

# INTERET DE LA TRYPSINE DANS LA RECHERCHE D'AGGLUTININES IRREGULIERES

## THE INTEREST OF THE TRYPSINE IN THE SEARCH FOR IRREGULAR AGGLUTININS

T. REKIK<sup>1,2,\*</sup>, I. BEN AMOR<sup>1,2</sup>, H. MENIF<sup>1,2</sup> ET J.GARGOURI<sup>1,2</sup>

1 : Centre Régional de Transfusion Sanguine de Sfax , Université de Sfax - Tunisie

2: Faculté de médecine, Université de Sfax-Tunisie

\*e-mail de l'auteur correspondant : taicir.loukil@gmail.com

### Résumé

La recherche d'agglutinines irrégulières (RAI) est un examen clé de l'immunohématologie permettant de dépister et identifier les anticorps (Ac) dirigés contre les antigènes (Ag) des groupes sanguins érythrocytaires autres que ceux du système ABO. Depuis l'avènement du support réactionnel en filtration (cartes en gel), la combinaison de la technique en Coombs indirect (CI) BFI à la technique enzymatique est, désormais, réservée aux rares cas de difficulté d'identification d'Ac. Notre étude a consisté à comparer les résultats des RAI en CI-BFI avec ceux des RAI en CI-BFI trypsiné. D'un point de vue pratique, l'association du TCI-enzymatique au TCI-BFI en support filtration trouve bien sa place en cas de mélange complexe d'Ac afin d'identifier les spécificités de ces Ac et d'adapter la thérapeutique transfusionnelle. Cette association peut également être utile pour dépister les Ac anti-Kidd, particulièrement dans un contexte d'accident hémolytique transfusionnel avec une RAI en TCI-BFI négative.

**Mots clés:** Trypsine; RAI; Polytransfusés ; Test indirect à l'antiglobuline.

### Abstract

Erythrocyte antibody screening is an essential biological analysis to detect and identify antibodies (Ab) against red cells antigens (Ag) other than those of the ABO system. The combination of indirect antiglobulin test-low ionic strength solution (IC/LISS) with the enzymatic technique is reserved for difficulties of Ab identification. Our study compared the results of IC/LISS with the enzymatic technique for 31 multi-transfused patients. In practice, the association of IC/LISS with the enzymatic technique finds is indicated in case of complex mixture of Ab in order to identify the specificities of those Ab and to adapt the transfusion. This association can also be useful to detect anti-Kidd, particularly in a context of a transfusional hemolytic accident with a negative erythrocyte antibody screening with IC/LISS.

**Key words:** Trypsine; RAI; Muli-transfused patients; Indirect antiglobulin test.

### ملخص

البحث عن الاجسام المضادة غير النظامي هو تحليل بيولوجي اساسي لكشف الاجسام المضادة ضد المستضدات بالدم بخلاف نظام أ،ب،او. استعمال تقنية الانزيمية (تربسين) مخصص لبعض حالات صعوبة تحديد الاجسام المضادة. في هذا الإطار قمنا في هذه الدراسة بمقارنة نتائج البحث عن الاجسام المضادة غير النظامي بتقنية الكومبس غير المباشر في محلول منخفض القوة الايونية بدون وباستعمال التربسين عند 31 مريض تلقوا عدة عمليات نقل الدم. من وجهة النظر العملية، جمع تقنية الانزيمية بتقنية الكومبس غير المباشر في محلول منخفض القوة الايوني يرى افادته جيدا في حالة اختلاط الاجسام المضادة لتحديد خصائص تلك المضادات وتكييف نقل الدم. وهذا الارتباط يمكن ان تكون مفيدة ايضا للكشف عن المضاد Kidd، ولا سيما في سياق حادث انحلالى مع عدم وجود للاجسام المضادة غير النظامية بتقنية الكومبس غير المباشر في محلول منخفض القوة الايوني.

**الكلمات المفاتيح:** التربيسين ; البحث عن الاجسام المضادة غير النظامي; مرضى تلقوا عمليات نقل الدم; الكومبس غير المباشر.

## INTRODUCTION

Le risque immuno-hémolytique des transfusions sanguines, présent pour toute transfusion, est particulièrement élevé en hématologie de par les nombreuses pathologies nécessitant un support transfusionnel et, pour certaines, du caractère répété des transfusions. Ces caractéristiques exposent à la survenue d'une allo-immunisation plus fréquente et parfois plus complexe que dans d'autres domaines de la médecine. C'est ainsi que la recherche des anticorps irréguliers anti-érythrocytaires (RAI) occupe une place de choix dans la panoplie des analyses immunohématologiques visant à assurer la sécurité transfusionnelle [1]. Elle permet de dépister et d'identifier les anticorps (Ac) dirigés contre les antigènes (Ag) des groupes sanguins érythrocytaires autres que ceux du système ABO. La mise en évidence de ces Ac, dont certains pourraient engendrer des accidents hémolytiques graves, permettra d'assurer et de maintenir la compatibilité immunologique entre le patient et les produits sanguins tout au long du processus transfusionnel.

L'avènement du support réactionnel en filtration (cartes en gel) ainsi que l'utilisation de la solution de basse force ionique (BFI) ont permis de simplifier les étapes techniques de la RAI et d'augmenter la sensibilité de la détection des Ac et, par conséquent, d'améliorer la sécurité immuno-hématologique des transfusions.

La combinaison de la technique en Coombs indirect (TCI) BFI à une technique enzymatique, autrefois recommandée pour améliorer la sécurité transfusionnelle, est désormais réservée à la résolution des difficultés d'identification d'Ac, pouvant être inhérentes à une association complexe d'Ac ou à un Ac perfide difficilement mis en évidence par les techniques standards.

Ainsi, pour mieux cerner la contribution de la technique enzymatique par la trypsine dans la détection des Ac anti-érythrocytaires, nous avons étudié la sensibilité de cette technique par comparaison au TCI-BFI.

## MATERIEL ET METHODES

Notre étude a comporté deux parties. Dans un premier temps, nous avons pratiqué la RAI chez 31 patients hospitalisés et transfusés au service d'Hématologie Clinique de l'hôpital Hédi Chaker de Sfax. Les échantillons étudiés (sérum ou plasma) ont été recueillis à l'occasion d'une nouvelle demande de produits sanguins labiles

(tube destiné au cross match) et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans la sérothèque «RAI des polytransfusés». Dans un second temps, nous avons comparé les résultats des TCI-BFI et TCI-BFI trypsiné de différentes dilutions de deux sérums-tests: anti-Jka et anti-Jkb. Les dilutions ont été faites en cascade, de raison 2, dans du sérum physiologique. Les deux hématies testées étaient homozygotes, respectivement, pour les Ag Jka et Jkb.

La RAI a été effectuée au moyen d'un panel d'hématies-test de groupe sanguin O et de constitution phénotypique définie par la réglementation et permettant la détection des Ac correspondant aux Ag D, C, c, E, e, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb, M, N, S, s, Lea, Leb, P, Lua, Lub [2]. La RAI a été faite en 2 étapes. Une étape de dépistage pour tous les sérums/plasmas permettant de détecter la présence ou l'absence d'Ac anti-érythrocytaires. En cas de dépistage positif, on complète par une étape d'identification de la spécificité du ou des Ac détectés et par un phénotypage érythrocytaire correspondant à (aux) l'Ac identifié(s).

La méthode réglementaire utilisée est le TCI appelé également test indirect à l'antiglobuline [2], qui repose sur la mise en évidence de la sensibilisation *in vitro* des hématies du panel grâce à l'utilisation d'une antiglobuline humaine polyspécifique (anti-IgG + anti-C3d). De plus, tous les sérums/plasmas ont été testés avec des hématies-tests traitées par la trypsine [3]. Les hématies du panel ont été mises en suspension dans une solution de basse force ionique (BFI). Le support réactionnel a été les cartes en gel LISS/Coombs (Diamed).

## RESULTATS

La moyenne d'âge de nos patients a été de 48,7 ans avec des extrêmes de 3 ans et 87 ans. Le sex-ratio a été de 1,38. La répartition des patients selon la pathologie est donnée dans la figure n°1.

La RAI en TCI-BFI a été positive chez 4 polytransfusés (3 hommes et 1 femme) avec identification d'Ac de spécificité anti-E dans 3 cas et anti-K dans 1 cas.

L'étude comparative entre la RAI en TCI-BFI, avec et sans traitement par la trypsine des 31 sérums, a donné les résultats représentés dans le tableau n°I. Après traitement par la trypsine, la RAI a été positive chez 13 patients dont ceux ayant donné des réactions positives en TCI-BFI. Le test de Coombs direct (TCD) pratiqué chez les 9 patients ayant une réaction positive uniquement en technique enzymatique a été négatif.

Les résultats du TCI-BFI avec et sans traitement enzymatique des différentes dilutions des deux sérums-tests anti-Jka et anti- Jkb avec deux hématies du panel de dépistage sont résumés dans les tableaux n° II et III.

Pour les deux sérums-tests étudiés, l'intensité des réactions a été plus élevée après traitement enzymatique de l'hématie du panel avec une dilution d'écart dans les deux cas. Pour les titres faibles (dilution 1/16 pour l'anti-Jka et 1/32 pour l'anti-Jkb), la RAI été positive uniquement en TCI-trypsiné.

## DISCUSSION

Chez les patients polytransfusés, la RAI, faite au bon moment au cours du suivi de transfusions, permet de prévenir les accidents immuno-hémolytiques transfusionnels.

Dans notre étude, la détection d'Ac anti-érythrocytaires par le TCI-BFI versus TCI-BFI trypsiné s'est révélée comparable en termes de sensibilité. En fait, chez les 4 patients pour lesquels nous avons identifié des allo-Ac anti-érythrocytaires en TCI-BFI, les spécificités de ces Ac ont toutes été confirmées par le TCI-BFI trypsiné avec des intensités des réactions au moins similaires à celles du TCI-BFI.

En fait, le TCI-BFI pratiqué sur un support en filtration est une technique sensible et bien standardisée. Avant l'avènement des supports de filtration, une association minimale du TCI-BFI et d'une technique enzymatique a été fortement préconisée pour assurer le maximum de sécurité transfusionnelle [4]. Après l'introduction de ce nouveau support réactionnel, la RAI en TCI-BFI permettrait pratiquement à elle seule de détecter les Ac les plus courants et les plus significatifs en transfusion. En effet, il permet de détecter des allo-Ac de classe IgG mais aussi de classe IgM (anti-Lewis, anti-P1, anti-S). Il est même plus sensible que la technique enzymatique pour la détection des Ac des systèmes Kell, Luthéran et Kidd et permet seul d'identifier les Ac dirigés contre les Ag détruits par les enzymes protéolytiques [5].

Toutefois, il peut être utile, voire indispensable, d'utiliser, en complément du TCI-BFI, une technique enzymatique dans le cadre de difficultés d'identification d'Ac comme les associations complexes d'allo-Ac observées essentiellement chez les polytransfusés qui s'immunisent contre des Ag de plusieurs systèmes de groupe sanguins. C'est le cas des patients atteints de syndrome myélodysplasique, de drépanocytose ou de

thalassémies, pour les quels on a rapporté des taux d'allo-immunisation anti-érythrocytaire de l'ordre de 50 % [6], 4 - 47 % et 20 % respectivement [7,8]. Le traitement enzymatique des hématies-test du panel est une méthode d'agglutination artificielle qui augmente la sensibilité de détection des allo-Ac. En effet, les enzymes réduisent les charges électriques négatives à la surface des hématies, permettant ainsi une diminution de la distance intercellulaire et un rapprochement inter-globulaire, ce qui favorise l'agglutination des hématies par un Ac de type IgG. Ce traitement permet, également, en diminuant l'épaisseur de la couche protéique, une meilleure accessibilité de certains épitopes antigéniques et leur organisation à la surface de l'hématie ainsi qu'une potentialisation des interactions ioniques entre les Ag et leurs Ac [9].

Ainsi, la trypsine augmente l'expression antigénique des Ag des systèmes Rhésus, Lewis, P1 et Kidd (Jk) [5,10].

Une attention particulière est à réserver aux Ac dirigés contre les Ag du système Kidd. Ceux-ci, réputés "perfides et dangereux" peuvent être responsables d'accidents hémolytiques transfusionnels immédiats et parfois gravissimes, mais ils peuvent aussi provoquer des réactions retardées, d'autant que leurs concentration plasmatique chute rapidement, probablement en raison de leur nature IgG3 rendant souvent difficile leur mise en évidence dans les prélèvements pré-transfusionnels [11].

P. Rouger et C. Salmon ont rapporté que l'anti-Jka agglutine fortement les hématies trypsinées en TCI-BFI que celles qui ne sont pas traitées [4]. A cette époque, la RAI se faisait en tube qui est beaucoup moins sensible que le support filtration. Nous avons démontré en testant des dilutions en cascade des Ac anti-Jka et anti-Jkb avec des hématies-test du panel, une plus grande sensibilité de la technique enzymatique par rapport au TCI-BFI avec une seule dilution d'écart. Ceci est particulièrement intéressant pour les fortes dilutions (1/16 pour l'anti-Jka et 1/32 pour l'anti-Jkb) où les Ac ont été uniquement détectés par la technique enzymatique. Ainsi, ce résultat suggère la pertinence de la technique enzymatique pour la détection de ces Ac dont les taux plasmatiques chutent rapidement comme mentionné plus haut.

Aussi, cette combinaison de techniques a l'avantage de pouvoir orienter vers les spécificités d'Ac en cas de mélange complexes d'Ac en se basant, d'une part, sur les différences de réactivité entre les deux techniques et, d'autre part, sur la destruction de

certain Ag par la trypsine; il s'agit des Ag: Fya, S, s, Xga [12].

Autre intérêt de la trypsine est qu'elle détruit les antigènes cibles des Ac anciennement appelés Ac de type HTLA (high titer low avidity). Ces Ac, responsables d'une pan-agglutination des hématies du panel, en TCI, avec une grande hétérogénéité entre les réactions, n'ont que peu d'intérêt transfusionnel. Mais, il faut également mentionner que la trypsine détruit d'autres Ag responsables de pan-agglutination, comme l'Ag Gerbich et l'Ag Lub, lesquelles sont considérés comme potentiellement dangereux en transfusion [5].

Avec la technique enzymatique, il reste cependant le problème de réactions non spécifiques secondaires à la mise à nu de certains Ag cryptiques entraînant des réactions d'auto-agglutination. Ces réactions, qui compliquent parfois l'interprétation du résultat et prolongent le délai de délivrance du résultat, sont sans intérêt transfusionnel. Dans ces cas, c'est la négativité du TCD et de la RAI en TCI qui permettra d'orienter le diagnostic biologique.

## CONCLUSION

D'importantes évolutions dans les techniques d'immuno-hématologie se sont produites au cours de ces dernières décennies, liées à l'introduction de nouveaux procédés de détection des Ac comme le support réactionnel en filtration. Ces évolutions ont largement modifié les pratiques dans les laboratoires d'immuno-hématologie, notamment là où on réalise le suivi des patients polytransfusés, en simplifiant les techniques et en optimisant les seuils de détection des Ac anti-érythrocytaires.

D'un point de vue pratique, l'association du TCI-enzymatique au TCI-BFI en support filtration trouve bien sa place en cas de mélange complexe d'Ac afin d'identifier les spécificités de ces Ac et d'adapter la thérapeutique transfusionnelle. Cette association peut également être utile pour dépister les Ac anti-Kidd, particulièrement dans un contexte d'accident hémolytique transfusionnel avec une RAI en TCI-BFI négative.

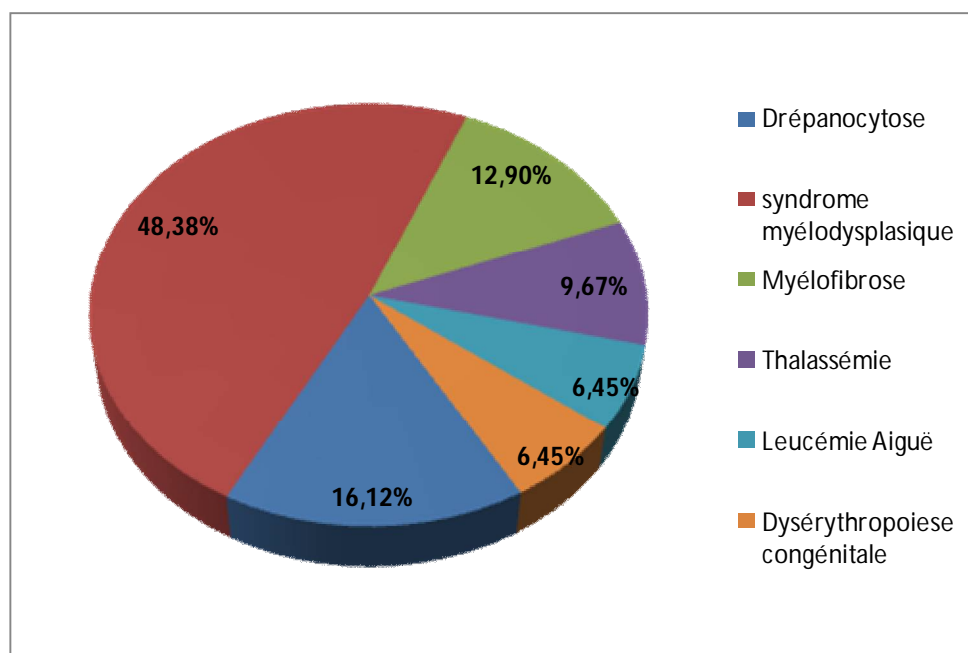


Figure n°1 : Répartition des patients selon la pathologie

**Tableau n°I : Résultats de la RAI chez les polytransfusés étudiés**

N° de l'échantillon	Coombs indirect BFI	Coombs indirect BFI Trypsiné
1	Négatif	Négatif
2	Négatif	Négatif
3	Négatif	Réaction non spécifique
4	Négatif	Négatif
5	Négatif	Négatif
6	Négatif	Réaction non spécifique
7	Anti-E, intensité (2+)	Anti-E, intensité (2+)
8	Négatif	Négatif
9	Négatif	Négatif
10	Négatif	Réaction non spécifique
11	Négatif	Négatif
12	Négatif	Réaction non spécifique
13	Négatif	Négatif
14	Négatif	Négatif
15	Négatif	Réaction non spécifique
16	Négatif	Négatif
17	Négatif	Négatif
18	Négatif	Négatif
19	Négatif	Négatif
20	Négatif	Négatif
21	Négatif	Négatif
22	Négatif	Réaction non spécifique
23	Anti-K, intensité (4+)	Anti-K, intensité (4+)
24	Négatif	Réaction non spécifique
25	Négatif	Réaction non spécifique
26	Anti-E, intensité (4+)	Anti-E, intensité (4+)
27	Négatif	Négatif
28	Négatif	Réaction non spécifique
29	Anti-E, intensité (2+)	Anti-E, intensité (3+)
30	Négatif	Négatif
31	Négatif	Négatif

**Tableau n°II : Résultats du CI-BFI de la dilution du sérum-test anti-Jka avec et sans traitement enzymatique de l'hématie 2 (Jka +/- Jkb-) du panel**

Dilution	CI-BFI	CI-BFI trypsiné
1 2	2+	2+
1 4	2+	2+
1 8	Quelques hématies	1+
1 16	Négatif	Quelques hématies
1 32	Négatif	Négatif

**Tableau n°III : Résultats du CI-BFI de la dilution du sérum-test anti-Jkb avec et sans traitement enzymatique de l'hématie (Jka-/ Jkb+) du panel**

Dilution	CI BFI	CI BFI trypsiné
1 2	2+	3+
1 4	1+	2+
1 8	1+	2+
1 16	Quelques hématies	1+
1 32	Négatif	Quelques hématies
1 64	Négatif	Négatif

**REFERENCES**

- [1]Chabrières C. Recherche des anticorps anti-érythrocytaires. Colloque du SNBH 2005. Spectra biologie n°151. Avril 2006:48.
- [2]Circulaire n° 32/15 du 11 mai 2015 relative à la sécurité transfusionnelle .Ministère de la santé publique de la république tunisienne.
- [3]Beattie K, Crawford M, Martin J, Moungey R, Nance S, McKeever Peoples B. Methods. In: Immunohematology Methods and procedures. USA : American Red Cross. 1993 : 42-43.
- [4]Rouger P, Salmon C. Recherche d'agglutinines irrégulières et tests de compatibilités In : La pratique des allo et auto-anticorps anti-erythrocytes. Paris : Masson 1981 : 55-73.
- [5]Mortelecque R, Mercadier A. Recherche d'anticorps anti érythrocytaires. In : Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. France : Eurotext John Libbey. 2011 : 67-77.
- [6] Novaretti MC, Sopelete CR, Velloso ER, Rosa MF, Dorlhiac Liacer PE, Chamone DA. Immunohematological findings in myelodysplastic syndrome. Acta Haematol. 2001; 105(1): 1-6.
- [7]Mintz PD. Alloimmunization to red blood cell antigens by transfusion. Blood. 2010 May 27; 115(21).
- [8]Ben Amor I, Louati N, Khemekhem H, Dhieb A, Rekik H, Mdhaffar M et al. Immunisation anti-érythrocytaire dans les hémoglobinopathies : à propos de 84 cas. Transfus clin biol .2012 ;19: 345-352.
- [9]Rouger P, Salmon C. La pratique de l'agglutination des érythrocytes et du test de Coombs. France. Edition Masson. 1981 :22-53.
- [10]Rouger P, Hertel F, Andreu G, Carton J, Salmon C. Etude critique du test de Coombs à basse force ionique sa place dans la sécurité immunologique des transfusions. Revue Française de Transfusion et Immuno-Hématologie ; Tome XXIII n°1.1980.
- [11]Janot C, Mannessier L. Immunohématologie et groupes sanguins. Aspects théoriques et applications cliniques transfusionnelles. Bioforma 2002; 26:81-83
- [12]Clavier B, Hadeff R, Ait Mansour C, Janus G, Joussemet M. A propos d'un cas d'allo-immunisation anti-Jk1 non dépisté sur plasma. Transfus clin biol 13(2006); 266-268.