

TEST DE COOMBS DIRECT : ETUDE COMPARATIVE DE LA SENSIBILITE ENTRE LA TECHNIQUE EN GEL DIAMED ET LA TECHNIQUE EN TUBE

H. Elleuch ^{1,2}, H. Mnif ^{1,2}, S. Sellami ², H. Rekik ^{1,2}, J. Gargouri ^{1,2}.

1- CRTS Sfax.

2- 99/UR/08-33 Laboratoire d'Hématologie, Faculté de Médecine de Sfax.

Résumé :

Le Test de Coombs Direct est une réaction clé en immuno-hématologie. Ainsi, la sensibilité de la technique est primordiale. Notre étude était de comparer la sensibilité de 2 techniques : le tube et le gel. Pour cela, nous avons sensibilisé des hématies de phénotypes connus par des Ac de type IgG (séparément Anti-D, anti-E, anti-K et anti-Fya), par des Ac fixant le complément (séparément anti-Jka et anti-Lea) ou par des fractions du complément (sucrose trypsine, sucrose sérum AB) selon les techniques de références décrites par Rouger et Salmon. Sur chaque hématie sensibilisée, nous avons effectué un test de coombs direct spécifique IgG ou complément, selon les cas, en tube et en gel.

Une étude préliminaire a été effectuée sur chacun des sérums-tests utilisés pour définir la dernière dilution donnant, en tube, une réaction d'agglutination d'intensité une croix. Chacune de ces dilutions a, ensuite, été considérée comme dilution de départ pour notre étude, à partir de laquelle nous avons réalisé des dilutions croissantes (1/2 en 1/2) en eau physiologique.

Les résultats montrent une plus grande sensibilité du gel par rapport au tube dans les coombs directs type IgG (1à2 dilutions) et une moins grande sensibilité du gel par rapport au tube pour les coombs directs type complément. Ce qui incite les utilisateurs à associer les 2 techniques surtout lorsqu'il s'agit d'une étude d'une anémie hémolytique auto-immune.

Mots clés : coombs direct, gel-test, sensibilité

1/ INTRODUCTION

Réaction clé en immuno-hématologie, le test de Coombs direct (TCD) ou test direct à l'antiglobuline est une épreuve globulaire qui met en évidence une sensibilisation des hématies in vivo par des anticorps (Ac) non agglutinants (IgG, IgA) et/ou du complément. C'est un test important en pathologie médicale (anémie hémolytique auto-immune ou allo-immune par incompatibilité foeto-maternelle ou transfusionnelle). Ainsi, la sensibilité de la technique est majeure.

Comme support de réaction, la technique de référence utilise le tube à hémolyse. Plus récemment, un nouveau support à base de gel a été mis en place avec, pour principal objectif, la standardisation de la sensibilité de la technique. Notre étude s'est donnée pour objectif la comparaison de la sensibilité des 2 techniques.

2/ MATERIEL ET METHODES

2-1- Matériel :

2-1-1- Globules rouges : nous avons

choisi :

* Des hématies de phénotype connu dans les systèmes Rhésus, Kell, Duffy :

hématie H₁ (D+ (DccEe)), hématie H₂(E+ (DccEe)), hématie H₃ (K+k-) et hématie H₄ (Fya+ b-). Il s'agit d'hématies de donneurs de panel prélevées sur EDTA. Ces hématies ont été utilisées dans l'exécution des TCD type IgG.

* Des hématies de phénotype connu dans les systèmes Kidd et Lewis : hématie H₅ (Jka+ b+) et hématie H₆ (Lea+ b-)

* Un pool d'hématies (ABO) : hématie H₇(A-B-O). Il s'agit d'hématies de donneurs de panel (H₅-H₆) et d'hématies de groupe sanguin A, B et O (H₇) prélevées sur EDTA. Ces hématies (H₅-H₆ et H₇) ont été utilisées dans l'exécution des TCD type complément ("C").

2-1-2- Sérums-tests : Pour être certain de la bonne sensibilisation de nos hématies étudiées par des Ac de type IgG ou par des Ac fixant le "C" ou par des fractions de "C", nous avons utilisé séparément des Ac de spécificité connue :

* Anti-D, anti-E, anti-K, anti-Fya pour l'exécution de TCD type IgG

* Anti-Jka, anti-Lea et sucrose trypsine, sucrose sérum AB pour l'exécution de TCD type "C".

L'ensemble des anti-sérums et des antiglobulines utilisées étaient de marque BIORAD. Les antiglobulines utilisées étaient spécifiques de la protéine utilisée pour la sensibilisation des hématies (anti-IgG ou anti-Complément).

2-2- Méthodes :

2-2-1- Schéma général de l'étude de sensibilité :

Nous avons procédé à une sensibilisation séparée :
 - Des hématies H₁, H₂, H₃ et H₄, respectivement par les sérums anti-D, anti-E, anti-K, anti-Fya (type IgG). Sur chaque hématie sensibilisée, nous avons effectué des TCD spécifiques IgG en tube et en gel.
 - Des hématies H₅ et H₆, respectivement par les sérums anti-Jka et anti-Lea fixant le "C" (sérum AB) et de l'hémaite H₇ fixant la fraction C3b du "C" convertie en C3d par la trypsine et le sérum AB. Sur chaque hématie sensibilisée, nous avons effectué des TCD spécifiques "C" en tube et en gel.

2-2-2-Etapes de sensibilisation des hématies :

La sensibilisation des hématies par des Ac de type IgG ou par des Ac fixant le complément ou par des fractions de celui-ci (C3b, C₃d*) a été faite selon les techniques de référence décrites par Rouger et Salmon (1).

2-2-3- Technique du TCD en tube :

Le TCD en tube a été réalisé selon la technique de référence qui donne une positivité de 0 à 3+ (1).

* par conversion trypsinique ou par sérum AB

2-2-4- Technique du TCD en gel :

Le TCD en gel a été réalisé selon et grâce aux cartes en gel Diamed (2). Selon cette technique la positivité va de 0 à 4+.

2-2-5- Etude préliminaire :

Une étude préliminaire a été effectuée sur chacun des sérums pour définir la dernière dilution donnant, en tube, une réaction d'agglutination d'intensité une croix. Cette étude a montré les résultats résumés dans les tableaux I et II.

Tableau I : Dilutions de départ des sérums type IgG

Sérums	Anti-D	Anti-E	Anti-K	Anti-Fya
Dilution de départ	1/100	1/4	1/256	1/32

Tableau II : Dilutions de départ des sérums anti-Jka et anti-Lea fixant le "C"

Sérums	Anti-Jka	Anti-Lea
Dilution de départ	pur	1/2

Chacune de ces dilutions a été considérée comme dilution de départ pour notre étude ("pur"), à partir

de laquelle nous avons réalisé des dilutions croissantes de demi en demi en eau physiologique.

3/ RESULTATS

L'étude comparative de la sensibilité du test de Coombs direct en tube et en gel a donné les résultats résumés dans les tableaux III, IV et V.

Tableau III : TCD type IgG sur les hématies sensibilisées par les dilutions des Ac anti-D, anti-E, anti-K, anti-Fya.

Dilutions	Technique en tube				Technique en gel				
	Pur	1/2	1/4	1/8	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16
H1 (anti(D))	+	-	-	-	+++	++	+	-	-
H2 (anti-E)	+	(+)	-	-	++	+	-	-	-
H3 (anti-K)	+	-	-	-	+++	++	+	-	-
H4 (anti-Fya)	+	(+)	-	-	+++	+++	++	+	-

Tableau IV : TCD type "C" sur les hématies sensibilisées par les dilutions des Ac anti-Jka et anti-Lea fixant le "C".

Dilutions	Technique en tube				Technique en gel				
	Pur	1/2	1/4	1/8	Pur	1/2	1/4	1/8	1/16
H5 (anti-Jka)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H6 (anti-Lea)	+	+	-	-	+	-	-	-	-

Tableau V : TCD type "C" sur l'hématie sensibilisée par la fraction du C3d du "C".

	Technique en tube	Technique en gel
H7 (Conversion trypsinique)	+	-
H7(Conversion par le sérum AB)	+	-

4/ DISCUSSION

Le TCD est un test immuno-hématologique de première importance. Il est incontournable pour démontrer la sensibilisation des hématies, in vivo, par des Ac et/ou du complément. Il est donc fondamental pour le diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes (3) ou allo-immunes par incompatibilité foeto-maternelle (4) ou par incompatibilité transfusionnelle (5). L'importance d'un diagnostic rapide et précis exige une sensibilité optimale de la technique utilisée.

Notre étude a ainsi consisté en une comparaison de la sensibilité de 2 supports de réaction : tube et gel. Pour cela, nous avons sensibilisé des hématies par

des Ac de type IgG (séparément anti-D, anti-E, anti-K et anti-Fya), par des Ac fixant le "C" (anti-Jka et anti-Lea) et par du "C". Les résultats de cette étude comparative permettent plusieurs réflexions :

- concernant le TCD type IgG, la technique en gel est plus sensible que celle en tube avec un écart allant de une à deux dilutions et une plus grande intensité d'agglutination.
- concernant le TCD type "C", la technique en tube semble plus sensible que celle en gel. Une étude complémentaire serait nécessaire pour confirmer cette donnée. Elle consistera en une étude préliminaire inverse par rapport à celle de la présente étude, c'est à dire axée sur le support en gel pour définir la dernière dilution donnant une réaction d'agglutination d'intensité une croix. La suite se fera selon le schéma détaillé dans le chapitre méthodes.

D'un autre coté, ces résultats mettent l'accent sur l'existence d'une différence de performance du gel entre les recherches d'agglutinines irrégulières et le TCD (6, 7, 8). D' ailleurs, Y. Lapierre qui a décrit, le premier, le support en gel a bien précisé que ce dernier est plus sensible que le support en tube dans les RAI alors que, pour le TCD, il a juste indiqué que le gel le simplifiait (6).

En définitive, l'association des deux techniques est recommandée pour assurer la meilleure sensibilité, surtout dans les cas d'AHAI où la sensibilisation par des Ac et/ou du "C" est possible. Il faut,

toutefois, rappeler que même si les 2 supports nécessitent le même temps de réaction (<15 mn), le gel permet de garder une trace de la réaction, mais reste nettement plus onéreux. Le choix de chaque laboratoire restera, bien entendu, tributaire de ses moyens financiers.

Références :

- 1-Rouger Ph, Salmon Ch.; La pratique de l'agglutination des érythrocytes et du test de coombs. Paris, Masson éditeurs, 1981, 101p.
- 2 - Diamed AG. ; Microtyping system-AG, 1785 cressier sur Morat Suisse.
- 3 - Gautier E, Homberg JC.; Anémies hémolytiques auto-immunes. In Najman et coll. Hématologie, tome I, Paris, Ellipses 1994, 391-406.
- 4 - Huchet J. Allo-immunisation foeto-maternelle et maladie hémolytique périnatale. In Najman et coll. Hématologie, tome I, Paris, Ellipses 1994, 407-417.
- 5- Salmon Ch, Jullien AM. La transfusion sanguine homologue. In Najman et coll. Hématologie, tome II, Paris, Ellipses 1994, 626-672.
- 6- Lapierre Y. Le gel-test : un nouveau procédé en immuno-hématologie. Spectra Biologie, 1989, 89/4, 38-42.
- 7- Reis KJ. Chachowski, R., Cupido A., Davies D., Jakway J., Setcavage TM. Column agglutination technology: the antiglobulin test. Transfusion 1993, 33/8 : 639-643.
- 8- Lassale B., Fourgnaud-Gaillard S., Malinvaud G. Recherche et identification d'anticorps irréguliers: place de la technique en gel Diamed par rapport à la technique de référence. Revue française des laboratoires, novembre 1992, N° 245 : 19-22.

