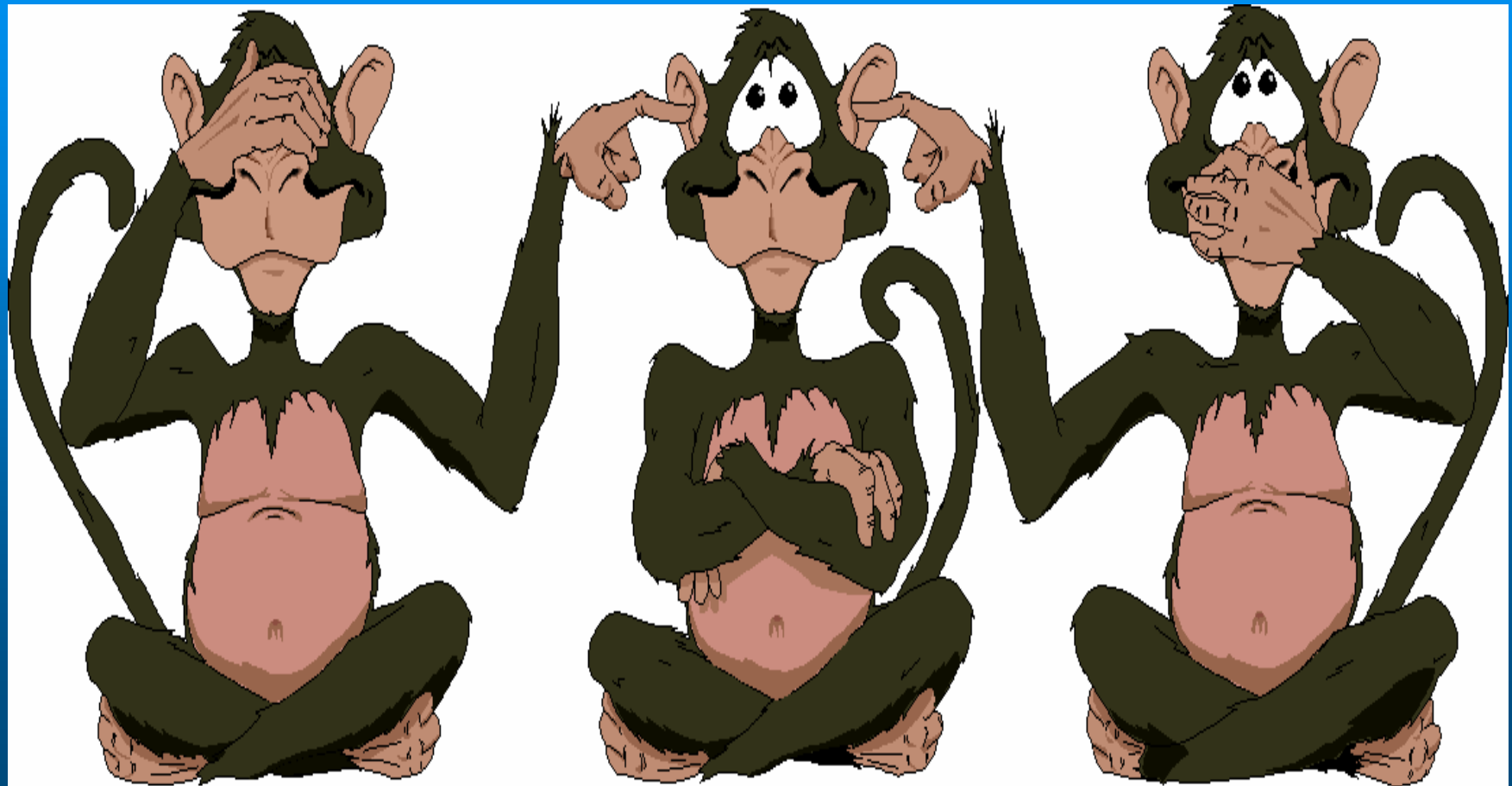




LES TESTS DE SEROLOGIE TRANSFUSIONNELLE

- ❖ Groupage ABO (**test érythrocytaire** et **test sérique**)
- ❖ Typisation Rhésus
- ❖ Détection des anticorps irréguliers
- ❖ Spécificité des anticorps irréguliers à l'aide d'un panel de plus de 10 solutions érythrocytaires, toujours de groupe O
- ❖ Type and Screen
- ❖ Test de compatibilité (**plasma du receveur** avec **les érythrocytes du donneur**) effectué sur gel en Coombs indirect.
- ❖ Test prétransfusionnel ultime au lit du patient (concordance **du groupe ABO** entre le patient et **les unités de sang** à transfuser)

Rhésus (RH)



SYSTEME RH

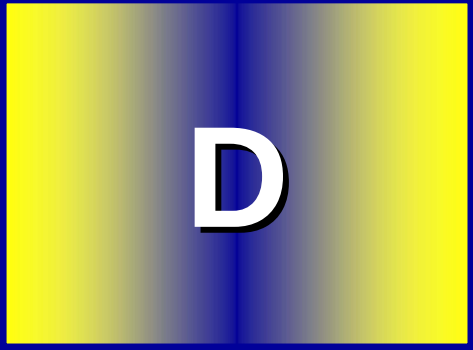
- Système complexe, 57 antigènes (août 2008)
- 1940: Landsteiner antigène D
- 1941: Wiener antigène C
- Lévine antigène c
- 1943: Wiener et Sonn antigène E
- 1945: Mourant antigène e
- 1946: Stratton antigène Du



SYSTEME RH

- ❑ antigène D
- ❑ antigène C
- ❑ antigène c
- ❑ antigène E
- ❑ antigène e

- ❑ antigène C^w
- ❑ antigène C^x



D

Caucasians

82 – 88 %

Africans

95 %

Chinese, Japanese

99 %

Fréquence antigénique

antigène e	99 %
antigène D	85 %
antigène c	80 %
antigène C	70 %
antigène E	26 %

Typisation Rhésus

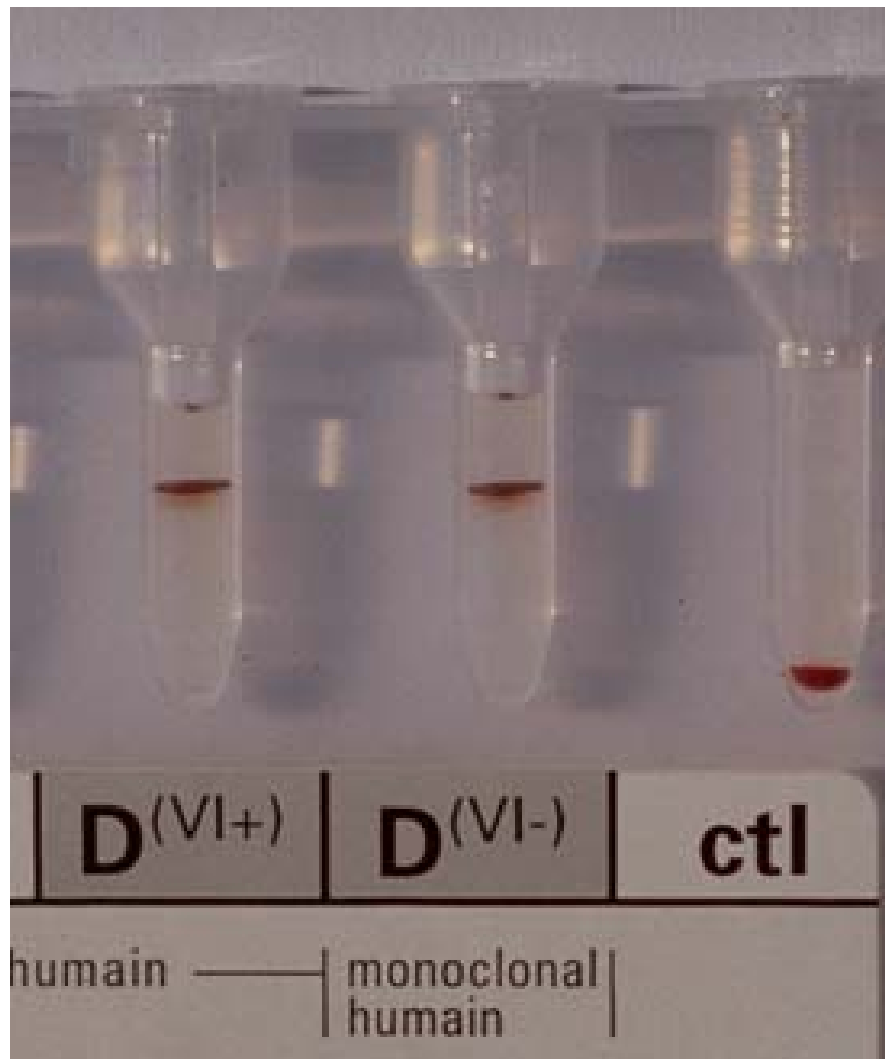
Détermination de l'antigène D

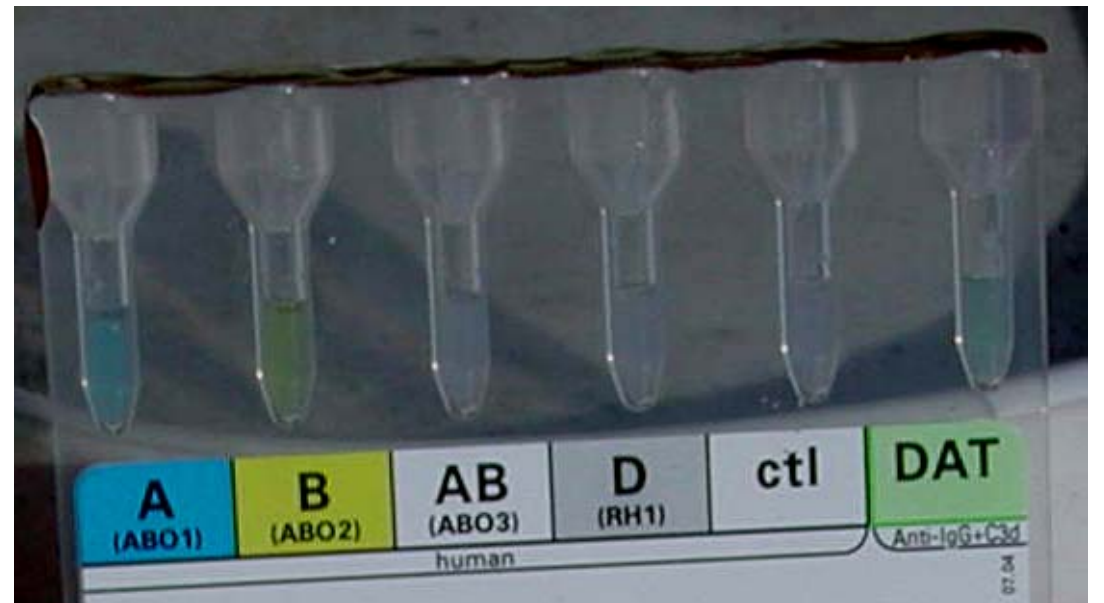
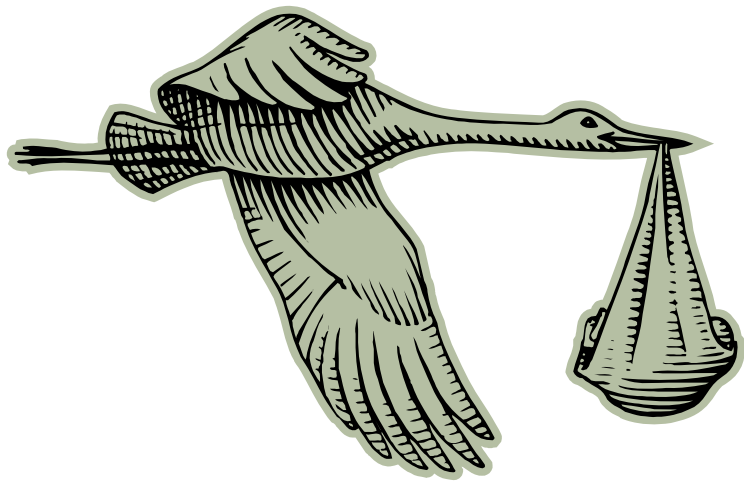
- ◆ **deux anti-D monoclonaux, de clones différents (IgM)**

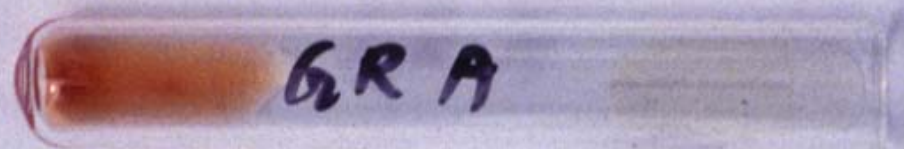
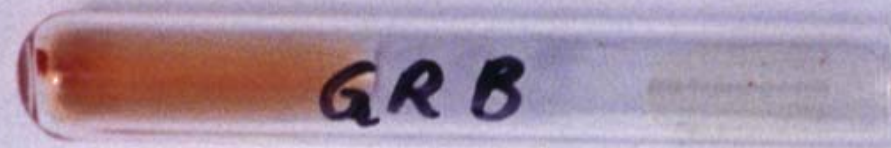
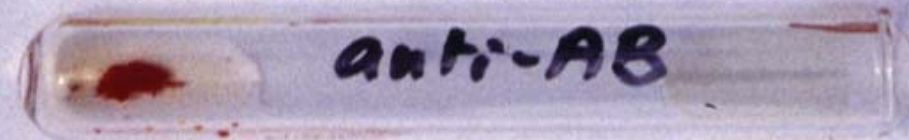
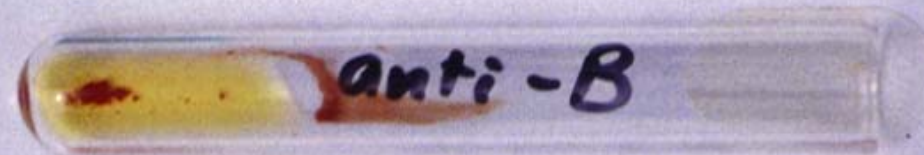
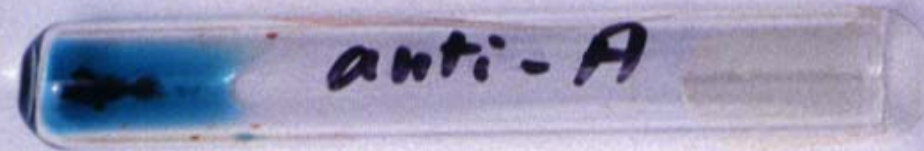
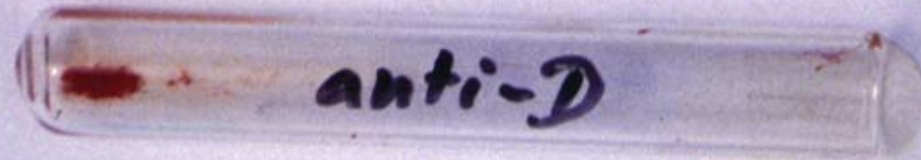
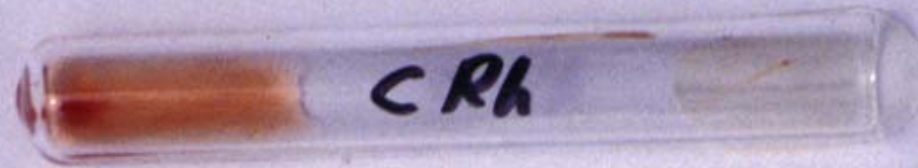
- ◆ **un anti-D ne doit pas détecter le variant D VI**

- ◆ **Le test de Coombs indirect n'est plus obligatoire**

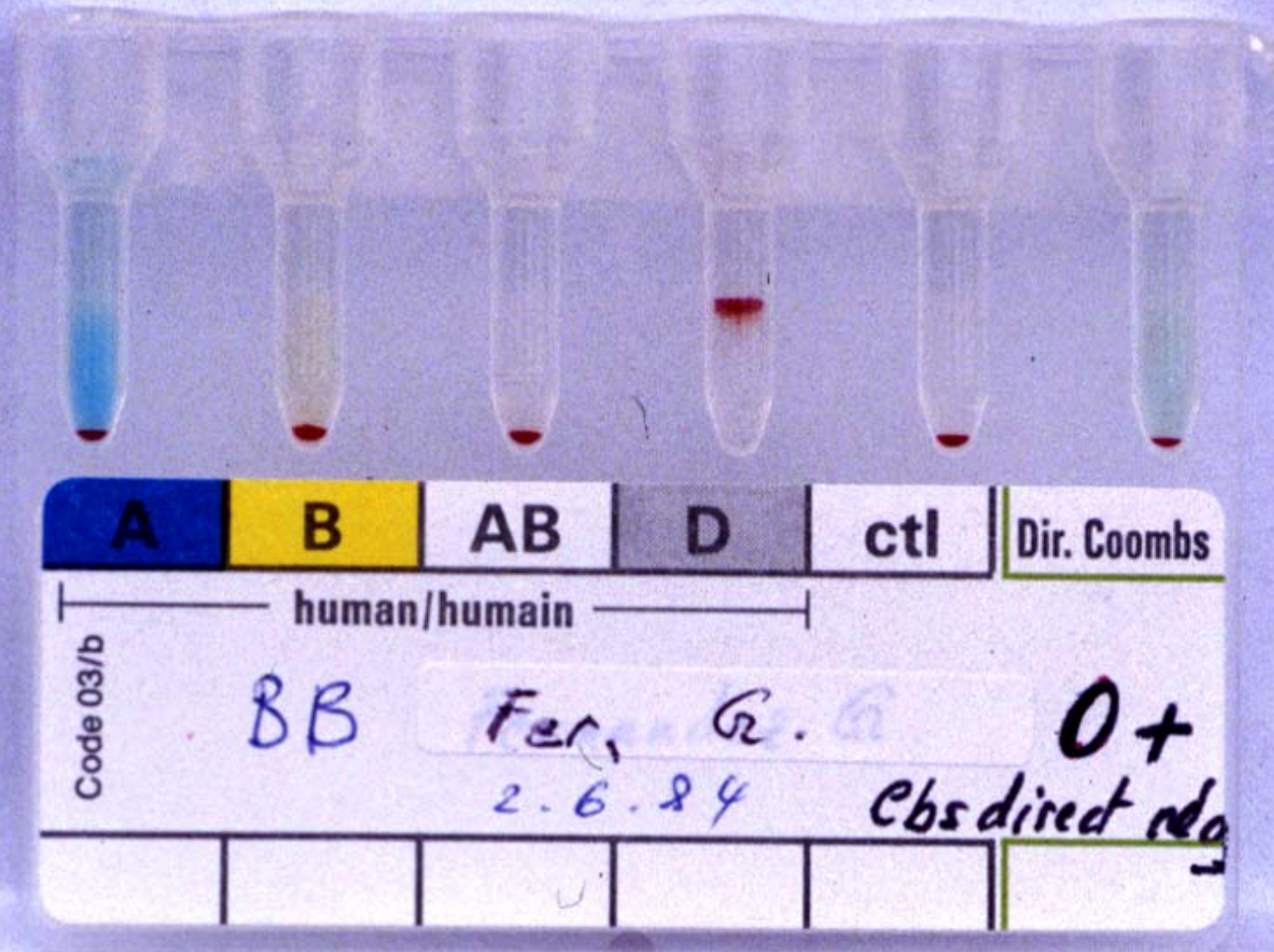


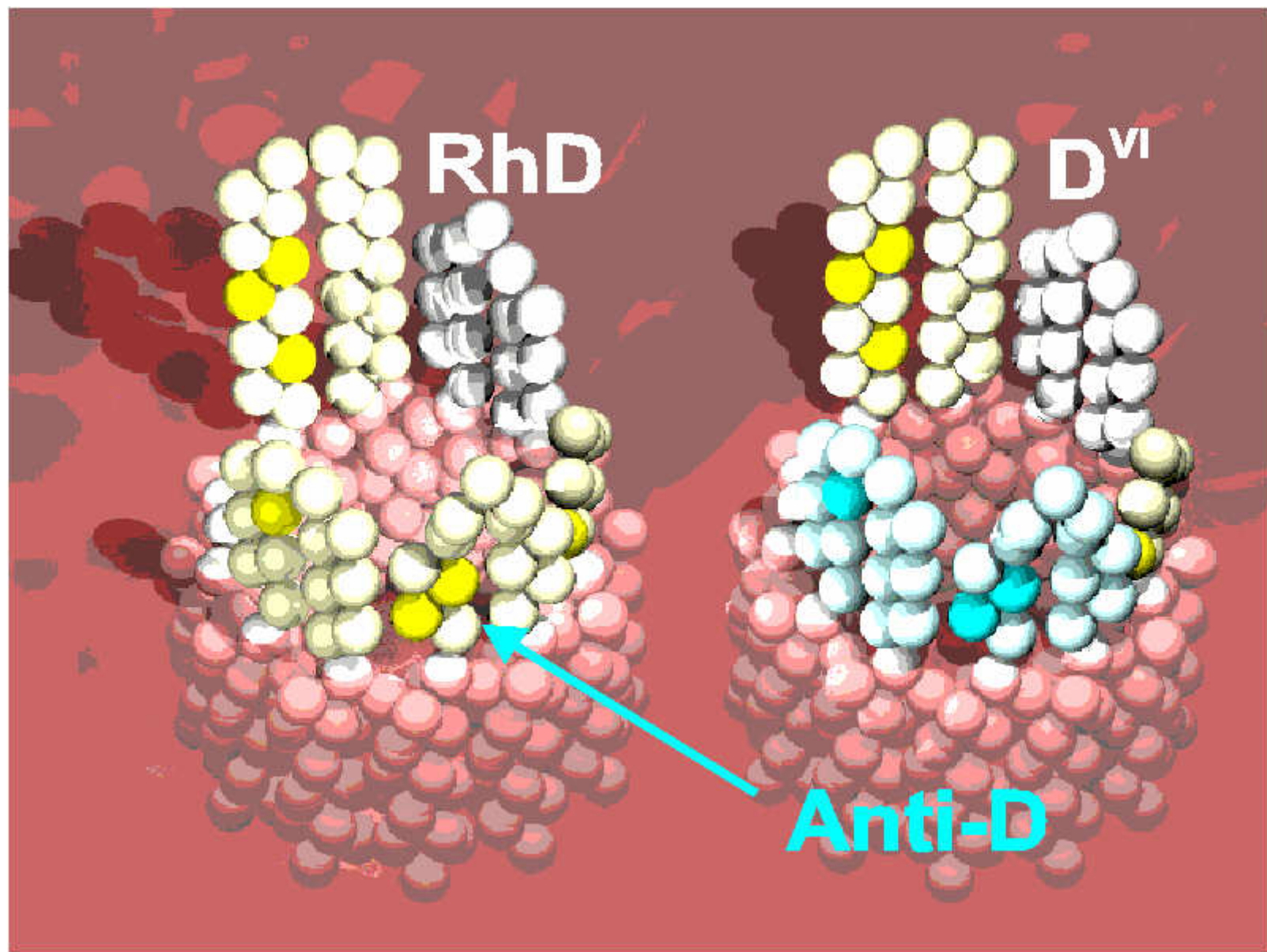












Typisation Rhésus

phénotype D faible

→ jamais anti-D

Phénotype D partiel

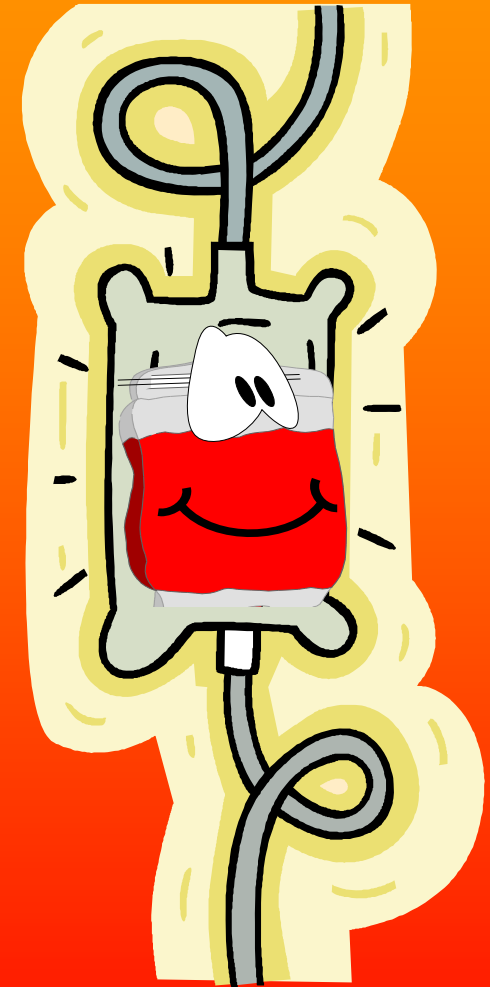
→ possibilité de développer un anti-D (épitopes non auto)



phénotype complet Rh

INDICATIONS

- ❖ présence d'anticorps
- ❖ transfusions itératives
- ❖ transfusions chez fillette ou une femme en âge de procréer
- ❖ conjoint d'une femme enceinte immunisée pour évaluer le risque foetal



Phénotypes:

Symbole du système suivi par la liste des ag séparés par une virgule. Si l'ag est testé mais absent, on met un – devant

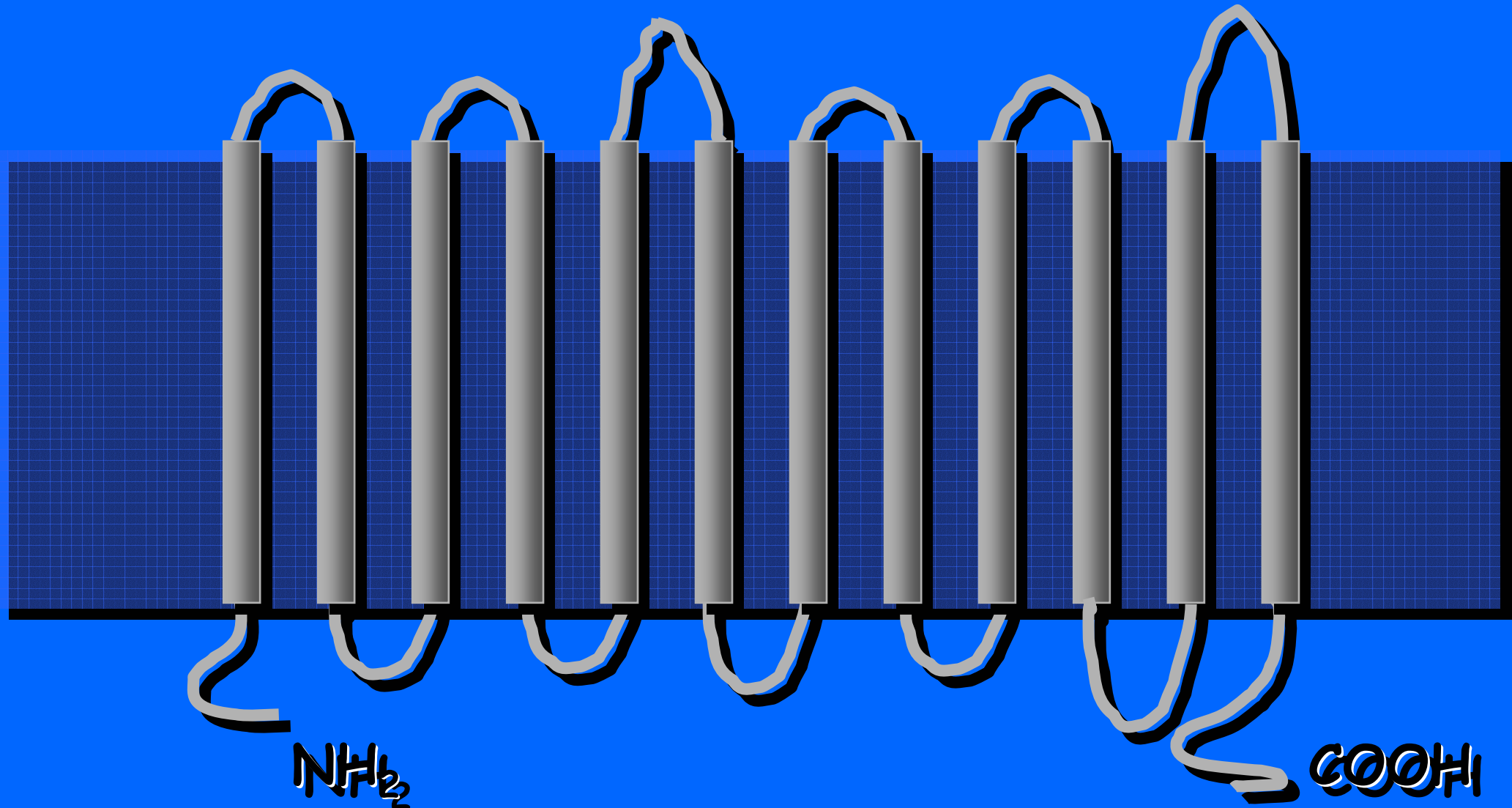
Ex: **D+C+E-c+e+ C^w-** donne RH: 1,2,-3,4,5,-8

Ex: **D-C-E-c+e+** donne RH:-1,-2,-3,4,5



RHD

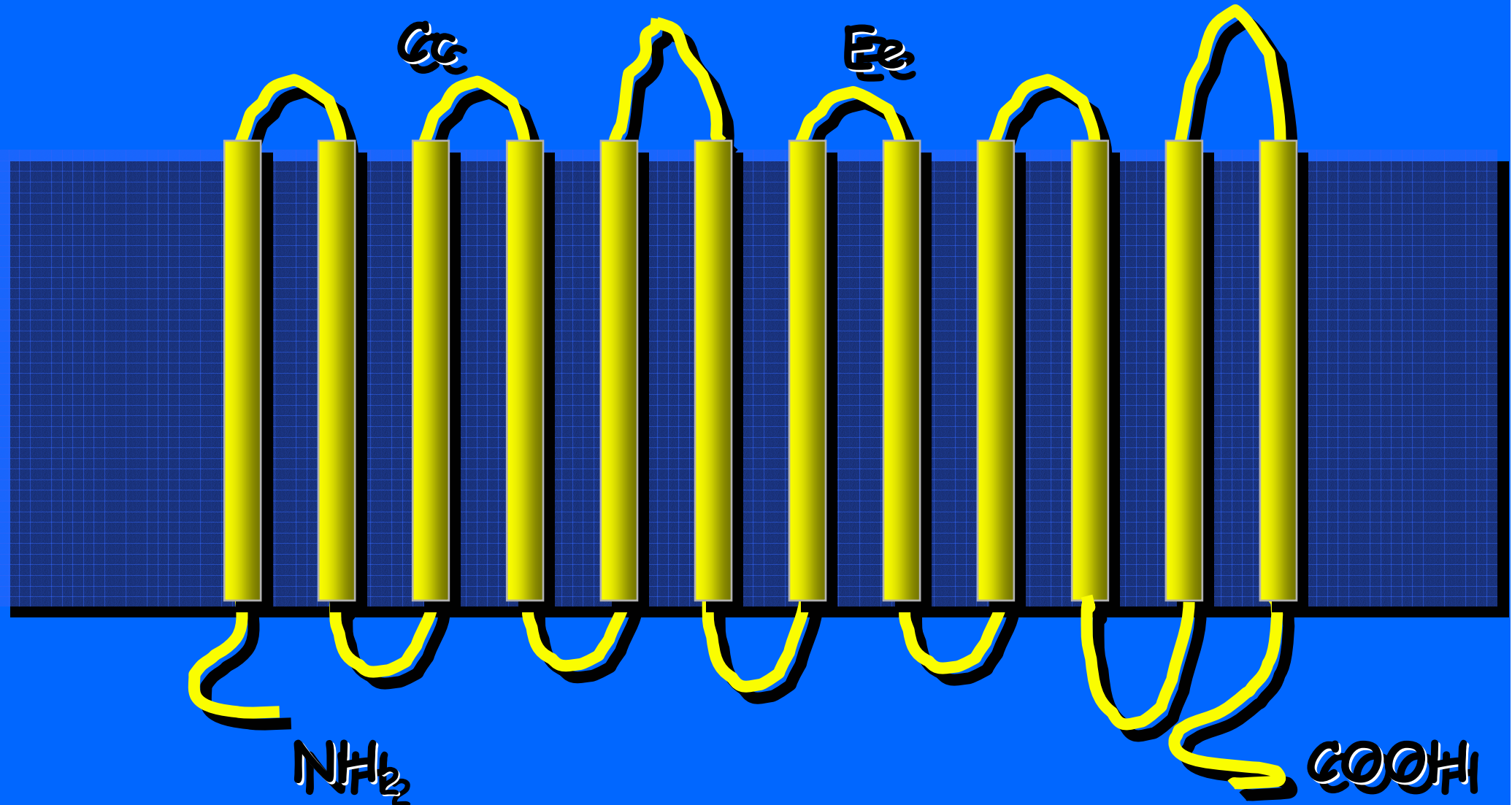
chromosomes n°1



INTS Paris

RHICE

chromosomes n°1



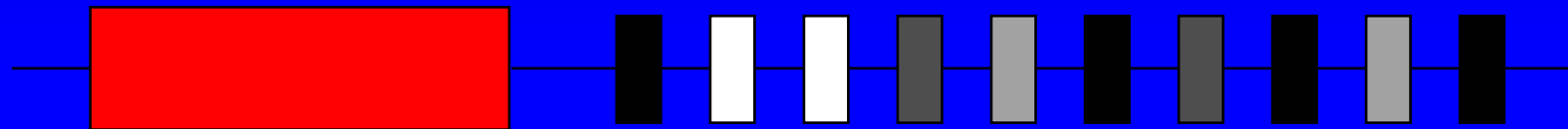
INTS Paris

Structure des gènes RH

Rh positif

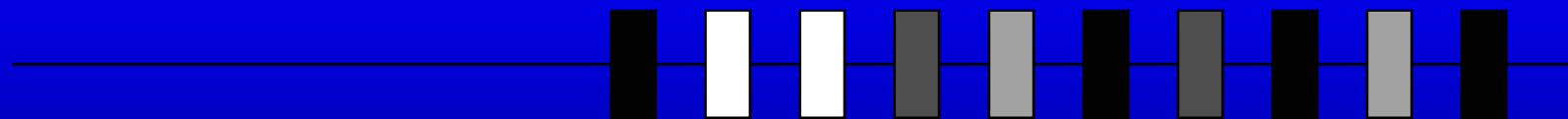
Gène *RHD*

Gène *RHCE*



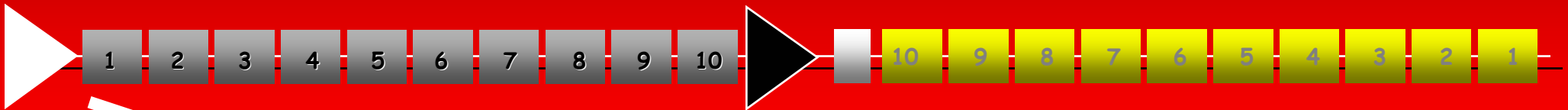
Rh négatif

10 exons

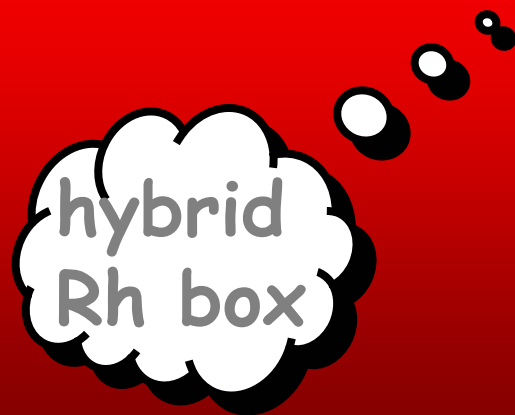
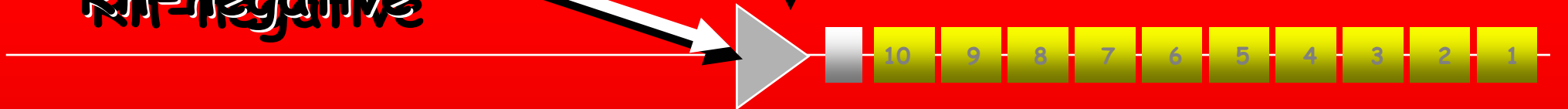


Absence du gène *RHD*

Rh-positive

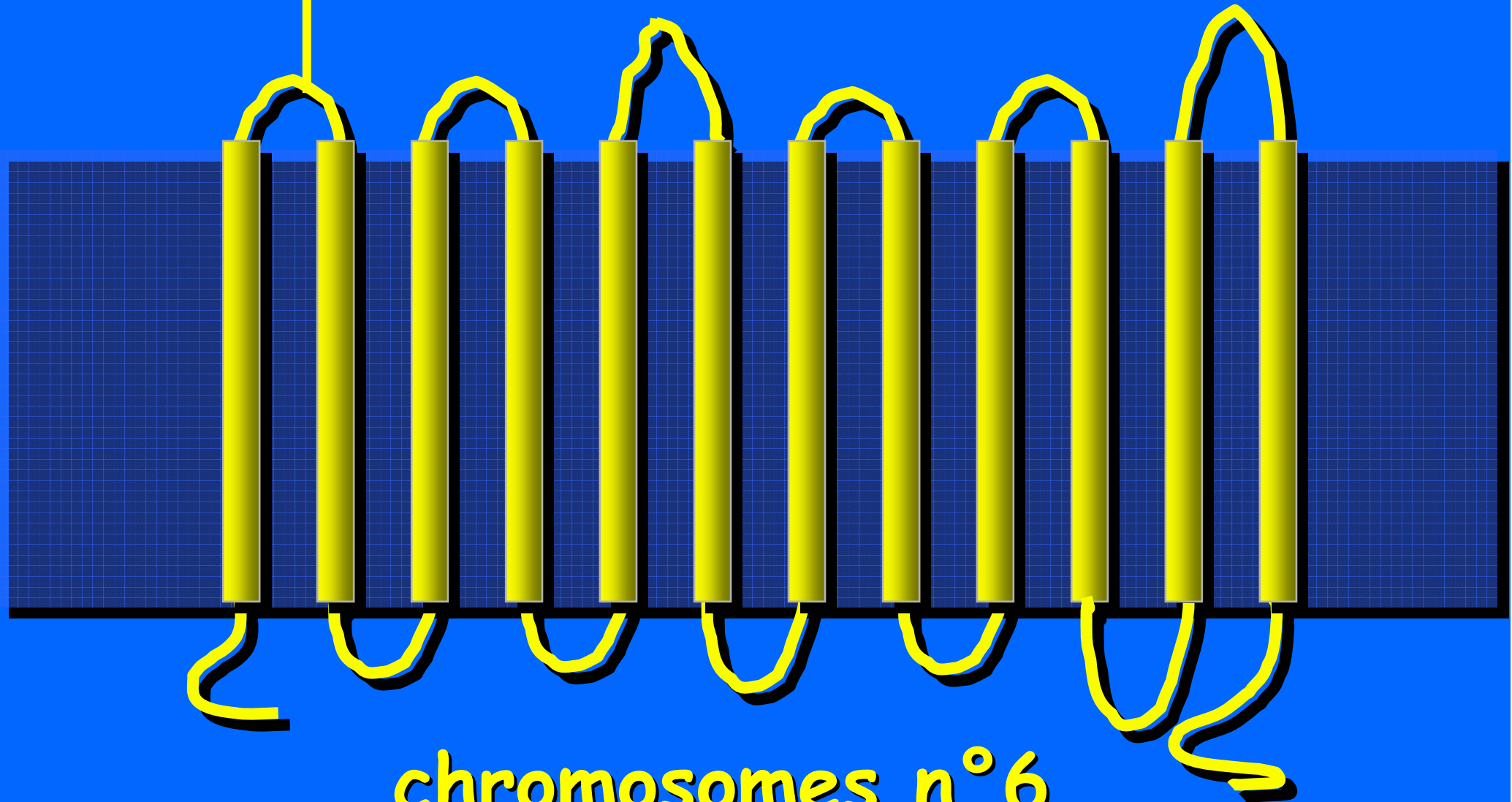


Rh-negative



RHAG

RhAG = Rh-Associated Glycoprotein

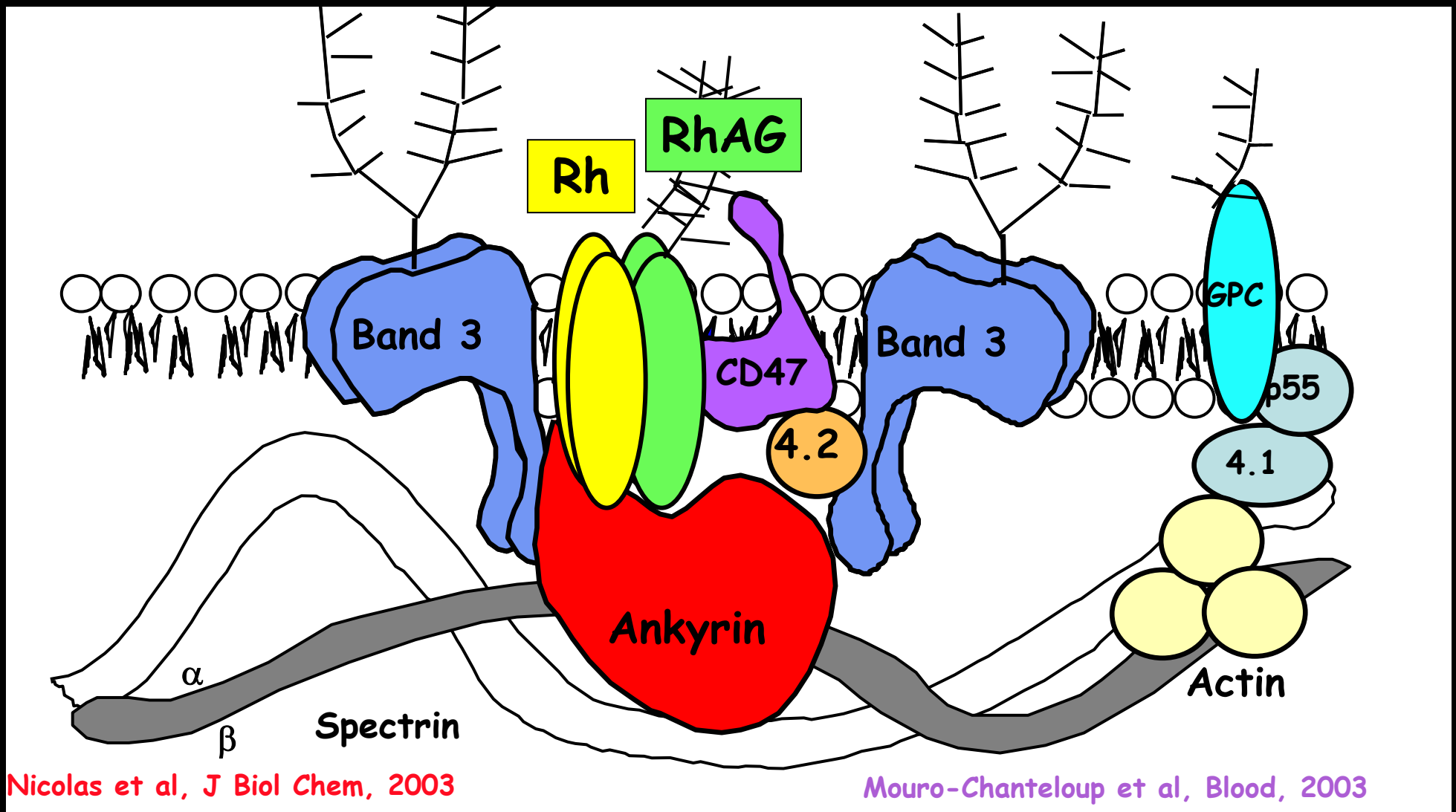


chromosomes n°6

024	OK	Ok ^a					
025	RAPH	MER2					
026	JMH	JMH	JMHK	JMHL	JMHG	JMHM	
027	I	I					
028	GLOB	P					
029	GIL	GIL					
030	RHAG	Duclos	OI ^a	Duclos-like			

systeme RHAG (août 2008)

The Rh complex*

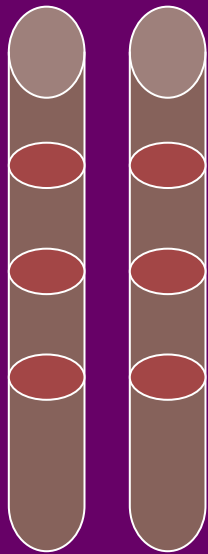


*Complex made of a Core [tetramer $(Rh)_2(RhAG)_2$] and Accessory chains [CD47, LW, GPB]



SYSTEME

RH

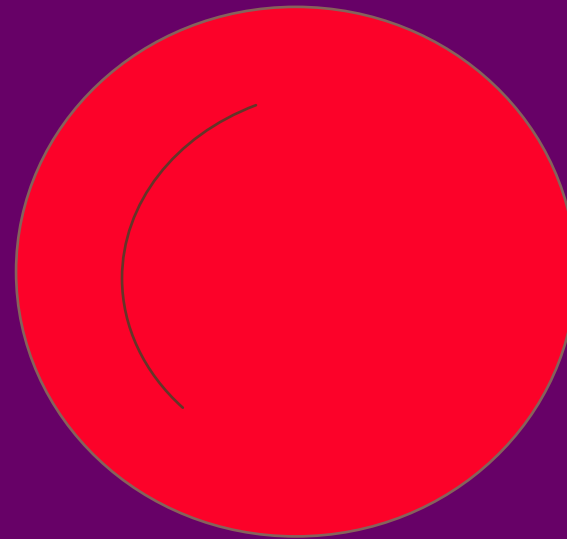


D, d, Df

C, c

E, e

chromosome n°1

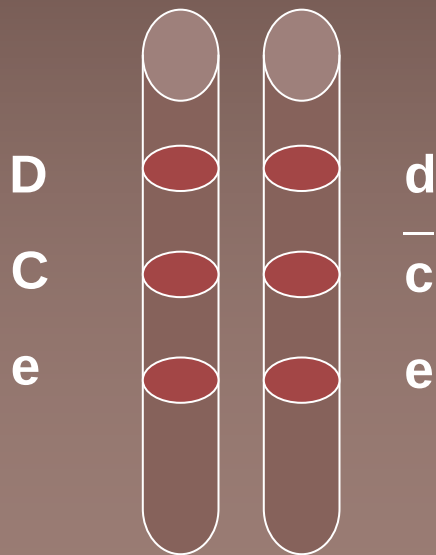


avant!

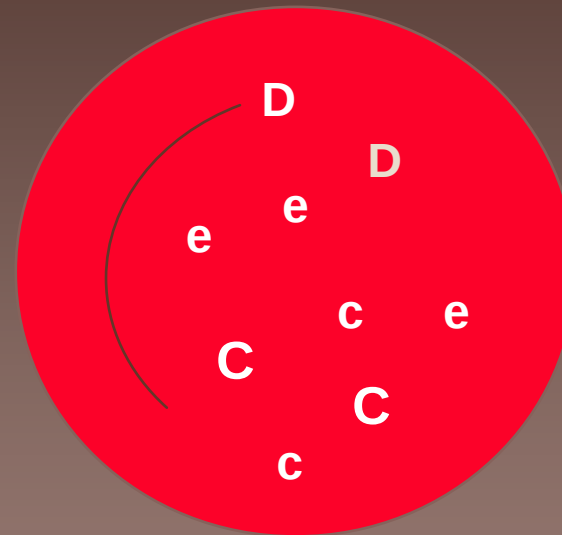
SYSTEME

RH

Rh positif



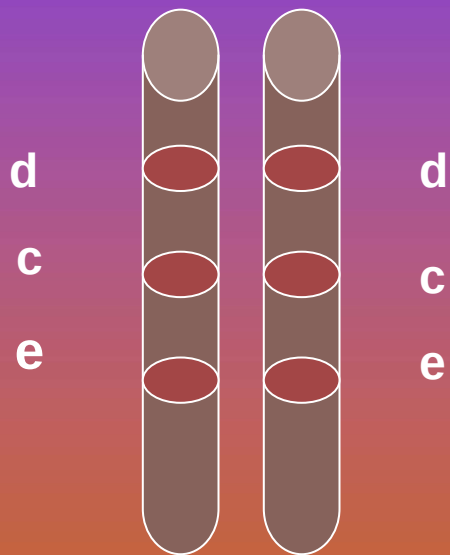
chromosome n°1



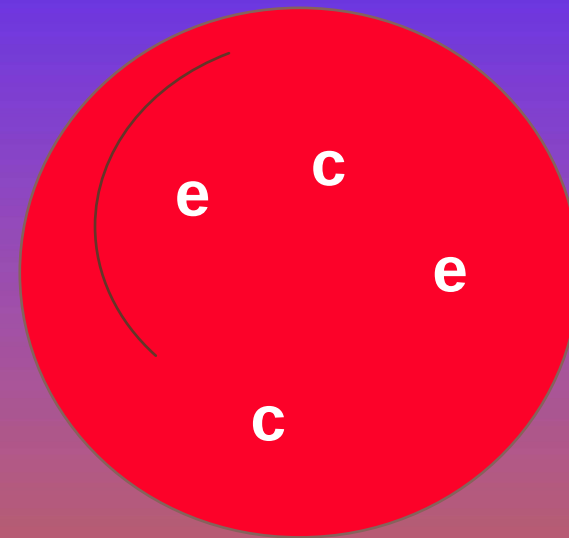
avant!

SYSTEME RH

Rh négatif



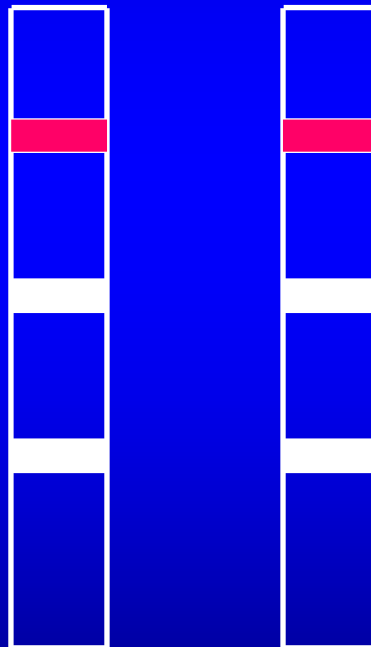
chromosome n°1



Principaux allèles du système Rh

Paire autosomique No 1

avant!



D, d, Df

C, c

E, e

Haplotypes fréquents

D

C

e

42%

d

c

e

39%

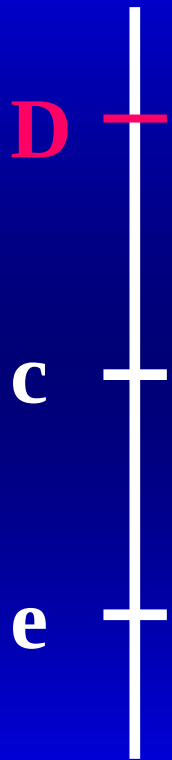
D

c

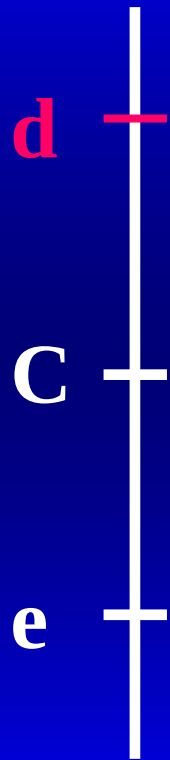
E

14%

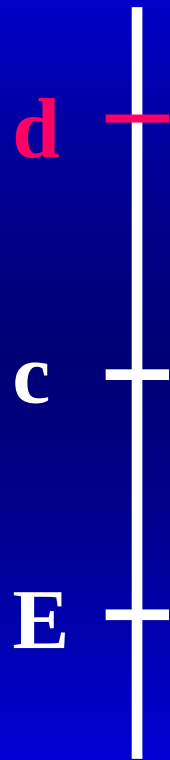
HAPLOTYPES PEU FREQUENTS



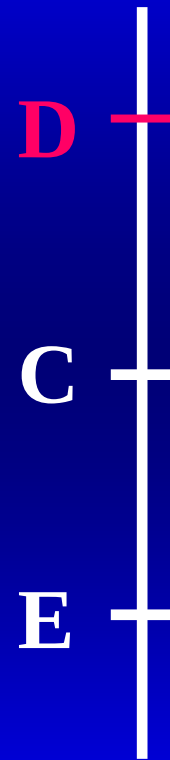
2%



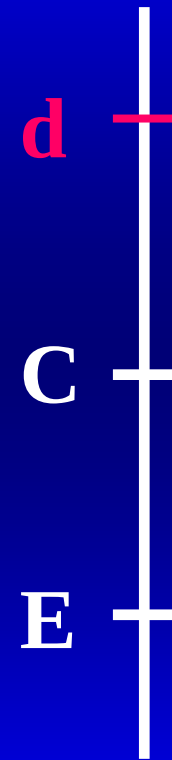
1%



1%



< 1%



excep.

Anticorps du système RH

- ◆ Presque toujours immuns (grossesse, transfusion)
- ◆ Généralement IgG (1 et 3)
- ◆ Ne fixent pas le C'
- ◆ Détectés
 - ◆ par test enzymatique
 - ◆ par test de Coombs
 - ◆ en albumine
 - ◆ en LISS
- ◆ Traversent la barrière placentaire

Anticorps du système RH

- ◆ **anti-D** le plus fréquent (ag D très immunogène) et associé (anti-DC, anti-DE)
- ◆ **Anti-E** immun, mais également naturel (IgM)
- ◆ **Anti-C** rare, souvent associé à anti-D
- ◆ **anti-c** rarissime (allo-ac et auto-anticorps)
- ◆ **Anti-e** *dito*

Phénotype D faible

- ◆ Lors de la détermination des phénotype Df, utiliser en parallèle des hématies Df (contrôle positif).
- ◆ Lors de la technique *en tube*, avec Cbs ind. pour chaque résultat négatif, valider avec un « Coombs contrôle »
- ◆ Un résultat Df positif ne sera validé que si Rh-contrôle ou le Coombs direct est négatif



Typisation Rhésus

D faible

→ Rh D positif si patient

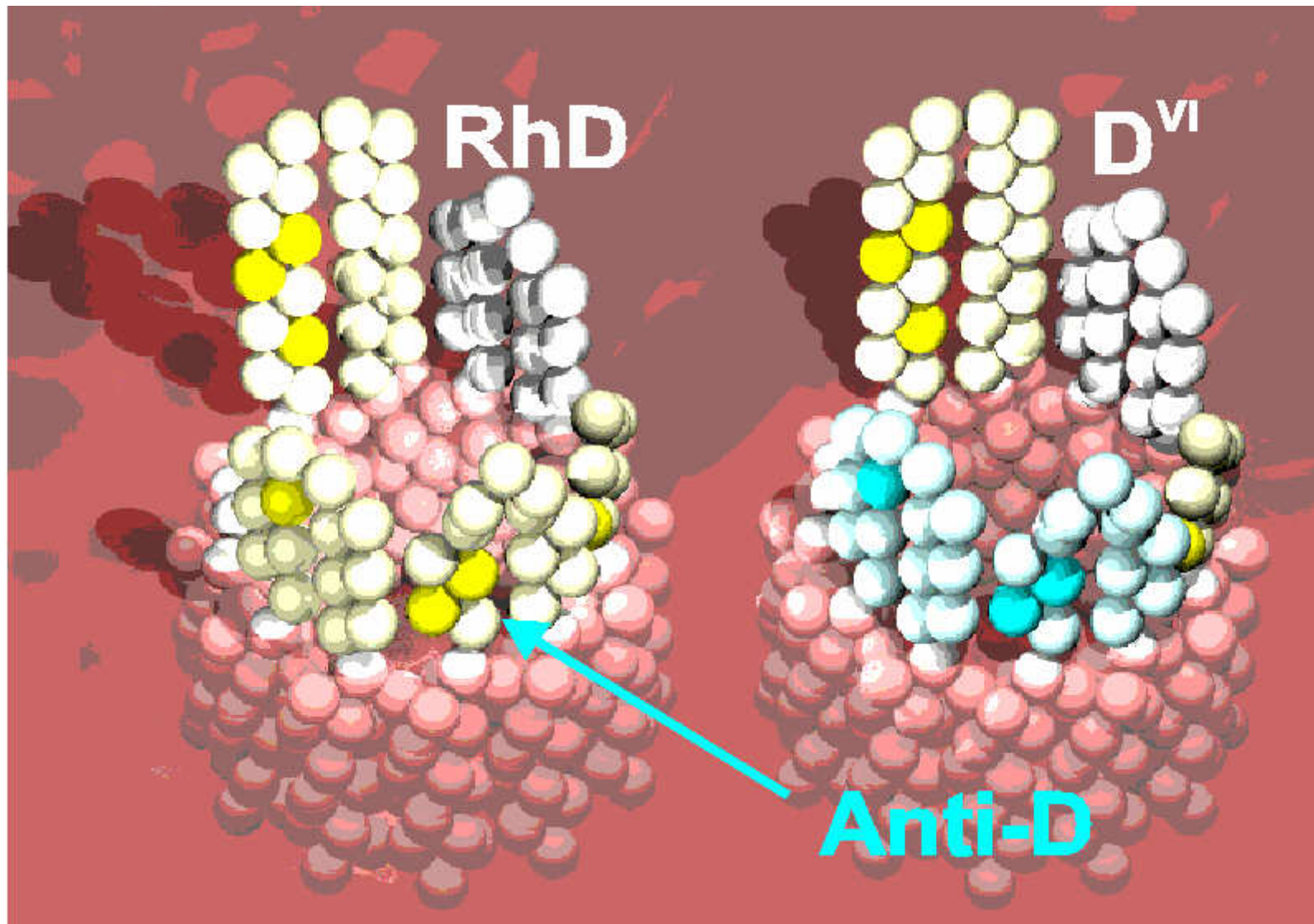
→ Rh D positif si donneur

D partiel

→ Rh D négatif si patient

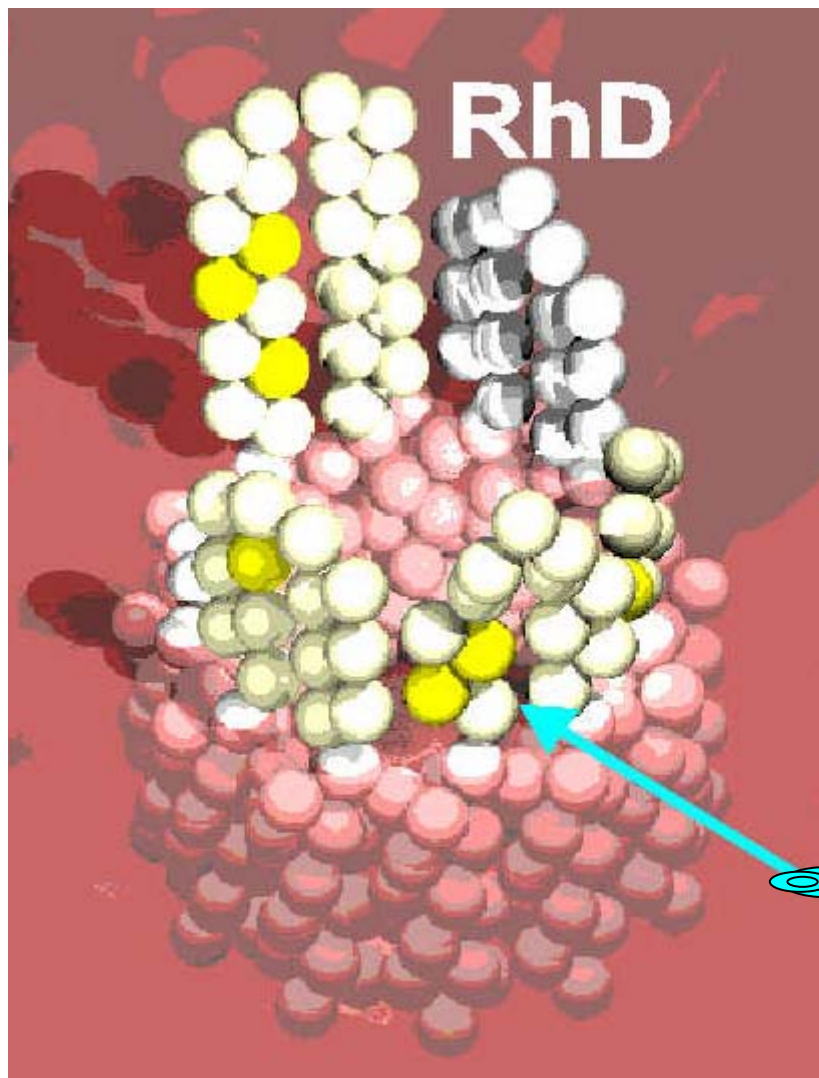
→ Rh D positif si donneur





Dr Willy Flegel, Uni d'Ulm, 2003

Antigène D (ISBT 004.001, RH1)



D faible ou weak D

⇒ **Quantitatif**

⇒ **Mutations moléculaires**

10 épitopes

Weak D

Avant $\rightarrow$ diminution du
nombre de sites D

D

Rhésus positif

D^f

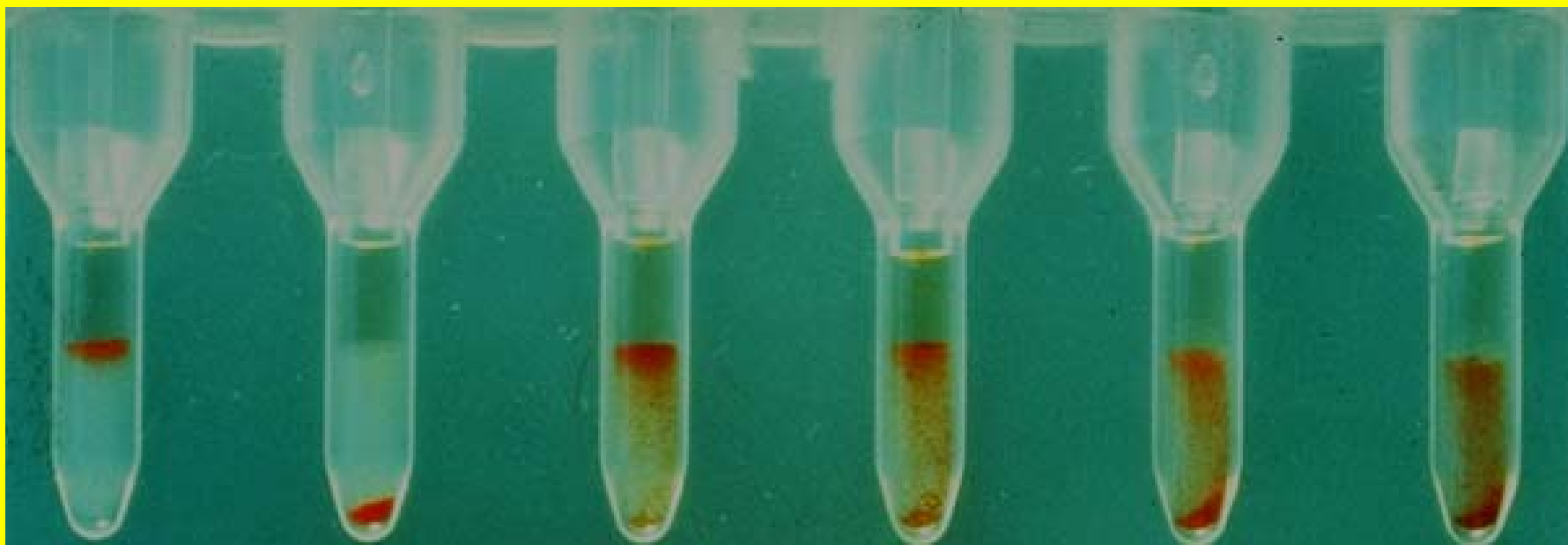
d

Sites D / GR

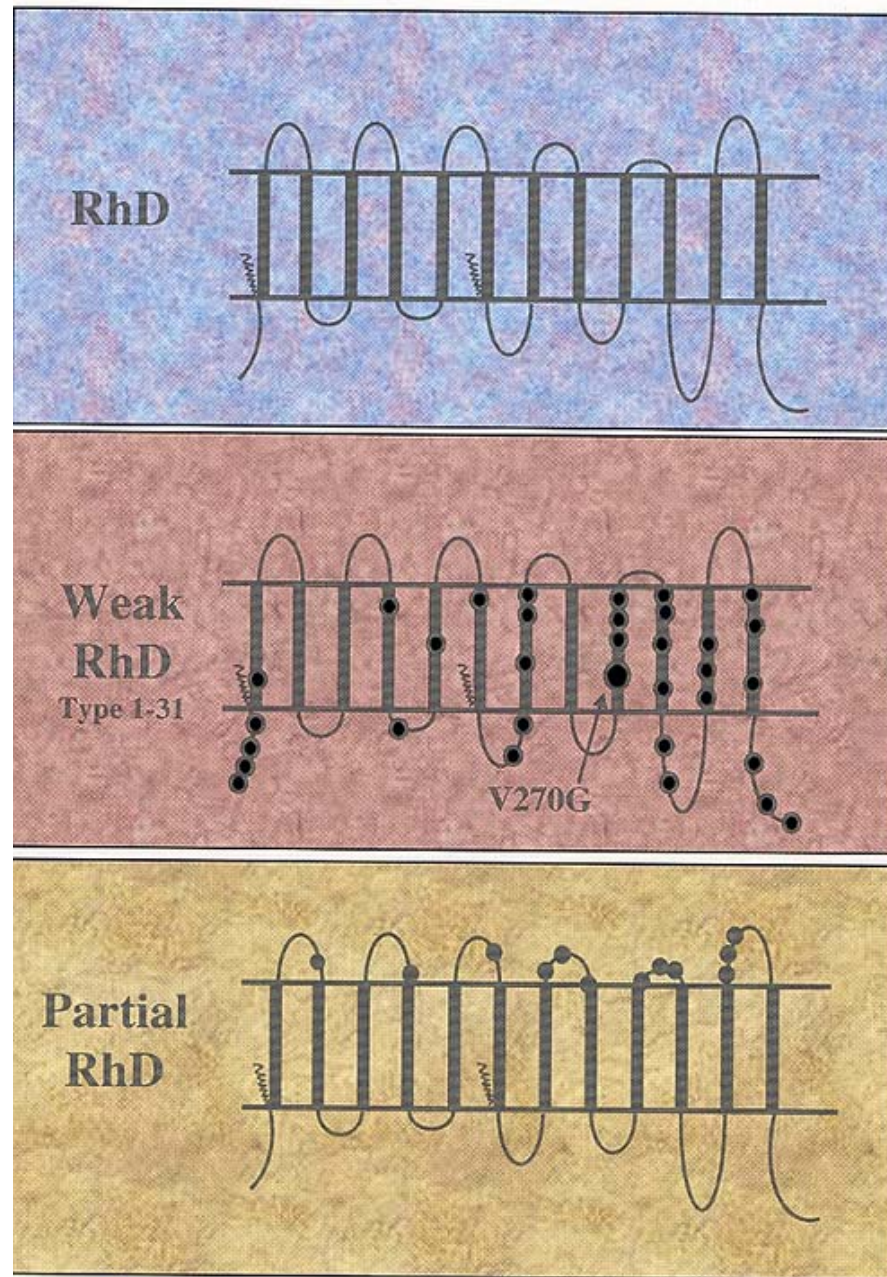
35'000

| *100*
à 9000 |

0



D	D	D	D	D	D
D.	dcl	Du	Du	Du	Du
8 30					



In-frame triplet deletions in RHD alter the D antigen phenotype

by W. Flegel, B. Mansouri and coll.

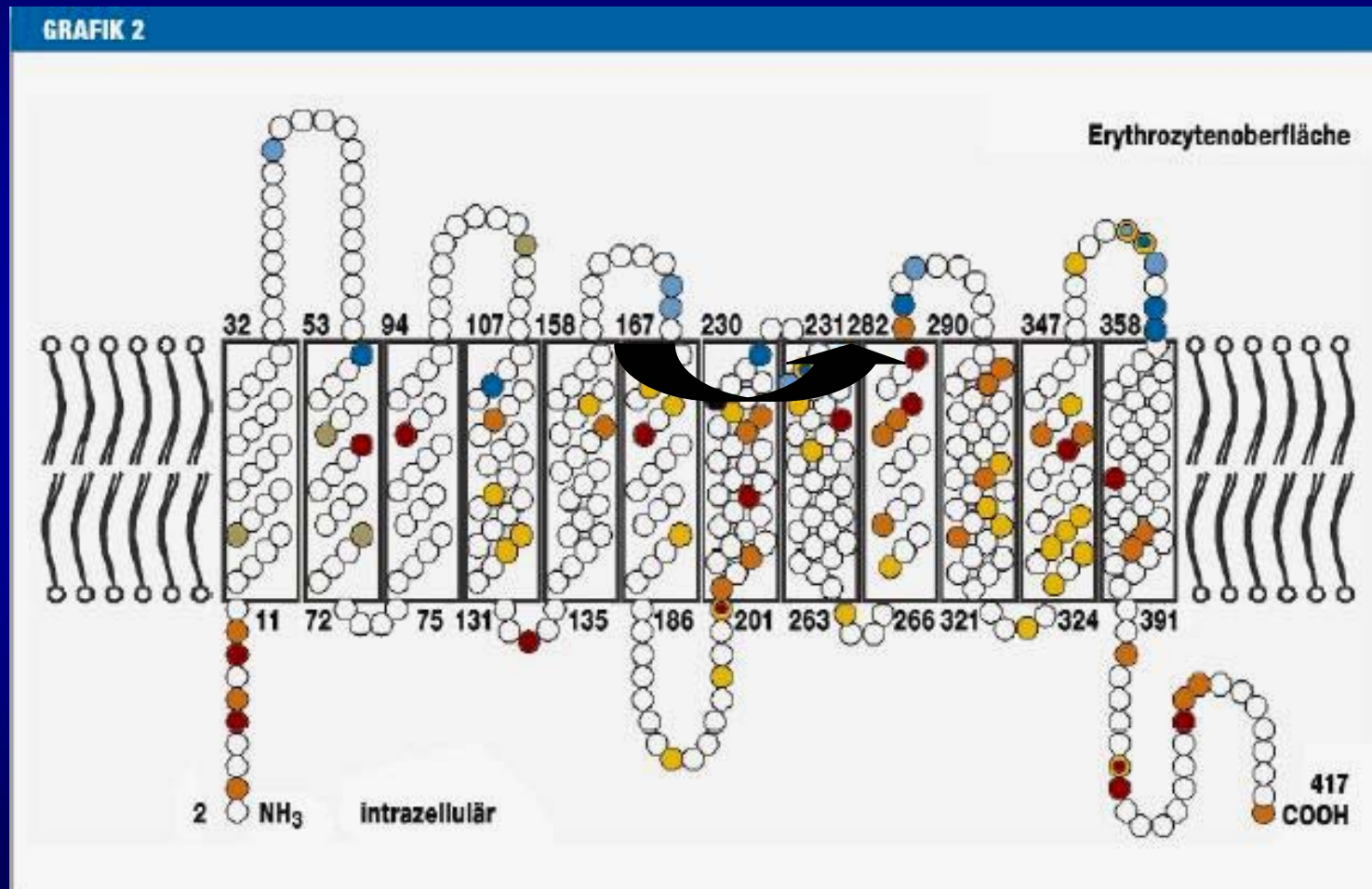
La diversité de l'antigène D est due à un nombre d'allèles *RHD* impressionnant plus de 135 connus

- ⇒ expression diminuée Dweak (surtout partie intracellulaire)
- ⇒ changement qualitatif Dpartiel (partie extracellulaire)
- ⇒ les 2 !

Dans cet article, on montre un autre mécanisme, la délétion d'a.a.

In-frame triplet deletions in RHD alter the D antigen phenotype

by W. Flegel, B. Mansouri and coll.



Article du Dr Willy FLEGEL et coll.

Transfusion 45, octobre 2005

- la sérologie ne suffit plus, seule la technique en biologie moléculaire est adéquate
- en Europe, surtout Dweak type 1 à 5
- seul Dweak type 1 (800 sites D) sort en gel
- dans le Nord de l'Allemagne et DK:
Dweak type 1.1. [600 sites D] par GR (voir photo)

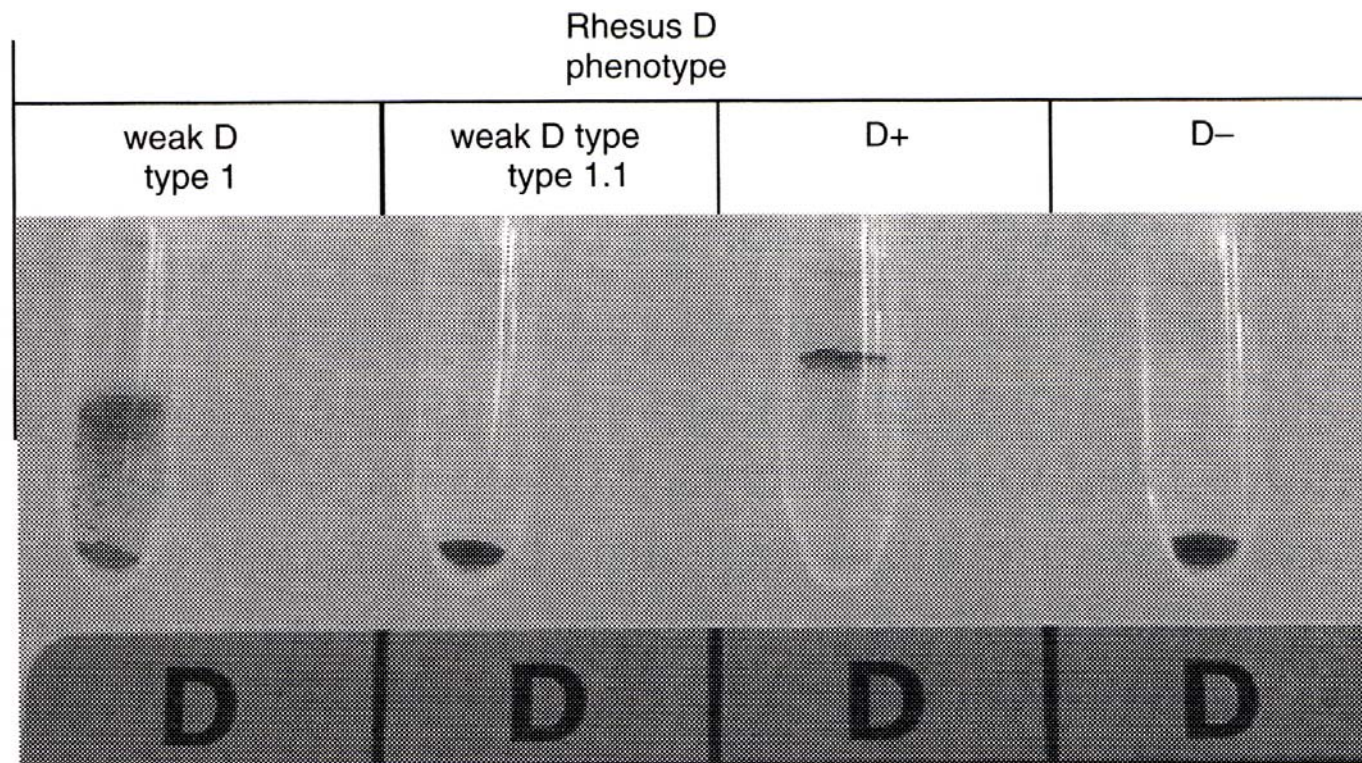
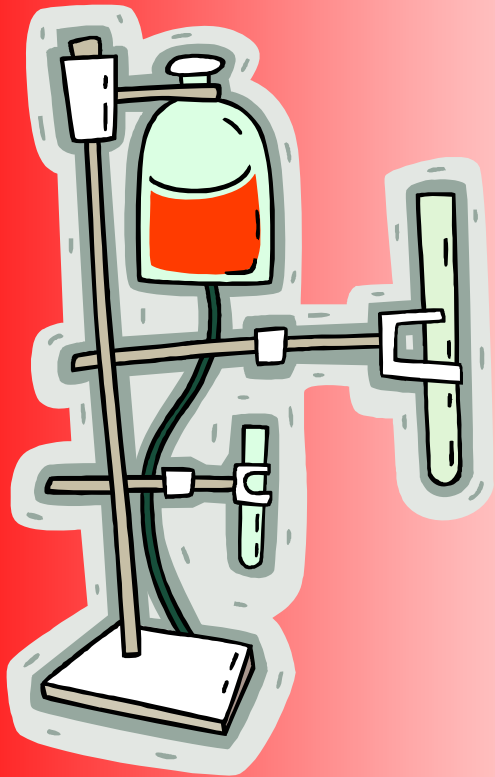


Fig. 3. D typing of weak D type 1.1 with a gel matrix test. There is no visible agglutination with the weak D type 1.1 sample. An agglutination pattern representative for weak D type 1 samples is shown for comparison.

Avant toute transfusion



- ✦ **2 déterminations de groupe sanguin du patient**
- ✦ **avec 2 prélèvements en différé, en respectant la date de la transfusion**

Analyses en Immuno-Hématologie

Contrôles de Qualité Internes (CQI)

- Appropriés et réguliers pour chaque prestation

Contrôles de Qualité Externes (CQE)

- Au minimum 4x / an

CQI: typisation Rh

Anti-D : hématies-tests CcDee et ccddee:
1x par jour o

Anti-D : hématies-tests D faible *lors du test*

Anti-C, -c, -E, -e : hématies hétérozygotes
pour les ag en question:
1x par jour o (ou lors du test)



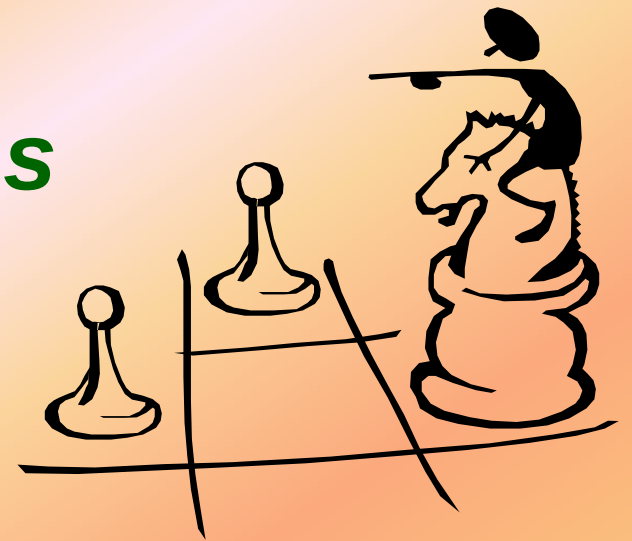
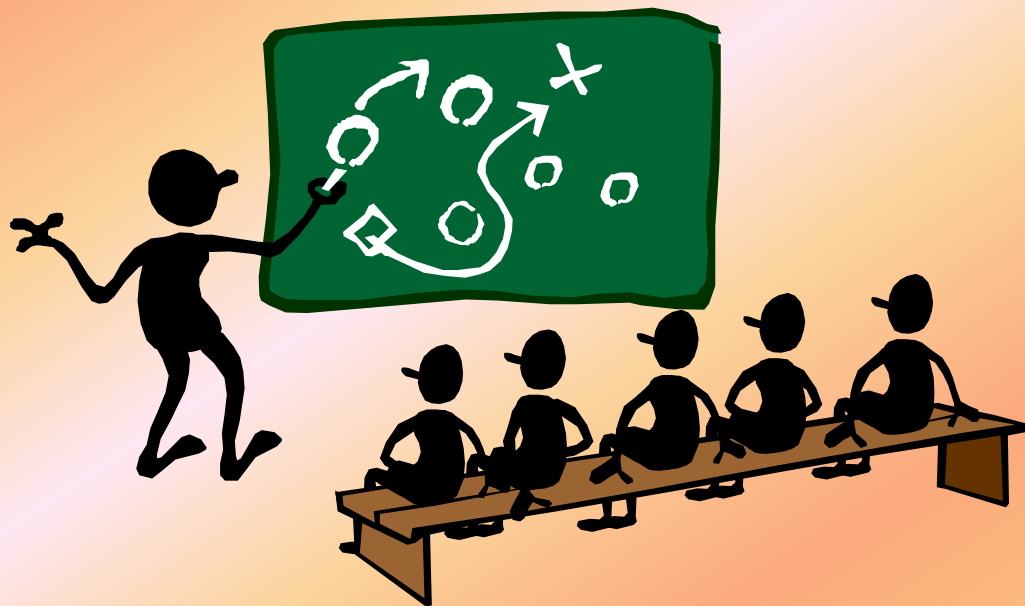
Contrôles de Qualité Externes

Les laboratoires pratiquant l'immuno-hématologie doivent se soumettre, **4 fois par an**, aux contrôles de

la qualité organisés par
le STS CRS à BERNE



Les résultats des CQI / CQE non satisfaisants doivent être analysés et font l'objet *d'actions correctives voire préventives*





This is a stick up! Fill the bag with AB
negative.



RH nul

Jeune homme en bonne santé pour carte de groupe avant l'école de recrue se présente au LCST en 1977

Groupe A et absence totale des antigènes RH ⇒ phénotype nul

Début d'une collaboration avec le Dr Jean-Pierre Cartron de Paris unique spécialiste à l'époque des systèmes rares et RH

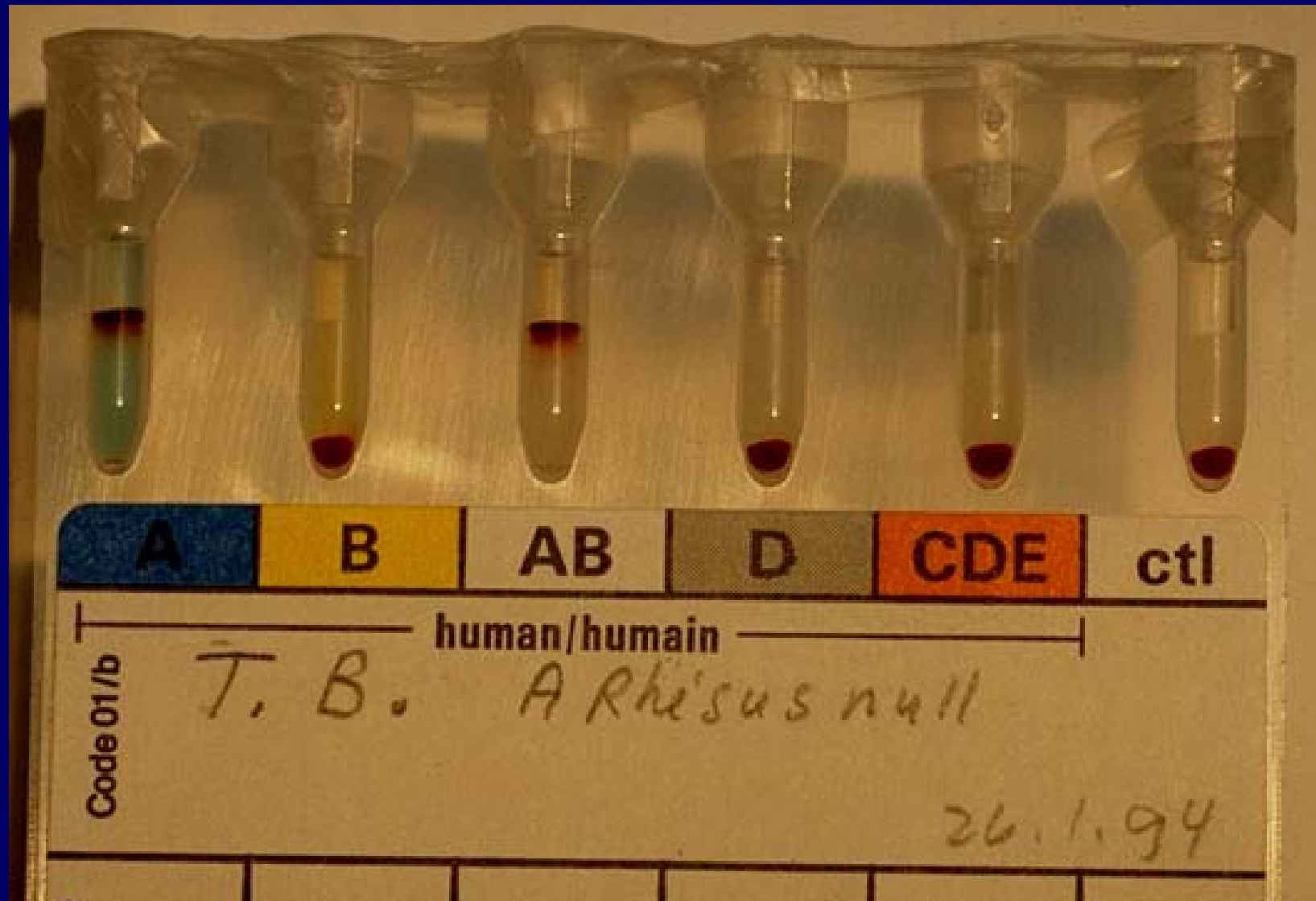
Type régulateur (mutations du gène *RHAG*) avec absence totale du *RHD*, *RHCE*, et *RHAG*, mais transmission normale des *RHD* et *RHCE*. Absence d'antigènes LW

Anomalie morphologique légère des GR (stomatocytose)

Anémie hémolytique très bien compensée (Hb normale, mais réticulocytes augmentés)

Réserve de sang autologue congelé

RH nul découvert par MJ Stelling-Auderset en 1977 aux HUG de Genève (technique initiale en tubes!!)



RH: -1,-2,-3,-4,-5





NO UNITE: 4324847 COLLECTE : 2122 PRELEVE LE : 09/03/92 BLOCAGE :
DONNEUR : 37121 NOM : T.B. Sexe: Mm

ANALYSE =	RESULTAT	ANALYSE =	RESULTAT	ANALYSE =	RESULTAT	ANALYSE =	RESULTAT
D	= -	C	= -	E	= -	C	= -
e	= -	K	= -	IR1	= -	GR	= A
Rh	= -	Hb	= 16	HBsAg	= -	ALAT	= 0
HIV	= -	CMV	= +	AC-HCV	= -	TPHA	= -
	=		=		=		=

Microarray slide with 6 test wells. The first well (A) shows a blue color change, indicating a positive result. The other wells (B, AB, D, CDE, and control) show no color change, indicating negative results.

A	B	AB	D	CDE	ctl
Blue	Yellow	Yellow	Grey	Orange	White
human/humain					
Code 01/b 000201 08.93					
Jameau ; Th. B. 29.04.1963					
21.03.95					

Microarray slide with 6 test wells. All wells (C, c, D, E, e, and control) show no color change, indicating negative results.

C	c	D	E	e	ctl
Pink	Purple	Grey	Brown	Green	White
human/humain					
Code 06/b 000206 08.93					
Jameau Th. B. 29.04.1963					
21.03.95					







Rh_{null} deficiency syndrome

Rare autosomal recessive disorder (« amorph » and « regulatory » types):
Hemolytic anemia of varying severity

Stomato-spherocytosis

Biochemical alterations

- . *Cations transport*
- . *Phospholipid organization*

Antigen and protein defects

- . *Rh, RhAG, LW, CD47, GPB*

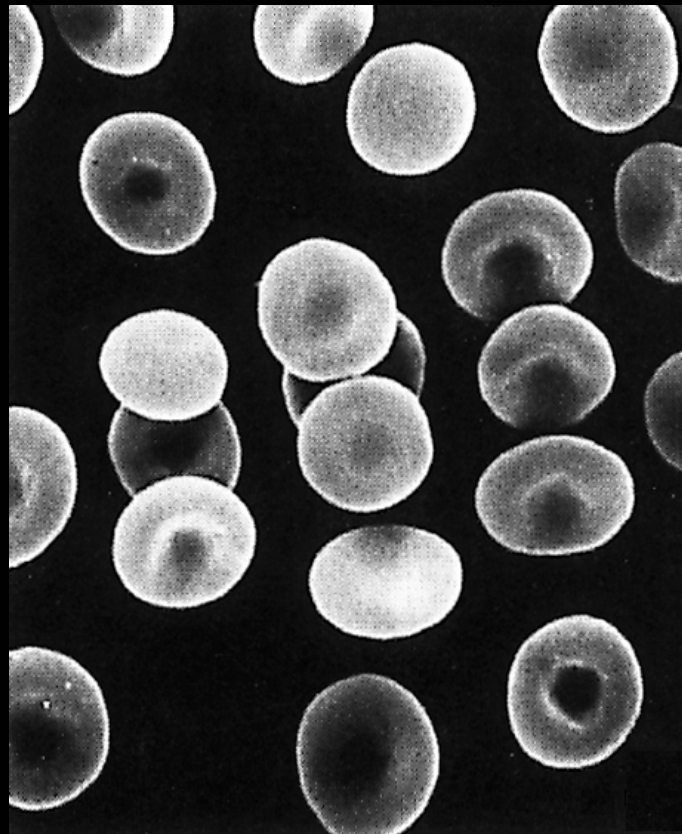
Genetic defects

RHAG mutations

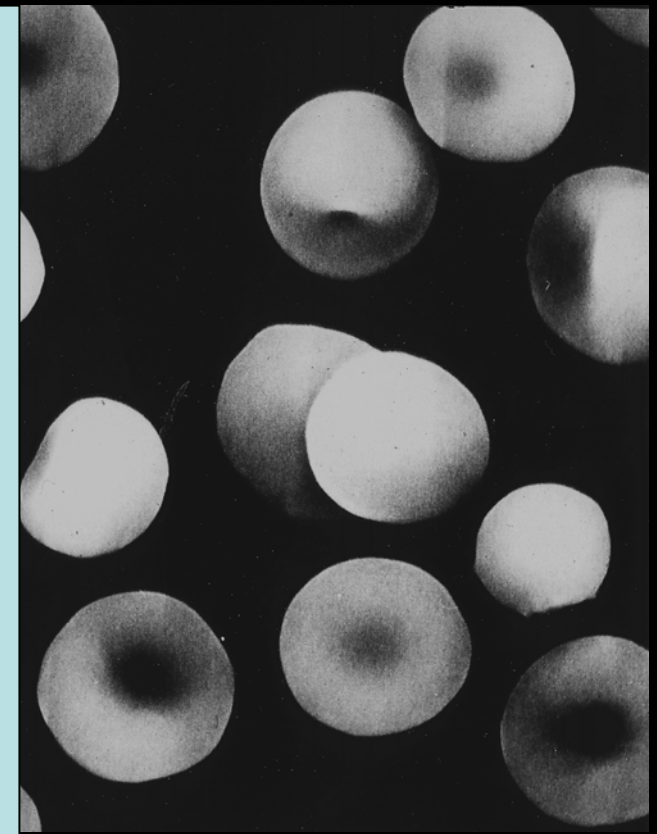
or

RH mutations

normal

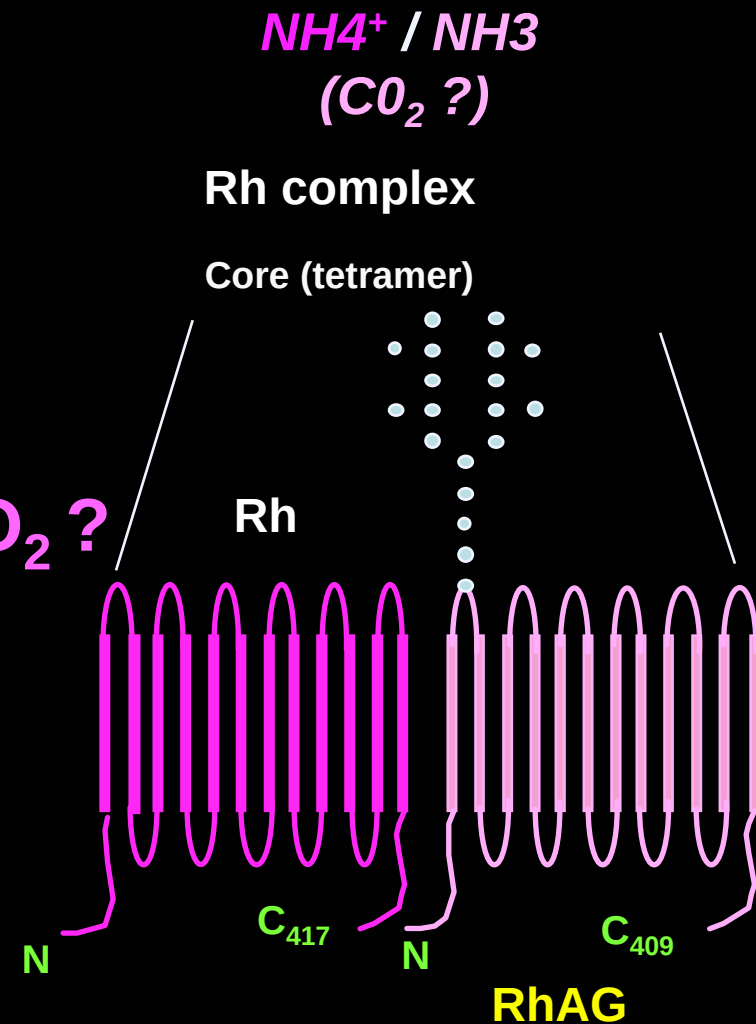


Rh_{null}

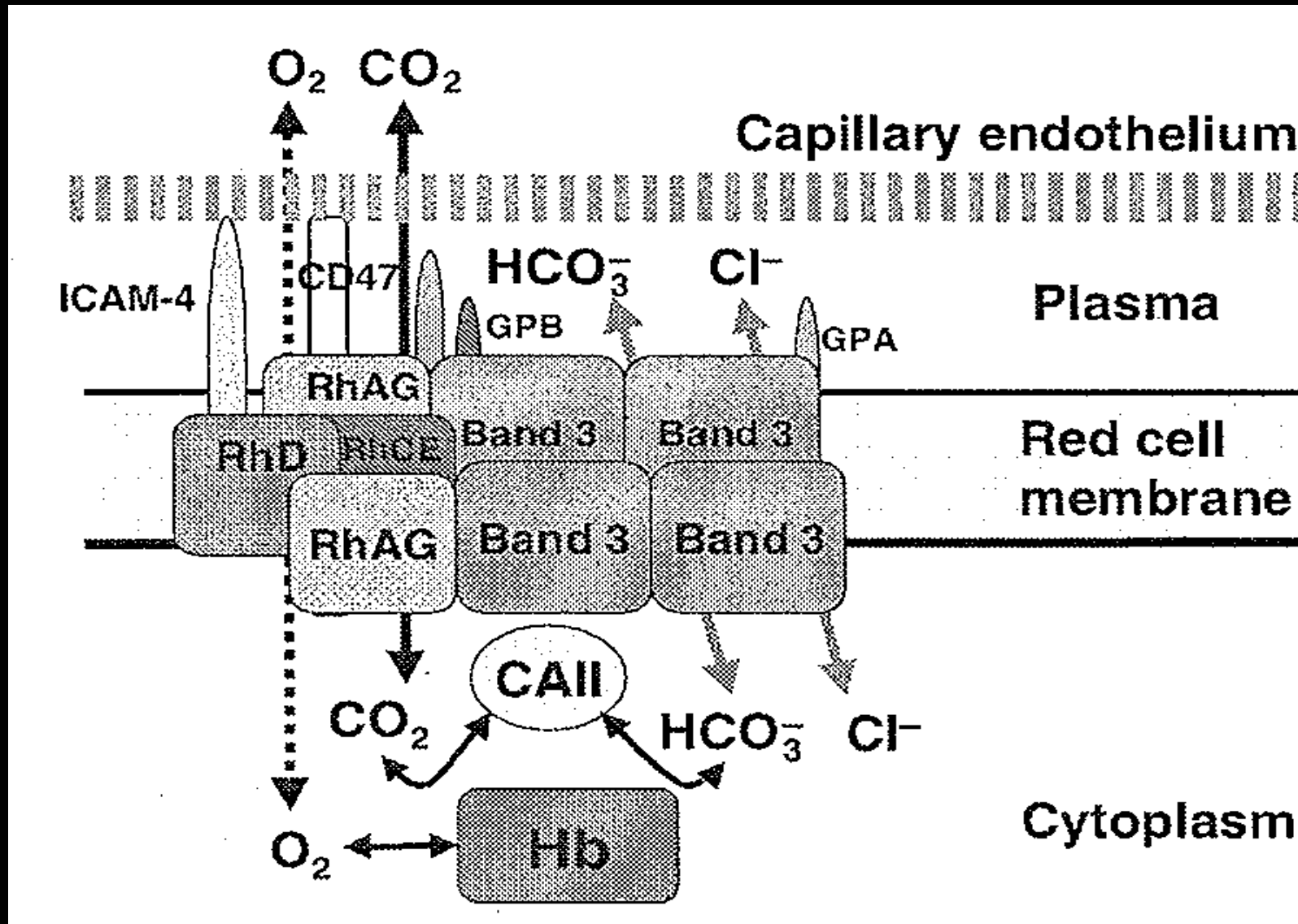


Rappel

- ▶ transport d'ammonium
- ▶ transport / canal à gaz, CO_2 , O_2 ?
- ▶ structure de la membrane

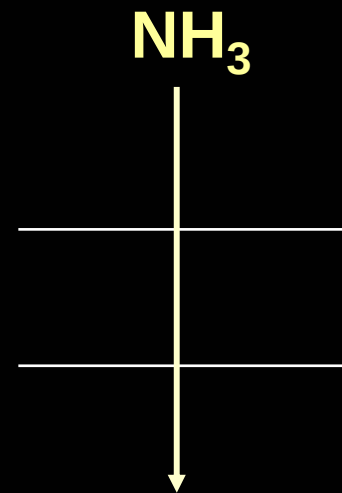
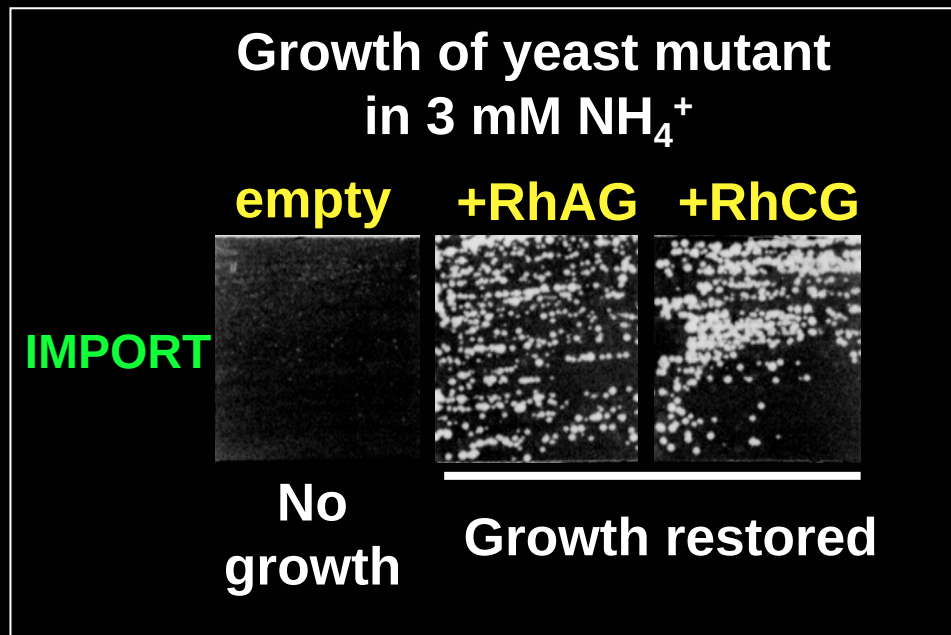


proximité du complexe RH
avec la bande 3 (échangeur d'anions)

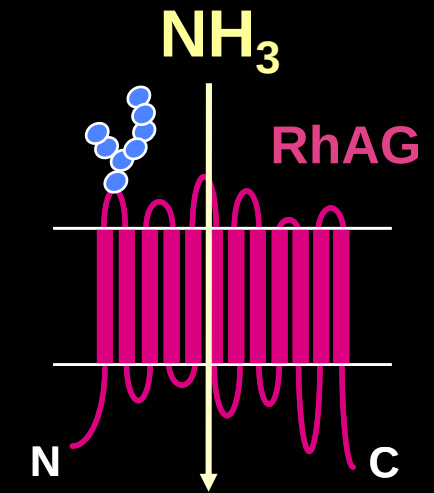


Homologie entre le RhAG et Mep protéine des plantes

⇒ Le RhAG serait un vestige ancestral dans la phylogénie!



Lipid
Diffusion



Gas Channel

Monsieur Gilbert D... (1939)

- août 1999 : **groupe 0 Rh négatif**
- erreur de prélèvement ? car ancien dossier 0 Rh pos.
- de 1992 à 1997 : groupe 0 Rh positif
 - » transfusé par CE 0 Rh positif
 - » RAI négatif et DAT négatif
- depuis août 1999 : 2 CE / mois, car forte anémie
- sept. 1999 : LC Berne groupe 0 Rh positif avec très faibles ag D et E, ag C négatif
formation de clones anormaux (?), donner 0 Rh nég.

Monsieur Gilbert D... (1939) *suite*

- octobre 1999 : **INTS à Paris Prof. JP Cartron**
- par cytométrie de flux avec anticorps monoclonaux
- 2 populations d'hématies
 - » **2% D+** hématies résiduelles non modifiées du patient
 - » **98% D nég.** hématies modifiées & transfusées *dce/dce*
- 1 population C+ et E+ du patient (2 %)
- 1 population c+ et e+ du patient et des donneurs
- **en conclusion:** les hématies «originelles» sont certainement **DCcEe**
 - » identifier l'anomalie moléculaire du gène D par analyses des réticulocytes et ARNm D.

Monsieur Gilbert D... (1939) *suite*

- mars 2000 : syndrome myélodysplasique de type leucémie
myélomonocytaire chronique
ancienne cirrhose «calme»
- transfusé régulièrement par CE, car érythropoïétine sans succès
- maintient Hb 7-8 g / dl
- anomalie chromosomique paire n° 3 (?)
- envoi prochain à INTS à Paris

Mlle Michelle E..... (1994)

- mars 1999, patiente venant d'un autre canton
- problème de groupage
 - » **antigène B très faible**
 - » **antigène D négatif**
 - » **Coombs direct +/-**
- Quel groupe transfuser ?
- historique transfusionnel : transfusée 2 CE / mois **0 Rh négatif** depuis octobre 1996
- mai 1999 par PCR : **groupe B Rh positif DCe / DCe**

Mlle Michelle E..... (1994) suite

- anémie dysérythropoïétique congénitale de type II nécessitant la transfusion de CE / mois
- avril 2000 : **groupe B DCe / DCe** et RAI négatif
- juin 2000 : anti-Wr(a) positif en Cbs indirect et papaine
- ag Wr^a présent 1: 1500 donc pas de problème pour trouver du sang compatible
- Coombs direct
 - anti-IgG ++
 - anti-IgM nég.
 - anti-IgA nég.
 - anti-C3d faible pos.