

Coombs direct positif **(et tout ce qui se cache derrière) :** **Gestion et interprétation**

Dr J.C. Osselaer,
Luxembourg, 14.12.2006

Etiologie d'un Coombs Direct positif

1. Autoanticorps

2. Alloanticorps

immunisation contre GR transfusés

transfert positif

plasma donneur

circulation maternelle

"passenger lymphocyte"

dirigé contre médicaments fixés sur
la membrane érythrocytaire (p.ex. pénicilline)

Etiologie d'un Coombs Direct positif

3. Fixation aspécifique d'Ig

hypergammaglobulinémie

Ig i.v. à haute dose

altération de certaines
composantes membranaires
(p.ex. par céphalosporines)

4. Présence de complément activé par

alloanticorps

autoanticorps

médicaments

infection bactérienne

- Un Coombs direct positif n'implique pas nécessairement une diminution de la survie érythrocytaire
- De petites quantités d'IgG et de complément sont présentes à la surface de tous les érythrocytes
 - IgG : 5 à 90 molécules/GR
 - C3d : 5 à 40 molécules/GR

Sensibilité du test de Coombs direct

Le test de Coombs peut détecter :


- 100 à 500 molécules d'IgG/GR
400 à 1100 molécules de C3d/GR

dépendant du réactif et de la technique

- On trouve des Coombs directs positifs sans manifestation clinique d'hémolyse immune chez
 - 1/1000 à 1/14000 de donneurs de sang
 - 1 % à 15 % de patients hospitalisés

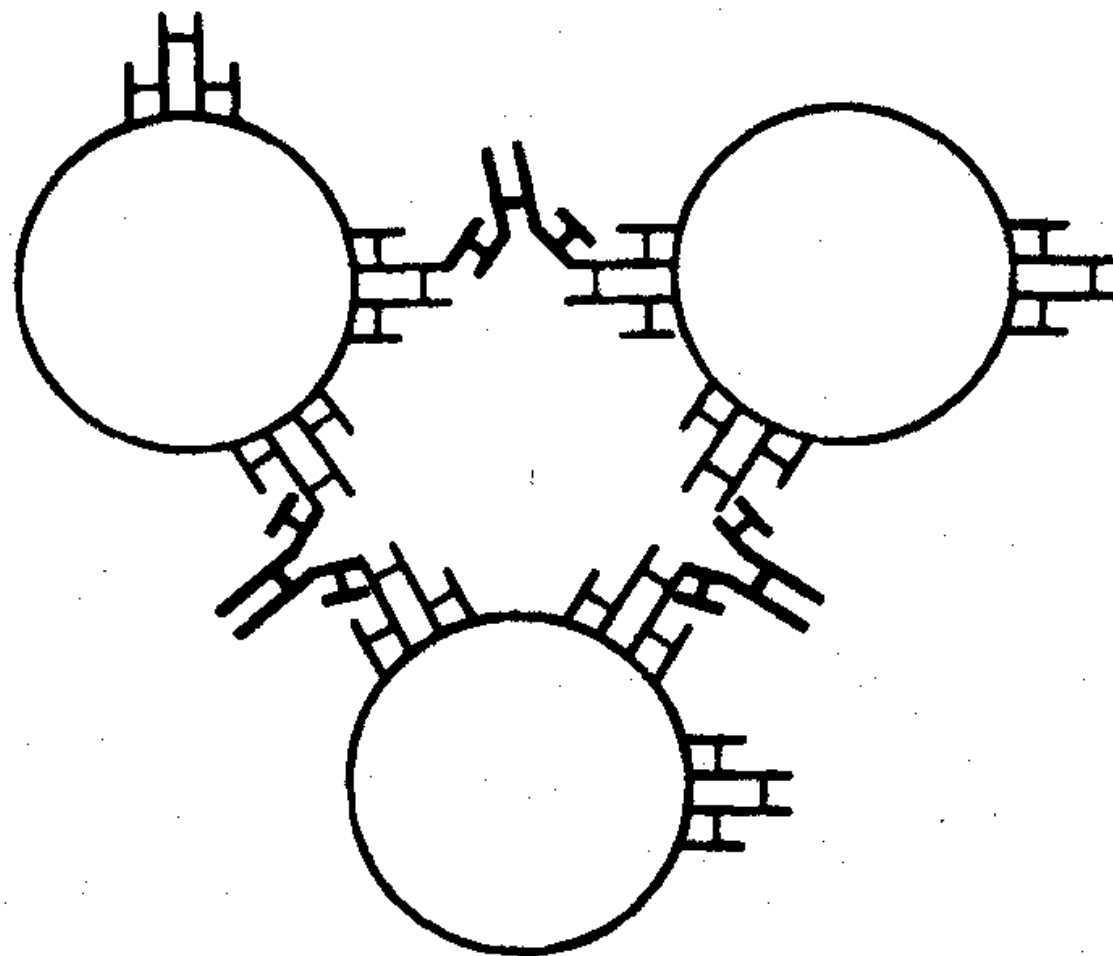
Signification d'un Coombs direct positif

- Découverte fortuite chez donneur de sang par ailleurs asymptomatique
 - Chez patients
 - hémolyse immune (minorité)
 - mais également dans :
 - . anémie falciforme
 - . b-thalassémie
 - . myélome multiple
 - . maladies autoimmunes
 - . SIDA
 - . hypergammaglobulinémie
 - . insuffisance rénale
- sans corrélation claire entre Coombs direct positif et anémie
- L'interprétation d'un Coombs direct positif doit toujours intégrer l'histoire clinique du patient et le résultat des autres tests.

- 
- **Principe et modalités techniques**
 - Exploration d'un Coombs direct positif
 - Hémolyse immune
 - Hémolyse médicamenteuse
 - Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps

Principe du test de Coombs

- Technique de sensibilisation de l'agglutination érythrocytaire, décrite en 1945 par Coombs, Mourant et Race
- Immunisation d'un animal par injection d'Ig humaines
® production d'un sérum-antiglobuline humaine (AHG)
- Utilisation de produits purifiés permis d'affiner la spécificité :
 - anti IgG
 - anti-différentes fractions du complément
- L'introduction de la technologie de l'hybridome a permis d'obtenir des réactifs monoclonaux



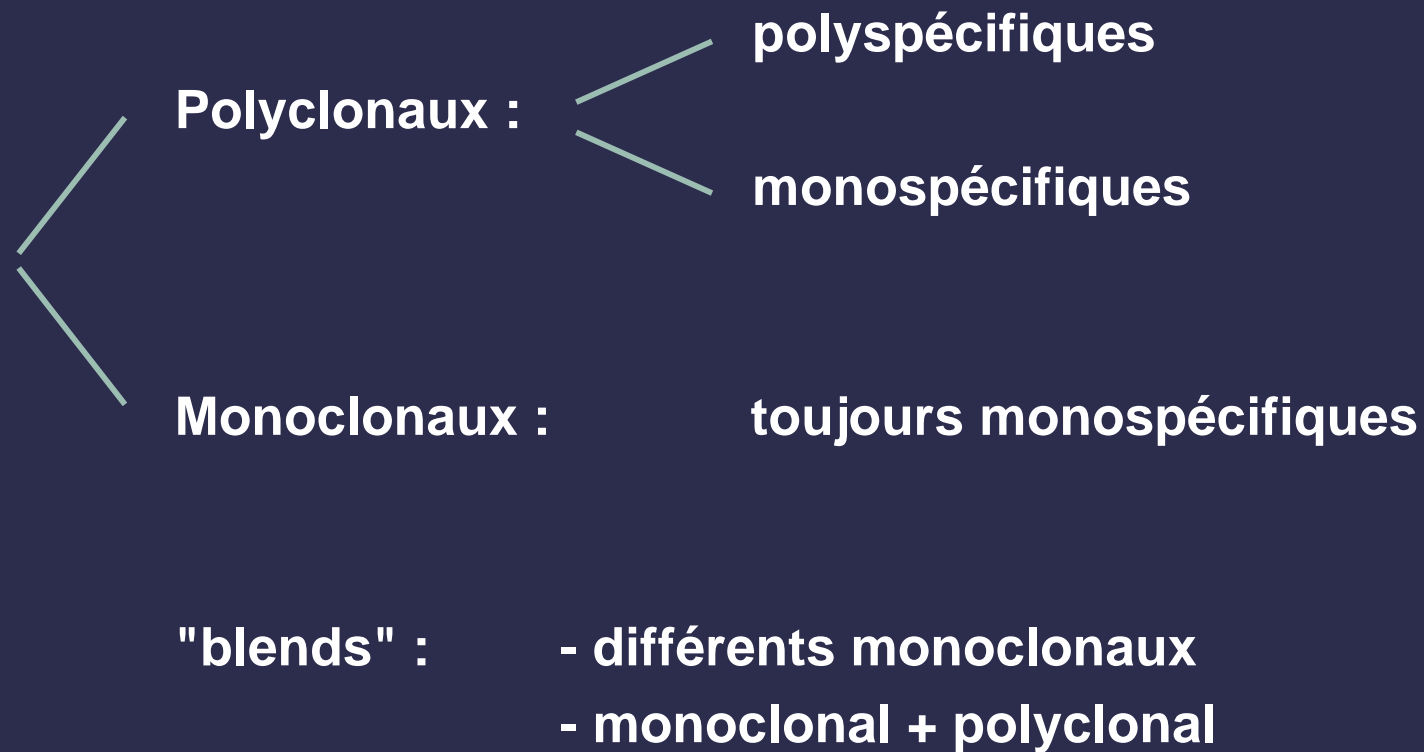
■ Coombs direct

- cellules coatées in vivo par anticorps ou complément (plus particulièrement IgG ou C3d)

■ Coombs indirect

- coating in vitro : préincubation GR et sérum à tester
- lavage des GR pour éliminer les Ig non liés
- certaines nouvelles techniques évitent le besoin de lavage, dans la mesure où on travaille en phases physiquement séparées

Réactifs antiglobuline



Réactifs AHG

anti-IgG, - C3d, polyspécifique

**contient anti-IgG et anti-C3d
(peut contenir autres anticorps
anti-complément et anti-Ig)**

anti-IgG

**contient anti-IgG sans activité
anti-complément (n'est pas
nécessairement spécifique pour
chaînes g)**

anti-IgG, chaînes lourdes

**contient uniquement anticorps
dirigés contre chaînes humaines
gamma**

Réactifs AHG

anti-C3b	contient uniquement anticorps contre C3b, sans activité anti-IgG
anti-C3d	contient uniquement anticorps contre C3d, sans activité anti-IgG
anti-C4b	contient uniquement anticorps contre C4b, sans activité anti-IgG
anti-C4d	contient uniquement anticorps contre C4d, sans activité anti-IgG

Rôle du complément dans les réactions de Coombs

- **2 mécanismes de fixation du complément sur membrane GR**

- ® activation par anticorps se fixant sur antigène spécifique érythrocytaire

- ® activation par complexe immun circulant, se fixant de manière non spécifique sur la membrane ("innocent bystander")

- **Résultat** : activation de la cascade du complément qui peut soit aller au bout et provoquer une hémolyse, soit avorter et laisser à la surface érythrocytaire certaines fractions du complément

Pourquoi trouve-t-on complément comme seule globuline ?

- Témoin d'un IgM disparu
- Dans 10 à 20 % des hémolyses à agglutinines "chaudes", on ne trouve jamais d'IgG (ni IgA ou IgM)
- Syndrome d'agglutinines froides : IgM fixés sur les GR dans la circulation périphérique disparaissent dans la circulation centrale
- Fixation faible et réversible des complexes immuns

Pièges techniques dans le test de Coombs


Faux négatifs

- Neutralisation du réactif AHG
 - lavages insuffisants
 - contamination du réactif par protéines étrangères
 - hypergammaglobulinémie
- Interruption dans le test
 - dissociation des Ac
- Stockage inadéquat des réactifs
- Procédures inappropriées
 - centrifugation
 - rapport cellules/sérum
- Anticorps complément-dépendants
 - rares anti-Jk
- Liquide physiologique de lavage
 - pH
 - température

Pièges techniques dans le test de Coombs

Faux positifs

- Agglutination avant lavage
- Contamination particulaire
- Procédures inappropriées
 - centrifugation
- Coombs direct positif interfère avec Coombs indirect
- Activation du complément
 - dans tubulures de poches
 - après coagulation
 - dans lignes d'infusion (dextrose)

- 
- Principe et modalités techniques
 - **Exploration d'un Coombs direct positif**
 - Hémolyse immune
 - Hémolyse médicamenteuse
 - Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps

Exploration d'un Coombs direct positif


- **Interprétation doit toujours se faire à la lumière du tableau clinique, en intégrant l'ensemble des résultats biologiques**
- **La décision d'explorer ou non doit se prendre après discussion avec le clinicien, en répondant aux questions suivantes**

Y a-t-il évidence de destruction érythrocytaire in vivo ?

Si pas de signes d'hémolyse in vivo, il est inutile d'aller plus loin

Le patient a-t-il récemment été transfusé ?

- GR transfusés survivant au moins 3 mois
- double population suggestive mais pas toujours présente
- possibilité d'alloanticorps fixes





 **Le patient prend-il des médicaments tels que céphalosporines, prozainamide, pénicilline i.v. ou a-methyldopa ?**


 **Le patient a-t-il reçu une transplantation de moelle, de cellules souches ou d'organe ?**

 **Le patient reçoit-il des Ig i.v. ?**
Immunoglobulines ou plasma

 **Le patient est-il septique ?**

Exploration d'un Coombs direct positif

-  Répéter le test avec réactifs monospécifiques (au moins : IgG et C3d)
-  Tester le sérum ou le plasma à la recherche d'allo- ou d'auto-anticorps
-  Elution, si possibilité d'un alloanticorps
-  Si transfusions envisagées : vérifier si phénotype étendu disponible. Typage moléculaire si non disponible

- 
- Principe et modalités techniques
 - Exploration d'un Coombs direct positif
 - **Hémolyse immune**
 - Hémolyse médicamenteuse
 - Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps

Classification des anémies hémolytiques immunes

■ Anémie hémolytique auto-immune

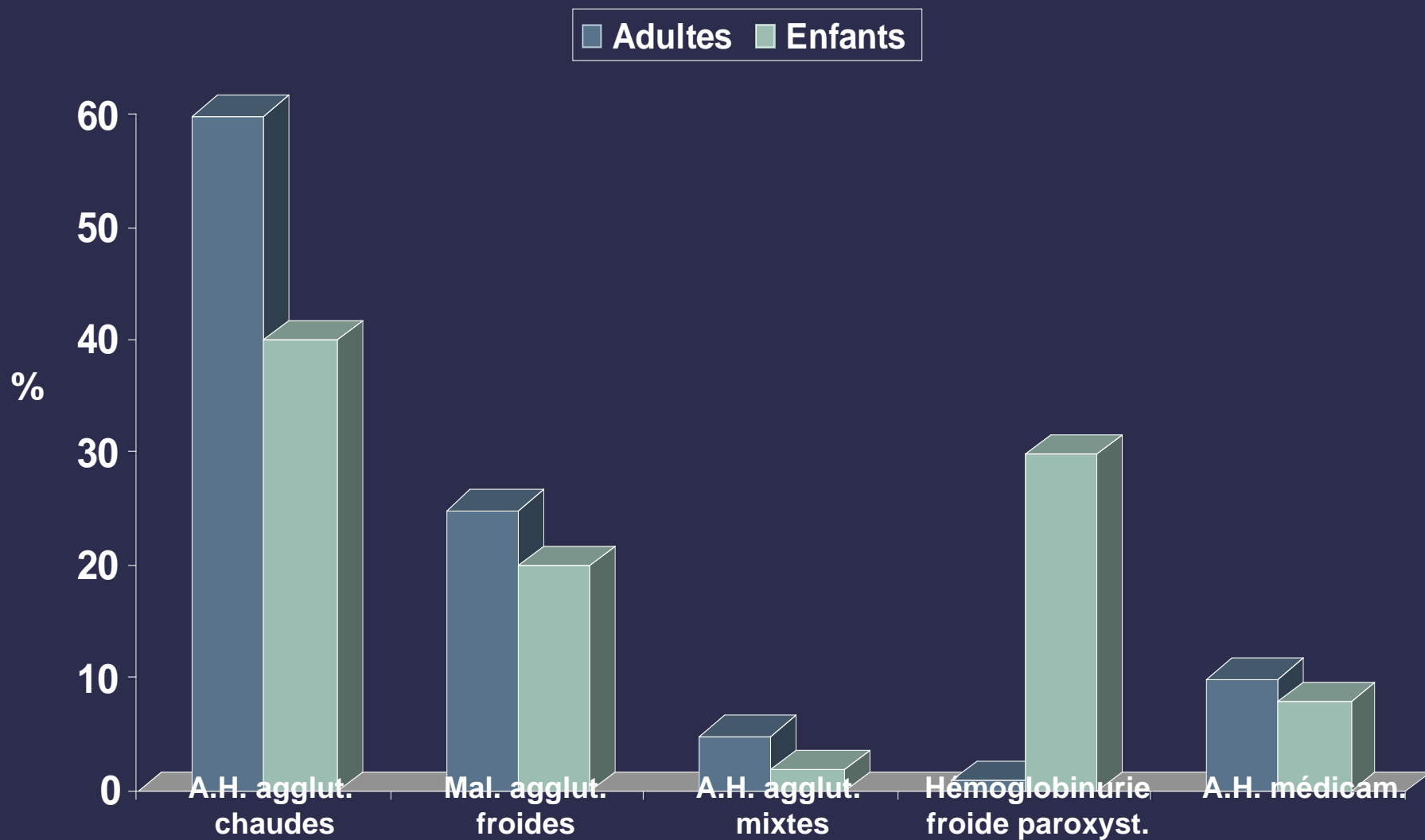
- 📁 Anémie hémolytique auto-immune à agglutinines chaudes
- 📁 Maladie à agglutinines froides
- 📁 Anémie hémolytique auto-immune mixte
- 📁 Hémoglobulinémie a frigore paroxystique
- 📁 Anémie hémolytique auto-immune à Coombs direct négatif

■ Anémie hémolytique médicamenteuse

■ Anémie hémolytique alloimmune

- 📁 Anémie hémolytique du nouveau-né
- 📁 Réaction transfusionnelle hémolytique

Fréquence relative



Sokal, Br Med J 1981; 282 : 2023-2027

Caractéristiques immunologiques

	AHAI à agglutinines chaudes	Maladie à agglutinines froides	AHAI mixte	HPF	AH médicamenteuse
Réactivité Coombs direct	IgG : 20% à 66 % IgG : 24% à 63 % C3 : 7 à 14%	C3 : 91% à 98%	Ig+C3 : 71% à 100% C3 : 13%	C3 : 94% à 100%	IgG : 94% IgG + C3 : 6%
Type d'Ig	IgG (parfois associée à IgA ou IgM)	IgM	IgG, IgM	IgG	IgG
Spécificité	souvent Rh	souvent I; parfois aussi i ou Pr	souvent peu claire	anti-P hémolysine biphasique	souvent lié à Rh

AHAI à agglutinines chaudes

- Autoanticorps n'apparaît dans le sérum que lorsque tous les sites érythrocytaires sont occupés
- Spécificité :
 - intérêt académique
 - pseudo-spécificités : sanction ?
- Dans 30 % à 40 % des cas, un alloanticorps peut se cacher derrière l'autoanticorps :
 - problèmes de . crossmatch
 - . screening
- Solutions :
 - anamnèse
 - phénotype préexistant
 - typage moléculaire
- La transfusion est en principe contre-indiquée chez un patient avec hémolyse

Maladie à agglutinines froides


- **Forme aiguë : svt après infection (mycoplasme, EBV)**
- **Forme chronique : lymphome, LLC, Waldenström**
- **Acrocyanose et hémoglobinurie par temps froid**
- **Interférence technique possible : travailler à 37°**
- **Titre, amplitude thermique**

La plupart des anticorps cliniquement significatifs ont :

- **une amplitude thermique $\approx 30^\circ$**
- **un titre (4°) > 1000**
- **Transfusion :**
 - **auto-absorption froide**
 - **travailler à 37°**
 - **IgG monospécifique**

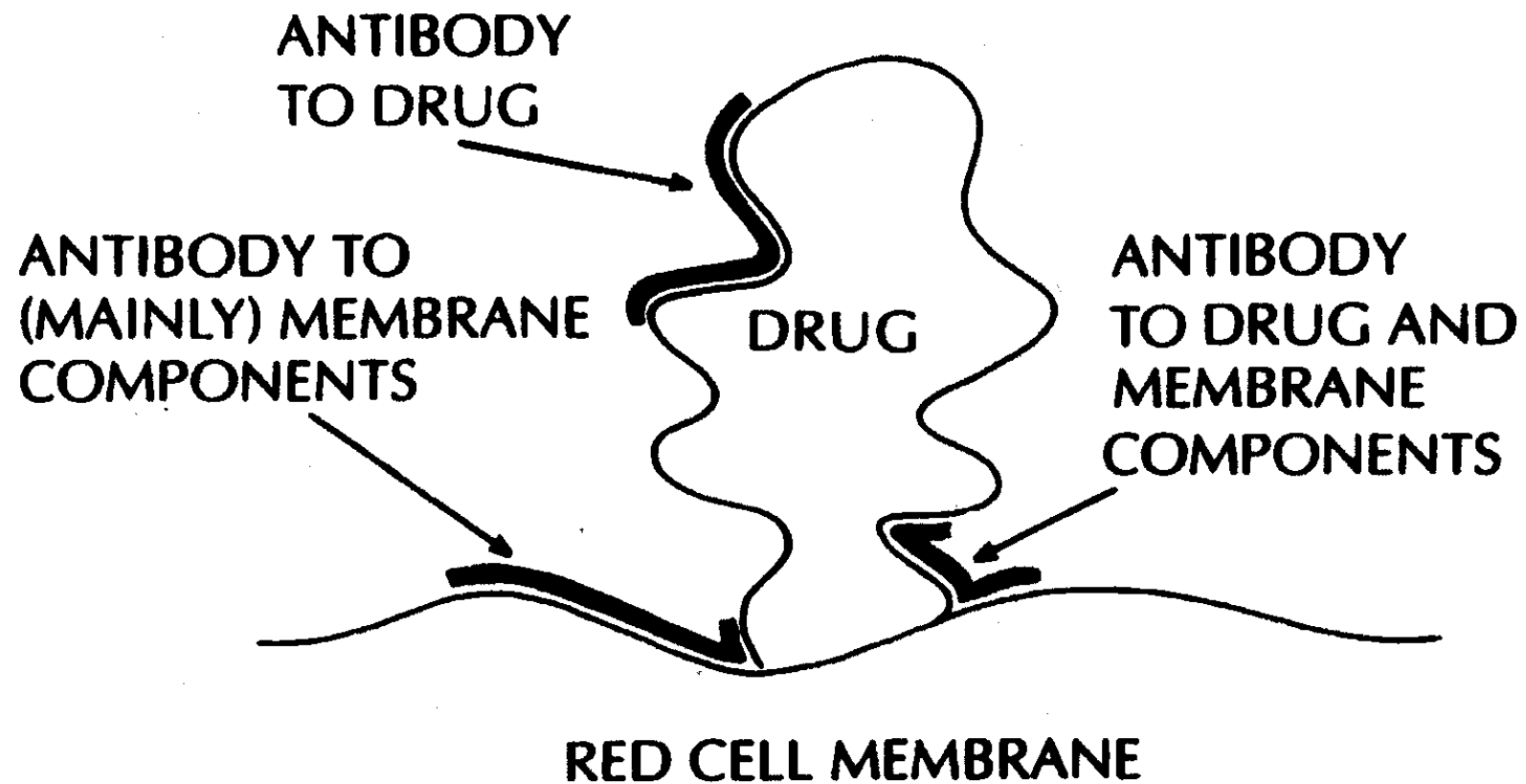
Hémoglobinurie paroxystique a frigore

- Spécifique de l'enfant (30 % des hémolyses)
- Souvent après infection virale
- Hémolysine biphasique :
 - IgG se fixe à basse température
 - fixe complément
 - hémolyse à 37°
- Test de Donath-Landsteiner

- 
- Principe et modalités techniques
 - Exploration d'un Coombs direct positif
 - Hémolyse immune
 - **Hémolyse médicamenteuse**
 - Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps

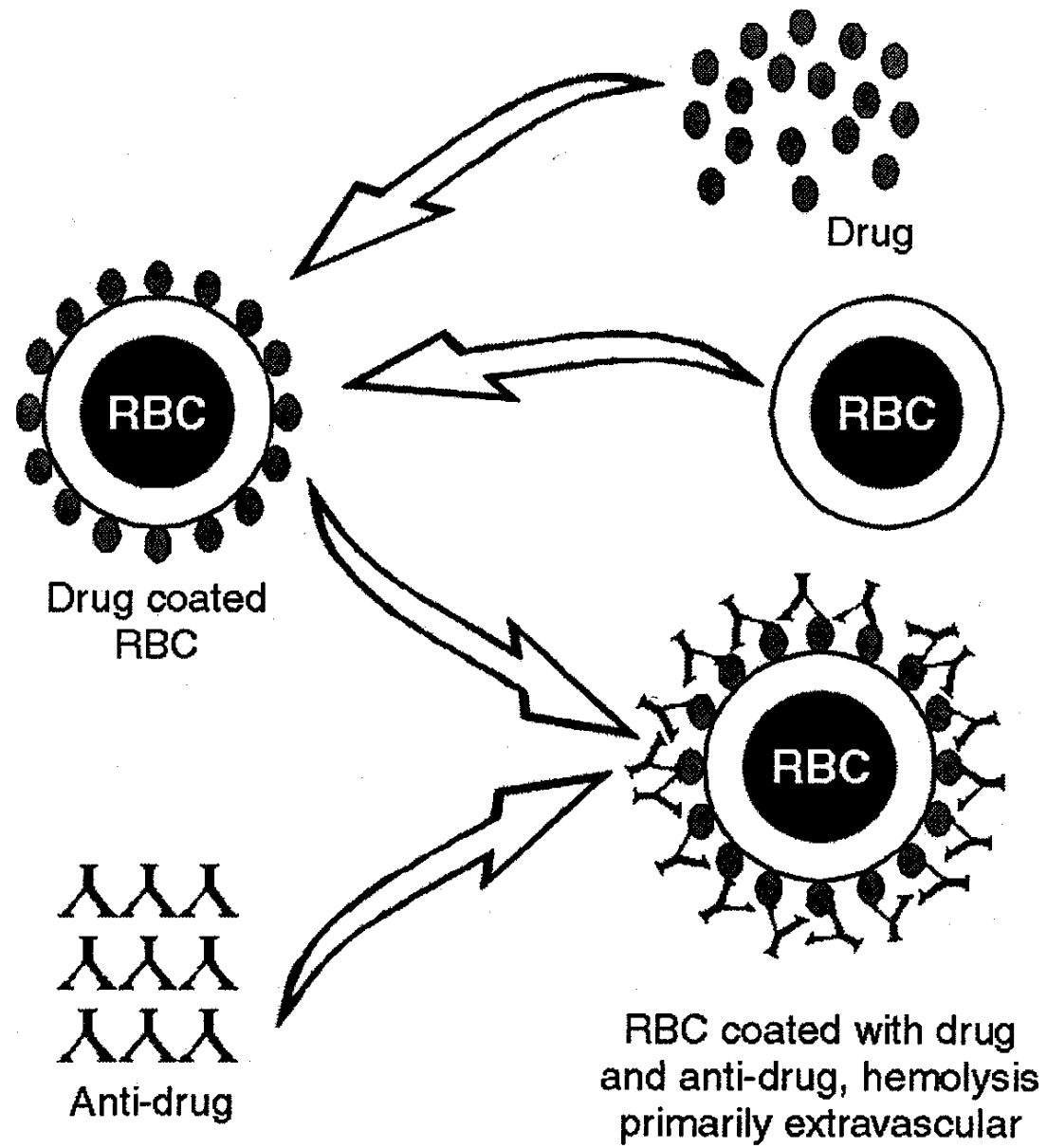
Hémolyse médicamenteuse

- Anticorps médicaments-dépendants réactifs avec GR
traités par médicament : anticorps type pénicilline
- Anticorps médicaments-dépendants réactifs par
mécanisme "complexe immun"
- Anticorps médicaments-indépendants : autoanticorps



Anticorps médicaments-dépendants réactifs avec GR traités par médicaments

- Coombs direct fortement positif à IgG (parfois aussi C3)
- Sérum contient IgG réactif avec GR exposés à pénicilline
- Idem pour éluat
- Hémolyse généralement extravasculaire
- 3 % des patients recevant pénicilline à hautes doses et 4 % des patients recevant céphalosporine développant Coombs direct positif
- L'arrêt du médicament entraîne l'arrêt de l'hémolyse



Anticorps médicaments-dépendants réactifs par le mécanisme "complexe immun"


- Coombs direct fortement positif à C3 (parfois aussi à IgG)
- Sérum contient IgG, IgM ou IgG + IgM
- Médicament (ou métabolite) doit être présent dans le sérum à tester
- Hémolyse intravasculaire, avec hémoglobinémie et hémoglobinurie, insuffisance rénale
- Récidive dès que faibles doses de médicaments sont administrées
- Médicament type : céphalosporines de 2^{ème} ou 3^{ème} génération

Anticorps médicaments-dépendants : production d'autoanticorps

- Induction de la production d'autoanticorps, évoquant AHAI à IgG
- Médicaments typiques :
 - a-methyldopa
 - L-dopa
 - prozainamide
 - certains AINS
 - fludarabine
 - céphalosporines 2^{ème} et 3^{ème} générations
- Preuve de l'étiologie : sur dossier clinique

Adsorption non-immunologique de protéines

- Coombs direct positif
- Très rarement hémolyse

- 
- Principe et modalités techniques
 - Exploration d'un Coombs direct positif
 - Hémolyse immune
 - Hémolyse médicamenteuse
 - **Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps**

Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps

Agglutination aspécifique des globules

- à température de chambre : ABO
 - travailler à 37°C
 - traitement par agent réducteur
- à 37°C
 - traitement par protéases
 - phénotype "préventif"
 - typage moléculaire

Problèmes sérologiques posés par des autoanticorps

Interférence dans le screening

- Autoabsorption
- Alloabsorption
- Matching sur base
 - du phénotype étendu
 - du typage moléculaire

Coombs direct positif

**Est-ce que le patient
a des signes d'hémolyse ?**

non

**STOP,
sauf si
transfusé récent**

oui

tester avec réactifs monospécifiques

IgG ± C3d

C3d seul

C3d seul



Tester sérum

MAF ?



**titre et amplitude thermique
dans agglutinines froides**

HPaF ?



test de Donath-Landsteiner

**Hémolyse
médicamenteuse**



**- anamnèse
- recherche des anticorps
médicaments-dépendants**

