

TEST DIRECT A L'ANTIGLOBULINE (TEST DE COOMBS DIRECT ERYTHROCYTAIRE)

DEFINITION

Le test direct à l'antiglobuline (TDA), encore appelé «test de Coombs direct érythrocytaire» est un test globulaire qui permet de mettre en évidence les anticorps fixés sur les hématies du patient *in vivo*, par une réaction d'agglutination à l'aide d'antiglobulines polyvalentes et spécifiques.

Le test direct à l'antiglobuline permet de mettre en évidence une sensibilisation *in vivo* des hématies par des antiglobulines humaines dont la portion Fab reconnaît des marqueurs isotypiques d'immunoglobulines (Ig) ou la fraction C3d du complément (qui traduit le passage d'une IgM), spécifiquement fixées sur l'hématie. Il permet de préciser la classe d'Ig ou du complément impliqués dans les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI).

La technique comprend impérativement l'utilisation simultanée et indépendante d'une antiglobuline monotypique anti IgG et d'une antiglobuline monotypique anti C3d, ainsi que des réactifs témoins appropriés. Les autres réactifs ne sont utilisés que dans des situations rares (antiglobuline réagissant avec les IgA, les IgA étant très rarement en cause dans les hémolyses auto-immunes).

BIOPATHOLOGIE

Les AHAI représentent des pathologies modèles de l'auto-immunité. Elles sont définies par une anémie associée à la présence sur les hématies et/ou dans le plasma d'un auto-anticorps dirigé contre un ou des antigène(s) érythrocytaire(s). L'auto-anticorps est une immunoglobuline de classe IgG, IgM ou plus rarement IgA.

Les hématies recouvertes d'anticorps sont dites «sensibilisées» et leur durée de vie est raccourcie.

La classification des AHAI est fondée sur la température optimale de fixation de l'auto-anticorps à l'antigène érythrocytaire.

On distingue :

- **les AHAI à auto-anticorps «chauds»** : de nature IgG et de fixation maximale à 37 °C (70% des AHAI). Leur capacité à fixer du complément varie selon la sous-classe d'IgG et la quantité d'auto-anticorps présente à la surface des hématies. Ils reconnaissent le plus souvent des antigènes érythrocytaires de haute fréquence (d'où une image de panagglutination à la RAI), et plus rarement des antigènes de spécificité courante (ex : anti-RH1, anti-RH5). On retrouve ces AHAI à anticorps «chauds» principalement au cours de syndromes

lymphoprolifératifs et de maladies de système, ou de façon idiopathique ;

- **les AHAI à auto-anticorps «froids»** : de nature IgM, d'optimum thermique bas (+ 4 °C) et fixant le complément. Elles sont fréquemment observées au cours de syndromes lymphoprolifératifs. Les agglutinines froides sont habituellement de spécificité anti-I, et, très rarement, de spécificité anti-i ;

- **les AHAI à auto-anticorps ou hémolysines biphasiques** : elles sont rares, observées au cours de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne. Il s'agit d'anticorps de nature IgG fixant le complément ; ils sont de spécificité antiGLOB1 (anti-P).

De façon simplifiée, on décrit 4 types d'AHAI :

- à IgG,
- à IgG + C3d (mixte),
- à C3d,
- à agglutinines froides.

Les plus fréquentes sont de type IgG ou mixte.

INDICATIONS

Le TDA reconnaît la nature de la sensibilisation ; c'est l'éluion qui va permettre de définir la spécificité de l'auto-anticorps.

Il est donc utilisé essentiellement pour :

- démontrer la sensibilisation du GR du nouveau-né au cours de la maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN),
- mettre en évidence la sensibilisation par des auto-anticorps ou du complément, des globules rouges de malades atteints d'AHAI,
- dépister les accidents hémolytiques dus à l'usage de certains médicaments où les globules rouges sont également sensibilisés,
- dans le cas d'accidents transfusionnels, pour démontrer la fixation sur les globules rouges du donneur en circulation chez le malade, d'allo-anticorps spécifiques présents dans le sérum du malade.

RECOMMANDATIONS PREANALYTIQUES

■ PRELEVEMENT

La détermination du TDA doit être impérativement réalisée sur un échantillon de sang prélevé sur anticoagulant : EDTA (ou éventuellement citrate) et en quantité suffisante pour effectuer des contrôles et/ou des examens complémentaires.

■ QUESTIONS A POSER AU PATIENT

- Age du patient ?
- Pathologie du patient ?
- Notion de transfusion et date ?
- Prise de médicaments ?

■ CONSERVATION ET TRANSPORT

Le TDA est réalisé sur un prélèvement de moins de 2 jours et conservé à + 4 °C.

METHODOLOGIE

- Le TDA est classiquement effectué en tube (technique d'agglutination avec hématies lavées) ;

- les techniques de filtration en phase solide des agglutinats (gel test ou sur microbilles de verre) tendent à remplacer les techniques en tube du fait de leur simplicité. Elles ont l'avantage d'être automatisables et permettent d'éviter l'étape de lavage préalable (connue pour entraîner l'élution de certains anticorps fixés, ainsi responsable de faux négatifs).

Elles augmentent également la sensibilité du test du fait de l'utilisation de milieux de basse force ionique. Ce gain de sensibilité s'accompagne d'une baisse de la spécificité et pose un problème de détermination des limites physiologiques et pathologiques ;

- les techniques sur support microplaque: utilisent le principe de l'immunocapture ou bien une magnétisation des hématies. Elles ont l'avantage d'être automatisables et il n'y a ni incubation, ni lavage.

INTERPRETATION

Le TDA est le plus souvent un élément déterminant en faveur du caractère auto-immun d'une anémie hémolytique. Cependant, il ne permet pas à lui seul de porter le diagnostic d'AHAI. En effet, la positivité du TDA peut être liée à d'autres causes que la présence d'auto-anticorps anti-érythrocytaires :

- des allo-anticorps post-transfusionnels, dirigés contre les hématies transfusées encore présentes dans la circulation,
- des allo-anticorps d'immunisation foeto-maternelle, dirigés contre les hématies de l'enfant,
- des anticorps anti-médicaments à l'origine d'une anémie hémolytique immuno-allergique,
- des allo-anticorps secondaires à une greffe d'organe ou à une allogreffe de moelle.

Le TDA peut être également positif en dehors de toute hémolyse dans certaines situations telles que les dysglobulinémies mono ou polyclonales ou encore les cryoglobulinémies, après administration d'IgG polyvalentes intraveineuses à forte dose, altération de la membrane érythrocytaire, fixation isolée du complément indépendamment de tout anticorps.

Enfin dans 4 % des cas, le TDA peut être négatif et associé à d'authentiques AHAI : il **peut** être faussement négatif par erreur technique, mauvaise qualité des réactifs, élution des anticorps lors du lavage des hématies, faible densité des anticorps à la surface des hématies.

Dans la plupart des cas, le contexte clinique, le résultat de l'élution et l'étude des anticorps sériques permettent d'établir le diagnostic différentiel.

POUR EN SAVOIR PLUS

- Cahier BIOFORMA, N° 26 (2002), *les anémies hémolytiques auto-immunes*, page 123.
- Drouet J. C., *Anémies hémolytiques auto-immunes*, Revue du praticien, 2000; 50: p. 567 à 571.
- Rochant H., *Anémies hémolytiques auto-immunes*, Revue du praticien, 2001; 51: p. 1534 à 1541.
- Extrait du J. O du 4 mai 2002 : arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.
- Chiaroni J., Roubinet F., Bailly P., Mannessier L., Noizat-Pirenne F., *Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques*, John Libbey Eurotext Ed, Paris, 2011 : p78-86 et p212-224.