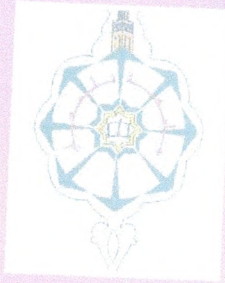
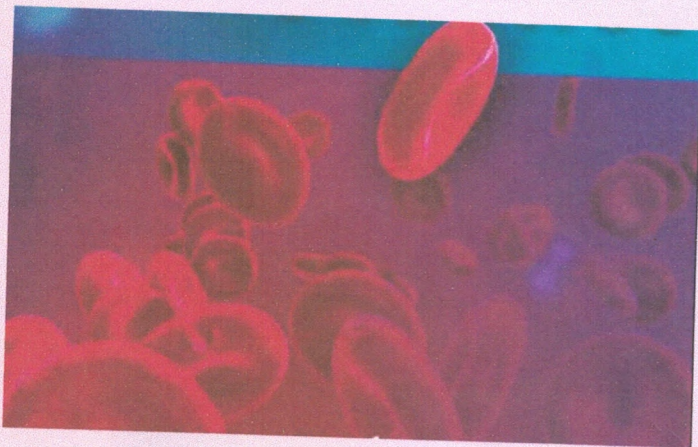


Université Abou-Bekr Belkaid Tlemcen
Faculté de médecine
Département de pharmacie



Mémoire de fin d'étude en Pharmacie
QUALIFICATION BIOLOGIQUE
DU DON DE SANG



Présenté Par :
RAMDAOUI MOURAD
YAHIAOUI HOCINE

Coordination Avec :
Pr. A. GHAFOUR
Médecin chef CTS

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2010 -2011

Bon: 624/616-15-16/01

Remerciements :

En préambule à ce mémoire, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

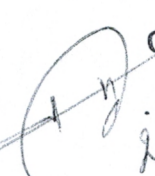
Je tiens à remercier sincèrement Monsieur **A.GHAFFOUR**, qui, en tant que Directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

J'exprime ma gratitude à tous les consultants et internautes rencontrés lors des recherches effectuées et qui ont accepté de répondre à mes questions avec gentillesse.

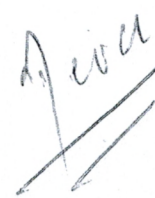
Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience. Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers l'ensemble du personnel du CTS.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes.


GHAFFOUR Abdelkader
DES M en hématologie

*Ramdaoui Mourad
Et
Yahiaoui Hocine*

23 mai 2011


Résumé :

Au cours des dernières décennies, la qualification biologique des dons de sang (QBD) a significativement contribué à l'amélioration de la sécurité transfusionnelle. Cela a été rendu possible grâce à l'évolution des performances des automates et des tests de dépistage utilisés dans les laboratoires de QBD (LQBD). Les évolutions technologiques des tests sérologiques semblent maintenant limitées. Le dépistage génomique viral (DGV) peut encore évoluer par le passage aux tests unitaires ou en pools de tailles réduites à l'aide d'une nouvelle génération d'automates. Dans le domaine de l'immuno-hématologie, peu de changements sont attendus, à l'exception du développement du génotypage moléculaire en puce à ADN. Seuls les secteurs pré- et post-analytiques semblent se préparer à une robotisation à court terme

Abstract:

In the past decades, blood donation screening contributed significantly to blood safety improvement, thanks to the increasing performances of serological and nucleic acid testing (NAT) assays, as well as the evolution of automated systems technology. The rapid pace of NAT development can be clearly seen to extend into the future. NAT for additional viruses as well as the use of new automated systems for individual donation or smaller mini-pool testing, with multiplex assays, is currently debated. However, few added benefit is expected for blood safety from such developments, while cost-effectiveness appears to be poor. The next step in laboratory automation will probably be the implementation of robotic pre- and post-analytical procedures

Mots clés : Qualification biologique ; sérologie ; groupes sanguins ; sécurité transfusionnelle ;

Keywords: Blood donation screening; serology; blood group; blood safety;

- 3 - **DE SANG** - M. Randaoui ; H. Yahaoui

Sommaire

Remerciements.....	1
Résumé.....	2
Sommaire.....	3
1. Introduction.....	5
2. Problématique	6
2.1 Définition.....	6
2.2 Objectifs	6
3. Techniques sérologiques	7
3.1 Objectifs	7
3.2 Agents transmissibles par le sang.....	7
3.2.1 Maladies virales	7
3.2.2 Maladies bactériennes	7
3.2.3 Maladies parasitaires	7
3.3 Différentes techniques	8
3.3.1 Tests de dépistage	8
3.3.1.1 Techniques classiques	8
3.3.1.1.1 Test ELISA	8
3.3.1.1.1.1 Principe	8
3.3.1.1.1.2 Avantage.....	9
3.3.1.1.1.3 Applications	9
3.3.1.1.1.4 Différentes variantes	10
3.3.1.1.1.5 Automatisation	12
3.3.1.1.2 Radio immunologique.....	12
3.3.1.1.3 Techniques d'agglutination	13
3.3.1.1.3.1 Principe	13
3.3.1.1.3.2 Les paramètres influents.....	14
3.3.1.1.3.3 Les différentes catégories	15
3.3.1.1.4 Tests rapides et spécifiques – bandelettes.....	18
3.3.1.1.4.1 Test rapide de détection de VIH... 18	
3.3.1.1.5 Choix des tests sensibilité et spécificité.....	19
3.3.1.2 Techniques actuelles	20
3.3.1.2.1 DGV ou PCR	20
3.3.2 Tests de confirmation	22
3.3.2.1 Western-blot.....	22
3.3.2.2 Immuno-blot.....	24
3.4 Interprétation des résultats.....	24
4. Techniques en immuno-hématologie.....	26
4.1 Objectifs	26
4.2 Groupes sanguins et systèmes immunogènes.....	26
4.2.1 Système ABO	26
4.3 Techniques classiques.....	29
4.3.1 Groupage ABO Rhésus	29
4.3.1.1 Procédure de Beth-vincent	30

- 4.3.1.2 Procédure de Simonin..... 31
- 4.3.1.3 Détermination de Rhésus-standard 31
- 4.3.2 Phénotype Rhésus Kell..... 32
- 4.3.3 Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires 33
 - 4.3.3.1 Principe..... 33
 - 4.3.3.2 Indication..... 34
 - 4.3.3.3 Les différents anticorps anti-érythrocytaires..... 35
 - 4.3.3.4 La réaction d'agglutination..... 35
 - 4.3.3.5 Modalités pratiques 36
 - 4.3.3.5.1 Les différents procédés 37
 - 4.3.3.5.2 La réalisation de la RAI..... 37
 - 4.3.3.5.3 Les différentes techniques de la RAI.....39
 - 4.3.3.6 Interprétation et rendu des résultats 40
- 4.3.4 Epreuve directe de compatibilité au laboratoire 42
 - 4.3.4.1 Rappels des modalités techniques de l'EDC 42
 - 4.3.4.2 Interprétation..... 43
 - 4.3.4.3 Arbres décisionnels 43
- 4.4 Validation analytique en immuno-hématologie..... 45
- 4.5 Nouvelles techniques en immuno-hématologie 47
 - 4.5.1 Techniques en microplaques..... 47
 - 4.5.2 Techniques en filtration 47
 - 4.5.3 Alternatifs actuelles aux techniques d'agglutination 48
 - 4.5.4 Alternatifs actuelles aux techniques immunologiques 49
- 5. Conclusion..... 50
- Références bibliographiques.....52

1. Introduction

La qualification biologique des dons (QBD), maillon important de la chaîne transfusionnelle, Contribue –en même temps que d'autres activités transfusionnelles (sélection médicale des donneurs, hémovigilance) - à assurer la sécurité du receveur vis-à-vis des risques liées à la compatibilité immuno-hématologique et aux maladies transmissibles par le sang.

Elle participe également à la l'information du donneur lorsque des anomalies ou des particularités sont mises en évidence a l'occasion des examens biologiques pratiques.

Au cours des deux dernières décennies, la QBD a connu des progrès considérables, tant sur le plan technique que celui d'une organisation de plus en plus déficiente. Parallèlement à l'amélioration des tests de dépistage, les laboratoires de QBD (LQBD) ont progressivement vu arriver des automates de plus en plus performants, inter mue sécurises. Dernière mesure en date, le dépistage génomique viral (DGV) est venu réduire le risque de transmission des virus VIH et VHC.

Même, sur le plan immuno-hématologique la qualification du don a connu différent progrès sur les plans techniques et sur le plan matériels.

Enfin, il ne faut pas oublier le rôle joue par les bonnes pratiques de qualification des dons et plus récemment, par des référentiels nationaux dans l'amélioration de la qualité et la sécurité de la QBD. Au fur et a mesure de cette évolution, le risque de transmission d'agents infectieux par transfusion a considérablement diminuée, pour devenir quasi nul aujourd'hui.

2. Problématique

2.1 Définition

La qualification biologique des dons appliquée aux produits sanguins labiles intègre:

- l'ensemble des analyses obligatoires systématiques ou non, effectuées sur des échantillons provenant de l'activité de prélèvement homologue;
- Le traitement d'informations disponibles liées au don ou au donneur utiles à la qualification biologique notamment les données administratives et biologiques du donneur, les données de l'entretien pré-don, les informations post-don, les données de vigilances et les résultats du suivi de la qualité.
- Les autres analyses non obligatoires qui permettent de compléter les qualifications de certains produits sanguins labiles, afin de répondre à des utilisations thérapeutiques spécifiques.
- L'ensemble de ces données concurrent à l'établissement du statut du don.

2.2 Objectifs

La qualification biologique vise plusieurs objectifs:

- Assurer la sécurité du receveur vis à vis des risques liés à la compatibilité immuno-hématologie et aux maladies transmissibles par le sang ;
- Participer à l'information du donneur lorsque des anomalies ou des particularités sont mises en évidence à l'occasion de ces analyses ;
- Participer au moyen des résultats biologiques recueillis à des missions de santé publique.
- Le diagnostic sérologique consiste à rechercher des Ac synthétisés par l'hôte en réponse à une infection aiguë, persistante ou ancienne.
- Les méthodes utilisées, dites techniques sérologiques, sont basées sur le principe de la spécificité de la réaction antigène-Ac, et utilisent des antigènes de référence sous différentes formes (entier purifié, protéine native ou recombinante, oligopeptide synthétique).
- Leur mise en œuvre repose sur des artifices permettant de visualiser la formation des complexes immuns.
- Le résultat d'une sérologie peut être qualitatif ou quantitatif grâce à la détermination du titre d'Ac en dilutions limites. Le titre est défini comme l'inverse de la plus forte dilution de sérum donnant une réaction positive. Les techniques sérologiques sont dominées par les techniques immuno-enzymatiques. Les autres méthodes seront discutées brièvement.

3. Techniques sérologiques

3.1 Objectifs

Exposer les principes des tests de recherche des anticorps et des antigènes les plus utilisés :

- Les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
- Les tests d'agglutination de particules
- Les tests rapides spécifiques
- Les techniques de diagnostic génomique virale (PCR)
- Les techniques de confirmation par western blot.
- Expliquer les différences entre les principaux types de tests.

3.2 Agents transmissibles par le sang

3.2.1 Maladies virales

- Hépatites virales B et C et infection par le VIH : risque devenu infime avec les produits sanguins labiles, en raison des moyens de prévention (sélection des donneurs de sang et dépistages biologiques systématiques) : risque théoriquement nul avec les produits stables en raison de la viro-atténuation par les solvants détergents.
- Infection par le HTLV-1 et par cytomégalovirus : risque devenu théoriquement nul en raison de la déleucocytation systématique.
- Infection par le parvovirus B19 : risque faible avec les produits sanguins labiles et préoccupant uniquement chez les receveurs immunodéprimés.

3.2.2 Maladies bactériennes

- Risque de choc endotoxinique en cas de contamination accidentelle de la poche de sang (bactéries de l'environnement) mais aussi risque d'infection par la syphilis.

3.2.3 Maladies parasitaires

- Paludisme : risque infime en raison d'une prévention spécifique.
- Toxoplasmose : risque exceptionnel, préoccupant uniquement chez les receveurs immunodéprimés.
- Risques beaucoup plus importants en pays d'endémie : leishmaniose trypanosomiase.

3.3 Différentes techniques

3.3.1 Tests de dépistage

3.3.1.1 Techniques classiques

3.3.1.1.1 Test ELISA

Ces techniques (Assay) ont divers applications (recherche/quantification d'antigènes ou d'anticorps viraux et diverses variantes, mais le mécanisme de base reste le même :

- une certaine qualité de plastique est capable d'adsorber (Sorbent) anticorps ou antigènes (immuno-sorbent), adsorption suffisamment forte pour résister au lavage.
- un antigène ou anticorps peut être lié à une enzyme (enzyme linked), enzyme catalysant la transformation d'un substrat incolore en substrat coloré.
- la coloration permet de détecter l'antigène ou anticorps et son intensité (mesurée en densité optique ou DO) en permet la quantification.

3.3.1.1.1.1 Principe

- ❖ Le sérum à tester est mis en contact avec un support solide (microplaque de titration, microparticules...) sensibilisé par l'antigène viral vis à vis duquel est effectuée la sérologie.
- ❖ Après incubation et lavage, le complexe immunitaire ainsi immobilisé est révélé par l'addition d'Ac anti-immunoglobuline humaine (anti-IgG, -IgG-1, -IgG-3, -IgM, -IgA ou -Ig totales), appelé conjugué, qui est couplé à un système de révélation de nature enzymatique (enzyme immuno assay = EIA ou enzyme linked Immuno Sorbent Assay = ELISA).
- ❖ Le substrat de l'enzyme peut être fluorogénique, chimioluminescent ou chromogénique, les effets obtenus étant quantifiés respectivement grâce à un fluorimètre, un luminomètre ou un spectrophotomètre.

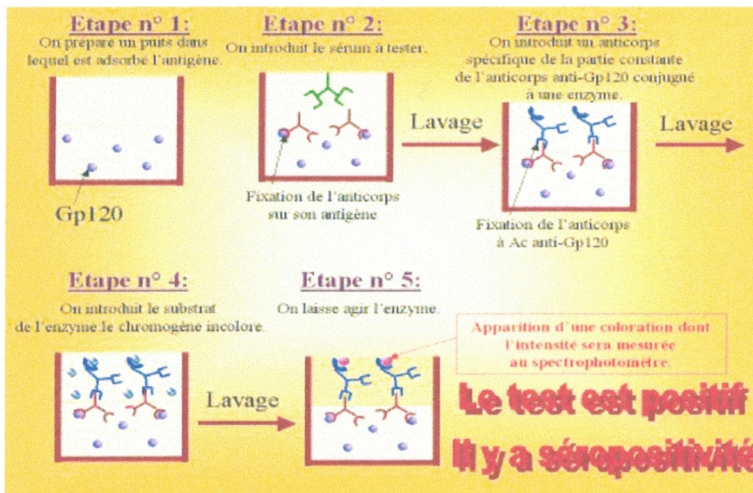


Figure 1: Principe générale de test ELISA

- La grande sensibilité des méthodes ELISA peut être optimisée grâce à une amplification du système de révélation (couple streptavidine-biotine par exemple). Néanmoins, on sait que toute augmentation de la sensibilité a tendance à réduire la spécificité.
- La spécificité d'une réaction aussi sensible que l'ELISA est également très liée à la pureté des antigènes viraux utilisés. Elle est optimale si des protéines recombinantes ou des oligopeptides de synthèse sont utilisés. Par contre, l'emploi de constituants viraux purifiés (même fortement) à partir d'un lysat de cellules humaines ne garantit pas toujours l'absence de déterminants cellulaires responsables de résultats faussement positifs.

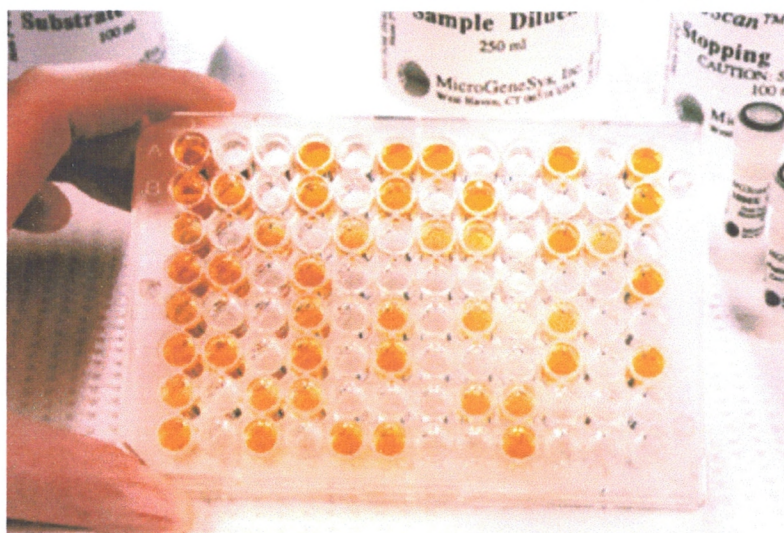


Figure 2: Microplaque ELISA après révélation.

3.3.1.1.1.2 Avantage

Elles présentent les avantages majeurs suivants :

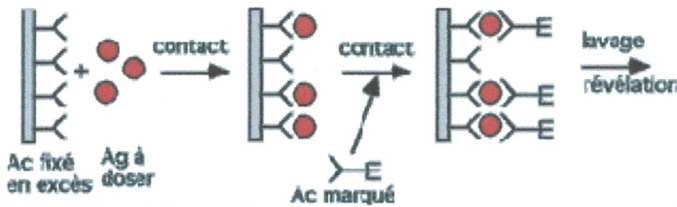
- Sensibilité peut être optimisée grâce à une amplification du système de révélation (couple streptavidine-biotine).
- Spécificité : liée à la pureté des antigènes viraux utilisés (protéines recombinantes ou oligopeptides de synthèse)
- Détection des classes d'Ac : IgG, IgM (infection virale récente)
- Automatisation : bonne reproductibilité, grandes séries et faibles volumes réactionnels adaptées au dépistage (HIV, hépatite C)
- Quantification des Ac : sérums étalons de référence (Rubéole)
- Avidité des IgG : distinguer primo-infection et infection ancienne

3.3.1.1.1.3 Applications

- Virus (HSV, CMV, rougeole, rubéole oreillons, varicelle, hépatites A, C, D, HIV, HTLV)
- Protéines (étude des profils EBV, hépatite B).

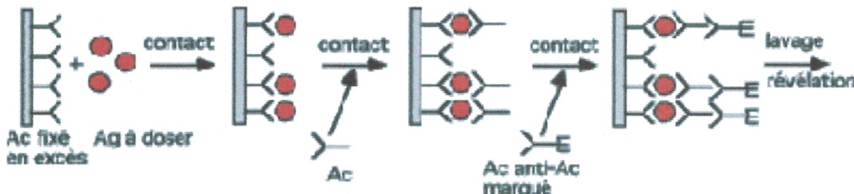
3.3.1.1.4 Différentes variantes

Dosage d'un antigène par méthode sandwich :



L'antigène doit posséder deux épitopes différents; il est pris en "sandwich" entre deux anticorps.

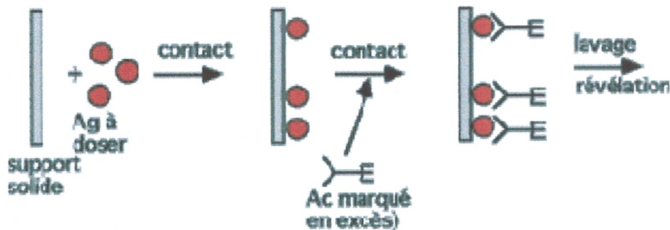
Dosage d'un antigène par la méthode du double sandwich :



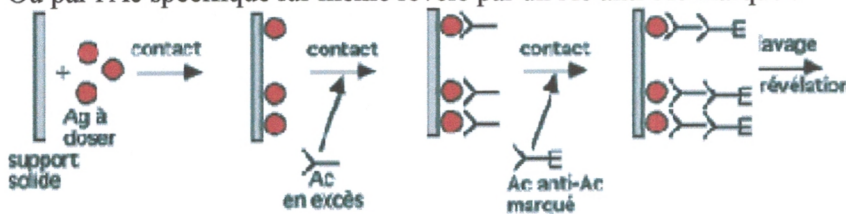
Dans ce cas, la fixation de l'antigène est révélée grâce à un anticorps anti-immunoglobuline marqué, qui se lie sur l'anticorps spécifique qui a reconnu l'antigène. Les anticorps anti Ig marqués sont disponibles dans le commerce ; cela facilite le travail de l'utilisateur car le marquage est une opération délicate à réaliser au laboratoire.

Dosage direct d'un antigène (ELISA direct) :

Il est possible de fixer la totalité de l'antigène présent dans l'échantillon à doser sur la paroi du tube ou de la cupule de réaction, puis de révéler cet Ag par l'Ac marqué :

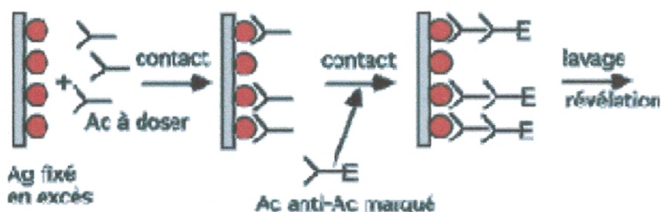


Ou par l'Ac spécifique lui-même révélé par un Ac anti-Ac marqué :



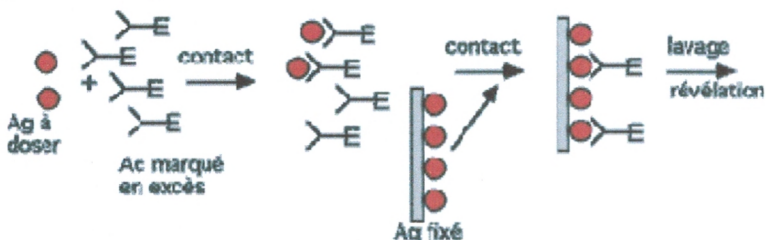
Dosage d'un anticorps :

L'anticorps à doser est pris en "sandwich" entre l'antigène et un anticorps anti-anticorps marqué.

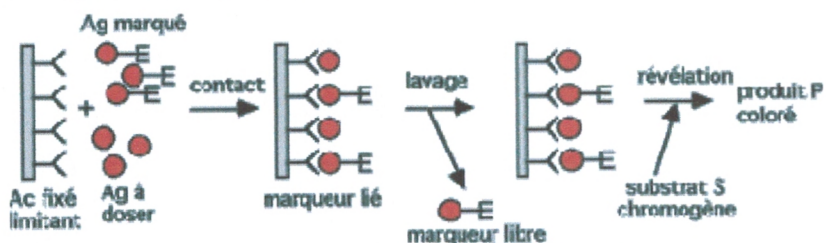


Dosage immuno-enzymométrique au sens strict (IEMA) :

Dans cette technique, la première étape a lieu en phase homogène : l'antigène à doser est mis en présence d'un excès d'anticorps marqué. On met ensuite le milieu en présence de l'antigène fixé sur un support solide (phase hétérogène) de manière à révéler l'anticorps marqué qui ne s'est pas lié à l'antigène lors de la première étape.

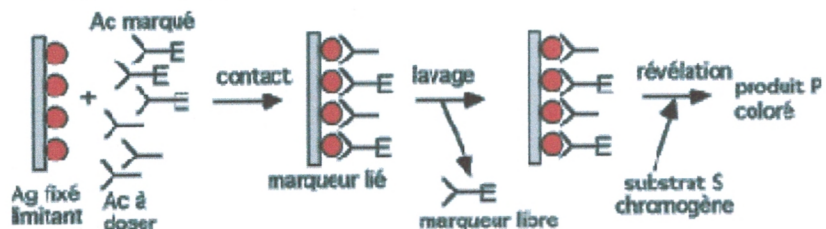


Dosage d'un antigène (ELISA compétition)



N.B : Cette technique est la technique ELISA "vraie".

Dosage d'un anticorps (ELISA compétition)



3.3.1.1.5 Automatisation

L'immuno-analyse par ELISA a été développée sur deux types d'automates, autorisant une bonne reproductibilité : (1) les systèmes "fermés" (n'acceptant que des réactifs propres) qui exploitent des supports sensibilisés performants permettent de raccourcir les temps d'incubation, et (2) les systèmes "ouverts" capables d'effectuer toute la réaction ELISA sur support de microplaque à partir de réactifs commerciaux ou propres au laboratoire. Ces appareils identifient souvent les échantillons sériques par code à barres et peuvent être connectés de façon mono- ou bi-directionnelle à l'informatique centrale du laboratoire.

3.3.1.1.2 Radio immunologique

- Le radio-immuno-essai (ou RIA) classique repose sur le principe d'une liaison compétitive. l'antigène reconnu par l'anticorps recherché est fixé à la phase solide.
- Les anticorps dans l'échantillon analysé et les anticorps radiomarqués ajoutés entrent en compétition pour les déterminants antigéniques disponibles; les anticorps libres sont ensuite éliminés par un lavage.

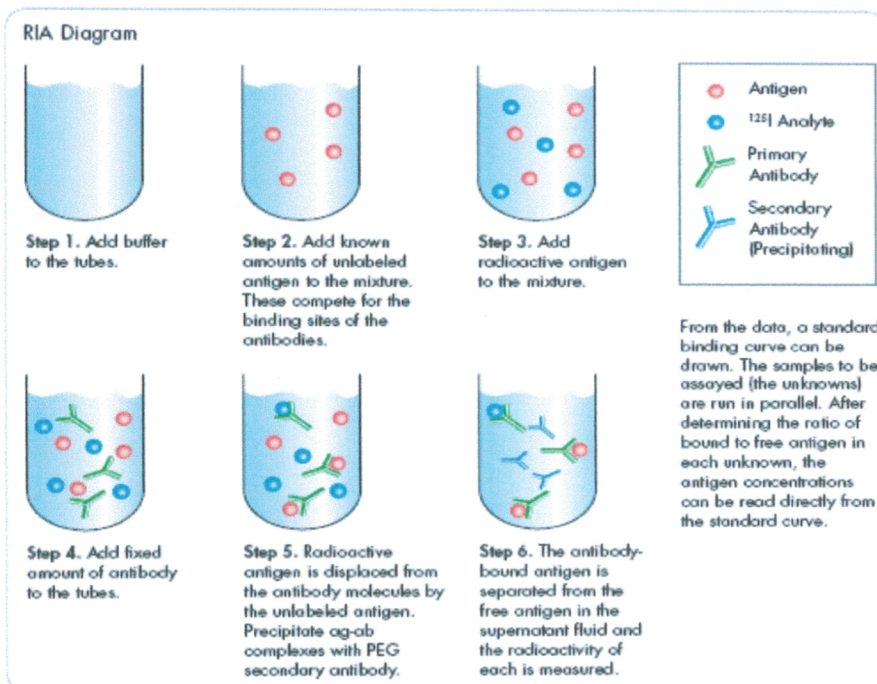


Figure 3 : principe générale de RIA

- Plus il y a d'anticorps dans le sérum, moins les anticorps radioactifs peuvent lier l'antigène.
- Une concentration élevée d'anticorps dans le sérum donne donc signal radioactif faible et vice versa.

3.3.1.1.3 Techniques d'agglutination

3.3.1.1.3.1 Principe

Elles mettent en jeu un antigène situé à la surface d'une particule. C'est un phénomène complexe au cours duquel les anticorps s'unissent aux antigènes portés par la particule formant ainsi des ponts spécifiques entre ces particules permettant leur réunion en amas.

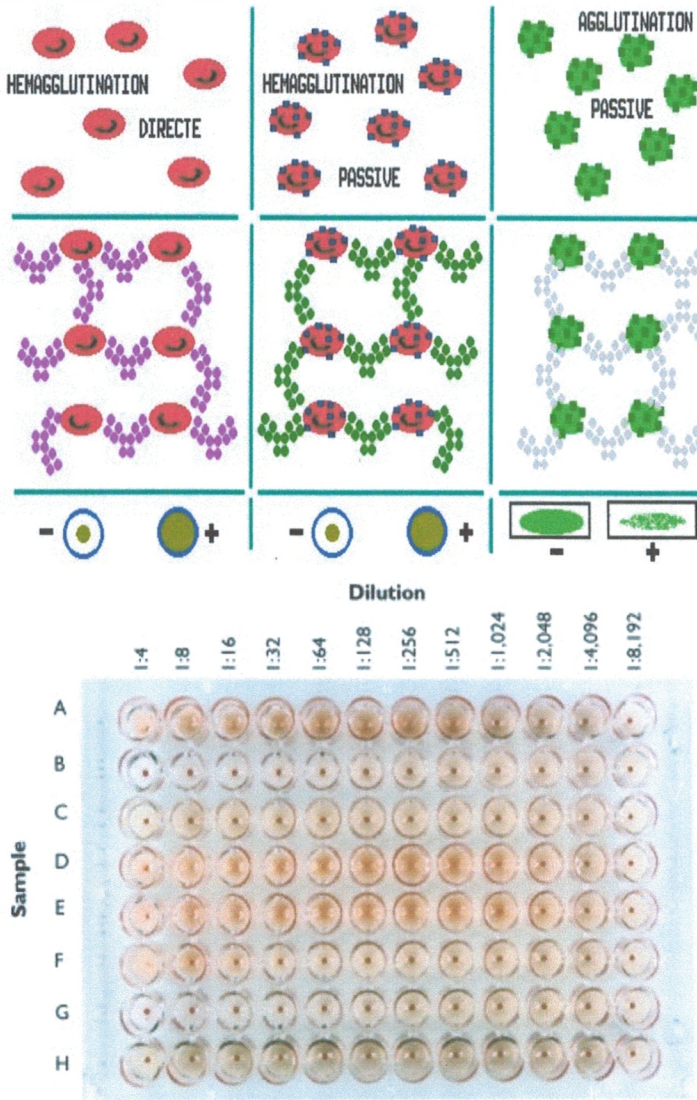


Figure 4 : Principe générale et résultats des réactions d'agglutination.

3.3.1.1.3.2 Les paramètres influents l'agglutination

3.3.1.1.3.2.1 Les anticorps : Ils sont dits :

3.3.1.1.3.2.1.1 Agglutinants :

La plupart des anticorps agglutinants sont des Ig M.

3.3.1.1.3.2.1.2 Non agglutinants :

Quand leur union aux antigènes présents à la surface de la particule ne suffit pas à provoquer une agglutination en milieu NaCl à 0,15 mol/L.

3.3.1.1.3.2.2 Les antigènes :

Il existe une relation entre l'agglutinabilité et :

- Le nombre de sites antigéniques.
- Leur localisation.

3.3.1.1.3.2.3 Le milieu :

L'union Ag-Ac et la formation du réseau sont influencées par :

3.3.1.1.3.2.3.1 La température :

Théoriquement, plus la température est élevée, plus l'agitation moléculaire est importante, augmentant ainsi la probabilité de rencontre des molécules. Une élévation de température devrait favoriser la rencontre de l'antigène et de l'anticorps et donc l'union de l'antigène et de l'anticorps ; C'est pourquoi l'agglutination apparaît souvent plus rapidement à 37 qu'à 4°C.

Toutefois, l'agitation moléculaire peut avoir un effet de dissocier les complexes les plus fragiles, certaines réactions d'agglutination ne peuvent donc être obtenues qu'à des températures de + 4°C.

On distingue pour cette raison :

- Des anticorps dits « chauds ».
- Des anticorps dits « froids ».

3.3.1.1.3.2.3.2 Le pH :

Dans la plupart des cas le pH optimum est compris entre 6 et 8.

3.3.1.1.3.2.3.3 La force ionique :

Elle contrarie l'union Ag-Ac mais favorise la formation du réseau puisqu'elle diminue le potentiel ζ .

3.3.1.1.3.3 Les différentes catégories d'agglutination

3.3.1.1.3.3.1 Agglutination active :

3.3.1.1.3.3.1.1 Définition :

L'agglutination est dite active quand elle résulte d'une union spécifique entre un anticorps agglutinant et un antigène appartenant en propre à la particule.

3.3.1.1.3.3.1.2 Caractéristiques :

Ces réactions peuvent être effectuées :

- En tube.
- En microplaques.
- Sur lames.

Ces réactions peuvent être :

3.3.1.1.3.3.1.2.1 Qualitatives :

Une agglutination est la preuve d'une réaction Ag-Ac et permet donc d'identifier l'antigène ou l'anticorps en raison de la spécificité de la réaction Ag-Ac.

3.3.1.1.3.3.1.2.2 Quantitatives :

La dernière dilution du sérum donnant encore une agglutination nette permet de déterminer alors le titre du sérum.

3.3.1.1.3.3.2 Agglutination indirecte :

3.3.1.1.3.3.2.1 Définition :

L'agglutination active indirecte est un agglutinat réalisé entre un anticorps non agglutinant et un antigène faisant normalement partie intégrante de la particule, en faisant appel à un artifice.

3.3.1.1.3.3.2.2 Les divers artifices utilisés pour l'agglutination indirecte :

De façon générale, on peut obtenir une agglutination avec des anticorps non agglutinants en diminuant le potentiel ζ :

- Soit en diminuant la charge électrique.
- Soit en augmentant le constant diélectrique.
- Soit en augmentant la force ionique du milieu.

3.3.1.1.3.3.2.2.1 Première technique :

On ajoute au milieu réactionnel des macromolécules qui servent de pont entre anticorps unis à des cellules voisines et qui diminuent les forces de répulsion inter globulaires en augmentant le constant diélectrique du milieu.

Les macromolécules utilisées sont la Sérum Albumine Bovine, le Dextran, le Ficoll.

3.3.1.1.3.3.2.2 Deuxième technique :

On hydrolyse les glycoprotéines présentes à la surface des cellules en les traitant par des enzymes protéolytiques comme la papaïne, la fucine, la broméline, la trypsine. Il y a diminution des charges électriques superficielles et diminution des forces de répulsion. De plus ces enzymes démasquent les antigènes qui sont souvent cachés et que l'on appelle cryptotigènes.

3.3.1.1.3.3.2.3 Troisième technique :

On établit un pontage spécifique par des anti-globulines qui, en s'unissant aux anticorps unis à des cellules voisines, rassemblent ces cellules et les agglutinent.

3.3.1.1.3.3.3 Agglutination passive :

3.3.1.1.3.3.3.1 Définition :

Agglutination réalisée entre un anticorps et un antigène normalement soluble, mais rendu particulaire fixation sur un support figuré.

3.3.1.1.3.3.3.2 Nature du support figuré :

Ces diverses particules ne peuvent pas être utilisées indifféremment pour tous les Antigènes. Pour chacun d'eux il est nécessaire de rechercher les particules les mieux adaptées.

3.3.1.1.3.3.3.2.1 Particules de Latex :

De forme sphérique, ces particules peuvent avoir trois diamètres différents. Ce sont généralement des particules de 0,81 µm de diamètre qui sont utilisées. L'antigène est fixé par simple contact sur ces particules. Afin d'éviter toute agglutination spontanée, on travaille à pH fixe égal à 8,2.

3.3.1.1.3.3.3.2.1 Les hématies :

Elles sont fragiles, s'hémolysant en trois semaines. L'emploi d'hématies formolées atténue cette fragilité.

Elles portent à leur surface une mosaïque d'antigènes dont certains sont susceptibles de s'unir à des anticorps différents de ceux recherchés et de donner des hémagglutinations non interprétables.

La fixation des antigènes sur les hématies peut être effectuée :

- Par simple contact.
- Après une préparation spéciale.
- Par fixation chimique.
- Par fixation immunologique.

3.3.1.1.3.4 Quelques applications :

3.3.1.1.3.4.1 TPHA :

Le test murex TPHA détecte les anticorps dirigés contre *T. pallidum* au moyen d'une méthode d'hémagglutination indirect (IHA), des érythrocytes aviaires intacts sont recouverts de composants antigéniques de *T. pallidum* pathogène: ces hématies test s'agglutinent en présence d'anticorps dirigés contre *T. pallidum* et pressentent des motifs caractéristiques sur des microplaques.

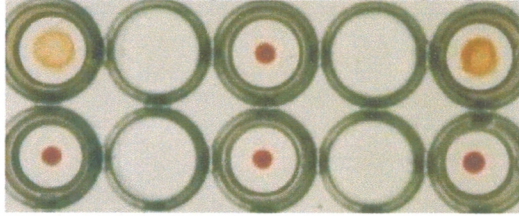
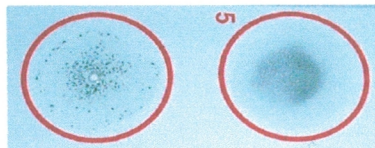


Figure 5 : Test Murex TPHA positif

Les anticorps dirigés contre les tréponèmes non pathogènes sont absorbés par un extrait de tréponèmes de Reiter inclus dans la suspension cellulaire. Les résultats sont obtenus en 60 mn. Les motifs d'agglutination sont faciles à lire. Pour faciliter l'étape de dilution nécessaire au dosage, un colorant bleu a été ajouté au diluant. Ce dernier change de couleur lorsque l'échantillon est ajouté.

3.3.1.1.3.4.2 VDRL :

Ces tests utilisent un **antigène cardiolipidique**, haptène lipidique ubiquitaire, constituant des tréponèmes mais aussi des cellules bactériennes, végétales ou animales (foie et cœur). Le plus utilisé est le **test de VDRL** (*Venereal Disease Research Laboratory*). Il s'agit d'une réaction d'**agglutination passive**. Les résultats sont rendus en croix (1 à 4) en fonction de l'intensité de la réaction. En cas de positivité, un titrage est effectué par dilutions du sérum de raison 2. L'inverse de la dernière dilution donnant une agglutination est le titre de la réaction.



TEST VDRL – CHARBON

Agglutination : + Pas d'Agglutination : -

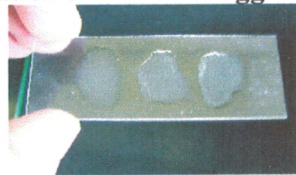


Figure 6 : Test VDRL positif

Témoin négatif à gauche; Témoin positif au centre ; Sérum testé à droite

3.3.1.1.4 Tests rapides et spécifiques – bandelettes

Ce sont le plus souvent des tests dits par immuno-chromatographie, avec une filtration ou une migration du sérum sur une membrane ou un support recouvert d'antigènes recombinants. Lors de cette filtration ou migration, les anticorps s'ils sont présents dans l'échantillon, se fixeront sur les antigènes présents sur le support. La révélation de cette liaison antigène-anticorps se fait généralement par un conjugué. Le test se réalise en une dizaine de minutes en général et se fait de façon unitaire. Cette simplicité d'emploi leur assure une large diffusion dans les pays en développement.

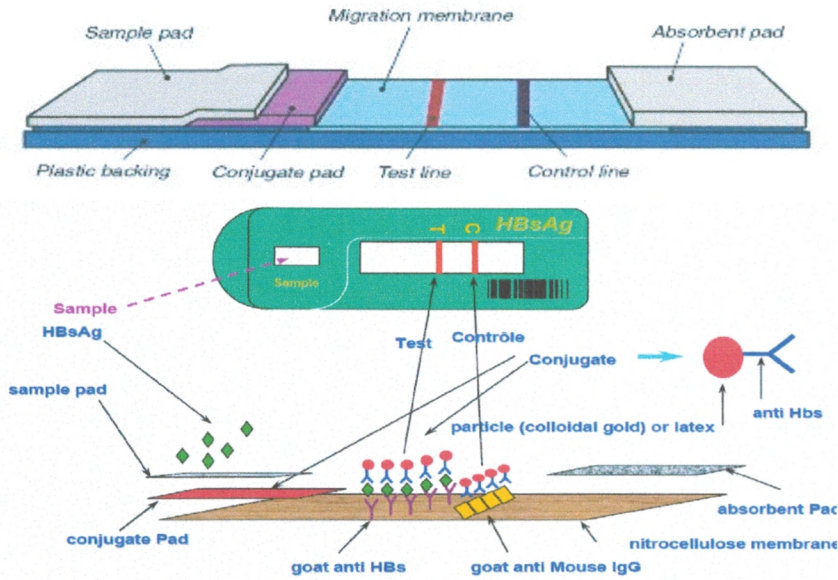


Figure 7 : Principe générale d'un test d'immuno-chromatographie.

3.3.1.1.4.1 Test rapide de détection de VIH

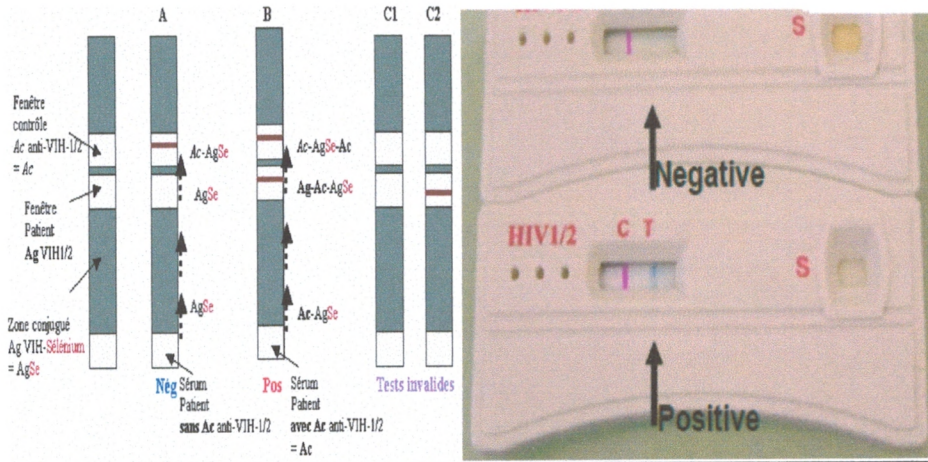


Figure 8 : Test VIH rapide positif

3.3.1.1.4.1.1 Principe du test

Il existe différentes trousse de détection rapide commercialisées dans le monde avec notamment les tests Determine HIV-1/2® (Inverness Medical), Genie II HIV-1/HIV-(Bio-Rad), HIV ½ Quick (Cypress Diagnostics), ImmunoComb II HIV 1+2 (Orgenics), Retrocheck HIV (Qualpro Diagnostics), Unigold HIV 1+2 (Trinity Biotech). Elles permettent la détection des anticorps anti-VIH-1 et VIH-2 par immuno-chromatographie sur membrane.

3.3.1.1.4.1.2 Avantages du test

Ce test rapide nécessite une quinzaine de minutes de manipulation. Il se fait de façon unitaire. Cette simplicité d'emploi permet d'utiliser ce test dans de nombreux pays en développement. Ces trousse ont déjà été testées avec succès dans des programmes de dépistage et de prévention dans les pays africains (Algérie, Cameroun, Sénégal...) (15-18). Il est très utile dans les accidents d'exposition au sang : si le sérum du patient source est positif, un traitement anti-rétroviral est mis en route très rapidement chez le patient exposé. Les performances de ces tests sont excellentes (Sensibilité entre 95,2 et 99,3%, Spécificité > 99%). Des trousse permettant la réalisation de ces tests à partir de la salive ou des urines ont été commercialisées. L'utilisation de ces prélèvements représente une option attrayante car ces méthodes de prélèvements sont non invasives et peuvent être effectuées pratiquement n'importe où (notamment au domicile d'un patient) (19).

3.3.1.1.5 Choix des tests sensibilité et spécificité

- La sensibilité : capacité du test à repérer les échantillons les plus faiblement positifs

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Vrais positifs}}{\text{Vrais positifs} + \text{faux négatifs}} \times 100$$

C'est la capacité d'un test à détecter une infection, une maladie ou une immunité lorsque celle-ci est présente.

Exemple : Si un test a une sensibilité de 98% pour détecter l'infection par le virus du SIDA (VIH), cela signifie que sur 100 personnes infectées je vais en détecter 98 avec mon test.

De même, si la sensibilité clinique d'un test destiné à la détection du virus de la mosaïque du tabac est de 95%, cela signifie que le test est capable de mettre la présence du virus en évidence 95 fois sur 100.

- La spécificité : capacité du test à ne pas donner des faux positifs ou des réactions non spécifiques

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Vrais négatifs}}{\text{Vrais négatifs} + \text{faux positifs}} \times 100$$

C'est la capacité d'un test à être réellement négatif quand une infection, une maladie ou une immunité est absente.

Exemple : Si en transfusion sanguine, lors du dépistage du SIDA chez des donneurs de sang on trouve 2 donneurs positifs sur 1000, parmi des donneurs parfaitement négatifs, la spécificité clinique du test est de 99,8%. Parmi les négatifs je trouve 0,2% de résultats faussement positifs.

- Sensibilité et spécificité varient en sens inverse
- L'importance de la sensibilité est évidente.
- La spécificité est une notion complexe dont il est essentiel que le personnel comprenne l'importance. L'un des problèmes majeurs est de déterminer la cause du manque de spécificité.

3.3.1.2 Techniques actuelles

3.3.1.2.1 DGV ou PCR

3.3.1.2.1.1 La réaction de la PCR

La Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR pour « Polymerase Chain reaction » a été mise au point vers les années 1980 par Kary Mullis. C'est une technique permettant d'amplifier une séquence recherchée. Son principe repose sur l'utilisation de l'ADN polymérase, il s'agit d'une répllication in vitro de séquences spécifiques d'ADN. Le matériel de départ est de l'ADN bicaténaire qui contient la séquence à amplifier. La réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est une technique puissante, révolutionnaire, largement répandue et qui est utilisée pour amplifier l'ADN et produire in vitro de grandes quantités d'une séquence d'acides nucléiques.

3.3.1.2.1.2 Les étapes de la PCR

Pour faire la PCR, on utilise l'ADN polymérase d'une bactérie : Thermophile aquatique qui vit à 75°C dans les eaux thermales. Cette polymérase est toujours active à 94-96°C. La réaction de la PCR comporte trois étapes qui constituent un cycle au cours duquel la quantité d'ADN à amplifier est doublée.

Ces cycles sont renouvelés entre 20 et 50 fois en fonction de la quantité d'ADN initial de départ et du but recherché. C'est une succession d'étapes qui consistent à une :

- Dénaturation de l'ADN à amplifier à 94°C ;
- Hybridation avec une amorce, appariement primer, annealing à 64°C
- Extension de l'amorce à 70-72°C par la Taq polymérase.
- L'amplification est effectuée par la répétition des cycles qui assure une duplication exponentielle de chaque brin.
- La technologie de la PCR permet de mettre en œuvre les recherches habituelles de génie génétique, même si l'on ne dispose au départ que d'une faible quantité d'ADN.

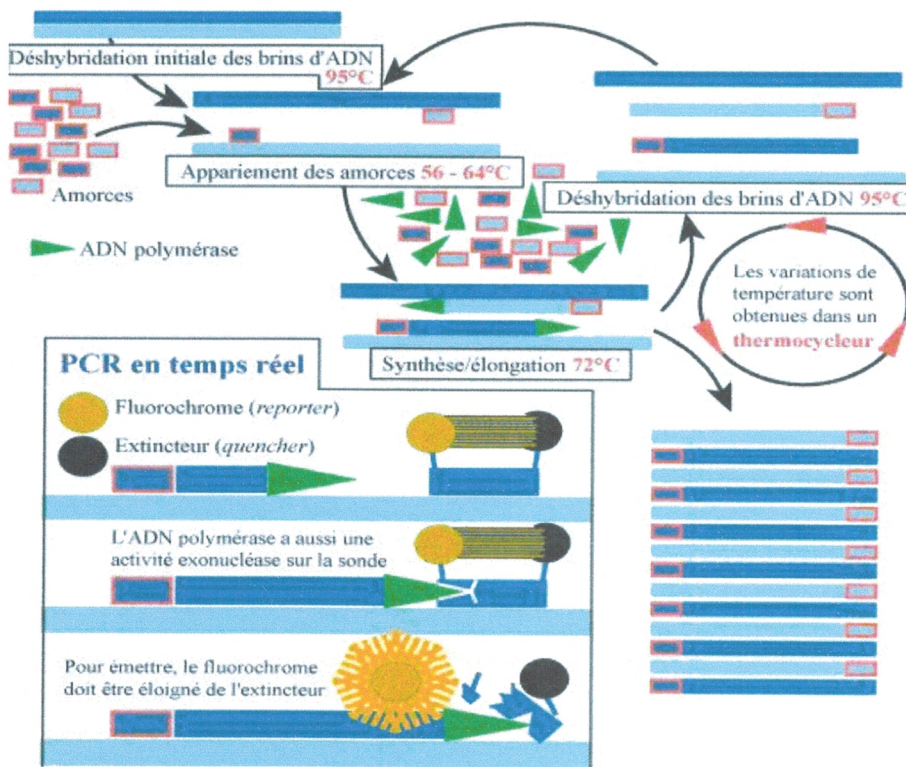


Figure 9 : Principe général du PCR

3.3.1.2.2 Indications des méthodes de diagnostic moléculaire :

- Techniques qualitatives : montrer la présence d'un virus, en particulier lorsqu'il n'est pas cultivable (HVC), ou que le liquide biologique se prête mal à la culture (LCR).
- Techniques quantitatives : suivi des patients sous traitement anti-viral (HIV, HVC, HVB).
- Séquençage : détection de mutations nucléotidiques
 - associées à la résistance aux anti-viraux (HIV, HVB)
 - caractéristiques des génotypes des virus (HVC, HVB).

3.3.1.2.3 Intérêts :

- Sensibilité remarquable
- Automatisation possible

3.3.1.2.4 Limites :

- Risques de contamination pour les techniques de PCR.
- Absence de preuve du caractère infectieux du virus détecté.
- Caractérisation phénotypique de la souche impossible.
- Coût encore relativement élevé.

3.3.2 Tests de confirmation

3.3.2.1 Western-blot

C'est une méthode de référence, mais son interprétation peut être délicate. Les protéines d'un lysat viral VIH-1 ou VIH-2 sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, puis transférées électrophorétiquement sur une membrane (de nitrocellulose, par exemple).

Sur la bandelette de WB, différentes protéines constitutives des virus seront reconnues par des anticorps spécifiques anti-VIH-1 ou VIH-2. Le recours au WB pour une confirmation de sérologie VIH positive n'est pas systématique dans tous les pays, y compris dans les pays industrialisés. Il est normalement réalisé sur un second prélèvement sérique, pour se mettre à l'abri d'une éventuelle erreur d'étiquetage du premier prélèvement. Il permet parfois d'évoquer une séroconversion récente ou une infection par des variants lors de profils incomplets.

En cas d'infection à VIH, le WB sera le plus souvent pleinement réactif et donnera peu d'informations complémentaires. Inversement, en cas de "non infection", des réactivités non spécifiques sont fréquentes et d'interprétation difficile. Aussi, des alternatives au WB sont nécessaires pour éviter un recours systématique à cet examen coûteux et pas toujours très informatif. Les protéines virales natives sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nylon. Les Ac spécifiques éventuellement présents dans le sérum se fixent sur ces protéines.

- les protéines virales natives sont séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nylon. Les Ac spécifiques éventuellement présents dans le sérum se fixent sur ces protéines.
- la liaison Ag-Ac est révélée par une anti-Ig marquée à l'aide d'une enzyme. On ajoute le substrat => réaction colorée.

3.3.2.1.1 Avantages :

- Plus spécifique que l'ELISA.
- Réponse en détail vis à vis des protéines virales

3.3.2.1.2 Applications :

- Stratégie diagnostic dans le cadre du HIV : Le dépistage des Ac anti-VIH doit s'effectuer avec 2 réactifs mixtes (VIH 1 et VIH2); En cas de positivité des résultats un western blot, confirmera le type de virus.
- Confirmation d'une sérologie positive en HTLV1 et 2.
- Dans le cadre de la recherche : CMV....

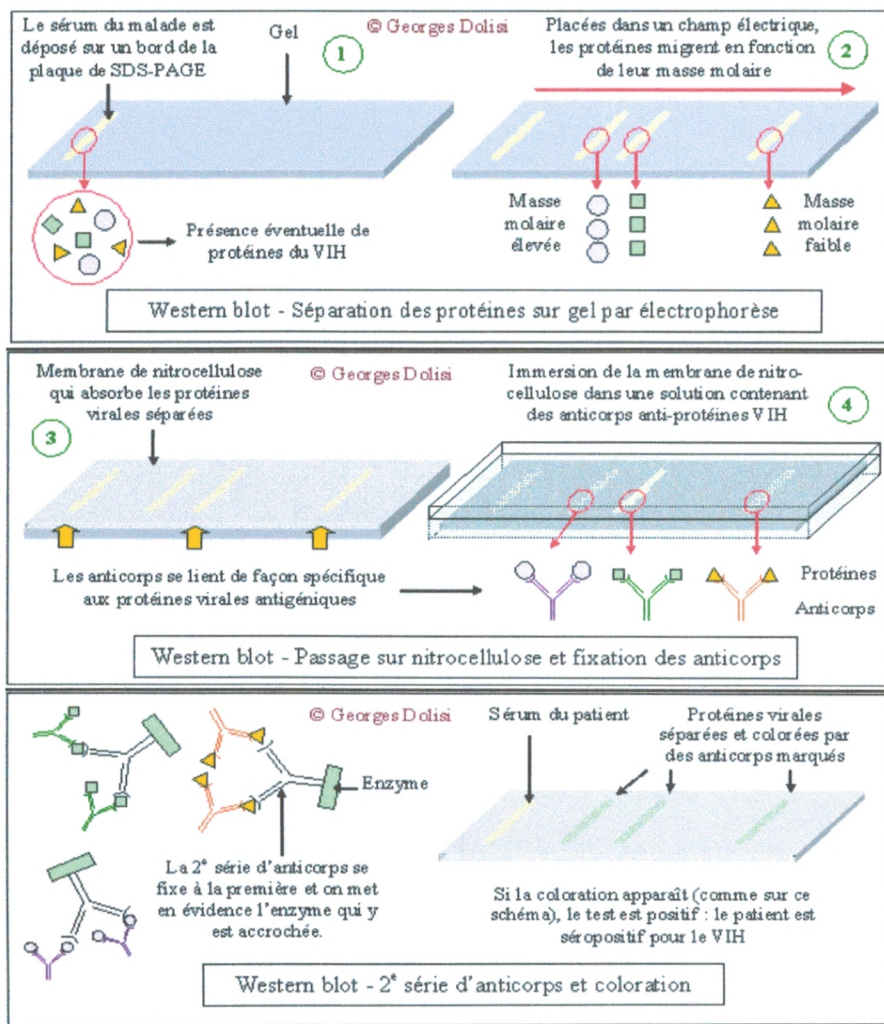


Figure 10 : Principe générale de la technique Western-Blot

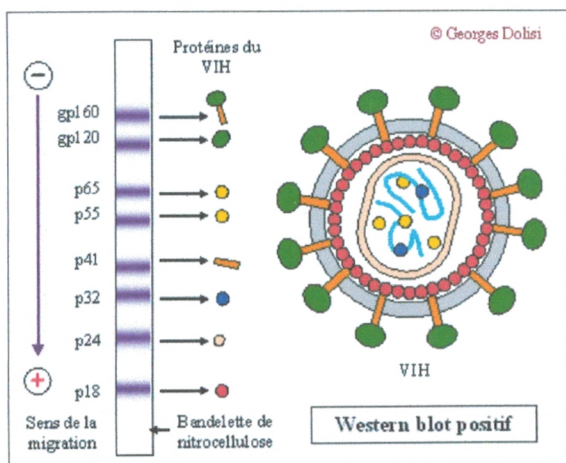


Figure 11: Western –Blot VIH positive

3.3.2.2 Immuno-blot

Ces tests utilisent des protéines de synthèse. Leur commercialisation est récente et leur coût aussi élevé que le WB. Ils disposent de différentes protéines recombinantes ou peptides de synthèse sur bandelette ou sur support plastique.

Ces tests ne sont qu'une présentation sur un format différent des antigènes utilisés lors des examens de dépistage et ils n'apportent ainsi aucune information complémentaire.

3.4 Interprétation des résultats

- Deux étapes :
 - ❖ Dépistage
 - ❖ Analyses complémentaires
 - Préciser le résultat définitif.
 - Apprécier la nécessité d'informer le donneur.
 - Participer à la qualification du don ultérieur.
- Le don est qualifié :
 - ❖ Sur la base du dépistage
 - ❖ Et, si nécessaire, sur la base des analyses complémentaires et des résultats du don antérieur.
- Le choix d'une stratégie repose sur :
 - ❖ l'objectif du dépistage
 - ❖ la sensibilité et la spécificité des tests
 - ❖ la prévalence de l'infection à VIH dans la population testée.
- Trois stratégies adaptées de l'OMS pour détecter les anticorps dans les échantillons de sérum ou de plasma sont présentées ci-après :

3.4.1 Stratégie I :

Les échantillons sont testés par ELISA ou par une méthode simple/rapide. En cas de réaction positive, le sérum est considéré comme positif. En l'absence de réaction, le sérum est considéré comme négatif. En transfusion sanguine, il convient de choisir le test le plus sensible. Si le résultat est positif, le don de sang doit être éliminé selon les mesures de précaution universelles. Cela étant, pour poser un diagnostic et rendre un résultat à un donneur de sang ou à un patient, il faut le plus souvent utiliser les stratégies II ou III.

3.4.2 Stratégie II :

Tous les échantillons de sérum/plasma sont d'abord soumis à un ELISA ou à un test simple/rapide. Un sérum qui ne réagit pas au premier test (test A) est considéré comme négatif. Si un sérum réagit au 1^{er} test, un second prélèvement doit être réalisé chez le patient, le nouveau sérum doit être analysé avec un 2^o

test (test B) ELISA ou un test simple/rapide, utilisant une préparation antigénique différente et/ou un principe différent (par exemple, méthode indirecte et méthode sandwich ou test simple/rapide). Si les 2 tests A et B sont positifs, le porteur est considéré comme positif. Si les résultats des deux tests A et B demeurent discordants, le sérum est considéré comme indéterminé.

3.4.3 Stratégie III :

Si le test A de dépistage est négatif, le sérum est déclaré négatif. En cas de positivité du test A, comme pour la stratégie II, un nouveau prélèvement est réalisé. Si ce sérum réagit au 2^o test B, la stratégie III fait appel à un 3^o test (test C). Les trois tests employés dans cette stratégie doivent utiliser des préparations antigéniques différentes et/ou reposer sur des principes différents

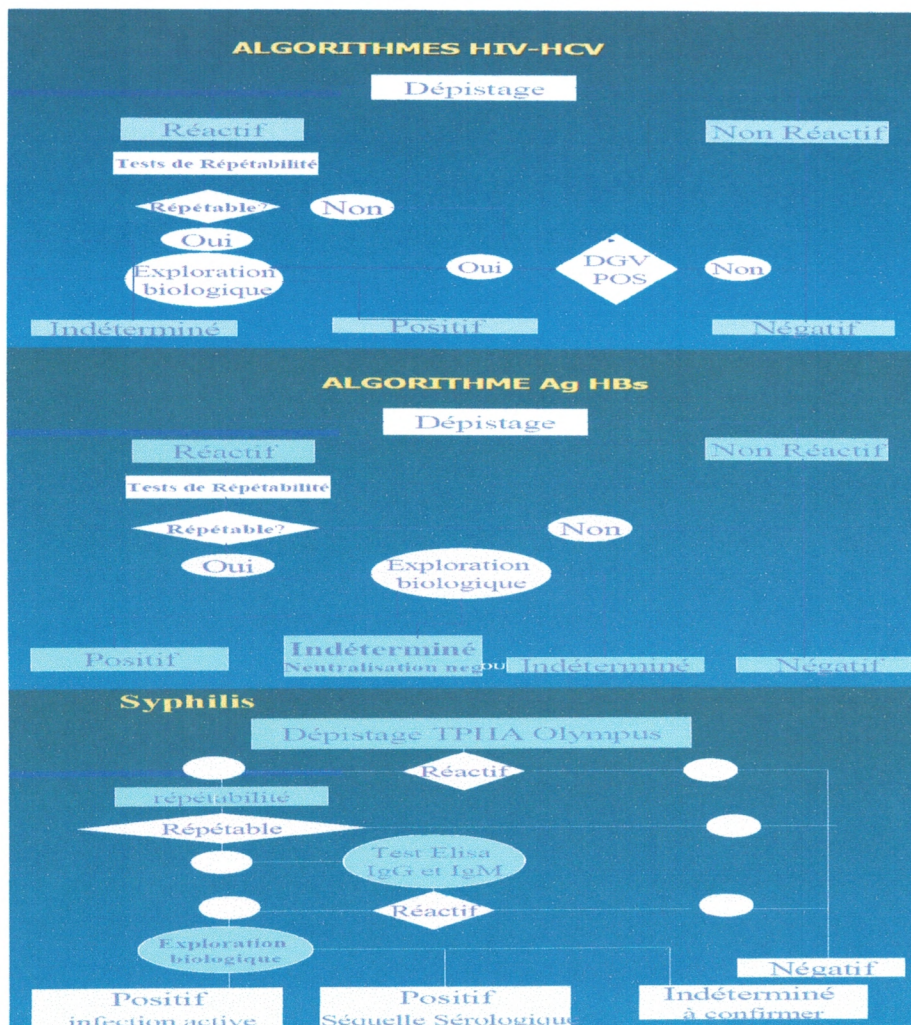


Figure 12 : Algorithmes Décisionnelles en Sérologie Infectieuse

4. Techniques en immuno-hématologie

4.1 Objectifs

- Groupage ABO-Rhésus par les deux épreuves : globulaires et sérique.
- Phénotype Rhésus-Kell.
- Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires.
- Epreuve directe de compatibilité au laboratoire.

4.2 Groupes sanguins et systèmes immunogènes

4.2.1 Système ABO

Historique :

En 1900, Karl Landsteiner Découverte des antigènes A et B (agglutinogènes) et de leurs anticorps anti-A et anti-B (agglutinines) respectifs.

4.2.1.1 Antigène A et B :

4.2.1.1.1 Répartition :

- sur les hématies.
- sur les autres cellules sanguines : leucocytes et plaquettes.
- sur les autres tissus (sauf tissu conjonctif et système nerveux central).
- dans les sécrétions - caractère sécréteur.

4.2.1.1.2 Nature biochimique :

- Les antigènes A et B sont construits par des enzymes spécifiques :
Les glycosyl transférases A et B.

4.2.1.1.3 Le phénotype :

- Il comprend l'ensemble des antigènes s'exprimant à la surface du GR.
- Le groupage ABO comporte obligatoirement la recherche des anticorps sériques correspondants.
- Par convention le groupe sanguin ABO est défini par les antigènes présents sur les globules rouges sanguins, transmis héréditairement, et permettant d'établir une classification des individus.
- Les anticorps présents dans le sérum correspondent à l'antigène ou aux antigènes absents à la surface des globules rouges.

Premier niveau de complexité :

Détermination de l'antigène A avec un Ac anti-A de sujet B.

Certaines hématies sont fortement agglutinées (A2, 20 % des sujets) que d'autres (A1, 80 % des sujets).

Les phénotypes courants qui sont observés : A1, A2, B, O, A1B et A2B.

4.2.1.2 Anticorps anti A et anti B :

4.2.1.2.1 Les Anticorps anti-A et anti-B réguliers :

4.2.1.2.1.1 Anticorps réguliers :

- Ils sont régulièrement présents en l'absence de l'antigène correspondant.
- Cas particulier : le nouveau-né. Il ne dispose pas de ces Anticorps à la naissance (Exemple : un nouveau-né de groupe A n'a pas d'Anticorps anti-B dans son plasma).

4.2.1.2.1.2 Anticorps naturels :

- Apparition spontanée chez le nourrisson entre 3 et 6 mois.
- Ce sont des Anticorps complets.
- Ce sont des immunoglobulines de classe M.
- Anticorps agglutinants en milieu salin.
- Anticorps plus actifs à +4°C qu'à 37°C.

4.2.1.2.2 Les Anticorps anti-A et anti-B immuns :

- Ce sont des immunoglobulines de classe G observées le plus souvent chez le sujet O.
- Anticorps non agglutinants en milieu salin. Actifs à 37°C.
- Ces Anticorps sont " acquis " par stimulation immune (transfusion incompatible, grossesse...).
- Ils sont dangereux en transfusion et responsables d'accident d'hémolyse indirect (Les Anticorps du donneur agressent les globules rouges du receveur).

4.2.2 SYSTEME RHESUS :

4.2.2.1 Les antigènes : Au nombre de 5 : D, C, E, c, e.

4.2.2.1.1 L'antigène D [RH1] :

- Définit le groupe Rhésus standard avec un sérum anti-D.
- Chez les caucasoïdes, 85 % des sujets ont leurs globules rouges agglutinés (Rh positif) et 15 % non agglutinés (Rh négatif).

4.2.2.1.2 Les autres antigènes :

4.2.2.1.2.1 Antigènes C et c [RH2 et RH4] :

- Ils sont antithétiques.
- toute hématie C négatif est systématiquement c positif et inversement.

4.2.2.1.2.2 Antigènes E et e [RH3 et RH5] :

- Ils sont antithétiques.
- Toute hématie E négatif est systématiquement positif et inversement.

4.2.2.2 Les anticorps :

- Les plus fréquents des anticorps irréguliers.
- Le système Rhésus représente le système le plus important en clinique.
- Par ordre de fréquence décroissante : anti-D, anti-E, anti-c, anti-C et anti-e.
- L'antigène D est le plus immunogène.
- Anticorps immuns ... Grossesse, transfusion.

4.2.3 SYSTEME KELL :

4.2.3.1 les antigènes :

Antigènes principaux :

Ce système comporte deux antigènes principaux :

- K (Kell) [KEL1]
- k (Cellano) [KEL2]

4.2.3.2 les anticorps :

- C'est l'anticorps anti-K. Il est acquis par allo-immunisation (grossesse, transfusion).
- Il appartient à la classe des immunoglobulines G.
- D'autres anticorps peuvent être observés : anti-k, anti-Kpb...
- Ces derniers anticorps se développent immédiatement après la première transfusion et sont dangereux pour le receveur (accident hémolytique grave)

Ex:

Les groupes A et B sont mortelle mais le groupe o peut provoquer une hémolyse.

4.2.4 SYSTEME DUFFY:

4.2.4.1 les antigènes :

Les antigènes les plus fréquents :

- Ce sont les antigènes Fya [FY1] et Fyb [FY2].
- Chez les caucasoïdes.

4.2.4.2 les anticorps :

- Ils apparaissent par : allo-immunisation (grossesse, transfusion)
 - anti-Fya (IgG). C'est le plus fréquent mais il est très rare chez les noirs.
 - Anti-Fyb.

4.2.5 SYSTEME KIDD :

4.2.5.1 les antigènes :

- Deux antigènes ont été décrits :
 - Ag Jka [JK1] très immunogène
 - Ag Jkb [JK2].

4.2.5.2 les anticorps :

- Les anticorps sont acquis par allo-immunisation (transfusion, grossesse,...).
- Le plus fréquent est l'anticorps anti-Jka.
- L'identification de l'anticorps anti-Jka est très difficile chez les malades polytransfusés.
- C'est un anticorps qui fixe bien le complément. Il est dangereux en transfusion.
- En raison de la difficulté de son identification, sa présence doit être évoquée ou soupçonnée devant tout accident hémolytique ou transfusion inefficace, inexplicquée.

4.3 Techniques classiques

4.3.1 Groupage ABO Rhésus

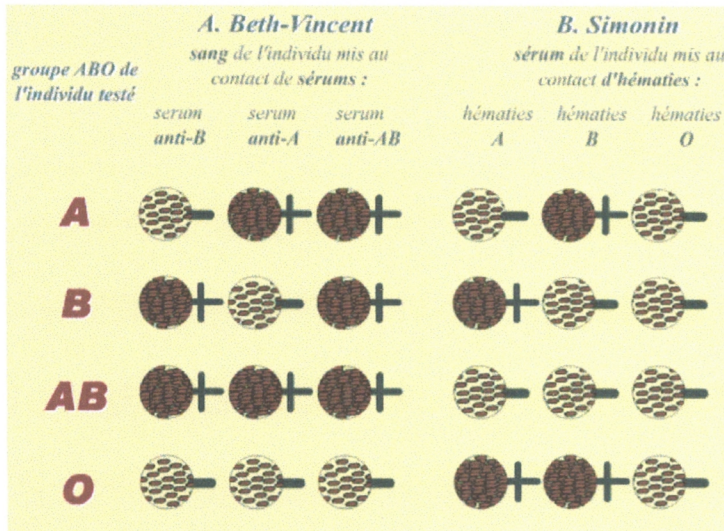


Figure 12 : Epreuves de Beth-Vincent et de Simonin.

Epreuve de Beth-Vincent. Le sang de l'individu, contenant ses globules rouges, est mis en présence de sérums tests, possédant chacun un type d'anticorps précis, dirigé contre un antigène du système ABO. Il s'agit donc d'un test d'agglutination des globules rouges avec des sérums tests.

Epreuve de Simonin. Le sérum de l'individu, contenant ses anticorps circulants, est mis en présence de globules rouges tests, appartenant chacun à un groupe antigénique précis du système ABO. Il s'agit donc d'un test d'agglutination du sérum avec des globules rouges tests. + : présence d'une agglutination. - : pas d'agglutination.

4.3.1.1 Procédure de Beth-Vincent

Epreuve qui se réalise au CTS et avant la transfusion en contrôle ultime. Cette méthode s'effectue avec des sérums test contenant des anticorps connus, afin de mettre en évidence la réaction Antigène - Anticorps. La présence ou l'absence d'agglutination permet de déterminer l'Antigène.

La réalisation du contrôle :

▪ La préparation et la vérification du matériel :

- ❖ Une plaque d'opaline ou Rhéscope.
- ❖ Une carte de contrôle pré-transfusionnel.
- ❖ Des sérums test Anti A, Anti B, Anti AB: Vérifier la date de péremption et la conservation a + 4°C.
- ❖ Un agitateur.
- ❖ Un marqueur.
- ❖ Des gants.
- ❖ Nécessaire de nettoyage.

▪ La technique :

- ❖ Inscrire sur le support: le nom, prénom, date de naissance du patient, la date du contrôle et le numéro de la poche.
- ❖ Inscrire sérum Anti B, Anti A, Anti AB sur la plaque d'opaline.
- ❖ Mettre les gants.
- ❖ Déposer une goutte de sérum test.
- ❖ Déposer une goutte de sang à coté du sérum test.
- ❖ Mélanger et bien essuyer entre chaque utilisation.
- ❖ La réaction apparaît une minute après l'agitation.
- ❖ Déterminer le groupe en fonction de l'absence ou la présence d'agglutination et vérifier que celui-ci est identique à la carte de groupe du patient et à l'étiquetage de la poche à transfuser.
- ❖ Après le passage des culots, nettoyer la plaque, si c'est une carte pré-transfusionnelle la garder sous plastique dans le dossier.

▪ Détermination du groupe :

Anti B	Anti A	Anti AB	Détermination
Pas de réaction	Agglutination	Agglutination	Groupe A
Agglutination	Pas de réaction	Agglutination	Groupe B
Agglutination	Agglutination	Agglutination	Groupe AB
Pas de réaction	Pas de réaction	Pas de réaction	Groupe O

▪ **Particularités :**

- Patients O dangereux : Ils possèdent des anticorps immuns apparus à la suite de stimulations antigéniques variés (ex: Transfusion, grossesse).
- Les poches étiquetées O dangereux ne peuvent être utilisées que pour des patients du groupe O.

4.3.1.2 Procédure de Simonin

Elle se réalise au CTS à l'aide d'hématies test connues. Elle permet d'identifier les Anticorps naturels réguliers du plasma

Hématies A	Hématies B	Détermination
Pas de réaction	Agglutination	Groupe A
Agglutination	Pas de réaction	Groupe B
Pas de réaction	Pas de réaction	Groupe AB
Agglutination	Agglutination	Groupe O

4.3.1.3 Détermination de Rhésus-standard

- Dans le système Rhésus il y a D, C, E, c, e.
 - ❖ Rh+ = Présence de l'Antigène D.
 - ❖ Rh- = Absence de l'Antigène D.
- Il y a deux techniques de détermination du Rhésus :
 - ❖ L'une a une température de 37° à l'aide d'un Rhésuscope (Plaque d'opaline chauffée a 37°) + sérum test Anti D.
 - ❖ L'autre a température ambiante avec sérum Anti D spécifique dit à froid.

4.3.1.3.1 Réalisation :

- Brancher et allumer le Rhésuscope.
- Mettre en contact le sérum test Anti D avec une goutte de sang du patient, mélanger avec un agitateur, attendre 2 à 3 minutes et déterminer le rhésus.

4.3.1.3.2 Détermination :

Sérum Anti D	Détermination
Agglutination	RH+
Pas de réaction	RH-

4.3.1.3.3 Particularités :

- Dans le système rhésus il n'existe pratiquement pas d'anticorps naturels mais des anticorps immuns.
- L'allo-immunisation est soit transfusionnelle soit fœto-maternelle.
- La circulaire du 17 juillet 1985 définit, que pour établir une carte transfusionnelle d'un patient il faut deux prélèvements différents, deux techniciens déterminent à l'aide des deux techniques et deux séries de réactifs.

4.3.2 Phénotype Rhésus Kell

4.3.2.1 But :

- Identifier à la surface des hématies les antigènes de groupes sanguins autres qu' ABO-Rh.
- Les systèmes de groupes sanguins les plus étudiés sont :
 - ❖ le système Rhésus : antigènes C, E, c, e ;
 - ❖ le système Kell : antigène K ;
 - ❖ le système Duffy : antigènes Fya, Fyb ;
 - ❖ le système Kidd : antigènes Jka, Jkb ;
 - ❖ les systèmes MNSs, Lewis, P, etc.

4.3.2.2 Principe :

La détermination des phénotypes érythrocytaires est basée sur le principe de l'agglutination des hématies par des anticorps (sérum tests) reconnaissant des antigènes spécifiques à leur surface.

4.3.2.3 Réalisation pratique

Prélèvement de 2 à 3 ml de sang anti coagulé (EDTA ou citrate).

Au laboratoire, les sérum tests standardisés sont utilisés selon les techniques adaptées à chaque antigène et préconisées par les fournisseurs.

4.3.2.4 Résultats :

La fréquence de chaque antigène ou groupe d'antigènes (phénotype) dans un système donné est variable.

- Par exemple, pour le système Rhésus :
 - ❖ Ccee : 35 p. 100 ;
 - ❖ CCee : 18 p. 100 ;
 - ❖ ccee : 15 p. 100 ;
 - ❖ ccEe : 12 p. 100 ;
 - ❖ CcEe : 12 p. 100.
- Pour le système Kell :
 - ❖ K + : 10 p. 100 ;
 - ❖ K - : 90 p. 100.

4.3.2.5 Interprétation et intérêt :

- La détermination du phénotype Rh-Kell est obligatoire dans le cadre de la prévention de l'allo-immunisation transfusionnelle :
 - ❖ chez les malades devant recevoir de nombreuses transfusions ;
 - ❖ chez les sujets de sexe féminin non ménopausée ;
 - ❖ lors de l'étape d'identification d'un anticorps irrégulier ;
 - ❖ lorsqu'une transplantation est prévue.
- Elle est également obligatoire dans le cadre des examens prénatals. Les autres phénotypes sont éventuellement déterminés chez les polytransfusés potentiels et en cas d'immunisation.
- On peut également utiliser la détermination des phénotypes érythrocytaires parmi les batteries de tests effectués lors de recherches de paternité, des diagnostics de gémellité homozygote, les études génétiques.

4.3.3 Recherche d'anticorps anti-érythrocytaires

La RAI est devenue une analyse incontournable pour assurer :

- **La prévention et le diagnostic des incompatibilités anti-érythrocytaires en transfusion sanguine :**

Les données de l'hémovigilance confirment la fréquence élevée de ces incidents hémolytiques, la RAI systématique pré-transfusionnelle doit contribuer à limiter la fréquence des ces hémolyses immédiates ou différées.

- **La surveillance des incompatibilités foeto-maternelles (IFM) érythrocytaires non ABO en obstétrique :**

La prévention des incompatibilités RH1 chez les femmes RH 1 par les « immunoglobulines anti-D » a permis de diminuer la fréquence de ces allo – immunisations anti-RH1, mais elles n'ont pas totalement disparues. L'antigène RH1 du système RH n'est pas le seul concerné et d'autres antigènes : RH4, RH3, KEL1... peuvent être impliqués Le diagnostic précoce et le suivi de l'évolution des anticorps peuvent permettre d'améliorer le pronostic de ces IFM.

4.3.3.1 Principe

- La RAI a pour objectif la mise en évidence et l'identification des anticorps anti-érythrocytaires en mettant en présence le sérum (ou le plasma à étudier) avec une gamme d'hématies-tests O phénotypées dans la plupart des systèmes de groupes sanguins.
- La présence d'anticorps se traduit classiquement par une réaction d'agglutination.

4.3.3.2 Indication

- Les anticorps anti-érythrocytaires sont actuellement encore responsables d'accidents transfusionnels ou fœto-maternels qui sont d'autant plus regrettables qu'une bonne organisation de détection de ces anticorps a montré que ces accidents pouvaient être évités. La RAI doit être réalisée sur un prélèvement frais et conservé dans de bonnes conditions à 4 °C. Elle a une validité maximum de 3 jours.

Elle est indiquée :

- chez tout patient susceptible d'être transfusé,
- avant toute transfusion ou toute nouvelle série de transfusions,
- après transfusion (dans le cadre du suivi d'hémovigilance),
- chez les patients polytransfusés, en bonne place au cours des séries de transfusion,
- après transfusion dans le cadre du suivi de l'hémovigilance.
- chez la femme enceinte (examens médicaux pré et post-natals).

Cette recherche est systématique :

- au moins à 2 reprises chez les femmes enceintes de phénotype RH1 primigeste et sans antécédent transfusionnel,
 - ❖ Avant la fin du 3 mois (1^{er} trimestre examen prénatal),
 - ❖ Au cours des 8 ou 9 mois (6 ou 7 examen prénatal), de préférence au 9 mois si la recherche était négative au 1 examen prénatal ;
- au moins à 4 reprises :
 - ❖ Chez les femmes de phénotype RH1 primigeste avec antécédent transfusionnel,
 - ❖ Chez les femmes de phénotype RH1 à partir de la 2 grossesse (en raison de l'hémorragie fœto-maternelle à l'accouchement),
 - ❖ Chez les femmes de phénotype RH :
 - avant la fin du 3 mois de la grossesse (1 examen prénatal),
 - au cours du 6 mois (4 examen prénatal),
 - au cours du 8 mois (6 examen prénatal),
 - au cours du 9 mois (7 examen prénatal),
 - à l'accouchement
 - ❖ Chez les femmes de phénotype RH : 1 avant l'injection d'« immunoglobuline anti-D »,
 - ❖ Chez l'ensemble des femmes en cas de besoin transfusionnel,
- Dans les huit semaines suivant l'accouchement.

Si la RAI est positive, l'identification des anticorps est obligatoire. En cas de présence d'anticorps, une nouvelle programmation des RAI doit être effectuée tous les mois jusqu'à l'accouchement. En cas de présence d'anticorps susceptibles d'entraîner des accidents d'IFM, la RAI avec identification et titrage (et dosage pondéral pour les anti-RH) doit être effectuée à périodes rapprochées de 3 à 4 semaines, voire 2 semaines à partir de la 21 semaine d'aménorrhée.

4.3.3.3 Les différents anticorps anti-érythrocytaires

4.3.3.3.1 Les anticorps naturels :

Les anticorps naturels préexistent en dehors de toute stimulation fœto-maternelle ou ils sont relativement peu souvent actifs à 37 °C et ne sont pas dangereux pour le fœtus puisqu'ils sont de nature IgM, donc incapables de traverser la barrière placentaire. Cependant, certains d'entre eux possèdent une amplitude thermique élevée et pourraient être dangereux en transfusion. Ceci montre l'intérêt d'une RAI avant toute première transfusion. Ils sont généralement agglutinants en milieu salin.

Les spécificités les plus fréquentes sont : anti-LE1, anti-LE2, anti-P1, anti-H, anti-MNS1.

4.3.3.3.2 Les anticorps immuns :

Les anticorps immuns résultent d'une stimulation fœto-maternelle ou transfusionnelle. Ils sont de nature IgG, toujours actifs à 37 °C et rarement agglutinants en milieu salin. Ils sont toujours dangereux en transfusion et peuvent l'être pour le fœtus s'il possède l'antigène correspondant. Les spécificités les plus fréquentes sont : anti-RH1 (RH2 RH3), anti-RH3, anti-KEL1, anti-RH4, anti-FY1, anti-JK1, anti-MNS3...

TECHNIQUES PRÉFÉRENTIELLES DE MISE EN ÉVIDENCE DES ANTICORPS IMMUNS	
Anti-RH	IAT ET « enzyme »
Anti-KEL	IAT
Anti-FY	IAT
Anti-JK	IAT
Anti-MNS3, 4	IAT

IAT: test indirect à l'anti-globuline

4.3.3.4 La réaction d'agglutination

- La réaction d'agglutination comporte deux étapes :
 - ❖ la fixation de l'anticorps sur son antigène spécifique : elle a toujours lieu
 - ❖ l'agglutination des hématies sensibilisées par les anticorps : elle ne se produit pas toujours.
- La réaction d'agglutination fait intervenir plusieurs facteurs que sont la classe d'immunoglobuline de l'anticorps, la concentration en anticorps, le nombre de sites antigéniques à la surface des hématies-tests et leur localisation, la température, le pH et le potentiel Zêta qu'il faut diminuer pour provoquer l'agglutination :
 - ❖ soit en diminuant la charge électro-négative des érythrocytes due à la présence de groupements carboxyliques des acides sialiques, en les traitant par les protéases ;
 - ❖ soit en modifiant la composition du milieu, en jouant sur la force ionique ou la constante diélectrique ;

- Un milieu de basse force ionique intervient sur la première étape de la réaction antigène-antigène spécifique. Par contre, pour obtenir une agglutination, il faut revenir à une force ionique normale.
- L'agglutination directe des hématies sensibilisées concerne essentiellement les anticorps de classe IgM, mais tous n'en sont pas capables. L'exemple le plus typique est celui des anti-LE, en raison du faible nombre d'antigènes LE adsorbés à la surface des érythrocytes.
- Classiquement les anticorps de nature IgG ne sont pas agglutinants en milieu salin. En raison de leur importance tant sur le plan de la sécurité transfusionnelle que le risque materno-fœtal, il est nécessaire d'utiliser des artifices techniques pour les mettre en évidence : traitement des érythrocytes par les enzymes protéolytiques, addition de macromolécules (albumine, dextran, PVP, Ficoll...), test indirect à l'anti-globuline (IAT).
- Le traitement des hématies par les enzymes protéolytiques améliore la mise en évidence de certains antigènes comme ceux des systèmes RH, LE, mais aussi certains auto-anticorps « chauds » ou « froids ». A l'inverse certains antigènes sont totalement détruits : c'est le cas des antigènes FY1 et FY2 du système FY, MNS1, MNS2, MNS3 et MNS4 du système MNS, XG1 du système XG... Ce phénomène limite les performances de la technique enzymatique qui ne peut pas être utilisée isolément.
- Enfin, comme il l'a été observé, une mauvaise conservation des hématies peut entraîner une contamination bactérienne avec production d'enzymes protéolytiques et destruction partielle ou totale des antigènes précités. Il en est de même lors de la sénescence des érythrocytes, qui de façon physiologique sécrètent de la neuraminidase, entraînant la même altération de ces antigènes.
- Il est donc fondamental de pratiquer des Contrôles Qualités Internes quotidiens (CQI) permettant de s'assurer de la stabilité des antigènes des gammes d'hématies-tests de dépistage ou d'identification de la réception à la péremption.
- La technique de référence pour la RAI est l'IAT. Il s'agit d'une technique d'agglutination artificielle qui permet de visualiser la réaction antigène-anticorps grâce à l'utilisation d'une anti-globuline humaine.

4.3.3.5 Modalités pratiques

- La RAI est un examen de réalisation délicate, en effet, elle fait intervenir plusieurs composants réactionnels :
 - ❖ le sérum des patients, qui contient, à l'inverse des réactifs standardisés et puissants, des Ac de force très variable, parfois difficile à détecter,
 - ❖ la puissance des différents antigènes de groupes sanguins varie beaucoup d'un type d'hématie-test à un autre,
 - ❖ les anti-globulines sont des réactifs fragiles et difficiles à préparer.

- Pour le dépistage et l'identification, la méthodologie technique repose sur la mise en œuvre d'un test indirect à l'anti-globuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter, sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale.
- Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'allo-anticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immuno-hémolytiques transfusionnels.

4.3.3.5.1 Les différents procédés

- Plusieurs procédés sont utilisables : les techniques traditionnelles en tube ont été remplacées par les nouveaux procédés : colonnes de filtration, immuno-adhérence.
- Les deux derniers sont préférables car ils présentent l'avantage de limiter les interventions manuelles et donc les risques d'erreur liés à certaines étapes de la méthodologie qui se trouve standardisée. Par ailleurs, ils sont entièrement automatisables et informatisables.
- Quel que soit le procédé retenu, les réactifs doivent posséder un numéro d'enregistrement. et un numéro de conformité.
- Les nouveaux procédés de filtration permettent d'éliminer les deux causes d'erreurs essentielles dans la réalisation du test indirect à l'anti-globuline : les lavages qui sont souvent défectueux et l'omission d'addition d'anti-globuline.
- Dans les techniques de filtration, après la phase d'incubation des hématies-tests avec les sérums, les hématies plus denses que les immunoglobulines plasmatiques pénètrent, lors de la centrifugation, dans la colonne de gel ou de microbilles, et peuvent réagir avec l'anti-globuline incorporée dans la colonne, en cas de sensibilisation. La phase plasmatique reste au-dessus de la colonne. Les étapes de centrifugation et de lecture restent néanmoins critiques.
- Le biologiste se doit de choisir les procédés les plus performants, compte tenu de l'impact des résultats sur les risques transfusionnels ou obstétricaux et leur prise en charge.

4.3.3.5.2 La réalisation de la RAI

- **Une première étape de dépistage des anticorps :**
La législation :
- ❖ oblige d'utiliser une gamme de dépistage comportant au moins trois hématies-tests O phénotypées qui doit permettre la détection des anticorps correspondants aux antigènes : RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL1 (K), KEL2 (Cellano), KEL4 (Kpb), FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1 (Lea), LE2 (Leb), P1, LU2 (Lub).

- ❖ Les phénotypes RH suivants doivent être obligatoirement représentés :
RH : 1,2,-3,-4,5 ;
RH : 1,-2,3,4,-5 ;
RH : -1,-2,-3,4,5.
- ❖ De plus, une expression phénotypique « homozygote » doit être respectée pour les antigènes FY1, JK1, JK2, MNS3 et recommandée pour les antigènes FY2 et MNS4.
- ❖ En aucun cas ces hématies ne feront l'objet de mélange.
- ❖ indique comment exprimer les résultats :
 - en cas de dépistage négatif : absence d'anticorps contre les antigènes étudiés,
 - en cas de dépistage positif : présence d'anticorps anti-érythrocytaire dont la spécificité reste à déterminer,
- ❖ le résultat doit comporter par ailleurs les antigènes testés, le nombre d'hématies-tests utilisé et les techniques utilisées.
- **Une seconde étape d'identification :**
- ❖ Qui consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents en confrontant la distribution des réactions positives et négatives obtenues avec la distribution des antigènes sur les gammes d'hématies-tests utilisées.
- ❖ Cette étape est réalisée sur un échantillon non décanté et non ouvert si possible, si elle est mise en œuvre par un laboratoire différent de celui qui a réalisé le dépistage.
- ❖ Cette étape repose sur l'utilisation, outre la gamme de dépistage, d'au moins 10 hématies-tests. L'ensemble de ces hématies de groupe O doit comporter les antigènes suivants :
RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, RH6, RH8 (Cw), KEL1, KEL2, KEL3 (Kpa), KEL4, FY1, FY2, JK1, JK2, MNS1, MNS2, MNS3, MNS4, LE1, LE2, P1, LU1 (Lua), LU2.
- ❖ Les phénotypes suivants doivent être représentés au moins sur deux hématies : KEL1, FY : 1,-2, FY : -1,2, JK : 1,-2, JK : -1,2, MNS : 3,-4, MNS : -3,4, P : -1.
- ❖ Cette phase doit permettre l'identification d'un anticorps courant isolé ainsi qu'une orientation dans cette identification des mélanges d'AC.
- ❖ L'interprétation des réactions positives et négatives observées est complexe et nécessite qualification, formation et expérience certaine.

4.3.3.5.3 Les différentes techniques de la RAI

4.3.3.5.3.1 Le test indirect à l'anti-globuline :

Le test indirect à l'anti-globuline (IAT) est la réaction fondamentale dans la recherche des anticorps anti-érythrocytaires. Il existe plusieurs variantes qui ont leurs avantages propres.

4.3.3.5.3.1.1 Le test indirect normal :

- **Lavage** : la gamme d'hématies-tests doit être lavée trois fois en solution saline 0,15M et mise en suspension à 3 % en solution saline 0,15M.
- **Sensibilisation** : mettre en présence dans un tube à hémolyse identifiée 100 ML de sérum à tester 50 ML de la suspension globulaire. Laisser incubé à 37°C durant 35 min au bain-marie ou 40 min à l'étuve.
- **Lavage** : les hématies sensibilisées doivent de nouveau être lavées trois fois en solution saline en décantant tout le surnageant après chaque lavage.
- **Phase anti-globuline** : ajouter dans chaque tube 100 ML d'anti-globuline, puis centrifuger pendant 1 min à 130 g. La lecture est macroscopique ou microscopique.

4.3.3.5.3.1.2 Le test indirect en basse force ionique :

L'utilisation d'un milieu basse force ionique (BFI) entraîne une réduction du temps d'incubation à 12 min au bain-marie et à 15 min à l'étuve.

4.3.3.5.3.1.3 Le test indirect par filtration (gel ou billes) :

Le test indirect par filtration doit être effectué selon les recommandations du producteur. C'est le test le plus performant, le plus sécurisant et le plus utilisé de nos jours.

4.3.3.5.3.1.4 Le test indirect en phase solide :

Le test indirect en phase solide doit être effectué selon les conditions techniques décrites par le producteur.

4.3.3.5.3.2 Le test aux enzymes protéolytiques :

Le traitement des hématies-tests lavées de la gamme doit être réalisé selon les conditions précisées par le producteur sur la notice d'utilisation. Les temps de traitement doivent être scrupuleusement respectés et suivis immédiatement de lavages préconisés.

4.3.3.5.3.2.1 Technique par filtration :

Le test par filtration sur hématies traitées par les enzymes doit être effectué selon les procédures validées et décrites par le producteur.

4.3.3.5.3.2.2 Technique en phase solide :

Le test en phase solide doit être effectué selon les conditions techniques décrites par le producteur.

4.3.3.6 Interprétation et rendu des résultats

- Le dépistage est soit négatif, soit positif. Si le dépistage est négatif, la RAI est négative.
- Si le dépistage est positif, il convient de déterminer la spécificité des anticorps.
- L'identification de la spécificité nécessite de trouver une relation entre les réactions positives et négatives observées avec la présence ou l'absence d'un antigène sur les hématies testées correspondant à l'anticorps suspecté.
- Dans tous les cas, il faudra, à minima, procéder :
 - ❖ à une validation phénotypique pour vérifier l'absence de l'antigène correspondant à l'anticorps suspecté,
 - ❖ au phénotypage RH-KEL1, puisque tout patient possédant (ou ayant possédé) un anticorps doit être transfusé avec du sang qualifié phénotypé et compatibilisé.
- L'identification fait appel aux connaissances des fréquences des différents phénotypes dans tous les systèmes de groupes sanguins, des anticorps les plus fréquemment rencontrés en raison de l'immunogénicité des antigènes correspondants, des variations de la force antigénique d'un donneur d'hématies-tests à un autre, des différents types de réactions d'agglutination en fonction des systèmes concernés, des effets de dose de certains anticorps, des techniques préférentielles de mise en évidence des anticorps en fonction des procédés utilisés...
- Plusieurs situations peuvent être rencontrées :
 - ❖ **L'identification la plus simple est celle qui met en évidence un anticorps unique à condition :**
 - qu'il soit en concentration suffisante pour agglutiner toutes les hématies testées quelle que soit leur expression phénotypique homozygote ou hétérozygote pour un antigène donné,
 - que le nombre de réactions positives observées soit suffisant, sinon, il faudra tester le sérum sur plusieurs hématies-tests supplémentaires possédant l'antigène concerné.
 - ❖ **Les résultats de l'étude des réactions positives et négatives obtenues avec les hématies-tests de la gamme d'identification font suspecter un mélange d'anticorps.**
 - Chacune des spécificités suspectées doit être confirmée de façon séparée en utilisant plusieurs gammes différentes d'hématies-tests d'identification.
 - Dans certaines situations, il est parfois nécessaire de procéder à des adsorptions du sérum sur des hématies-tests sélectionnées, possédant l'un des antigènes concernés par le mélange d'anticorps.

- On procède ensuite à une élution secondaire de l'anticorps fixé sur ces hématies, pour obtenir l'isolement d'un premier anticorps à l'état libre.
- Le sérum adsorbé sera de nouveau testé sur les différentes gammes d'hématies-tests d'identification pour confirmer la ou les spécificité(s) du ou des anticorps non adsorbé(s).
- ❖ **Le sérum testé agglutine toutes les hématies-tests des différentes gammes d'identification.**

Dans ce cas, il peut s'agir là encore d'un mélange complexe d'anticorps, d'un anticorps dirigé contre un antigène de grande fréquence ou « public », ou d'un auto-anticorps.
- On procède alors à la réalisation du témoin autologue :
 - ❖ s'il s'avère positif, il convient d'adsorber l'auto-anticorps pour déceler et identifier un éventuel allo-anticorps masqué. Les modalités d'adsorption dépendent des antécédents transfusionnels ou obstétricaux proches ou lointains (adsorption homologue avec des hématies-tests dépourvues de l'ensemble des antigènes immunogènes, ou auto-adsorption) ;
 - ❖ s'il s'avère négatif, il s'agit d'un problème encore plus complexe concernant l'identification correcte des anticorps, qui nécessite de disposer de gammes d'hématies tests (conservées en azote à -160°C) informatives ou dépourvues d'antigènes de grande fréquence, mais aussi la disponibilité d'unités de sang rare, en cas de besoin transfusionnel.
- L'étude des problèmes complexes d'identification précités relève d'un laboratoire référent régional de l'établissement français du sang qui fera appel au CNRGS.
- Dans tous les cas, les résultats de RAI positive doivent mentionner les spécificités des anticorps identifiés et la validation du phénotype du patient.
- Le résultat sera complété par une mention biologique faisant état de l'obligation de demander, en cas de besoin transfusionnel, du sang phénotypé RH-KEL1 a minima et qualifié compatible.
- Pour les anticorps dirigés contre un antigène de grande fréquence, un programme de transfusion autologue programmée pourra éventuellement être envisagé en fonction de l'état du patient, sinon, il faudra recourir au CRNGS.
- S'il s'agit d'une femme enceinte, il sera fait état du risque d'incompatibilité fœto-maternelle et de la nécessité de sa prise en charge par un laboratoire référent régional de l'EFS en coordination, initialement, avec un centre spécialisé dans le diagnostic anténatal, puis secondairement avec le centre régional de thérapie fœtale.

4.3.4 Epreuve directe de compatibilité au laboratoire

- L'épreuve directe de compatibilité au laboratoire des produits sanguins labiles (PSL) érythrocytaires, fondamentale pour la prévention des accidents immuno-hémolytiques de la transfusion sanguine, est l'examen immuno-hématologique pré-transfusionnel le plus long et le plus délicat.
- L'EDC est obligatoire en cas de transfusion prévue pour les patients ayant développé un allo-anticorps, les nouveau-nés présentant un test direct à l'anti-globuline positif ou issus d'une mère possédant des anticorps anti-érythrocytaires autres que des anti-A ou anti-B, les fœtus et les patients possédant un phénotype érythrocytaire rare.
- L'EDC doit être pratiquée avec des unités qualifiées phénotypées RH-KEL1 à minima et antigéno-compatibles avec les allo-Ac présents chez le patient.
- L'EDC est un examen biologique de réalisation techniquement complexe qui s'adresse à des patients que l'on pourrait dénommer « receveurs dangereux ». Elle devrait pour ces deux raisons être automatisée.

4.3.4.1 Rappels des modalités techniques de l'EDC

- L'EDC, examen complémentaire de la RAI consiste à tester le sérum ou le plasma du receveur vis-à-vis des hématies contenues dans la tubulure du concentré globulaire à transfuser.
- L'EDC s'effectue après :
 - ❖ vérification des antécédents du patient : groupes sanguins ABO-RH1, phénotype RH-KEL1, phénotype étendu, RAI, test direct à l'anti-globuline (DAT) et notion d'incident transfusionnel...
 - ❖ recherche et identification des anticorps anti-érythrocytaires qui doivent être réalisées sur le même prélèvement que celui utilisé pour réaliser l'EDC,
 - ❖ vérification technique de la compatibilité des groupes sanguins ABO du receveur et de celui des unités à transfuser,
 - ❖ vérification de l'antigéno-compatibilité entre le phénotype du receveur, ses anticorps éventuels (ou antécédents) et les unités à compatibiliser.
- L'EDC est effectuée selon les mêmes conditions techniques que la RAI après sélection des unités à comptabiliser et la préparation des hématies de la tubulure de l'unité à transfuser.
- Une des difficultés du test réside dans la sécurisation de l'identification positive de la tubulure et du tube secondaire utilisé dans le test, à partir du numéro codé en barres de l'unité de PSL.

- Il est donc souhaitable de :
 - ❖ prendre les mesures indispensables au maintien de la chaîne du froid,
 - ❖ d'identifier la tubulure du PSL à l'aide d'une étiquette codée en barres disponible sur la poche, avant de la désolidariser de la poche,
 - ❖ dupliquer le numéro codé en barres sur des étiquettes (ou utiliser des étiquettes disponibles sur la poche) qui seront apposées sur les tubes secondaires et les supports utilisés pour le test,
 - ❖ de vérifier « informatiquement » l'étiquetage secondaire du tube et du support par rapport au concentré globulaire.
 - ❖ Pour des raisons évidentes d'hygiène et de sécurité, il est fortement recommandé d'utiliser des dispositifs à usage unique pour perforer la tubulure.
 - ❖ Comme pour toute analyse de biologie médicale, il est impératif de valider l'EDC à l'aide de contrôles de qualité internes (CQI). C'est une démarche qualité de type préventif qui permet, en vérifiant le fonctionnement du processus analytique interactif (matériel-Technique-réactif) dans son ensemble, la détection de toute anomalie, erreur ou altération des résultats. Ce CQI devrait être effectué à minima une fois par jour à l'aide de deux anticorps faibles : un anticorps actif uniquement en test indirect à l'anti-globuline (IAT) (anti-FY1 par exemple) et un anticorps actif uniquement en technique enzymatique (anti-RH) par exemple.
- L'obtention des résultats conformes à ceux attendus permet au personnel technique, sous la responsabilité du biologiste, d'effectuer la validation analytique. En cas de résultats non conformes, des procédures doivent préciser les mesures à prendre. Le responsable du laboratoire doit être immédiatement informé de toute anomalie des résultats des CQI pour analyser les causes du dysfonctionnement et y apporter une mesure corrective adaptée et rapide. L'ensemble des résultats obtenus avec les CQI et les éventuelles mesures correctives prises en cas d'anomalie doivent être consignés et archivés.

4.3.4.2 Interprétation

- En cas de réaction positive, l'unité est incompatible. S'il s'agit d'auto-anticorps et après avoir vérifié l'absence d'allo-anticorps masqué, l'unité peut dans certains cas être attribuée.
- En cas de réaction (-), l'unité est compatible. Il convient bien évidemment d'avoir vérifié la conformité des résultats obtenus avec les CQI.

4.3.4.3 Arbres décisionnels

Plusieurs situations biologiques schématiques peuvent être rencontrées. Elles sont en cours d'étude au sein du groupe Immuno-Hématologie de la Société Française de Transfusion Sanguine et seront publiées prochainement dans Transfusion Clinique et Biologique. Nous évoquons ici simplement la conduite transfusionnelle à tenir en présence des allo-anticorps les plus fréquents.

Présence dans le sérum d'un anticorps immun ou antécédent d'allo-immunisation :

- **il s'agit d'un anticorps du système RH : anti-RH1,-RH2,-RH3,-RH4,-RH5 :**

L'EDC sera réalisée avec du sang qualifié phénotypé RH-KEL à minima.

- **il s'agit d'un allo-anticorps dirigé contre un autre antigène d'un autre système (anti-FY1,-FY2,-JK1,-JK2,-MNS3,-MNS4) ou d'un mélange d'anticorps :**

L'EDC sera réalisée avec du sang qualifié phénotypé RH-KEL1 et a minima phénotypé étendu antigéno-compatible avec le phénotype du patient et son anticorps.

- **il s'agit d'un auto-anticorps :**

L'EDC doit être réalisée après adsorption de l'auto-anticorps. Dans ce cas, il est vivement conseillé de transfuser avec du sang phénotypé RH-KEL1.

- **il s'agit d'un fœtus ou d'un nouveau-né issu d'une maman allo-immunisée :**

L'EDC sera pratiquée avec le sérum maternel ou à défaut celui du nouveau-né. Quel que soit le groupe ABO-RH1 du nouveau-né et de sa mère, l'EDC se pratiquera avec des concentrés globulaires de groupe O non isogroupe et du plasma sécurisé de groupe AB. En fonction de la spécificité des anticorps maternels, il sera utilisé du sang phénotypé RH-KEL1 a minima ou phénotypé étendu antigéno-compatible avec le phénotype de l'enfant et les anticorps maternels.

- **il s'agit d'un nouveau-né dont la RAI maternelle est négative, mais il présente un DAT positif (anti-privé) :**

L'EDC sera pratiquée avec le sérum maternel ou à défaut celui du nouveau-né. Quel que soit le groupe du nouveau-né et de sa mère, l'EDC se pratiquera avec du sang de groupe O non isogroupe phénotypé RH-KEL1.

4.4 Validation analytique en immuno-hématologie

La qualité et la fiabilité des analyses d'immuno-hématologie reposent en grande partie sur les conditions d'utilisation des réactifs au laboratoire. Pour s'assurer de leur conformité, ces derniers, doivent avant leur utilisation, faire l'objet d'une validation interne adaptée.

Au cours de leur utilisation, les CQI permettront de s'assurer du maintien de leur performance au sein du système « matériel-réactifs-technique ».

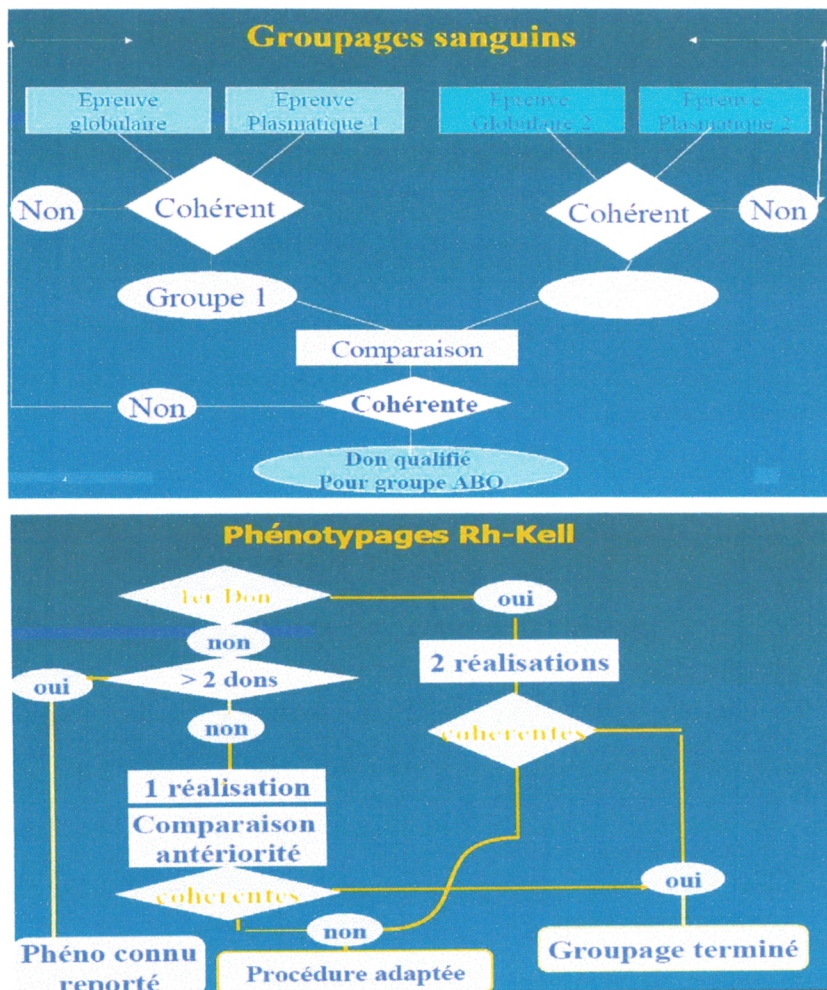


Figure 13 : Algorithme Décisionnel groupage sanguin.

4.4.1 Typages érythrocytaires :

La validation analytique du typage érythrocytaire repose :

- sur les résultats attendus des CQI,
- la concordance pour le groupage sanguin ABO entre les résultats des recherches des antigènes globulaires et des anticorps plasmatiques,
- la négativité des témoins RH et KEL1,
- l'absence de fausses réactions positive ou négative, d'image de double population, d'agglutination anormalement faible, et la non-absence de 2 antigènes antithétiques,
- la concordance des résultats avec les 2 lots différents de réactifs, et entre les déterminations effectuées sur 2 prélèvements différents (ou avec l'antériorité).

4.4.2 RAI et l'EDC :

La validation analytique de la RAI repose sur :

- les résultats attendus des CQI,
- l'étude d'un nombre suffisant d'hématies-tests pour s'assurer que la distribution des réactions observées n'est pas due au hasard, et notamment, s'assurer de l'absence de tout autre anticorps que celui identifié, à l'aide d'hématies d'expression homozygote pour les principaux antigènes immunogènes en particulier,
- la validation phénotypique consistant à vérifier l'absence de l'antigène correspondant à l'anticorps suspecté,
- la détermination du phénotype RH-KEL1 en cas de RAI positive, puisque tout patient possédant un anticorps anti-érythrocytaire doit être transfusé avec du sang de phénotype RH-KEL1 antigéno-compatible et soumis à une EDC,
- la détermination des groupes sanguins ABO-RH1 pour pouvoir établir une carte de groupes sanguins ou compléter celle existante.

4.4.3 Test direct à l'anti-globuline :

La validation du test direct à l'anti-globuline repose sur les résultats attendus des CQI et de la négativité du témoin réactif.

4.5 Nouvelles techniques en immuno-hématologie

4.5.1 Techniques en microplaques

4.5.1.1 Aspects théoriques :

Le principe repose sur l'adaptation des réactions d'agglutination en tube au support microplaque de 96 puits à fond rond. Cette technique est parfaitement bien adaptée depuis de nombreuses années aux typages érythrocytaires y compris celui des patients.

4.5.1.2 Avantages :

- Evolution de réactifs adaptés à ce support permettant un gain de spécificité-sensibilité par rapport aux techniques conventionnelles.
- Diminution de la consommation des réactifs et des échantillons.
- Réduction de l'encombrement de paillasse.
- Gain de temps ; automatisation possible.
- Pré-répartition des réactifs possible : outre le gain de temps, la pré répartition des réactifs contribue à améliorer la fiabilité des résultats en supprimant des risques d'erreurs liés à l'oubli ou l'écart de distribution.
- Hygiène et sécurité.

4.5.1.3 Inconvénients :

L'agitation : Si la microplaque offre de grandes possibilités de standardisation par rapport aux techniques conventionnelles, l'agitation demeure une phase critique.

4.5.2 Techniques en filtration

4.5.2.1 Aspects théoriques :

Cette méthode consiste à détecter une agglutination par filtration des hématies au travers d'une micro-colonne contenant un milieu défini. Trois types de procédés sont couramment mis en œuvre :

4.5.2.1.1 Le gel test :

4.5.2.1.1.1 Typage et détection d'Ac par test indirect à l'anti-globuline :

Dans ces conditions le milieu contient de l'anti-globuline humaine et les particules de gel fonctionnent comme un filtre qui arrête, après centrifugation, les hématies sensibilisées in vitro par l'anticorps spécifique et laisse passer celles qui ne le sont pas.

4.5.2.1.1.2 Typage par agglutination en solution saline 0,15 M :

Dans ces conditions le milieu contient un sérum test et les hématies portant l'antigène correspondant seront arrêtées alors que des hématies dépourvues de cet antigène traverseront le gel sans s'y arrêter.

4.5.2.1.2 Les microbilles de verre :

Comme pour le gel-test, en fonction des réactifs présents dans le milieu, les microbilles peuvent piéger de la même façon des hématies agglutinées et des hématies sensibilisées.

4.5.2.1.3 Les colonnes d'affinité :

- Dans ce procédé, un ligand, telle que la protéine A ou G qui se fixe spécifiquement au fragment Fc des Ig G, est associé à un gel.
- Ce ligand peut ainsi capturer des hématies sensibilisées lors de leur passage au travers de la colonne.
- De même un anticorps spécifique, préalablement fixé sur le ligand, peut arrêter des hématies porteuses de l'antigène correspondant.

4.5.2.2 Avantages :

- Sensibilité.
- Absence de lavage.
- Stabilité de la phase réactionnelle.
- Standardisation des phases d'exécution technique et de lecture.
- Pré-répartition des réactifs.
- Faible quantité des réactants.
- Automatisation possible.

4.5.2.3 Inconvénients :

- Risque de non détection de certaines agglutinations très faibles et notamment lors de l'épreuve plasmatique du groupage ABO.
- Les doubles populations ne sont pas toujours visibles par piégeages de petites quantités d'hématies libres dans l'agglutinat bloqué dans la partie supérieure de la colonne.
- Excès de « sensibilité » en technique enzymatique.
- Non applicable à certains champs d'application analytique.

4.5.3 Alternatives actuelles aux techniques d'agglutination

4.5.3.1 Technique en phase solide :

4.5.3.1.1 Aspects théoriques :

- Le principe repose sur l'utilisation de microplaque avec des hématies pré-fixées ou fixées extemporanément.
- Après addition du sérum-test, la microplaque est incubée, puis sont effectuées des lavages en solution saline 0,15 M pour éliminer les protéines non spécifiquement fixées. Les anticorps fixés sont ensuite révélés par immuno-adhérence en ajoutant des hématies révélatrices sur lesquelles est fixée de l'anti-globuline humaine anti- IgG.

4.5.3.1.2 Avantages :

- Gain de temps : absence de centrifugation, de lavage et de répartition d'hématies révélatrices pour la technique utilisant le champ magnétique.
- Automatisation possible.

4.5.3.1.3 Inconvénients :

- Nécessité d'un apprentissage spécifique de la lecture lors des formations initiales.
- Sensibilité au pH de la solution de lavage : le pH de la solution de lavage doit être strictement compris entre 6.6 et 7.2 sous peine d'obtention de réactions faussement positives ou négatives.
- Absence de détection des anticorps de nature IgM posant des difficultés pour l'épreuve plasmatique du groupage ABO.

4.5.3.1.4 Autres alternatives techniques :

D'autres techniques peuvent être mises en œuvre pour détecter la réaction antigène érythrocytaire – anticorps anti-érythrocytaire. Ces procédés ne sont pas utilisés en routine mais plutôt à des fins de typages antigéniques spécifiques. Parmi ceux-ci nous pouvons citer :

- la cytométrie de flux particulièrement bien adaptée aux dépistages d'hématies fœtales ou suivi de chimérisme post greffe,
- l'immunofluorescence,
- les techniques radio-immunologiques,
- les techniques ELISA et la technique MAIEA (monoclonal anti body-specific immobilization of erythrocyte antigens assay).

4.5.4 Alternatifs actuelles aux techniques immunologiques

Il s'agit essentiellement des techniques de biologie moléculaire permettant de déduire la présence de l'antigène par la détection du gène. Bien que ces techniques ne puissent se substituer en routine aux techniques immunologiques, elles n'en possèdent pas moins des indications spécifiques.

A titre d'exemple nous pouvons citer le typage RH1 fœtal à partir d'un prélèvement maternel ou le phénotypage chez un patient dont les antécédents transfusionnels empêchent toute validation compte tenu de la persistance d'hématies transfusées dans la circulation.

5. Conclusion

La transfusion sanguine est une activité médicale unique crée un lien direct et fort entre le sain et le pathologique. Cette particularité qu'elle partage avec la transplantation et la greffe nécessite une approche sécuritaire importante qui repose sur des bases concrètes et variées :

- L'organisation des structures des établissements et des interfaces, sous l'égide de l'établissement du sang et des autorités de tutelle ;
- L'hémovigilance, qui constitue un système de recueil de données au service de la sécurité transfusionnelle ;
- Les bonnes pratiques transfusionnelles ;
- La formation des acteurs de la transfusion ;
- Enfin, le développement des activités de référence de la recherche.

La transfusion sanguine repose sur le concept de la chaîne transfusionnelle. Cela implique une prise en compte de l'ensemble des activités de la médecine transfusionnelle qui vont de la promotion du don au suivi des malades transfusés.

Cet ouvrage est constitué de deux parties essentielles :

- La prévention des maladies transmissibles,
- La prévention des accidents immunologiques.

Références bibliographiques :

- Transfusion sanguine et produits dérivés du sang Item 178 : Université Médicale Virtuelle Francophone 2009-2010
- Pr. M. SEGHIER
Diagnostic des infections virales Jeudis Pédagogiques de Médecine Institut Pasteur d'Algérie ; 2007-2008
- Cahier de formation en biologie médicale N° 26 « immuno-hématologie et groupes sanguins aspects théoriques et applications cliniques et transfusionnels » ; 2002.
- BRAHIM BOUBEKER SEDIK-BOUKOURIA KADDA
Mémoire procédure de qualification biologique en immuno-hématologie Université de SIDI BELABBES 2005-2006.
- Marie-Hélène El Ghouzzi
Qualification biologique des dons
EFS Ile de France avril ; 2005.
- Pr .NAGALO BOLNI MARIUS
Diagnostic moléculaire, par RT/PCR, du VIH-1 et sécurité transfusionnelle ; 2010.
- Jean-Christophe Plantier et François Simon
Diagnostic sérologique des infections à VIH
Laboratoire de virologie CHU Charles Nicolle 76031 ROUEN.
- Jean-Marie Huraux et al
Virologie Université Laboratoire DCEM1 ; 2006 – 2007.
- Revue Médicale Suisse Apport du dépistage génomique viral dans la sécurité transfusionnelle J. Coste N° 2344 Sujet: Hématologie.
- Diagnostic biologique des infections à VIH EN Afrique Mise en place d'une nouvelle technique localement Médecine d'Afrique Noire ; 1990
- Diagnostic biologique dans les pays en voie de développement Utilisation des tests rapides.
- EMILIE ALLAIS MARIE-LAURE Supervisé par Dr S.TIGAUD
La Syphilis carage des Bactériologie ; Février 2007.
- Les tests rapides de diagnostic des infections virales et parasitaires SPECTRA BIOLOGIE n° 151 ; Avril 2006
- AZZEDINE ASSAL et al
Les évolutions technologiques dans la qualification biologique des dons de sang EFS ; 25 mai 2007.
- PASCAL DIEUSAERT
Guide pratique des analyses médicales ; Maloine 1999
- Initiation à la virologie Chapitre IV : Diagnostic viral [www.virologie-uclouvain.be].

Liens internet

- http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/carte.htm
- <http://biotechnologie.over-blog.com/categorie-1090723.html>
- <http://biotechnologie.over-blog.com/article-18589062.html>
- <http://www.arnobio2.com>
- www.bmb.leeds.ac.uk/.../images/std/tpha3.jpg
- www.microbe-edu.org/etudiant/imgdiag/1.jpg
- www.phylogene.com/techniques_elisa.html
- <http://www.inist.fr/article188.html>
- http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_immunosorbent_assay#mw-head
- <http://www.microbe-edu.org/contact/avis.html>
- <http://www.gyneweb.fr/sources/obstetrique/andem/preambule.htm>
- http://www.transfusion.be/pages/fr/le_sang.php#analyses
- <http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html>
- <http://www.microbe-edu.org/etudiant/methodediag.html#haut>
- <http://www.boomer.org/c/p3/c02/c0201.html>
- <http://www.millipore.com/userguides/tech1/qc-rvftn52hk>
- <http://www.memoireonline.com/>
- http://www.who.int/bct/Main_areas_of_work/BTS/HIV_Diagnostics/Evaluation_reports/Operational%20Characteristics_HIV%20Report11.pdf
- <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D1.html>
- <http://fr.wikipedia.org/wiki/Western-blot#Technique>
- http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/sida_description.htm
- <http://www.indicia.fr/pages/fr/30/singulex.html>
- <http://membres.multimania.fr/btsab/vdrl-charbon.html#principe%20vdrl>