



TRANSFUSION INTERREGIONALE CRS  
INTERREGIONALE BLUTSPENDE SRK

# Test direct à l'antiglobuline et élution

03.11.2023\_journée de formation romande en transfusion\_Neuchâtel

**Giorgia Canellini**

**Unité de Médecine Transfusionnelle CHUV**

**Transfusion Interrégionale CRS**

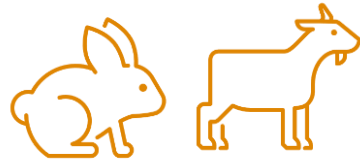
**[giorgia.canellini@chuv.ch](mailto:giorgia.canellini@chuv.ch)**

# Plan de la présentation

- Aspects techniques du TDA
- Son utilité en clinique
  - La transfusion incompatible
  - La maladie hémolytique néonatale
  - L'anémie hémolytique auto-immune
  - Les hémolyses médicamenteuses
- L'élution du TDA

# Historique

- Le principe du test direct à l'antiglobuline a été démontré en 1908 par Carlo Moreschi lorsque des GR de lapins sensibilisés ont été agglutinés par l'addition d'antisérum obtenu après immunisation de chèvres



- Le test direct à l'antiglobuline a été ensuite mis au point par R. Coombs, Mourant et Race en 1945. Le sérum d'animaux immunisés avec des protéines humaines a été utilisé pour détecter des anticorps «incomplets» fixés sur les hématies.
- La capacité de détecter des molécules à la surface des hématies grâce à l'antiglobuline humaine et son utilité ont été finalement reportées par Dacie, Crookston and Christensen en 1957. Ce test a révolutionné la transfusion.



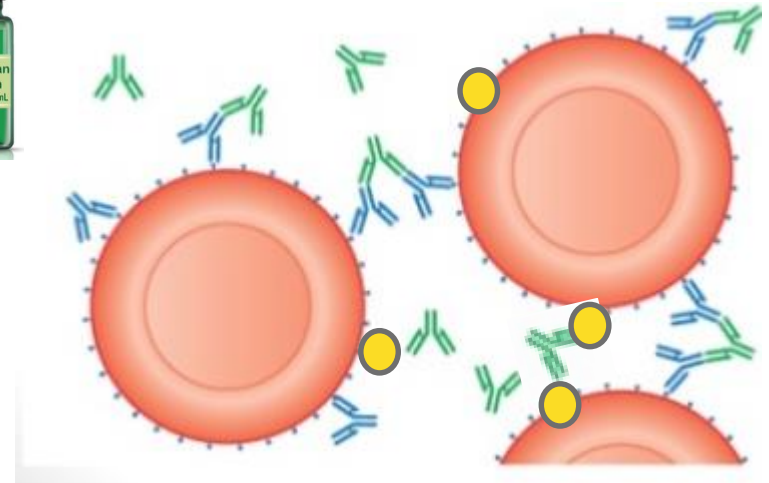
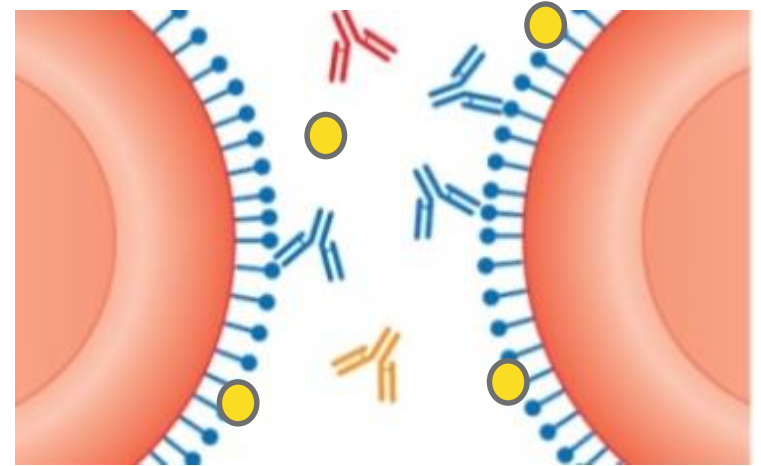
**Artifice de nature immunologique**  
**L'antiglobuline humaine (AGH)**

« Un Anticorps anti Anticorps »

The Lancet 2006 367DOI: (10.1016/S0140-6736(06)68528-0)

# Principe du TDA

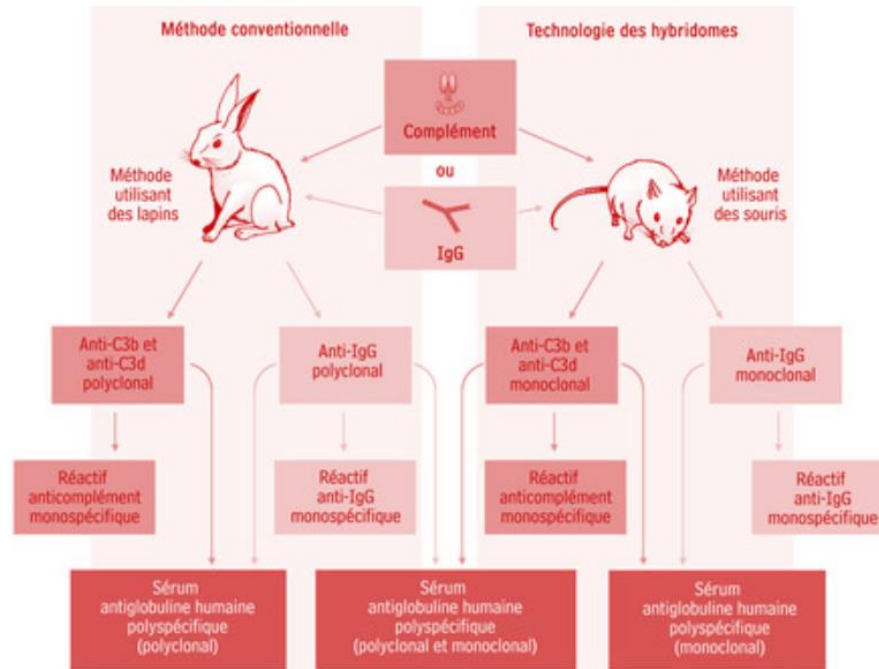
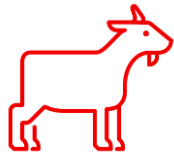
- Le **test direct à l'antiglobuline** permet de mettre en évidence, par le réactif de Coombs polyspécifique (antiglobuline humaine=AGH), des hématies sensibilisées par des anticorps ou des fractions du complément
- L'étape de **lavage** (méthode en tube) permet d'enlever les anticorps ou fractions du complément résiduels non fixés
- En ajoutant **l'antiglobuline humaine** aux hématies, des ponts entre les IgG et/ou les fractions C<sub>3</sub>d fixées à la surface des hématies vont être créés et vont permettre de détecter une agglutination.
- A noter que le réactif de Coombs ne diminue pas le potentiel zéta.



# L'anti-globuline humaine = réactif de Coombs

## Evolution du réactif :

- Historiquement : immunisation d'un animal par injection d'Ig humaines. Les fragments Fab de ces «Ac anti-anticorps» vont se fixer sur la portion Fc des Ig humaines
- L'utilisation de produits purifiés va permettre d'affiner la spécificité du réactif
- L'introduction de la technique des hybridomes a permis la synthèse d'anticorps monoclonaux, utilisée surtout pour les anti-compléments



## L'anti-globuline humaine = réactif de Coombs

- Anti-IgG est le composant principal car la plupart des alloanticorps sont de type IgG n'activant pas le complément
- Les réactifs ne doivent pas contenir des Ac hétérospécifiques (faux pos)
- Les performances et la stabilité des réactifs doivent être vérifiées par les fournisseurs
- Le réactif peut être libéré si :
  - il donne des réactions négatives macroscopiques avec des GR non sensibilisés , de groupe ABO différents, d'âge différent,
  - si sa performance est comparable à un réactif de référence (titration) et avec des cellules sensibilisées avec des alloAc faibles (anti-K, anti-Fya). L'anti-complément est aussi testé avec des alloAc activant le complément (anti-Jka).
  - S'il ne montre pas un effet prozone significatif.

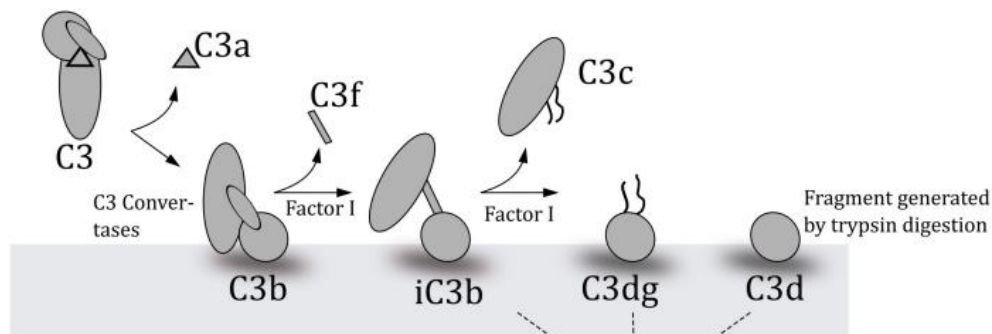
# L'anti-globuline humaine = réactif de Coombs

→ Exemple de test de titration pour évaluer la performance d'un AGH anti-IgG vis-à-vis de cellules sensibilisées avec un anti-D ou un anti-Fya et comparé à un réactif de référence (FDA).

Table II. Anti-IgG potency with weakly sensitized cells

		RIIIM		R3P		FDA anti-IgG	
		neat	diluted 1+3	n	1+3	n	1+3
Ant-D serum	N	++/+++	++/+++	+++	++	++/++	+/++
	2	++/+++	++/+++	++/+++	+/++	++	+
	4	+/++	+	++	+	(+)	
	8	+	+	+	+	W	
	16	W	(+)	W	(+)	W	
Anti-Fy <sup>a</sup> serum	N	+++	++	+	++	(+)/+	
	2	+++	++	+	++	(+)	
	4	++/+++	+/++	+	++	W	
	8	+/++	+	(+)	+	W	
	16	+	W	(+)	W	W	

# AGH et anti-complément



- A la surface du GR, le C3b est converti en iC3b rapidement ( 1 min). Il est dégradé environ 10 min plus tard en C3d. Le C3d est fixé de façon stable sur le GR. IL est un marqueur précoce de l'activation du complément mais n'indique pas si elle va aboutir jusqu'au MAC.
- L'anti-C4d doit être évité (accumulation durant le stockage de l'échantillon -> faux pos) et l'anti-C4c est accepté à très faible titre
- L'anti-C3d et C3c ne doivent pas être en excès (->faux pos)
- Anti-C3d reconnaît le C3b, l'iC3b et le C3dg. accumulation lors de la conservation du sérum à 4°C -> EDTA
- L'anti-C3c reconnaît le C3b et l'iC3b. Il est le réactif le plus spécifique pour indiquer la présence d'une hémolyse, mais ne détecte pas les GR ayant échappés à la lyse (C3dg)



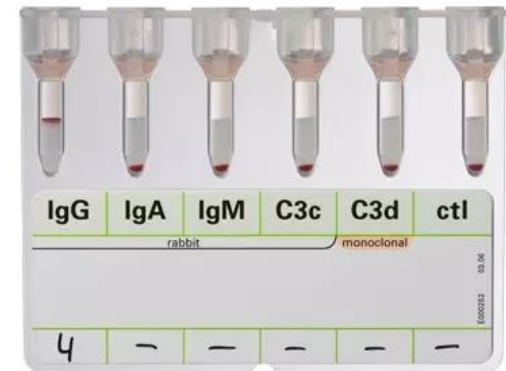
# AGH

## Polyspécifique :

- contient des Ac anti-IgG et des Ac anti-complément (anti-C3d, anti-C3c).
- Potentialisation des réactions lors d'Ac faibles activant le complément (anti-JK).
- Généralement ne reconnaît pas l'IgA et l'IgM. Si anti-chaînes kappa ou lambda -> détection d'IgA et IgM également

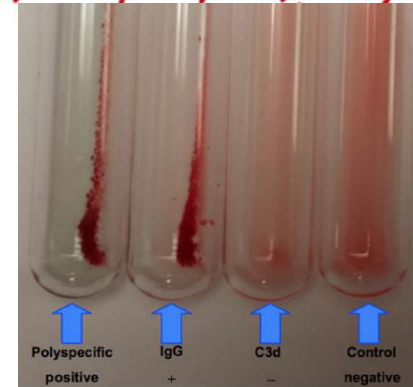
## Monospécifique :

- Anti-complément
  - Permet de suspecter la présence d'IgM activant le C
  - Permet de renforcer la réaction de certains IgG difficilement décelables (anti-JK, anti-KEL1)
  - Anti-C3 est plus important que anti-C4
  - ne peut pas faire la différence entre une hémolyse extravasculaire (C3b médiée), une erythrophagocytose (C3dg médiée) une hémolyse intravasculaire (MAC C5-9) ou une erytrose (C5b-C8 médiée).
- Anti-IgG, Anti-IgA, anti-IgM : typiquement reconnaissent la chaîne lourde correspondante (gamma,....)

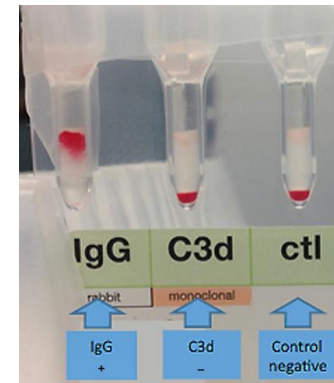


# Méthodes

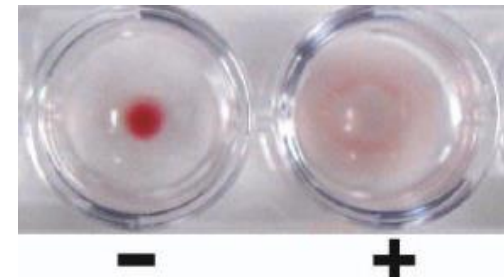
<b>TUBE</b>	<b>Laver des GR</b>
	Préparer une suspension de GR
	Ajouter AGH
	Centrifuger
	<b>Agiter doucement</b>
	Lire (macroscopique)



<b>CARTE</b>	Préparer une suspension de GR
	Pipeter la carte
	Centrifuger
	Lire (macroscopique)



<b>PHASE SOLIDE</b>	<p>Cupules recouvertes d'AGH. Rajout des GR lavés Lecture par spectrophotomètre</p>
---------------------	---



# Critères de qualité

- Echantillon EDTA
- **TDA en tube** :
  - Les réactions négatives doivent être vérifiées avec les cellules du Coombs Ctl
  - Si toutes les spécificités sont positives un Ctl nég est nécessaire. En cas de positivité du Ctl nég, refaire le test en lavant les érythrocytes à chaud ou si insuffisant, utiliser du DTT
- **TDA en gel** : le puit Ctl doit être négatif.
- Pas de CQI exigé par T-CH CRS en l'absence de test commercial adapté
- Pas de CQE disponible en CH



# Pièges techniques

<b>Faux négatif</b>	AGH non ajouté
	Étape de lavage inadéquate
	AGH contaminé
	effet prozone
	hémolyse à IgA ou IgM
	Ac de faible affinité
	Ac ou complément sous le seuil de détection

<b>Faux positif</b>	Autoagglutination (agglutinines froides, Ag T/Tn)
	Tube souillé
	Centrifugation trop forte
	rouleaux

<b>Double population</b>	Présence de fibrine
	Transfusion incompatible
	Allogreffe CSH

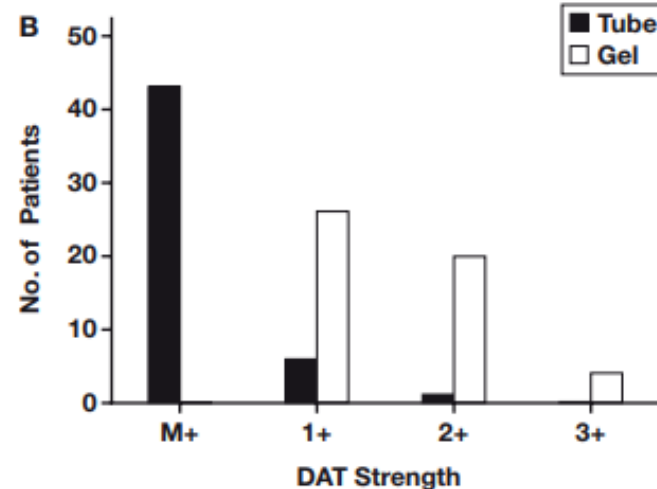
# Sensibilité-spécificité

Plusieurs études ont montré une meilleure sensibilité de la méthode en gel par rapport à la méthode en tube

**TABLE 2. Results of DATs performed on D-sensitized RBC samples by tube agglutination, gel microcolumn, affinity microcolumn, modified affinity microcolumn, and flow cytometric assays**

Anti-D dilution	Assay					Flow cytometry <sup>†</sup>
	Tube agglutination	Gel microcolumn	Affinity microcolumn	Modified affinity microcolumn*		
25	3+	4+	2+	3+	1.488	
50	2+	4+	1+	2+	0.986	
100	1+	3+	1+	1+	0.734	
200	Neg <sup>‡</sup>	3+	Neg	Neg	0.455	
400	Neg	1+	Neg	Neg	0.408	
800	Neg	Neg	Neg	Neg	0.389	
1600	Neg	Neg	Neg	Neg	0.372	
3200	Neg	Neg	Neg	Neg	0.368	

\* Affinity microcolumn with added IgG.  
<sup>†</sup> Fluorescence intensity; RBCs sensitized with anti-D diluted up to 1-in-400 were interpreted as positive.  
<sup>‡</sup> Negative.



Test	Seuil de détection (Nbre /GR)
TDA IgG tube	200
TDA IgG gel	100
TDA C3d tube	400
TDA IgG cytométrie de flux	78

Le seuil de détection dépend de la méthode utilisée

*Arch Dis Child Educ Pract Ed 2015;100:198–203.  
 Dittmar et al. Transfusion 2001*

# CQE UK NEQAS\_sensibilité

Figure 2. Percentage of reaction grades reported vs. polyspecific AHG by technique (n=306).

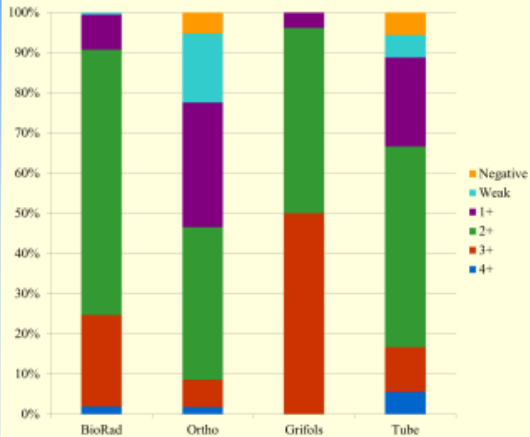


Table 2. Number of reaction grades stronger, weaker and the same as the median (2+) versus polyspecific AHG by technology.

Technique	Reaction grades vs. polyspecific AHG (%)		
	Stronger	2+ (median)	Weaker
<b>BioRad (n=206)</b>	51(24.8)	136(66.0)	19(9.2)
<b>Ortho (n=58)</b>	5(8.6)	22(37.9)	31(53.4)
<b>Grifols (n=26)</b>	13(50.0)	12(46.2)	1(3.8)
<b>Tube (n=18)</b>	3(16.7)	9(50.0)	6(33.3)

Figure 3. Percentage of reaction grades reported vs. anti-IgG by technique (n=306).

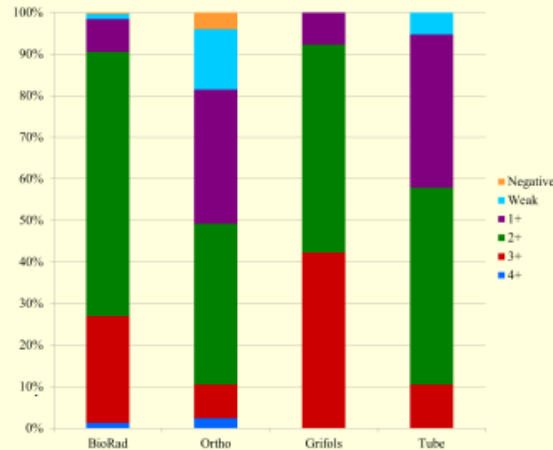


Table 4. Number of reaction grades stronger, weaker and the same as the median (2+) versus anti-IgG by technology.

Technique	Reaction grades vs. anti-IgG AHG (%)		
	Stronger	2+ (median)	Weaker
<b>BioRad (n=303)</b>	82(27.1)	192(63.4)	29(9.6)
<b>Ortho (n=124)</b>	13(10.5)	48(38.7)	63(50.8)
<b>Grifols (n=26)</b>	11(42.3)	13(50)	2(7.7)
<b>Tube (n=19)</b>	2(10.5)	9(47.4)	8(42.1)

De 2015 à 2017 UK NEQAS a mené une enquête interlaboratoire en Angleterre sur le TDA  
 Résultats pour les échantillons IgG positif d'intensité 2+

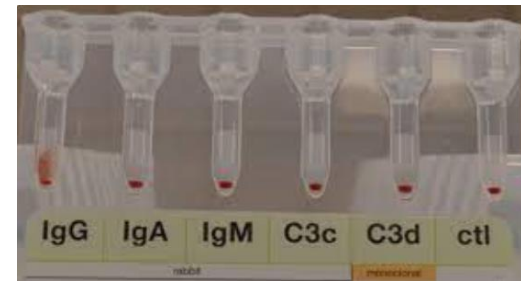
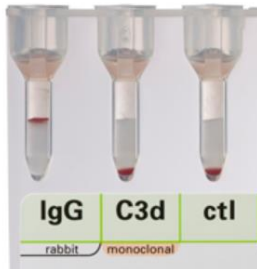
Biorad et Grifols ont la meilleure sensibilité pour détecter l'IgG que Ortho et la méthode en tube.

# TDA\_arborescence

TDA  
polyspécifique  
(IgG+ C3d)

+

TDA  
monospécifique  
(IgG, C3d, voir  
IgA, IgM )

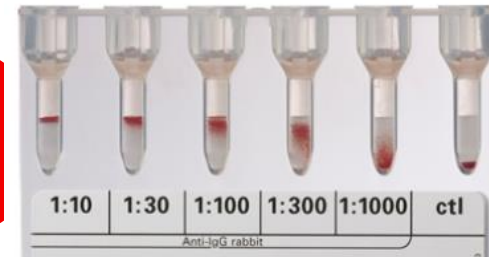
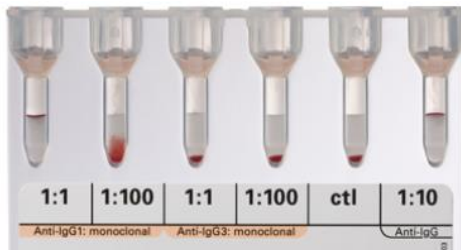


IgG

+

Sous-  
classes  
IgG1, IgG3

Titre IgG=  
quantité de  
molécules fixées



# TDA sous classes IgG1/IgG3

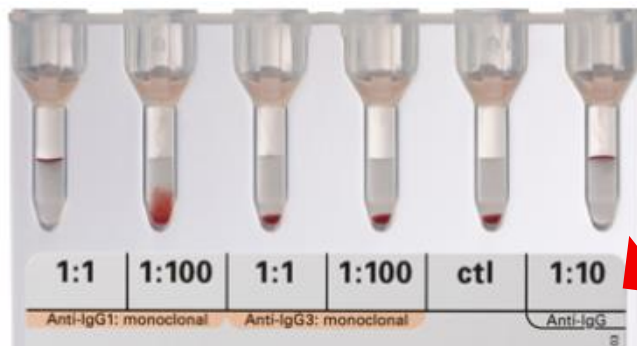
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Quantité relative	65%	23%	8%	4%
Traverse le placenta	++	+/-	++	++
Fixe le complément	+++	++	++++	+/-
Phagocytose	+++	+	+++	+/-

**Table 1.** Correlation of IgG subclass with hemolysis

IgG subclass	Number of patients	Hemolysis	No hemolysis
IgG1	25	20 (80.00%)	5 (20.00%)
IgG1 and IgG3	11	9 (81.82%)	2 (18.18%)
IgG3 only or neither IgG1 nor IgG3 detected	44	20 (45.45%)	24 (54.55%)
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>49 (61.25%)</b>	<b>31 (38.75%)</b>

p value < 0.005.

- IgG1 seul : hémolyse si quantité élevée d'IgG1 ( 900-1000 molécules)
- IgG3 seul : hémolyse dès faible quantité d'IgG3 ( 100 molécules)
- IgG2 ou IgG4 : peu ou pas d'hémolyse



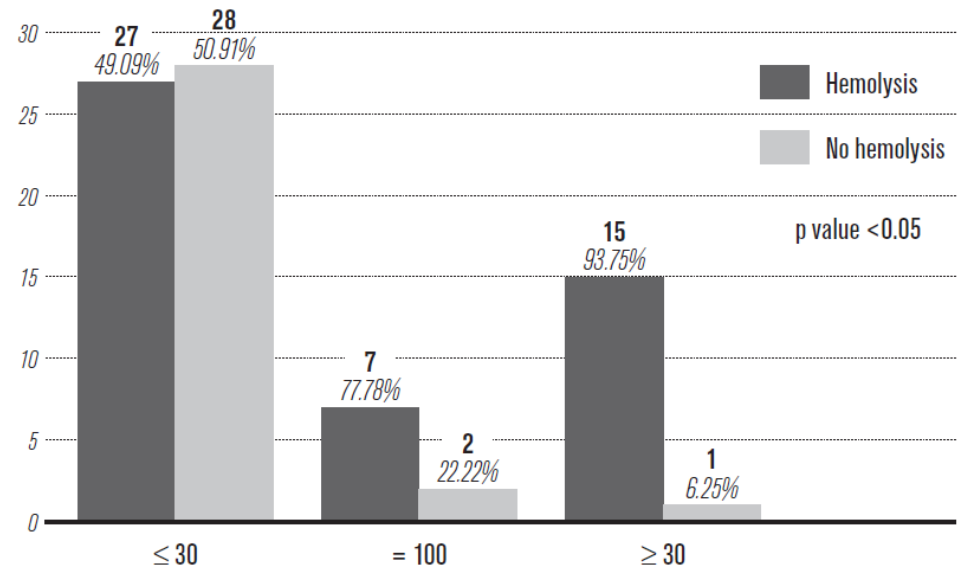
Positif en l'absence d'IgG1 ou IgG3 : cela signifie qu'il y a de l'IgG2 ou IgG4

*Lab Medicine 2020;51:50–55  
Immunoematology 2014;30(1):24-7*

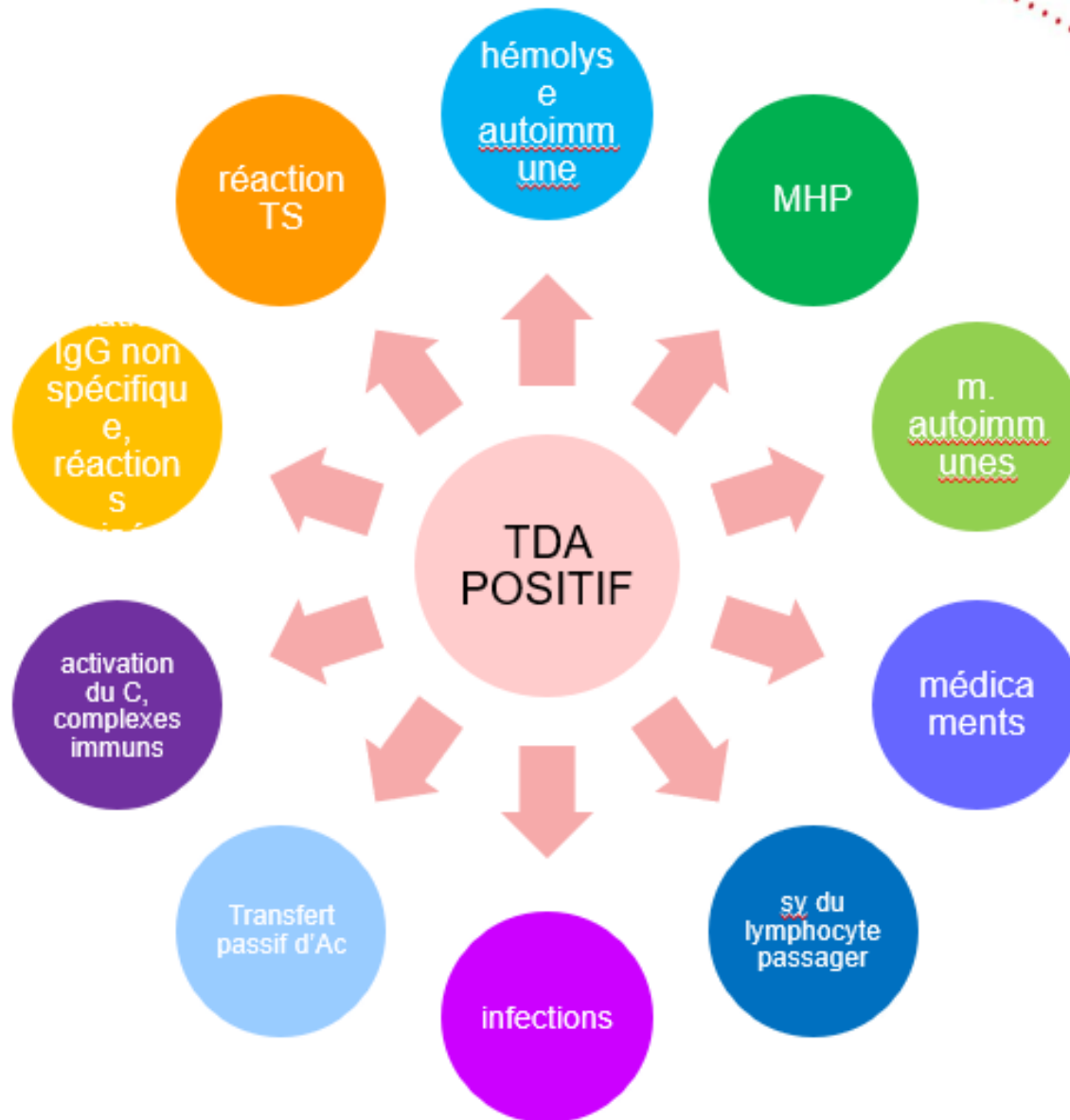


# TDA\_titration IgG

- Si présence d'IgG  $\geq 2+$ , il peut être utile de faire une titration
- Un titre  $> 1:30$  indique un risque élevé d'hémolyse
- L'évolution du titre d'anti-IgG peut être indicatif d'une évolution favorable ou d'un risque imminent de récurrence.
- La valeur du titre n'est pas corrélée à la sévérité de l'hémolyse car d'autres facteurs immunitaires entrent en jeu.



**Fig. 1** Correlation of IgG titer with in vivo hemolysis.



# TDA positif sans hémolyse

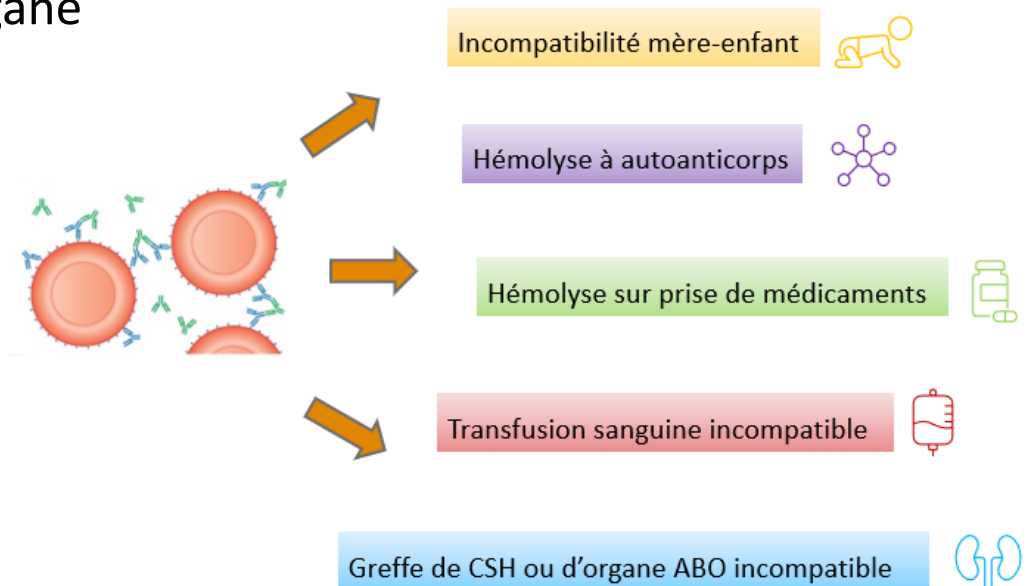
- Un TDA positif est retrouvé chez environ 0.1% des donneurs de sang, sans aucun signe d'hémolyse
- Le suivi réalisé chez les donneurs de sang avec TDA positif montre que 3-10% développent une AHAI, 20-25% ont un TDA qui devient négatif et 60-70% gardent un TDA positif sans maladie.
- Un TDA positif est retrouvé chez 1-15% des patients hospitalisés (étude 134 patients avec TDA pos : 40% n'avaient pas d'hémolyse)
- Les GR des sujets sains peuvent porter des molécules d'IgG ou de complément, fixées de manière non spécifique ou participant au processus physiologique de sénescence. Probablement la plupart des personnes possèdent des IgG fixées, au-dessous du seuil de détection (< 50 molécules IgG/GR).

# Intérêts cliniques du TDA

- Le TDA est utile en cas de suspicion d'hémolyse, pour en investiguer la cause. Son résultat doit toujours être interprété en fonction du contexte clinique

## Quand réaliser un TDA ?

- Tests pré-transfusionnels chez un patient transfusé récemment < 14j
- Réaction transfusionnelle
- Hémolyse
- Maladie hémolytique du nouveau-né
- Allogreffe, transplantation d'organe



# Transfusion sanguine incompatible



- La production d'anticorps non détectés avant la transfusion peut déclencher une hémolyse aigue ou retardée. Ces anticorps apparaissent en principe dans les 2 semaines
- Un TDA positif de type IgG et/ou complément peut être le premier signe d'une transfusion incompatible
- La survenue d'un TDA positif d'intensité faible dans les 14 jours après transfusion doit faire rechercher une alloimmunisation
- **En cas d'hémolyse sévère, le TDA peut être négatif par destruction de tous les GR transfusés**
- **Certaines réactions hémolytiques retardées peuvent survenir jusqu'à 21 jours après la transfusion**



# Incompatibilité mère-enfant



- Dans la maladie hémolytique périnatale (MHP) le TDA est positif (IgG) chez l'enfant par passage transplacentaire des anticorps maternels de type IgG qui se lient aux GR de l'enfant et peuvent causer une hémolyse.
- Dans la majorité des cas un TDA positif est retrouvé en cas de MHP bénigne par incompatibilité ABO entre la mère et l'enfant
  - 15-25% mère-enfant ABO incompatible
  - 33% nouveaux-nés auront un TDA pos dont <1 % vont présenter une MHP
- La prophylaxie anti-D (Rhophylac) réalisée avant l'accouchement peut être responsable d'un TDA positif chez l'enfant à la naissance
- La gelée de Wharton peut causer des TDA faussement positif-> lavage ou sang capillaire



# Incompatibilité mère-enfant



- La corrélation entre un TDA positif seul et la survenue d'une hémolyse néonatale est mauvaise (VPP entre 10-50%)
- Un TDA positif chez le nouveau-né demande une corrélation avec le contexte clinique et les données IH de la mère
- Par contre, en cas de TDA négatif, la présence d'une MHP cliniquement significative est peu probable (VPN 90-95%)

Characteristics of four neonates diagnosed with HDN.

	Delivery	Jaundice score	DAT	Eluate	Ab	PT
1	Vacuum extraction	7	-	1+	anti-A	-
2	Forceps extraction	5	1+	2+	anti-A	-
3	Spontaneous partus	4	-	1+	anti-A	-
4	Spontaneous partus	8	2+	2+	anti-A	+



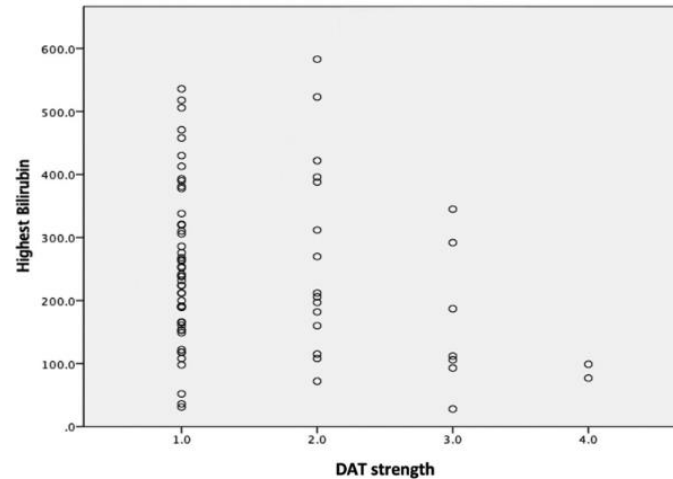
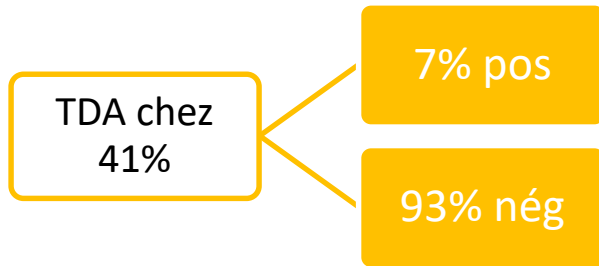
Diagnostic accuracy of DAT and eluate.

	Total population	Jaundice score $\geq 4$
HDN- and DAT- (n)	259	29
HDN+ and DAT+ (n)	2	2
HDN- and DAT+ (n)	19	0
HDN+ and DAT- (n)	2	2
Sensitivity DAT (%)	50	50
Specificity DAT (%)	93	100
PPV DAT (%)	10	100
NPV DAT (%)	99	94

# Incompatibilité mère-enfant



- L'intensité du TDA ne permet pas de prédire la sévérité de l'hémolyse néonatale ni la nécessité d'un traitement (photothérapie).



clinique	TDA 1+ 54	TDA ≥ 2+ 24
TIU	0	1
TS dans les 6 semaines	1	0
Échange TS	2	1
IVIG	4	3
Photothérapie	33	18

*the journal of maternal-fetal & neonatal medicine* 2023, vol. 36, no. 2, 2227910



# Incompatibilité mère-enfant



- Les indications à réaliser un TDA chez le nouveau-né sont :
  - Une suspicion élevée de MHP (présence d'hémolyse), même si la RAI est négative chez la mère et quelle que soit la constellation de groupe sanguin entre la mère et l'enfant.

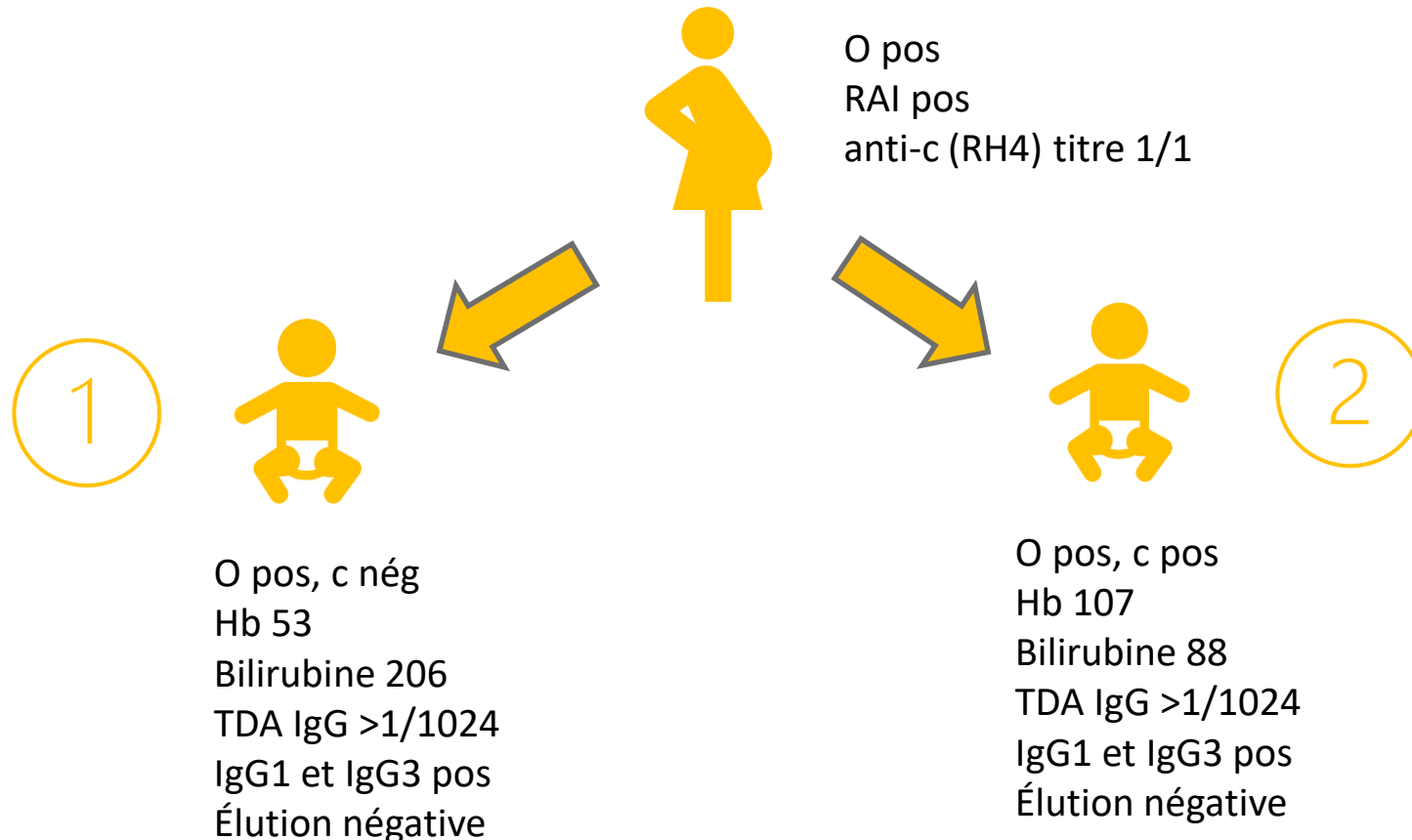
*NB: une hyperbilirubinémie seule n'est pas une indication à réaliser un TDA en l'absence d'anémie, réticulocytose, ↑ LDH et sphérocytose au frotti sanguin*

- Enfants nés de mère connue avec des alloanticorps potentiellement significatifs
- Des investigations supplémentaires sont recommandées (élution, voir des investigations IH mère + père biologique) en cas d'hémolyse significative ou en cas de TDA fortement positif ( $\geq 2+$ ) chez le nouveau-né



# Incompatibilité mère-enfant\_à propos d'un cas

- Patiente de 32 ans, originaire des Balkans
- 1<sup>ère</sup> grossesse : mort in utero tardive
- 2<sup>e</sup> grossesse : jumeaux
- Césarienne prématurée car souffrance foetale



# Incompatibilité mère-enfant\_à propos d'un cas

## Votre avis? Quels tests supplémentaires ?

- Le test de compatibilité entre le plasma de la mère et les GR du père biologique était fortement positif
- Le test de compatibilité avec les éluats et les GR du père biologique étaient fortement positif

-> **Anticorps dirigé contre un antigène privé**

O pos  
anti-c (RH4) 1/1

anti-Hut, anti-Mut 1/64

MMA : 50%



O pos Cc  
GP Hut



Anti-Hut/anti-Mut



Anti-Hut/anti-Mut



# Hémolyse à autoanticorps

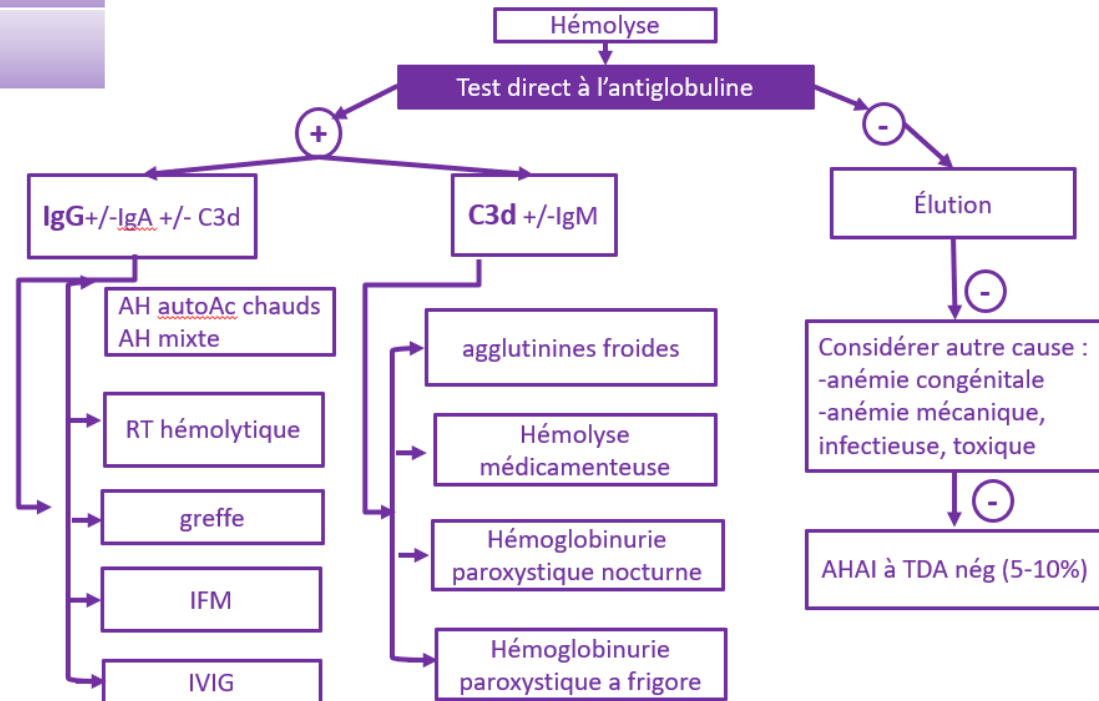


- Un TDA positif associé à une destruction accélérée des érythrocytes hors contexte médicamenteux, transfusionnel ou de greffe, oriente vers une hémolyse d'origine autoimmune
- L'hémolyse à **autoanticorps chauds** est la situation la plus fréquente. Elle est causée par des autoanticorps de **type IgG** dont certains sont capables d'activer le complément. Ils sont rarement de type IgA. Ces autoanticorps ont une spécificité large (panréactivité) et rarement une pseudospécificité (auto-anti-e.....), Une élution s'avère nécessaire si les ACA ne sont pas décelables dans le plasma. La corrélation entre l'intensité du TDA (titre) et l'hémolyse est mauvaise. Le TDA peut rester positif après guérison.
- Lors d'**agglutinines froides le TDA est** de spécificité C3d/C3c, signe indirect de l'activation du C par des IgM s'étant détachées des GR après leur fixation dans la circulation périphérique. Un TDA nég peut raisonnablement écarter se diagnostic car observé seulement dans 2% des cas.
- Il existe des hémolyses autoimmunes mixtes (8%) avec autoanticorps à la fois chauds et froids (TDA IgG et C3d).
- **L'hémoglobinurie paroxystique à froid** est rare, rencontrée surtout chez les enfants. Il s'agit d'une hémolysine biphasique de type IgG qui se lie à froid et active le complément à chaud. Le TDA est de type C3d. La spécificité IgG peut être mise en évidence lors de la réalisation du TDA à froid

# Hémolyse et utilité du TDA



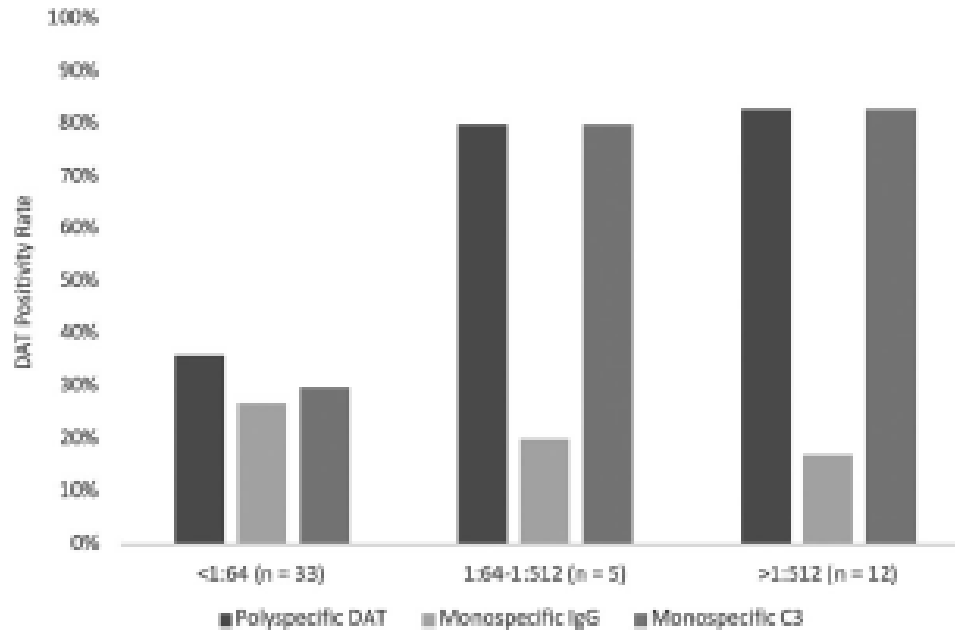
Hémolyse immune	IgG	C3d
<b>Autoanticorps chauds</b>		
67%	+	+
20%	+	-
13%	-	+
<b>Agglutinines froides</b>	-	+
<b>Médicaments</b>	+	+
<b>Donath-Landsteiner</b>	-	+



# TDA et agglutinines froides



- Dans les agglutinines froides, la prévalence d'un TDA polyspécifique ou de type C3d positif est plus élevée lorsque les titres d'agglutinines froides sont élevés
- Des titres d'agglutinines froides sont en relation avec l'intensité de glycosylation de leur chaînes légères.



*Transfusion. 2021;61:1302–1311.*

# Hémolyses autoimmunes à TDA négatif



L'incidence des anémies immunes à TDA négatif est estimée à 5-10% des patients.

Plusieurs mécanismes peuvent en être responsables:

(1) Le seuil de détection est de 100 à 200 molécules d'IgG ou au moins 400 molécules de complément par érythrocyte

Un taux plus faible peut être suffisant pour causer une hémolyse, en cas de forte affinité et capacité de l'Ac à fixer le complément (seuil de 78.5 molécules d'IgG par érythrocyte détecté par techniques radio-immunologiques)

Des techniques plus sensibles comme, la cytométrie de flux peuvent révéler des IgG non décelées par le test classique mais elles sont rarement disponibles dans les laboratoires de routine.

Le test d'éluion, qui consiste à détacher les anticorps fixés puis à les identifier, a une sensibilité proche de la cytométrie de flux.

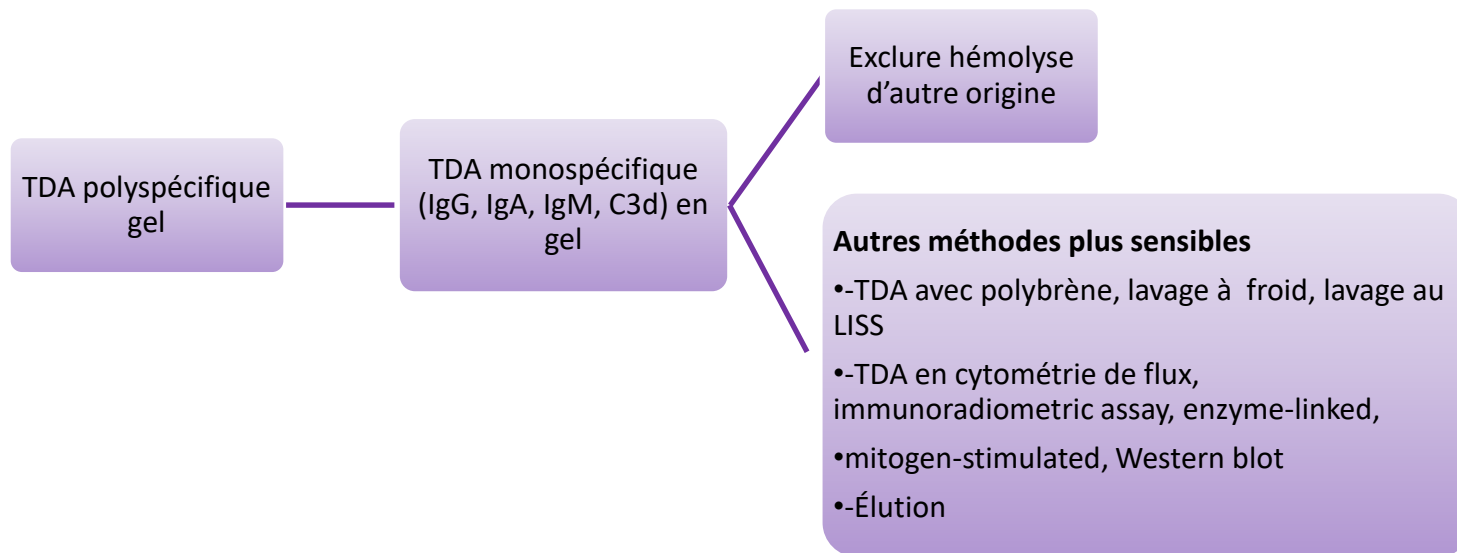
(2) Le test de dépistage (TDA polyspécifique) peut donner un résultat négatif en cas d'hémolyse à IgA ou IgM.

(3) Les anticorps de faible affinité peuvent être perdus durant les étapes de lavage (s'applique aux tests effectués en tube)

# Hémolyses autoimmunes à TDA négatif



- Il est important de différencier les AH autoimmunes à TDA négatif des autres causes non immunes en raison des effets délétères du retard diagnostic et des effets secondaires des traitements immunosuppresseurs
- Causes des TDA négatifs : 80% IgG en trop faible quantité, 15% IgG de faible affinité, 4% IgA et 1% IgM
- Attitude en cas de TDA négatif

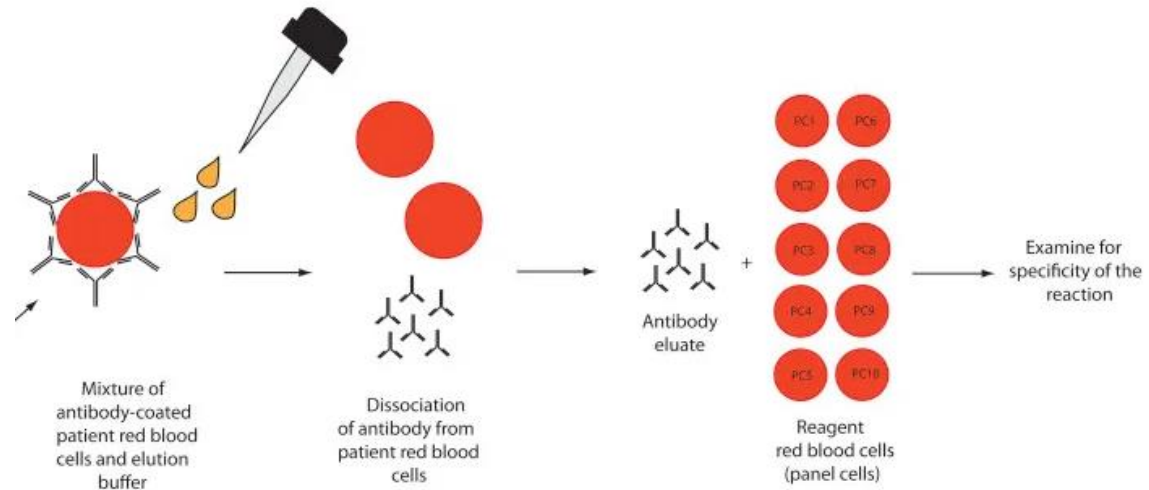


*Transfusion. 2022;62:205–216.  
J. Clin. Med. 2020, 9, 3858*



# L'éluotion

- L'éluotion consiste à décrocher les anticorps fixés sur les globules rouges *in vivo* (même lorsque le TDA est négatif) et les identifier par la suite.
- L'éluotion est plus sensible que le TDA et permet une concentration des IgG. Elle est recommandée en situation d'hémolyse, même si le TDA est négatif



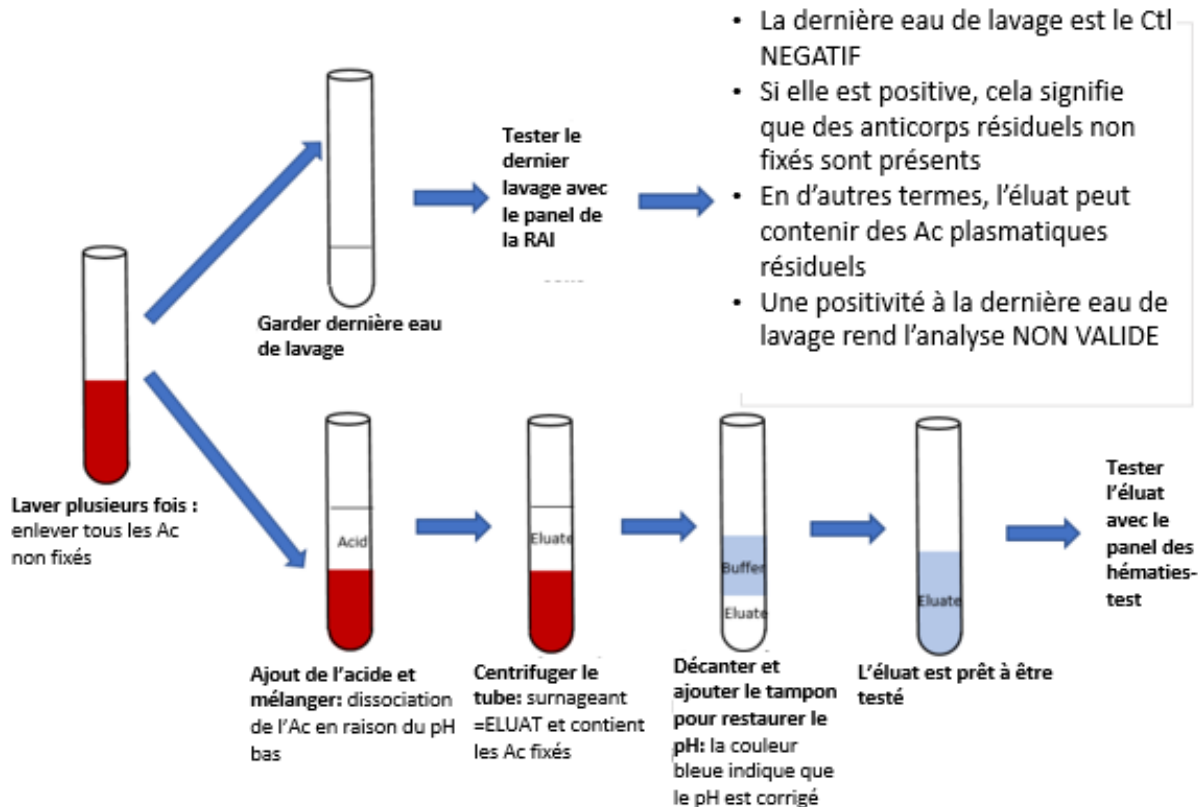
## Méthodes:

- Physiques: chaleur à 56°C, congélation-décongélation
- Chimiques: diminution du pH, solvants organiques comme le chloroforme.

Méthode	+	-
<b>Ether, xylène ou chloroforme</b>	• Très bons résultats	• Dangereux
<b>Acides</b>	• Très bons résultats	• L'acide doit être neutralisé
<b>Chaleur</b>	• Très bonne méthode pour les IgM	• Pas adapté aux IgG

# L'éluotion à l'acide

- Le lavage permet d'enlever les anticorps non fixés. Cela garantit que l'anticorps retrouvé dans l'éluat était fixé de façon spécifique sur le GR.
- Contrôle pour la qualité de l'éluotion: Garder la dernière eau de lavage, à tester en cas d'éluotion positive montrant un allo-anticorps également présent dans le plasma. Si la dernière eau de lavage est positive, le résultat de l'éluotion n'est pas valide



# L'éluotion

Résultat élution	Situation clinique
négative	<ul style="list-style-type: none"><li>• Médicaments</li><li>• IgG non spécifique (hypergammaglobulinémie, myélome) ou IgG de faible affinité</li><li>• Ac contre un Ag de basse fréquence</li></ul>
panréactive	<ul style="list-style-type: none"><li>• Autoanticorps chauds</li></ul>
Anticorps avec spécificité	<ul style="list-style-type: none"><li>• Alloanticorps lors de MHP, réaction transfusionnelle</li><li>• Autoanticorps avec pseudo spécificité</li></ul>

Un TDA de type IgG +/- C3d associé à une élution négative, sont plus souvent observée lors de:

- fixation non spécifique d'anticorps, réactions croisées ou activation de complément (lors de : hypergammaglobulinémie, myélome, maladies hépatiques, infections, néoplasie, lupus systémique, syndrome des antiphospholipides, maladies rénales, complexes immuns circulants, médicaments, IVIG et sérum anti-lymphocytaire, thalassémie, drépanocytose)
- anticorps de faible affinité,
- Anticorps dirigé contre un antigène privé ( tester éluat avec CE)
- hémolyse médicamenteuse.
- Le prélèvement sur sang de cordon peut également amener à un résultat faussement positif en raison de la gelée de Wharton.-> lavage des hématies

# L'élu­tion

La performance de l'élu­tion pour l'identification d'anticorps fixés est meilleure que le TDA standard et est voisine de celle de méthodes très sensibles comme le TDA par cytométrie de flux. Ces 2 dernières techniques peuvent déceler une faible proportion de GR sensibilisés. Cependant leur sensibilité peut varier de cas en cas.

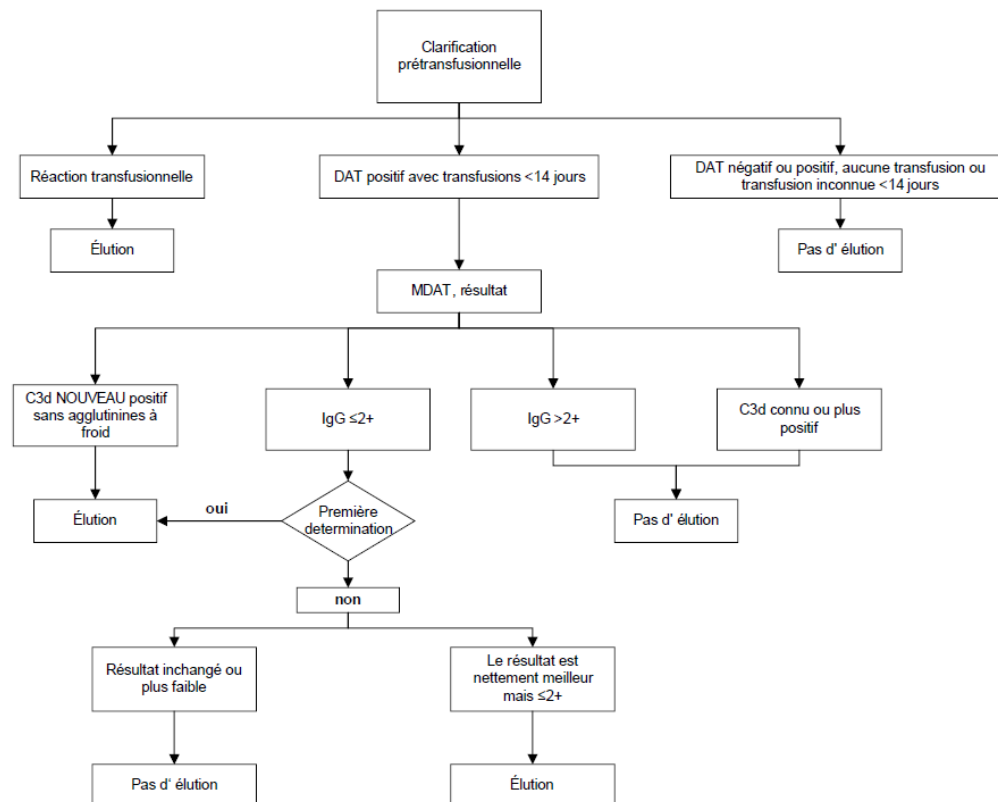
**Table 1. Minimum proportion of antibody-coated RBCs in non-sensitized RBCs that gave a positive test result.**

	<i>Direct antiglobulin test</i>	<i>Antibody detection in eluate</i>	<i>Flow cytometry</i>
Autoantibody (1)	> 10%	5%	1%
Autoantibody (2)	> 10%	10%	1%
Autoantibody (3)	> 10%	2.5%	1%
Autoantibody (4)	10%	1%	1%
Autoantibody (5)	> 10%	0.5%	1%
Anti-D (1)	> 10%	1%	5%
Anti-D (2)	> 10%	1%	2.5%
Anti-D (3)	10%	1%	1%
Anti-E	> 10%	2.5%	5%
Anti-K	> 10%	1%	1%

# Indication à l'éluotion

- Réaction transfusionnelle hémolytique même si TDA nég
- Hémolyse non expliquée, même si TDA nég
- TDA positif nouveau, d'intensité faible, associé à une transfusion récente
- Maladie hémolytique périnatale
- TDA pos IgG  $\geq 2+$  chez nouveau-né

Illustration 5.4.2



## Elution ABO

- greffe d'organe ou CSH, ABO non identique
- hémolyse sur concentré plaquettaire
- hémolyse sur traitement d'immunoglobulines intraveineuses (patient de groupe A)
- réaction transfusionnelle chez patient avec un anti-A1 nouveau

# Résultats d'élu­tion

1

	Rh					Kell		Duffy		Kidd		MNS				Results	
	D	C	E	c	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	M	N	S	s	Plasma LISS IAT	Eluate PEG IAT
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2+	3+
2	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	2+	3+
3	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	2+	3+
4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	2+	3+
5	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	2+	3+
6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	2+	3+
7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	2+	3+
8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	2+	3+
9	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	2+	3+
10	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	2+	3+
11	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	2+	3+

IAT et élu­tion panréactifs  
**AutoAc chauds**

2

	Rh					Kell		Duffy		Kidd		MNS				Results	
	D	C	E	c	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	M	N	S	s	Plasma PEG IAT	Eluate PEG IAT
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
2	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	0
3	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0
4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0
5	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0
6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0
8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0
9	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	0
10	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0
11	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0

IAT et élu­tion négatifs  
**Hémolyse médicamenteuse**

3

	Rh					Kell		Duffy		Kidd		MNS				Results	
	D	C	E	c	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	M	N	S	s	Plasma PEG IAT	Eluate PEG IAT
1	+	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
2	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	2+
3	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0
4	+	0	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0
5	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0
6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	2+
8	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0
9	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	0	0
10	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0
11	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	2+

IAT negative et anti-K (KEL1) fixé  
**Alloimmunisation (réaction TS, MHP....)**

# Données internationales

La valeur d'une élution en transfusion est sa capacité à identifier un alloanticorps cliniquement significatif fixé sur les hématies mais non décelable dans le plasma.

La performance de l'élution est difficile à comparer dans notre pays et au niveau international car n'est pas réalisée dans les mêmes situations

Auteur	Année	DAT pos	Élution	Élution informative*
Huh	1985	515 DAT pos suite à autoCtl pos sur 14'548 tubes	114 nég 18 pan-agglutination 52 anti-ABO 5 Ac spécifiques 5 réactions non spécifiques	0
Stec	1986	638 DAT pos suite à autoCtl pos	401 nég 154 pan-agglutination 60 : anti-ABO passifs 23 : Ac	4 <b>(0.6%)</b>
Domen	1986	122 DAT pos	83 nég 35 pan-agglutination 2 Ac	1 <b>(0.8%)</b> dont un anti-A et un non conclusif(?)
Judd	1986	778 DAT pos chez patients transfusés < 14j	518 nég 192 pan-agglutination 16 Ac passifs 52 alloAc	6 <b>(0.7%)</b> dont 2 anti-K, 3 anti-Jka et un anti-Lua.
Yazer	2009	648 DAT pos	244 nég 284 pan-agglutination 30 anti-ABO 90 Ac	2 <b>(0.9%)</b> dont un anti-E et un anti-D (DAT + microscope)
Geisen	2017	29'942 DAT pos sur 159'719 tubes. Patients transfusés < 28j	2866 élutions selon algorithme ( <b>pas d'élution si C3d+ seul</b> )	40 <b>(1.4%)</b> dont 14 anti-E et 11 anti-Jka. (98% DAT IgG ≤ 2+ et 81% TS ≤ 14j)

# En Suisse

Centre	Année	DAT pos	Élution	Élution informative*
Inselspital	2015	1357	1100 nég, 200 pan-agglutination, 20 ABO, 37 Ac	5 (0.4%) dont un anti-C, un anti-E, un anti-Fya et 2 anti-Jka (DAT IgG +/- à 2+)
USZ	2017	797	747 nég, 40 non spécifiques, 3 auto Ac, 2 alloAc	0
UMT CHUV	2019	421	244 élutions	0
IRB BERN	2022	498	142 nég, 36 non spécifiques, 7 AlloAc, 4 Rhophylac, 8 ABO	2 (1%) dont un anti-E et un anti-S (2)
UMT CHUV	2022	1115	252 nég, 21 AlloAc, 5 Rhophylac	1 anti-K (0.3%)
ICH (HVS + HRC)	2022	1783	104 nég, 9 AlloAc	2x anti-E (1.7%)
ZHBSD	2022	819	446 nég, 11 AlloAc	0
ZH Triemli	2022	801	26 nég, 2 AlloAc	0
SRTS TI	2022	1603	689 nég, 102 non spécifiques, 1 Rophylac, 14 ABO, 13 AlloAc	0
BSD Ostschweiz	2022	335	167 nég, 1 non spécifique, 1 Rophylac, 2 AlloAc	0
Inselspital	2022	186	132 nég, 6 non spécifiques	0
Kantonspital Luzern	2022	1930	213 nég, 39 non spécifiques, 1 Rhophylac, 1 ABO, 1 AlloAc	0
HUG	2022	1803	421 nég, 70 non spécifiques, 4 ABO, 14 AlloAc	1x anti-C (0.2%)
BSD SRK beider Basel	2022	842	317 nég, 29 non spécifiques, 36 ABO, 1 AlloAc	0
Admed(JU)	2022	153	101 nég, 44 non spécifiques, 3 AlloAc	0
<b>TOTAL</b>		<b>14443 (40% sont élués)</b>	<b>5889 élutions (14% positives)</b>	<b>11 (0.2%) -&gt; 1 élution sur 500</b>



# Les hémolyses médicamenteuses



- Rare : 1 sur 1 million
- > 140 médicaments en cause
- Hémolyse souvent sévère, intravasculaire
- Peut entraîner le décès du patient
- Mécanisme non complètement élucidé.  
Plusieurs hypothèses différentes (haptène, néoépitope, adsorption non immunologique, autoAc).

Médicament	nombre	%
Cefotetan	36 (4)	43
Ceftriaxone	17 (5)	21
Piperacilline	14(1)	17
B-lactamase inhibiteurs	6	7
Autres céphalosporines	11	
Autres	9	11
<b>total</b>	<b>83 (10)</b>	<b>100</b>

## ANTICORPS ANTI-MÉDICAMENTS (AAM)

### Dépendants

=> nécessitent la présence du médicament dans le mélange réactionnel

Réactifs contre les GR traités par le médicament

« médicament adsorbé »

ex: Ac anti-pénicilline et certaines céphalosporines

Réactifs contre les GR natifs en présence d'une solution de médicament

« complexe immun »

ex: Acs anti-ceftriaxone, quinine

### Indépendants

=> ne nécessitent pas la présence du médicament dans le mélange réactionnel

- « vrais » auto-anticorps (IgG)

- ne peuvent être différenciés des auto-Ac des AHAI idiopathiques

mécanisme « auto-immun »

ex: auto-anticorps induits par méthylidopa, fludarabine

# Les hémolyses médicamenteuses



- Présentation initiale peut ressembler à AutoAc chauds, froids, réaction transfusionnelle
- TDA positif. RAI positif si médicament toujours présent dans le plasma ou
- Mais aussi résultats atypiques ( ressemble à alloAc ou à réaction non spécifiques

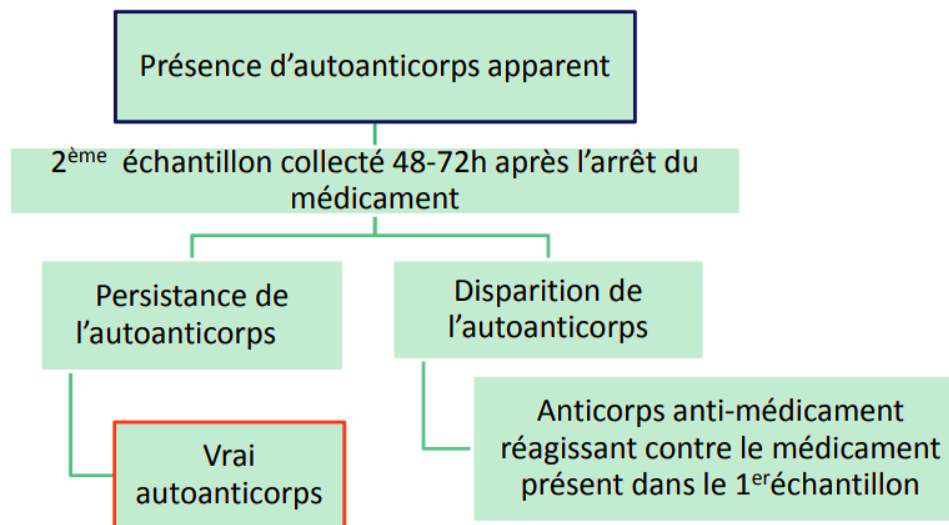
<b>TDA</b>			
Poly	3-4+		
Anti-IgG	3-4+		
Anti-C3d	0-3+		
<b>RAI</b>	<b>IS</b>	<b>37°C</b>	<b>TIA</b>
I	0	0	0-4+
II	0	0	0-4+
III	0	0	0-4+
<b>Élution</b>	<b>TIA</b>		
I	0-1+		
II	0-1+		
III	0-1+		

# Les hémolyses médicamenteuses



- Différence entre Ac médicaments-AutoAc chauds

	Médicaments	AutoAc chauds
Élution	Négative /faible pos	Fort pos
RAI	Positive <b>transitoire</b>	Positive persistante

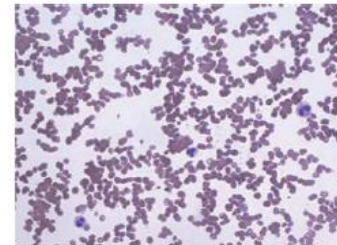


- La corrélation temporelle entre traitement et hémolyse ainsi qu'une exposition antérieure est un élément essentiel du diagnostic.
- Des tests spécialisés (laboratoire de référence international) en présence du médicament ou de son métabolite permettent de confirmer le diagnostic mais sont rarement réalisés.

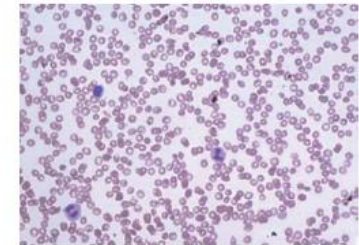
# A propos d'un cas



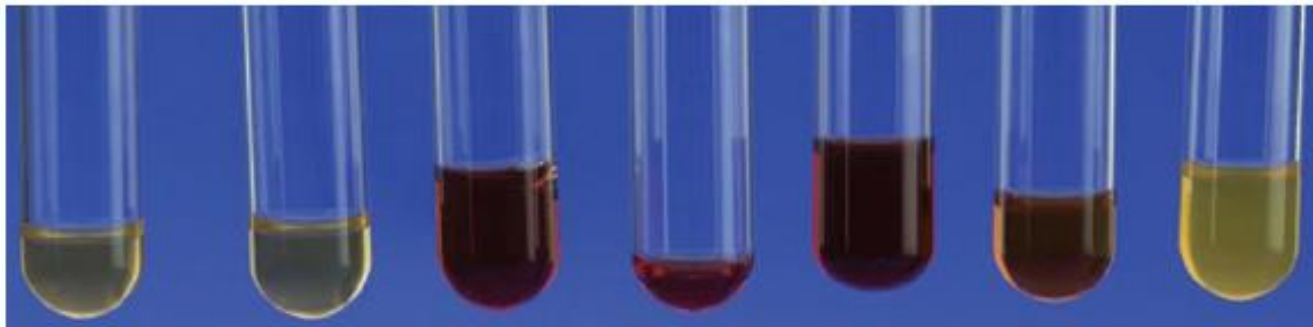
- Enfant de 7 ans, traité pour une maladie hématologique
- Hospitalisé pour état fébrile
- Mis sous traitement antibiotique (amikacine, ceftriaxone)
- Il développe rapidement après la prise du médicament des douleurs abdominales et lombaires avec vomissement, des urines foncées, une hypotension
- Chute de l'Hb de 117 à 44 g/l en quelques heures
- Signes d'hémolyse avec LDH à 1700 U/l
- TDA positif de type C3d +++ avec élution négative,
- Ac anti-ceftriaxone à un titre élevé dans le plasmas, disparition au Jour 5



Day 2



Day 5



One week  
prior

Day 1  
1PM

Day 1  
9 PM

Day 2

Day 3

Day 4

Day 5

# Conclusion

- Le TDA qui a été mis au point il y a plus de 70 ans, reste un élément essentiel dans le domaine de la transfusion et du diagnostic des hémolyses
- Un résultat de TDA nécessite toujours d'être corrélé à la situation clinique car il n'est pas capable de prédire la présence ou la sévérité d'une hémolyse. La valeur prédictive du TDA n'est donc solide que si elle est corrélée à une hémolyse.
- La survenue d'un TDA positif d'intensité faible dans les 14 jours après transfusion doit faire rechercher une alloimmunisation
- En cas d'hémolyse post-transfusionnelle, une élution est préconisée à la recherche d'une alloimmunisation même si le TDA est négatif

**MERCI POUR VOTRE ATTENTION !**

