiguës
- Réactions négatives avec le réactif témoin

Les difficultés

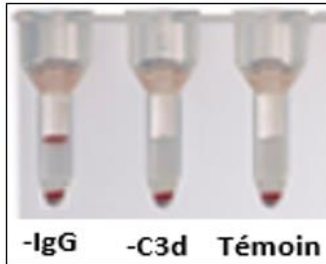


Réactif témoin positif

- GR sensibilisé par un Anticorps (Agglutinine froide)
- Lavage des GR à 37° jusqu'à RT négatif



Après lavage
des hématies à 37°



Double population

- Contexte transfusionnel / Greffe CSH
- Le plus souvent agglutination des hématies transfusées incompatible / Hématies patients libres

Faux négatifs

- Contexte transfusionnel en raison de la destruction de la majorité des hématies sensibilisées
- AHA1 à auto anticorps IgA (anti-IgA)
- Sensibilisation en deçà du seuil de détection technique (50-100 IgG) → élution (plus sensible que EDA)
- Erreur technique **en tube** : omission de l'AGH ou lavages insuffisants (Contrôle réactions négatives)

NEGATIVE
Anti-Médicament

POSITIVE / Spécificité
Allo anticorps → Contexte
• Transfusionnel
• MHNN
• Greffe – Transplantation
 • ABO Mismatch greffe CSH
 • \$ Lymphocyte passager
Auto anticorps avec spécificité

POSITIVE / Panagglutination
Anti-Public
• Contexte Transfusionnel : Allo anti-Public
• Injection d'immunoglobulines / AC Mono
• **Auto anticorps**

Anémie Hémolytique
Appel du prescripteur : hémolyse, patho, TRT

TDA
IgG / C3d

ELUTION

+

AH
Immunologique

0

AH
Non immunologique

AHAI



Corpusculaire
• **Membrane** : MH, EH, SHD, HPN, Nul (RH, KX, CD59) SAO
• **Enzyme** : PK, G6PD
• **Hb** : Thalassémie, Drépanocytose, Hb instables

Extracorporelle
• **Mécanique** (Schizo): valve, MAT (P<150) : PTT, SHU
• **Infectieuse** (T>39°) : Paludisme, *Clostridium perf*
• **Toxique** : Venin, Champignon, Saturnisme, oxydants
• **Brulures** sévères
• **Transfusion non immuno** (thermique, mécanique pompe et cell saver)

0

• IgA
• Technique sensible : Filtration et non lavé
• Elution + dans 3% des AHAI à TDA négatif
• Enfant avec hémoglobinurie → HDL
• Diagnostic d'exclusion AHAI à TDA négatif (souvent Corticosensible)

IgG ou mixte +/- IgA

AHAI à AAC chauds IgG fixant le C ou associé à IgM +/- IgA
Maladie auto immune : LEAD – PR (si thrombopénie associée : \$ Evans)
Lymphopathie maligne - Post GCSH 2 à 8 mois plus tard
Médicaments
Infections virales / bactérienne
Si IgA associée (peut activer le C par alterne)
Support TS + important (1.4 vs 2.1 CGR/patient, Daas, IH 2022)

C3d

Titre >> 64 à 4°
Amplitude >30°

+

AHAI à AF
• Adulte subaiguë ou chronique (lymphopathie ...)
• Enfant aigue post infectieuse (corticosensible)

0

TCD à 0°C → **IgG+**
Hémoglobinurie paroxystique *afrigore* de l'enfant
Hémolysine biphasique anti-P (Donath Landsteiner)

	AHAI	MED DEP	Réaction TS
TDA Intensité	Forte	Forte	Faible $\leq 2+$ (classiquement)
	Augmente en qq jours à semaines	Augmente en qq heures à qq jours Diminue rapidement à l'arrêt	
Éluat	Positive et intense	Positif faible ou négatif	Allo AC possible si hématies intactes
Sérum	Persiste	Disparaît rapidement à l'arrêt	RAI peut retrouver un allo AC

RT Hémolytiques Immunologiques

Situations particulières : Immunoglobulines IV (Polyvalente – anti-RH1)

Immunoglobulines polyvalentes

Hémolyse aigue possible notamment

- chez l'enfant
- de groupe A ou AB
 - Forte densité de l'antigène A
 - Hauts titres des anti-A dans certaines préparations
- Maladie de Kawasaki

Immunoglobulines anti-D

Bien que le plus souvent hémolyse modeste

Hémolyse aigue décrite dans le TRT du PTI

RT Hémolytiques Immunologiques

Situations particulières : Les Greffes de CSH

Incompatibilité ABO n'est pas un obstacle

Incompatibilité mineure : O dans A

- Au moment de l'infusion : anticorps ABO immuns / risque d'hémolyse des GR du receveur
- Après infusion : lymphocyte passager ABO / hémolyse des GR du receveur par anti-A donneur 5 à 15 jours

Incompatibilité majeure : A dans O

- Au moment de l'infusion : apport des antigènes incompatibles (désérythrocytation)
- Après infusion : AG incompatibles avec AC receveur (retard voire érythroblastopénie prolongée jusqu'à 1 an)

Double Incompatibilité

RT Hémolytiques Immunologiques

Situations particulières : Les transplantations

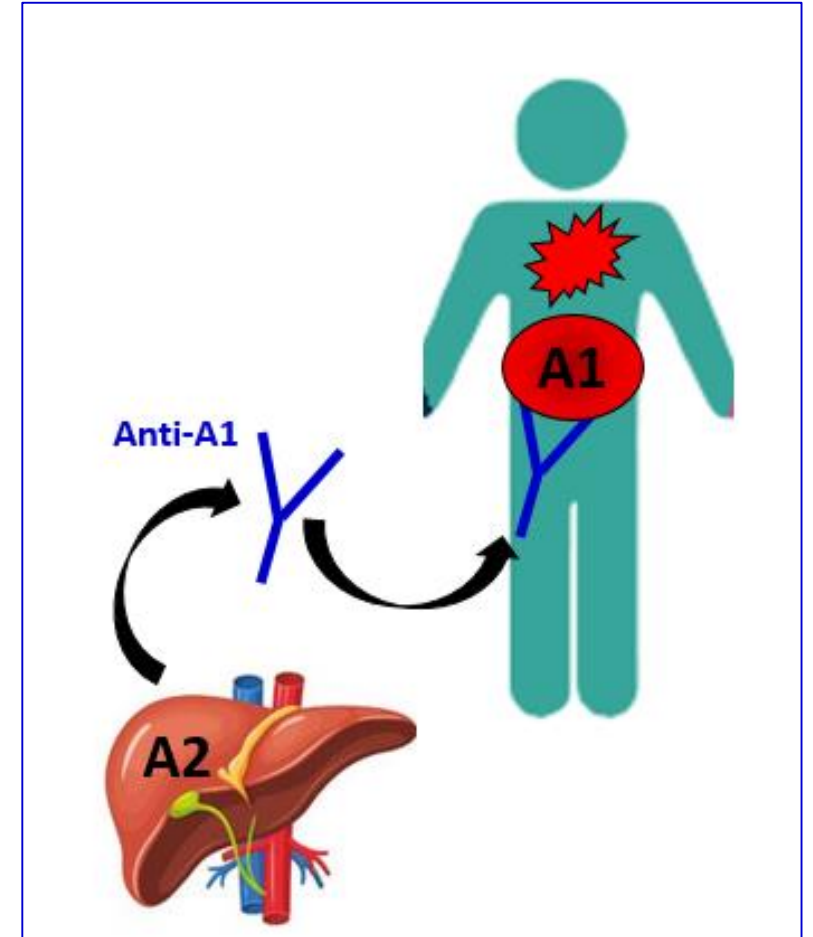
Le syndrome du lymphocyte passager est possible

- En cas de greffe de CSH
- En cas de transplantation d'organes
 - Foie
 - Cœur – poumon
 - Rein

Les anticorps du greffon hémolyse les hématies du patients

Les spécificité peuvent concerner

- Anti-RH
- ABO : anti-A1



Situations particulières : hémolyse TS **NON** immuno



↗ **Température / pré TS**

1° à 2°

Isolée

Associée

- +/- frisson
- +/- hémodynamique
- +/- digestifs
- +/- CIVD
- +/- Hburie

>2°

- **Hémolyse**
- **RFNH (exclusion)**

- **Contamination bactérienne**
- **Hémolyse**

↘ **TA systolique 3 / Pré TS**

- **Choc** hémolytique
- **Choc** anaphylactique
- **Choc** septique
- **Hypotension du TRALI** (dyspnée au 1° Plan)

Dyspnée

- **TRALI**
- **OAP**
- **Allergie sévère**
- (Bactérie / Hémolyse)

Hémoglobinurie (HIV)

Hémolyse intravasculaire

Coombs Direct Positif (peut être négatif)

- Immunologique : Incompatibilité érythrocytaire

Coombs Direct Négatif

- Mécanique (pompe doit rester <300 mm Hg, Cell-Sav)
- Thermique (blood warmer alarme >42, stockage)
- Osmotique
- Pousse bactérienne

Attention

Un TDA peut être **positif** en contexte hémolytique alors que **l'hémolyse est non immunologique**

et inversement il existe des anémies hémolytiques immunologiques avec des TDA négatifs

L'interprétation du **TDA doit prendre en considération** : la pathologie, les contextes (transfusionnels, greffe, transplantations, grossesse), les thérapeutiques, les stigmates clinico-biologiques d'hémolyse. Noter : Administration Ig polyvalente peuvent contenir des AC ABO voire de l'anti-D

De même des TDA peuvent être positifs **dans certaines pathologies** dont le mécanisme n'est pas forcément clair :

drépanocytose, thalassémie, pathologies rénales, myélome multiple, SIDA ou autres pathologies associées à une augmentation de l'urée

L'imputabilité transfusionnelle repose sur l'existence d'une **positivité ou renforcement TDA post transfusionnel** par rapport au pré transfusionnel avec, dans ce cas, la nécessité de réaliser une **éluat** même si le TDA est négatif dans un contexte **hémolytique** ou **d'inefficacité transfusionnelle**

Le conflit transfusionnel par allo anticorps

- le TDA est classiquement **<2+** avec une possible **double population**
- L'anticorps peut n'être détecté **que dans l'éluat**

puis dans le plasma 7 à 10 jours après la transfusion en cas de réponse primaire

ou 1 à 2 jours après en cas de réponse secondaire

Ictère chez un nouveau-né

Rechercher des signes cliniques d'ictère pathologique ou de sévérité

Bilan paraclinique de première intention

Ictères à bilirubine libre

Ictères bénins

*Ictère simple
Ictère au lait
de mère*

Ictères pathologiques

Hémolyse

*Allo-immunisations érythrocytaires
maternofœtales
Hémolyses constitutionnelles
Minkowski-Chauffard
Déficit en G6PD / pyruvate kinase*

Pas d'hémolyse

*Infections maternofœtales
Hypothyroïdie
Autres causes rares*

Ictères à bilirubine conjuguée

Ictères pathologiques

Cholestases intrahépatiques

*Infections postnatales
– E. coli
– virus (CMV, EBV, Echovirus...)
Autres causes rares*

Cholestases extrahépatiques

*Atrésie biliaire
Autres anomalies des voies biliaires*