Applications

THE COM DS CIPECT

LabMed-CPLN

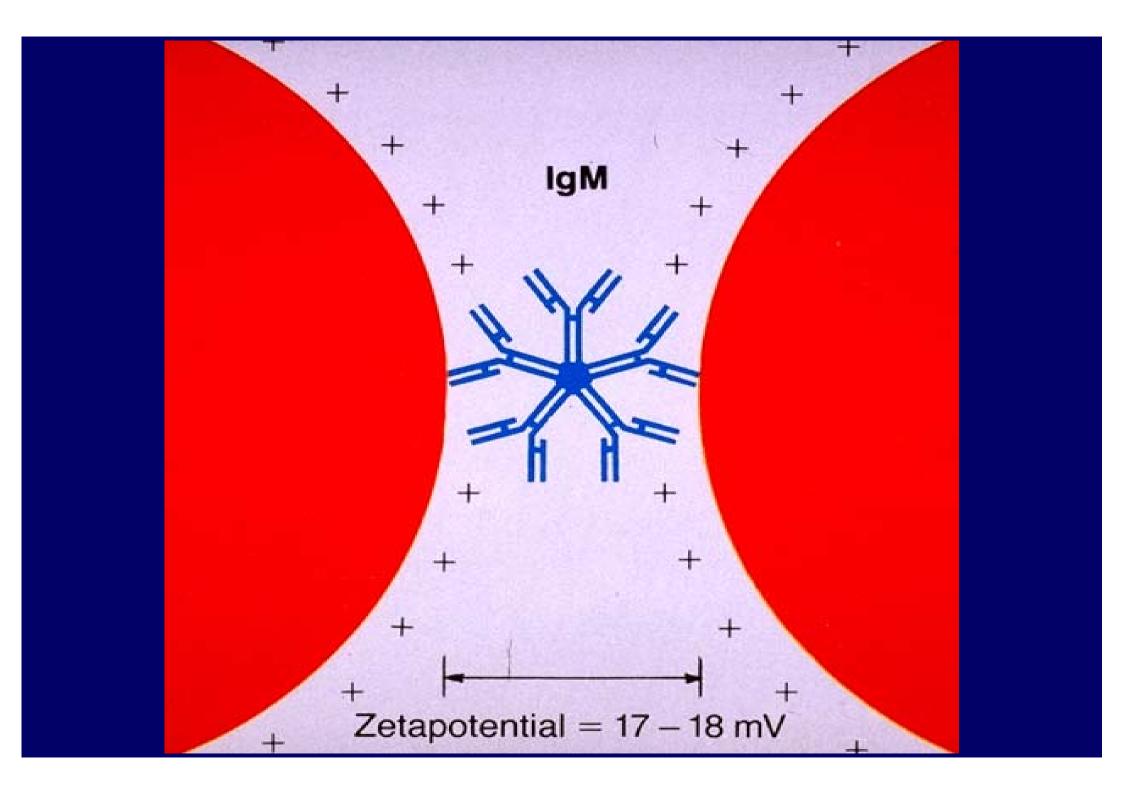
Neuchâtel, le 20 octobre 2008

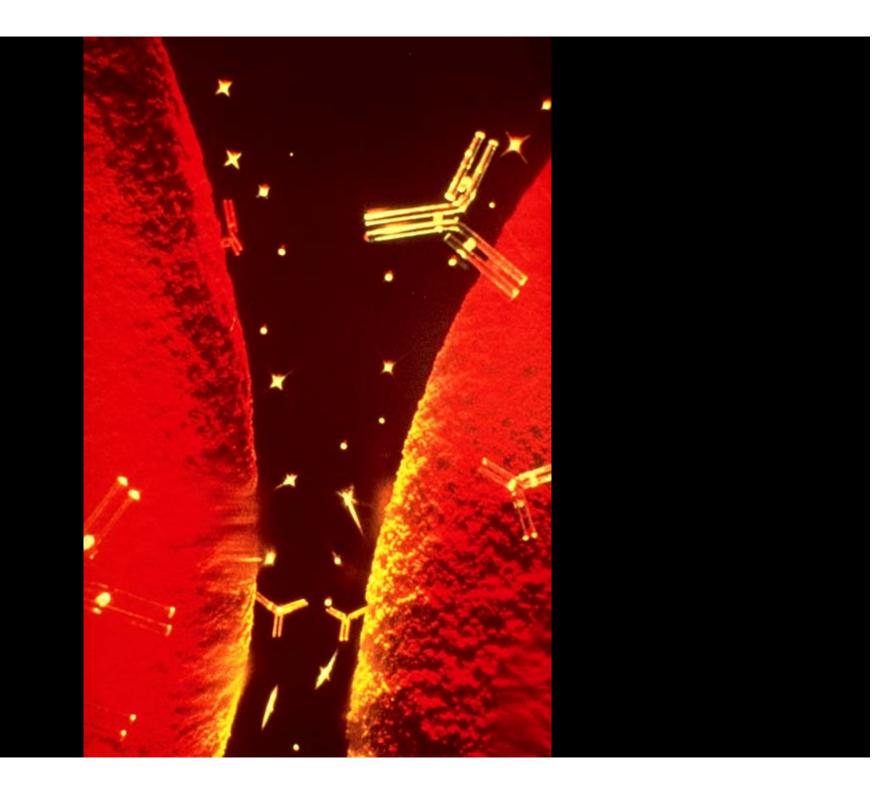
Dr Marie-José STELLING chargée de cours UNI Genève pastprésidente de l'ASMT

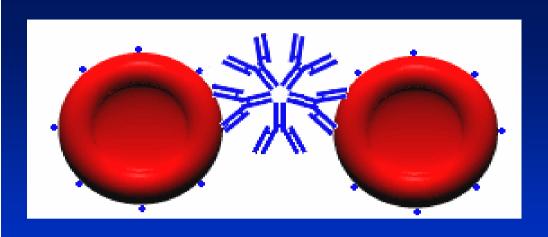




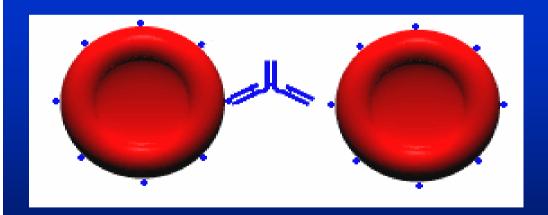




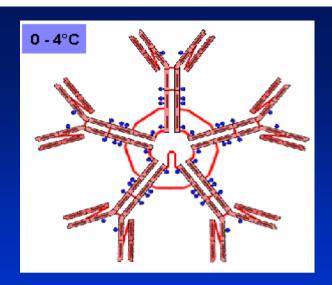




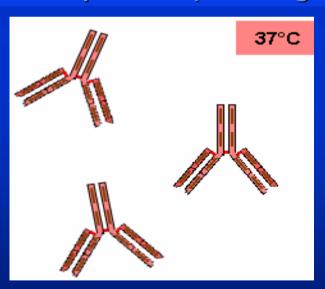
Anticorps complets (surtout IgM)



Anticorps incomplets (IgG)



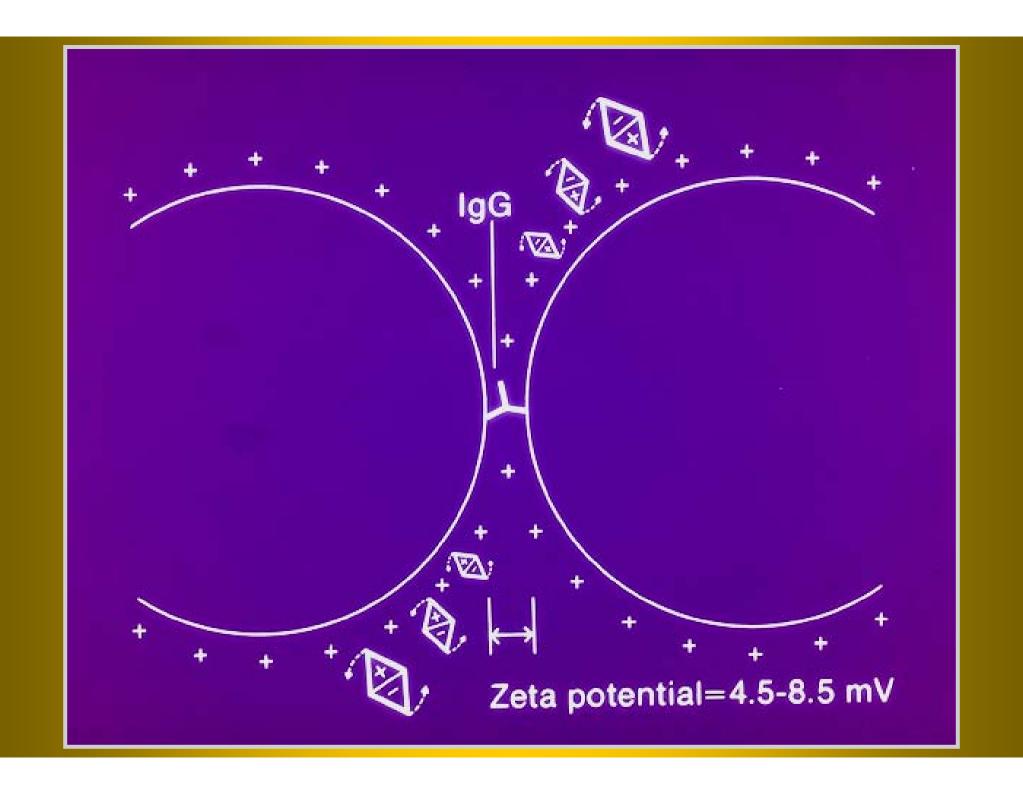
Anticorps froids (surtout IgM)



Anticorps chauds (surtout IgG) cliniquement importants

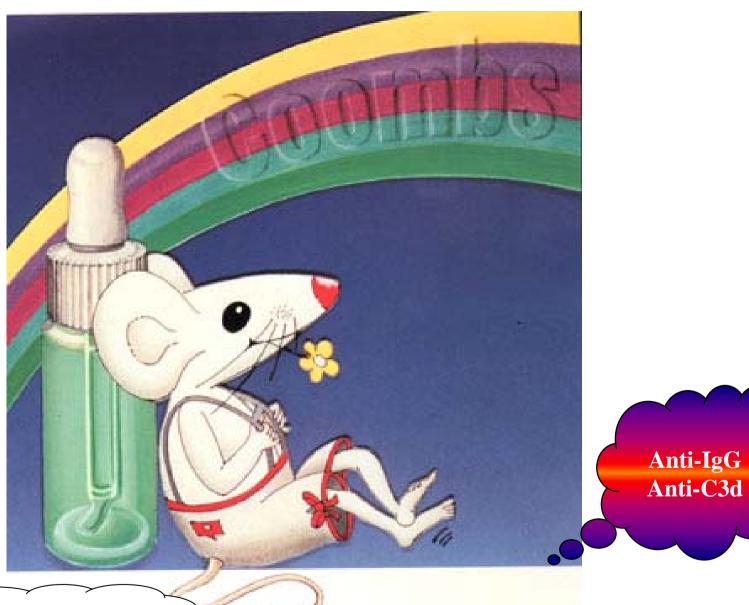
Agglutination artificielle

- 1) à l'aide de protéases (Broméline, papaïne, ficine, trypsine)
 - → réduction de la charge négative des hématies
- 2 à l'aide de substances (albumine 30%, dextran)
 - → augmentation de la constante diélectrique du milieu



Agglutination artificielle

- 3 à l'aide de LISS (Low Ionic Strength Solution)
 - ⇒ action complexe:
 - □ charge négative des GR
 - 7 constante diélectrique du milieu
 - 7 vitesse de réaction ag ac
 - 7 VGM des GR
- 4 réactif de Coombs



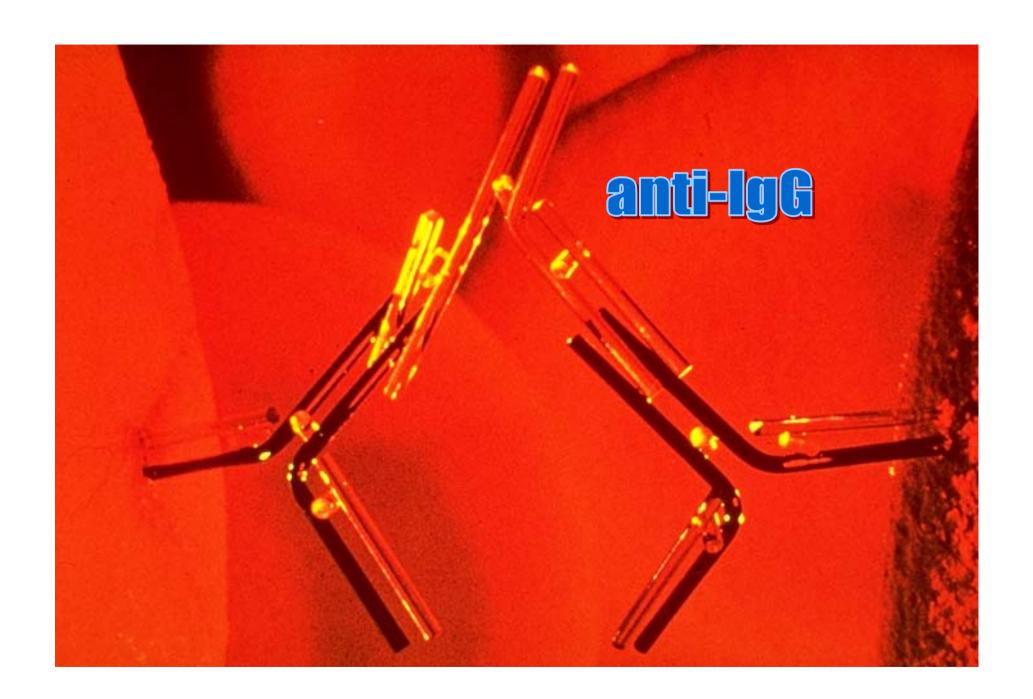
Réactif de Coombs

Réactif à l'antiglobuline

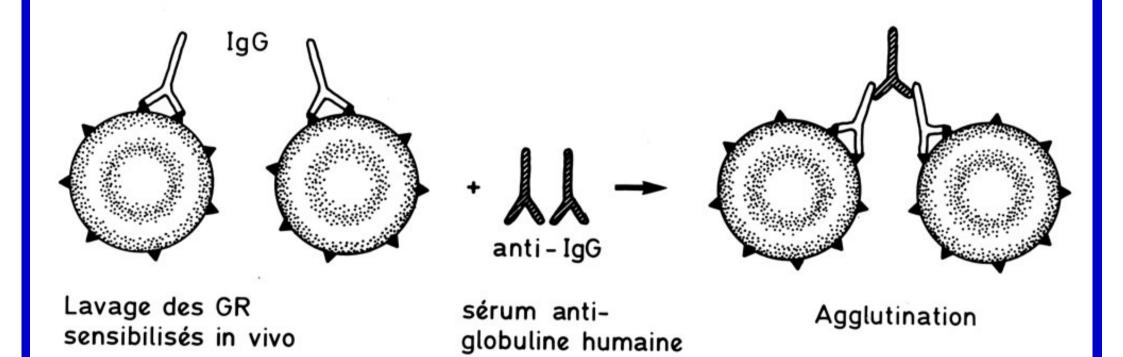










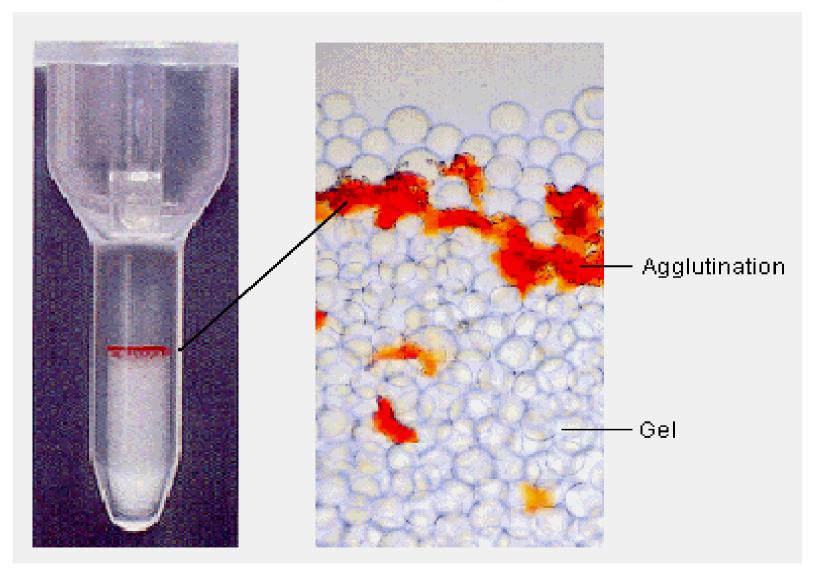


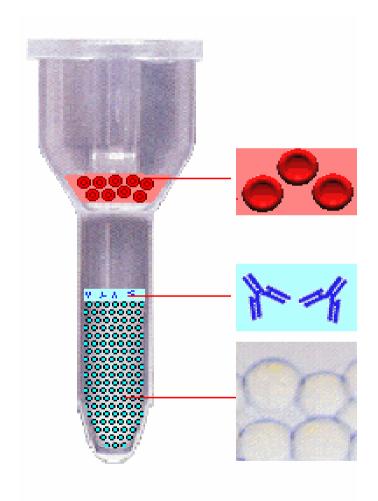


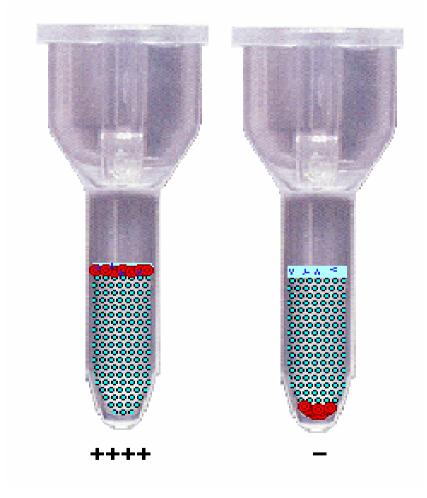
Technique en tubes



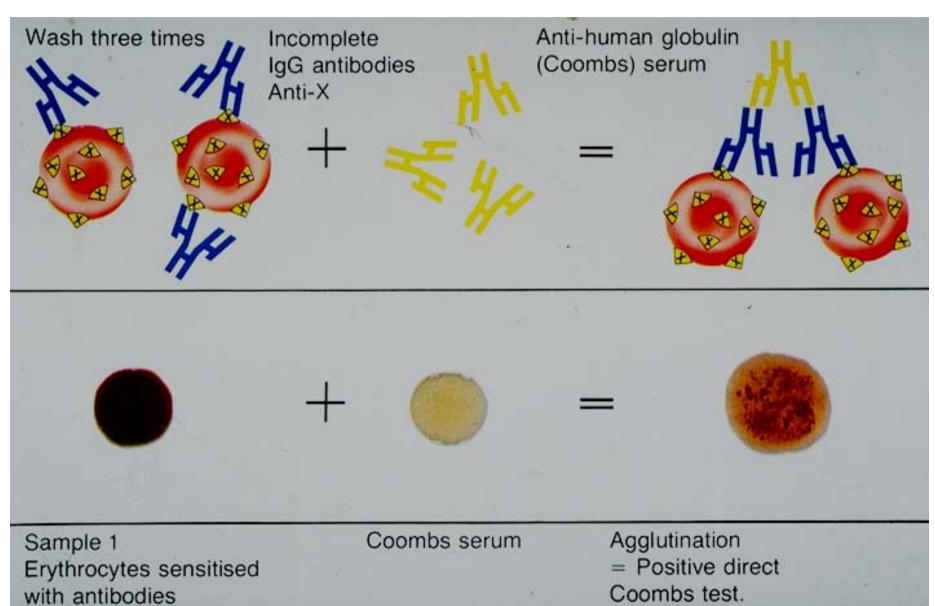
test sur gel



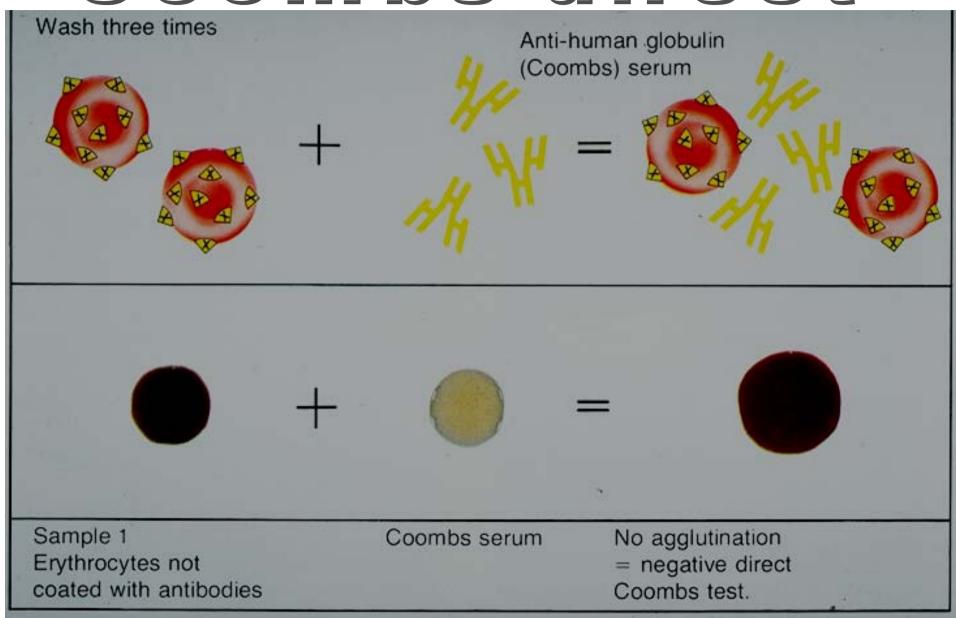




Coombs direct



Coombs direct



CQI: test de Coombs direct

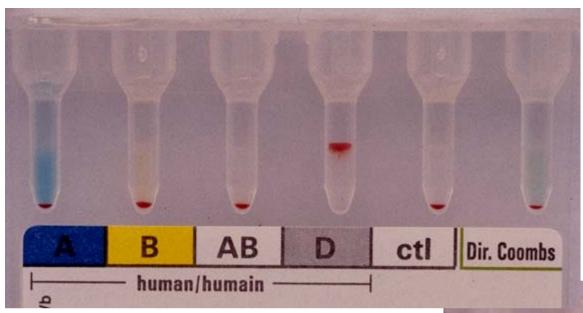
- * Utiliser un témoin de Coombs direct faiblement positif systématiquement lors d'une série d'analyses
- * si technique en tube: valider tout résultat négatif, par un « Coombs Control »

Coombs direct

- 1. Anémie hémolytique du nouveau-né
- alloac maternel
- 2. Anémie hémolytique auto-immune
- autoanticorps
- 3. Après une réaction transfusionnelle
- PFC incompatible
- CE incompatible
- 4. Après des allergies médicamenteuses

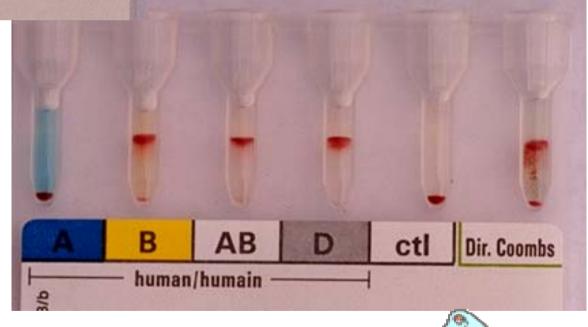


Tube EDTA



bébé 1

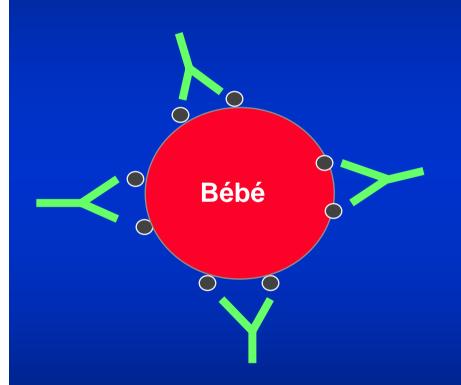




bébé 2



sensibilisation in vivo avec des alloanticorps

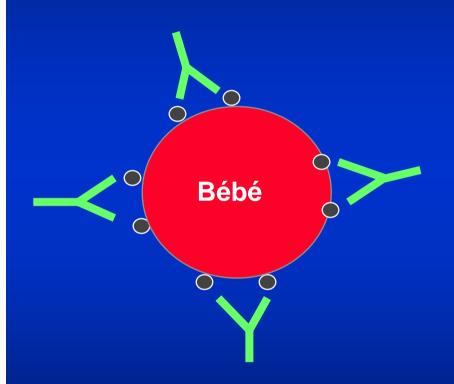


Anticorps maternels (IgG) GR du fœtus ou du nouveau-né

DAT positif: AHNx

Si anti-D, de quel groupe est la mère?

sensibilisation in vivo avec des alloanticorps

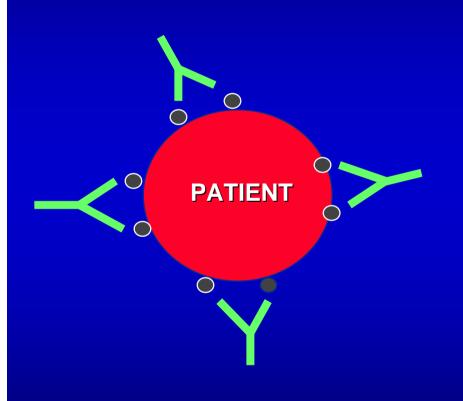


Anticorps maternels (IgG) GR du fœtus ou du nouveau-né

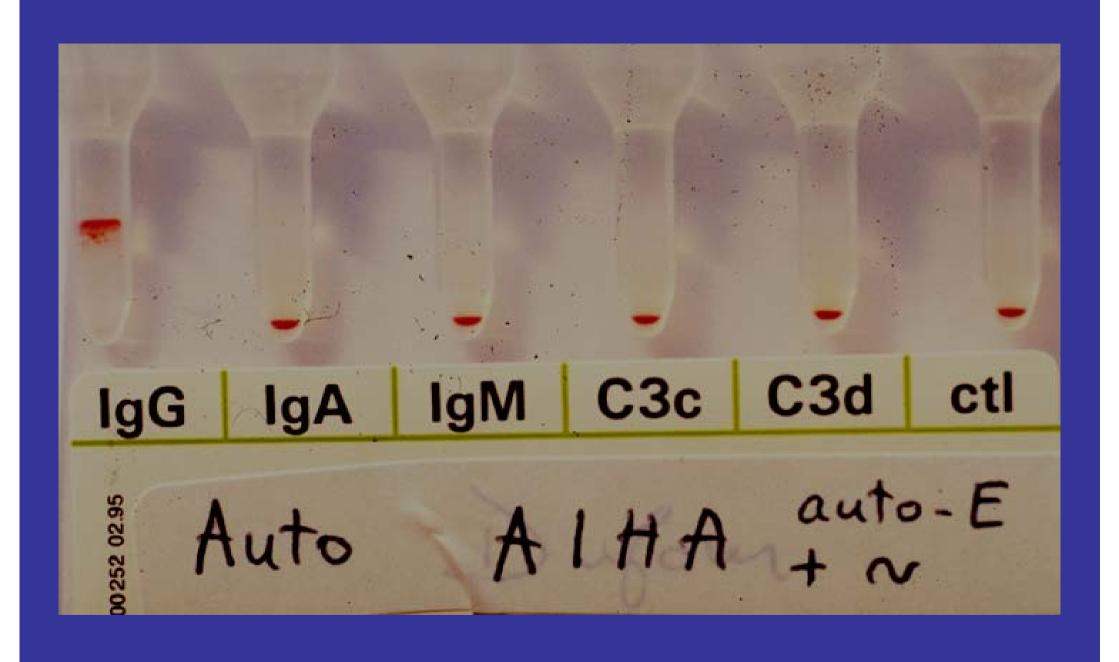
DAT positif: AHNx

Si anti-A, de quel groupe est la mère?

sensibilisation in vivo avec des autoanticorps



Warm autoantibodies react with patient's RBCs (IgG₁; IgG₃)



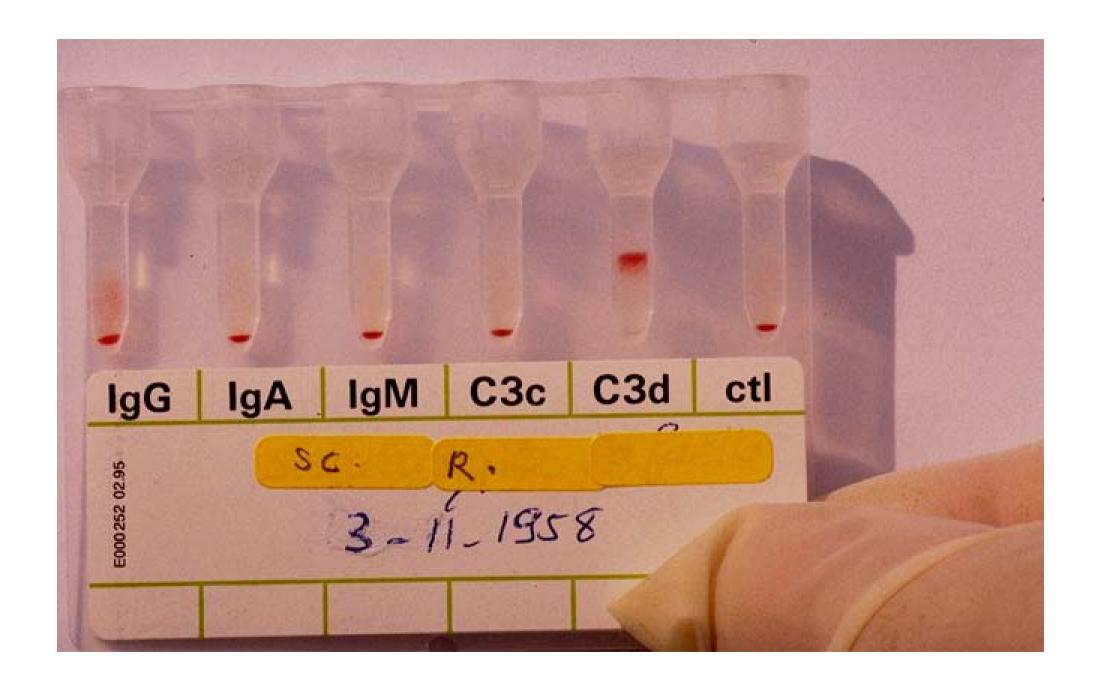
IN VIVO RED CELL SENSITIZATION WITH COLD ANTIBODIES



Cold reactive autoab bind to RBCs in peripheral circulation (< 37 °C)
IgM bind complement

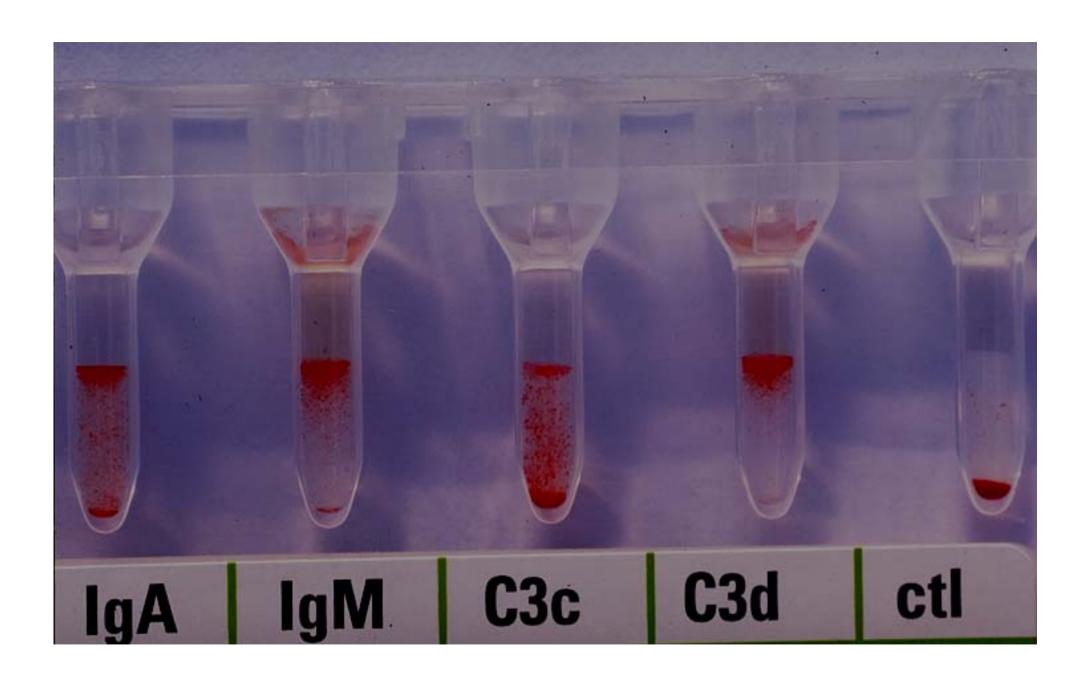
As RBCs return to warmer parts of circulation, IgM dissociate leaving RBCs coated with C3d only

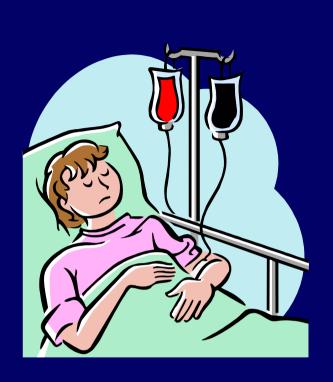






Patient CT avec agglutinines froides

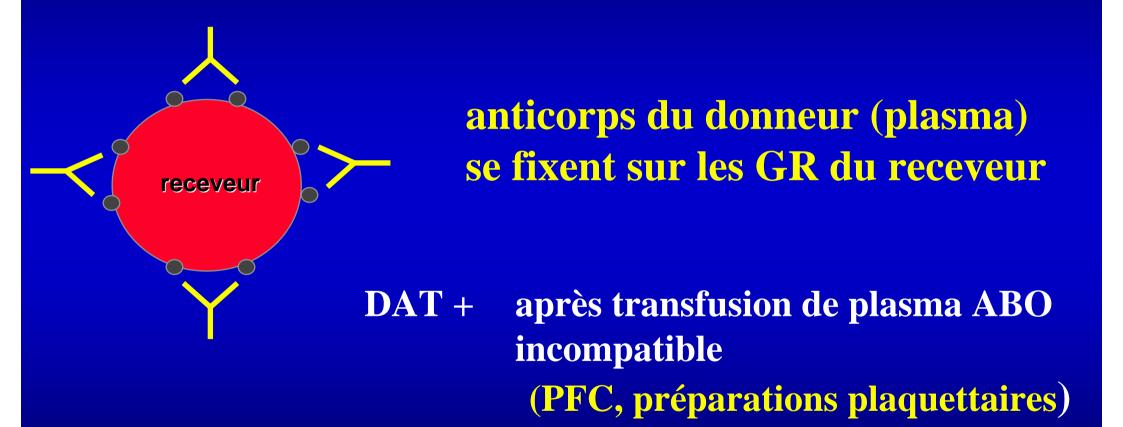


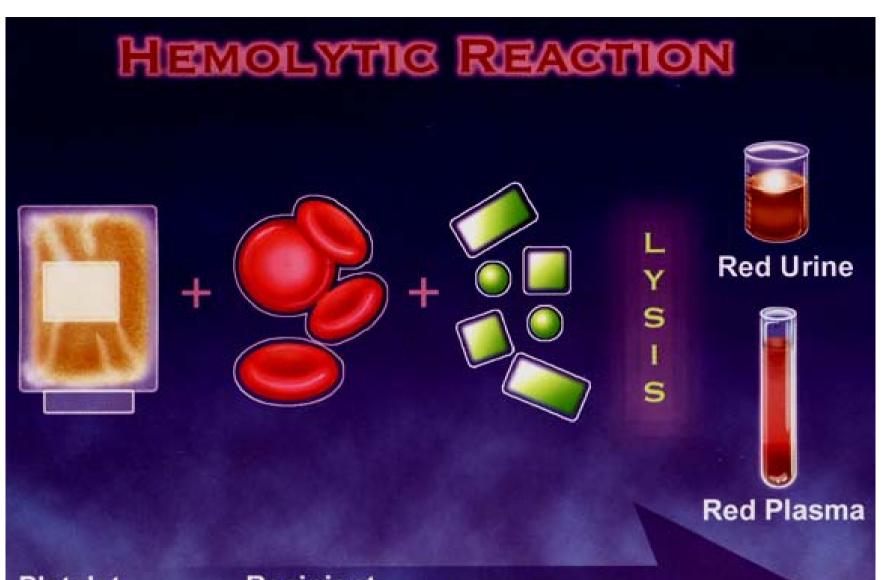






Réaction transfusionnelle





Platelet
Bag with
Incompatible
Plasma

Recipient Red Cells

+ Complement

Transfusion vol 44 June 2004

HOPITAL CANTONAL UNIVERSITAIRE GENEVE		fusion: Servi	ce & tél.: Chirargie YCL
Identité RECEVEUR: (pas d'abréviation) Nom: STELLING Prénom: Marie-) ode Date Naissance: 101111960	Anti- A	Anti - B 2	Lecture RECEVEUR: A B Signatures de contrôle: Infirmière A Dupar Médedin Médedin
Numéro poche 1 DONNEUR: (étiquette CTS) GE 4 368 369	Arti- A 3	Anti - B 4	Lecture poche 1 DONNEUR: AB Signatures de contrôle: Infirmière Médec n Médec n
Numéro poche 2 DONNEUR : (étiquette CTS) DONNEUR			Lecture poche 2 DONNEUR: Signatures de contrôle: Infirmière Médecin
		Anti - B 6	

sensibilisation in vivo avec des alloanticorps



DAT + : hemolytic transfusion reaction (HTR) souvent hémolyse des GR du donneur in vivo avec DAT nég!

Phénotypes érythrocytaires autres que ABO et D

La détermination des antigènes chez le donneur doit être effectuée en double sur 2 dons différents avec des hématies hétérozygotes (contrôle positif) et des hématies exemptes de l'antigène (contrôle négatif)

Anémies régénératives (périphériques)

- Anémies hémolytiques
 - d'origine extracorpusculaire
 - * immunologique
 - ⇒ allo-immunisation
 - **⇒** auto-immunisation
 - ⇒ allergies médicamenteuses

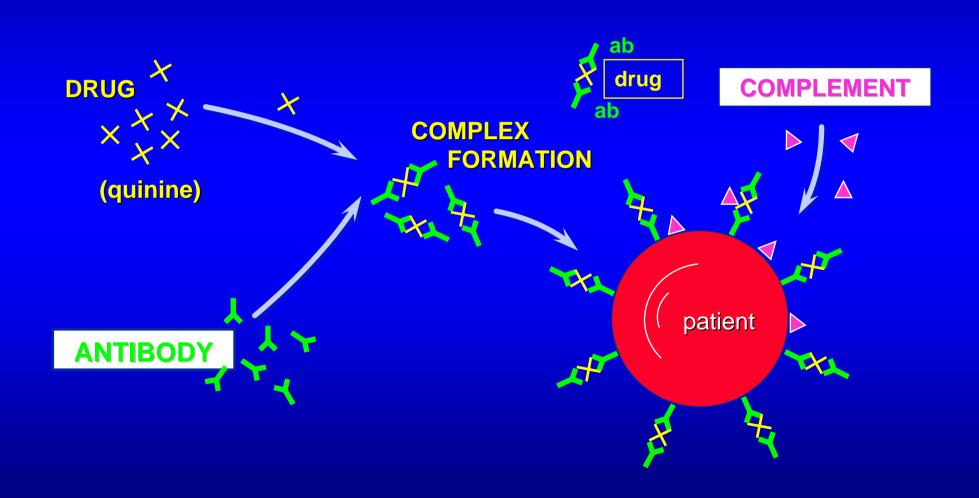
allergies médicamenteuses



CVC OS DOMINE



Mécanisme par complexes immuns

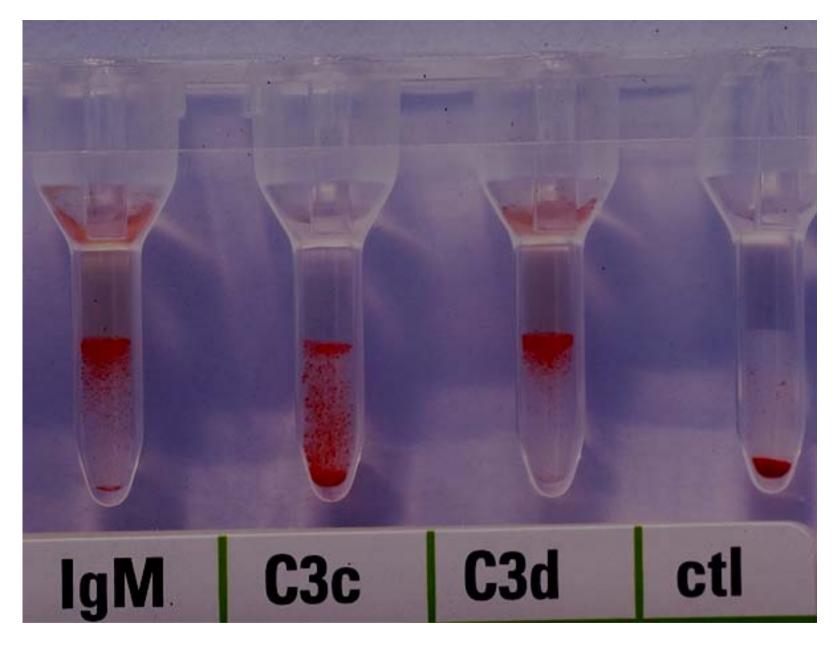


Drug	Therapeutic Category	Possible Mechanism
Quinidine Quinine	Cardiac depressant, antiarrhythmic Antimalarial	DD-DA DD-IC DD-IC
Acetaminophen Aminopyrine Amphotericin B Ampicillin Antazoline Apazone (azapropazone) Buthiazide (butizide) Carbenicillin Carbimazole Carboplatin Carbromal Catergen Cephalosporins First generation Second generation Third generation	Analgesic, antipyretic Analgesic, antipyretic Antifungal, antibiotic Antibacterial Antihistamine Anti-inflammatory, analgesic Diuretic, antihypertensive Antibacterial Thyroid inhibitor Antineoplastic Sedative; hypnotic Diarrheal astringent, treatment of hepatic disease Antibacterials	DD-IC DD-IC DD-IC DD-IC DD-IC DD-IC DI, DD-DA DD-IC DD-DA DD-IC DD-DA DD-IC DD-DA, DD-IC DD-DA DI NIA, DD-DA DD-IC, DD-DA, DI DD-IC, DD-DA, DI

AABB, Technical Manual, 2005

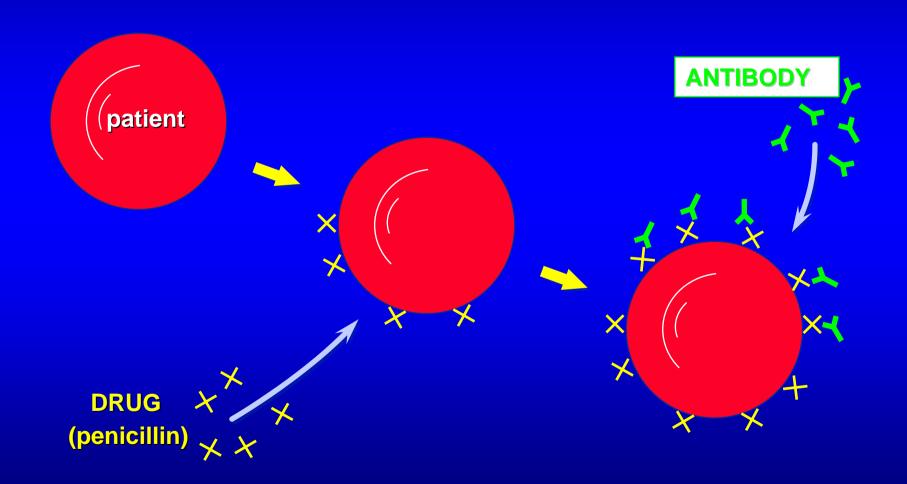
Mécanisme par complexe immun

Coombs direct				sérum	éluat	
Polyspécifique	Anti-lgG	Anti-C3d				
+	(+)	+	_	anticorps décelables si le sérum du patient, <u>le</u> <u>médicament soluble</u> , du Complément sont incubés avec des hématies	Anticorps non décelables même en présence du médicament	



hémolyse intravasculaire par activation du Complément par complexes immuns (drogue-antidrogue)

Adsorption médicamenteuse



Adsorption médicamenteuse

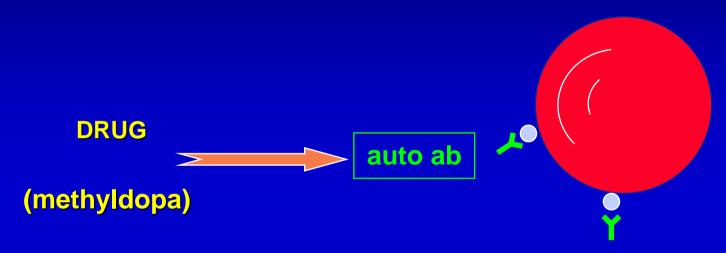
Coon	ı <mark>bs di</mark> r	ect	RAI	sérum	éluat	
Polyspécifique	Anti-lgG	Anti-C3d				
+	+	(+)		anticorps de titre élevé décelable si le sérum du patient est incubé avec des hématies recouvertes par le médicament	anticorps décelable en présence d'hématies recouvertes par le médicament	

Drug	Therapeutic Category	Possible Mechanism	
Melphalan	Antineoplastic	DD-IC	
6-Mercaptopurine	Antineoplastic	DD-DA	
Methadone	Narcotic analgesic	?	
Methicillin	Antibacterial	DD-DA	
Methotrexate	Antineoplastic, antimetabolite	DD-IC	
Methyldopa	Antihypertensive	DI	
Moxalactam (latamoxef)	Antibacterial	DD-IC, DI	
Nafcillin	Antibacterial	DD-DA	
Nomifensine	Antidepressant	DI, DD-IC	
n-Aminosalicylic acid	Antitubercular	DD-IC	
Penicillin G	Antibacterial	DD-DA	
Phenacetin	Analgesic, antipyretic	DI, DD-IC	
Piperacillin	Antibacterial	DD-DA, DD-IC	
Podophyllotoxin	Antineoplastic, cathartic	?	
Probenecid	Uricosuric	DD-IC	
Procainamide	Cardiac depressant, antiarrhythmic	DI	
Propyphenazone	Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory	DD-IC	
Pyramidon	Analgesic, antipyretic	DD-IC	
Quinidine	Cardiac depressant, antiarrhythmic	DD-DA, DD-IC	
Quinine	Antimalarial	DD-IC	
Ranitidine	Antagonist (to histamine H ₂ receptors)	?	
Rifampin (rifampicin)	Antibacterial, antitubercular	DD-IC	
Sodium pentothal	Anesthetic	DD-IC	
Stibophen	Antischistosomal	DD-IC	
Streptomycin	Antibacterial, tuberculostatic	DI, DD-DA, DD-IC	
Sulbactam sodium	β-lactamase inhibitor/antibacterial	NIA	
Sulfonamides	Antibiotics	DD-IC	
Sulfonylurea derivatives	Antidiabetic	DD-IC	
Sulindac Alls	Anti-inflammatory	DD-DA, DI	
Suprofen	Anti-inflammatory, analgesic	DD-IC, DI	
Suramin	Antitrypanosomal, antifilarial	NIA	
Temafloxacin	Antibacterial	DD-IC	
Teniposide	Antineoplastic	DI, DD-IC	
Tetracycline	Antibacterial, antirickettsial, antiamebic	DD-DA?, DD-IC	
Thiopental	Anesthetic	DD-IC	
Tolbutamide	Antidiabetic	DD-DA	
Tolmetin	Anti-inflammatory	DI, DD-IC	
Triamterene	Diuretic	DD-IC	
Trimellitic anhydride	Used in preparation of dyes, resins, etc	?	
7omenirac -	Analgesic anti-inflammatory	DD-DA. DD-IÇAÇABB, Te	echnical Manual, 2005



Drug - related autoantibodies

AUTOANTIBODY FORMATION MECHANISM

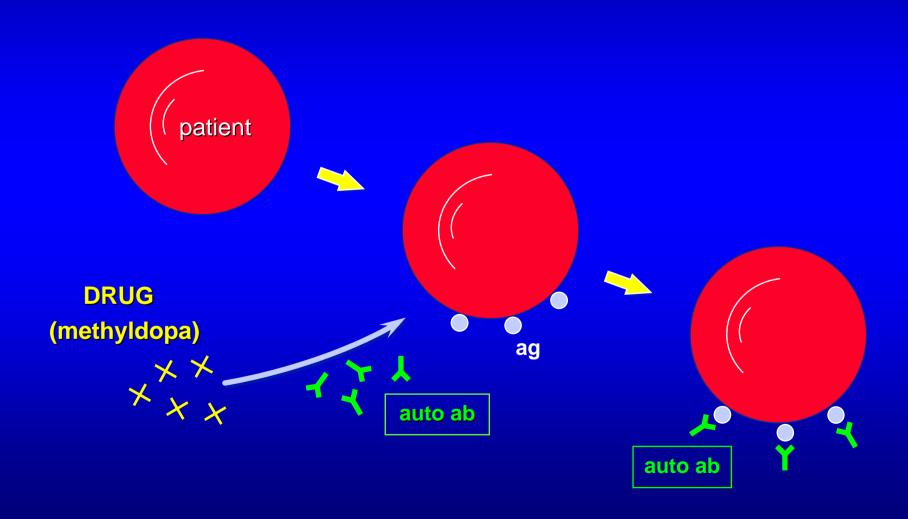


De 1970 à 1980: surtout méthyldopa (hypertension) qui induisait des AHAI avec test de Coombs direct positif.

Ce médicament était responsable de 15 % DAT +, mais 1 % de ces patients développent une AHAI.

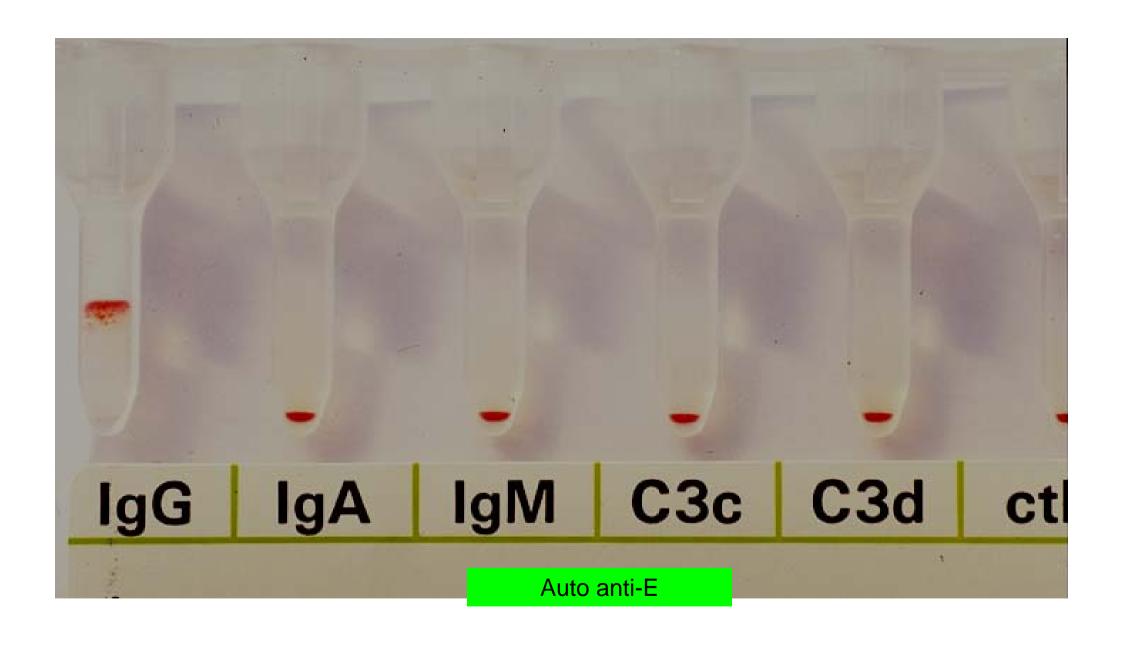
Actuellement, on pense que cette drogue affecte directement le système immunitaire en induisant une vraie maladie autoimmune.

Formation d'autoanticorps



Formation d'autoanticorps

Coom	bs dire	ect	RAI	sérum	éluat	
Polyspécifique	Anti-IgG	Anti-C3d				
+	+	(+)	+	Autoanticorps réagit avec des hématies normales	Réagit avec des hématies normales	



De nos jours, les médicaments causant des AHAI sont les analogues des purines comme la fludarabine (pour traiter les LLC) et aussi d'autres purines comme la cladribine.

Mais, attention, le médicament et aussi la LLC développent des DAT +.



Beaucoup d'autres médicaments induisent des AHAI, mais pour prouver cela, il faut des tests sérologiques positives et une anémie hémolytique.

Dès l'arrêt du médicament, tout redevient négatif!

Mais, pas tout de suite...



	IADLE 3. D	Al lesui	is compa	rea to aru	g course	and the second second
DAT strength			Day	s after disco	ntinuing dru	g
of reactivity	Total	<3	3-7	8-14	>14	Not kr

Zitt Gudigui		and and another and areas				9
of reactivity	Total	<3	3-7	8-14	>14	Not known
4+	25	12	2	3	2	6
3+	19	6	1	7	1	4
2+	7			3		4
1+	7	2	1	1	2	1
W+	10	1		1	1	7
0	3			1	1	1

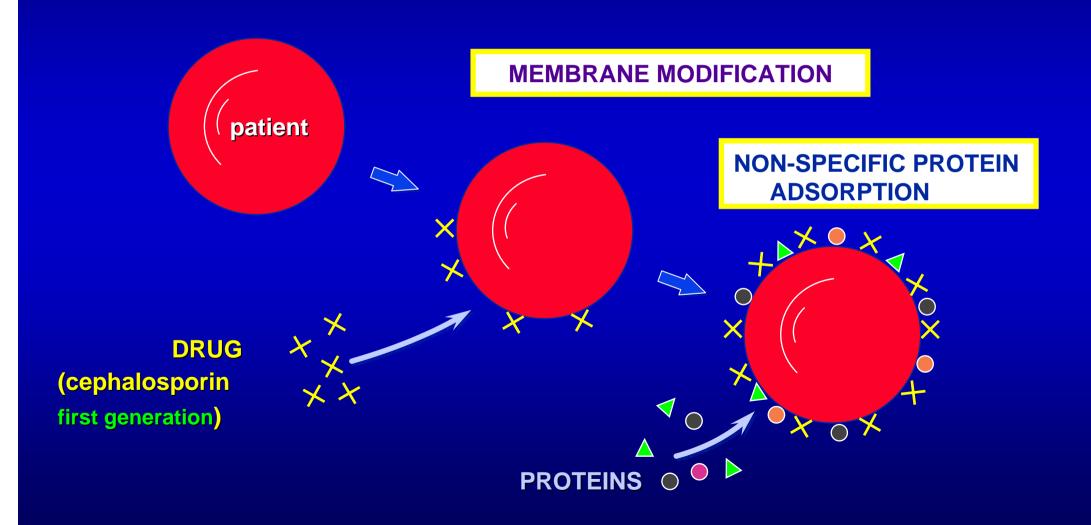
TARLE 2 DAT recults compared to drug courset

^{*} Length of drug exposure (in days) was not available in 23 cases investigated.

Coombs direct négatif dans anémies hémolytiques d'origine autoimmune

- 5 10 %
- Nombre insuffisant d'anticorps fixés sur les GR
- Auto-anticorps de type IgA ou IgM
- Faible affinité des autoanticorps avec l'implication éventuelle des NK

Modification de la membrane



Modification de la membrane

Cool	mbs dire	ect	RAI	sérum	éluat	
Polyspécifique	Anti-lgG	Anti-C3d				
+	+	+	Mécanisr	ne non immu	ınologique	



anticorps

contre les céphalosporines

Étude de 53 patients avec anémie hémolytique immune après prise de drogue

DAT

		DAT						
Drug	Number of patients	Anti-lgG	Anti-C3	Anti-IgM	Anti-IgA			
Cefoxitin	1	1/1	0/1	NT	NT			
Cefotaxime	1	1/1	1/1	NT	NT			
Ceftriaxone	8	6/8	7/7	0/5	0/5			
Cefotetan	43	43/43	37/43	2/27	12/27			

Transfusion, vol 39, Nov-Dec 1999
G. Garratty and coll

Analyse des sera des patients en présence de GR normaux (traités ou non par enzyme) et du médicament en solution

(±0.00 ±0.00	Serum + untreated RBCs + drug		Serum + untreated RBCs + PBS		95.00	Serum + enzyme-treated RBCs + drug		ited		
	Agglutination	Lysin	IAT		Agglutination	IAT	A	gglutination	Lysin	IAT
Cefoxitin	0/1	0/1	1/1		0/1	0/1	T^{-}	0/1	0/1	1/1
Cefotaxime	1/1	0/1	1/1†		0/1	0/1		1/1	0/1	1/1
Ceftriaxone	7/8	0/8	6/8‡		0/7	1/7	\	8/8	4/8	8/8‡
Cefotetan	9/42	4/42	41/42§		0/42	4/42	$oldsymbol{\Delta}$	37/3811	12/40	31/3711

Mécanisme par complexes immuns

Contrôles négatifs

ransfusion, vol 39, Nov-Dec 1999 G. Garratty and coll

anticorps

contre les céphalosporines

	Type of	Elua	te
10 ma A	eluate (wash)	Drug-treated	Untreated
Drug	(number tested)	RBCs	RBCs
Cefoxitin	Xylene	(1/1)	0/1
Cefotaxime	Xylene	0/1	0/1
Ceftriaxone	Xylene (1)		00000
	Acid (kit) (2)	0/2	0/5
V	Acid (PBS) (1)		117
Cefotetan	Acid (kit) (16)	15/15	7/16
	Acid (PBS) (17)	17/17	4/17
	Acid (LISS) (9)	9/9	1/9

Adsorption

Transfusion, vol 39, Nov-Dec 1999
G. Garratty and coll

Conclusion:

la plupart des céphalosporines de 2ème et 3ème générations induisent des anticorps selon les 2 mécanismes immuns:

- ⇒ par complexes immuns
- **⇒** adsorption du médicament

Mais, un 3ème mécanisme n'est pas exclu....

TABLE 4. Results of testing patients' sera against untreated and enzyme-treated RBCs without drug present (i.e., to detect drug-independent antibody)

	Methods (IAT results)				
Drug	Saline	PEG	Enzyme-treated RBCs		
Cefoxitin	0/1	NT	1/1		
Cefotaxime	1/1	NT	0/1		
Ceftriaxone	1/8	NT	2/8		
Cefotetan	14*/43	19†/43	18‡/40		

mécanisme par ac indépendant du médicament type autoac

Transfusion, vol 39, Nov-Dec 1999
G. Garratty and coll

DRUG

Therapeutic Category

Possible Mechanism

Cephaloporins

Antibacterials

Second generation

DD-IC, DD-DA, DI

Third generation

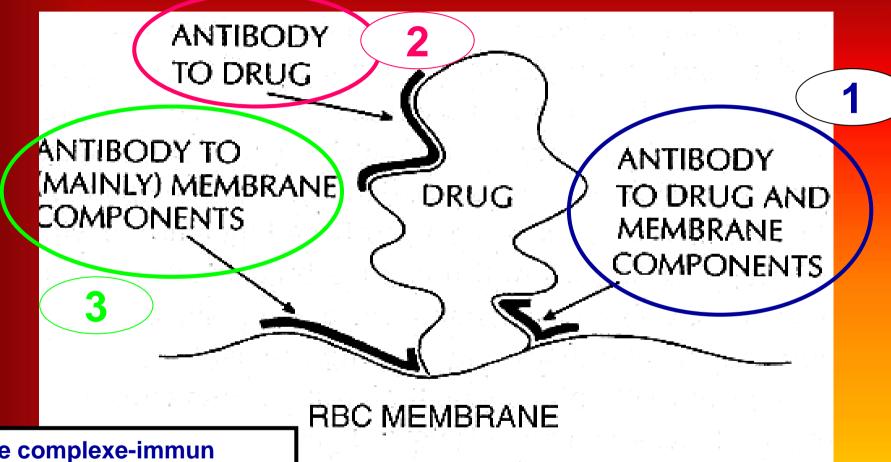
DD-IC, DD-DA, DI

DD-IC = mécanisme par complexe immun

DD-DA= mécanisme par adsorption sur la membrane

DI = drug independent (type autoac)

Schéma pour une théorie unifiée expliquant tous les mécanismes d'action induisant des anticorps



- Type complexe-immun
- Type haptène (adsorption)
- 3. Type autoanticorps

Transfusion, vol 39, Nov-Dec 1999 G. Garratty and coll

Oxaliplatin produisant une pancytopénie dans un cancer du rectum

- \sim 79 ans, F., Hb = 12,8 g/dL
- ▼ Traitement avec Oxaliplatin (Hb = 9 g/ dL):
 - ⇒ thrombopénie, neutropénie et hémolyse légère
- Tests spécifiques qui démontrent la présence d'antioxaliplatin réagissant avec les plaquettes, les granulocytes et les hématies

Transfusion, vol 45, May 2005 Behrouz Mansouri, A. Salama and coll

Oxaliplatin produisant une pancytopénie dans un cancer du rectum

TABLE 1. Results of serologic testing				
Reactants	Patient's serum sample	Normal serum sample		
RBCs				
DAT				
Anti-IgG	++++			
Anti-IgM	_			
Anti-IgA	_			
Anti-C3d	+/			
Control	-			
Eluate	***			
IAT				
Patient's serum sample plus RBCs		-		
Patient's serum sample plus oxaliplatin plus RBCs	++++			

Transfusion, vol 45, May 2005
Behrouz Mansouri, A. Salama and coll

Oxaliplatin produisant une pancytopénie dans un cancer du rectum

- médicaments produisant une bi ou pancytopénie sont rares
- mécanisme démontré est de type IC
- hémolyse est légère:
 - * active peu le Complément (anti-C3d +/-) avec destruction extravasculaire
 - * séquestration des plaquettes et des neutrophiles domine, donc moins de destruction érythrocytaire

Transfusion, vol 45, May 2005
Behrouz Mansouri, A. Salama and coll

Remarques

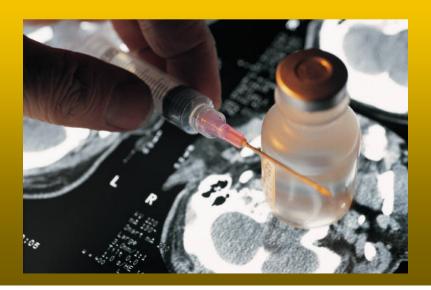
Lors de la prise de certains médicaments (dans les thérapies lourdes et de longue durée), il serait judicieux de faire des analyses d'immuno-hématologie, *type DAT* avec *recherche de sensibilité aux drogues*

Le patient a pu être sensibilisé auparavant lors d'une intervention chirurgicale où il n'a pas reçu du sang (donc pas de contrôle DAT), mais où des antibiotiques ont été utilisés largement comme prophylaxie

One center's experience: the serology and drugs associated with drug-induced immune hemolytic anemia—a new paradigm

Susan T. Johnson, Judith T. Fueger, and Jerome L. Gottschall

Transfusion, vol 47, April 2007



- rétrospective sur 20 ans de 71 patients
- nouveaux médicaments induisant une anémie hémolytique immune
- DAT très positif dans 75% des cas
- éluat négatif 73% des cas
- éluat > 2+ seulement chez 2 patients
- 52% dues aux céphalosporines (surtout anti-Céfotetan)
- 4 anti-inflammatoires non stéroïdiens ont besoin d'une analyse des métabolites dans l'urine en plus du DAT

TABLE 4. DA	Γ reactivity and	specificity*
-------------	------------------	--------------

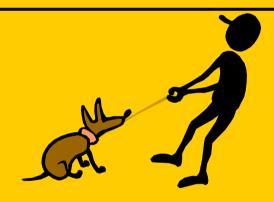
Reactivity	IgG Only	IgG and C3	C3 only
4+	5	19	1
3+	4	15	
2+	1	6	
1+	5	2	
Weak+	2	4	4
Totals	17	46	5

^{*} Three patients had a negative DAT.

Comme dans l'article de Garraty

Une nouvelle classification est proposée en fonction de l'interaction du médicament avec les GR:

Ceux qui s'attachent fortement par liaison covalente sur les GR de <u>type haptène</u> dont les anticorps sont détectés par des hématies-tests recouvertes par le médicament



Ceux qui s'attachent faiblement de <u>type</u>
<u>complexes immuns</u> dont les anticorps sont
détectés par le médicament sous forme soluble

technique pour démontrer la présence de complexes immuns (Technical Manual AABB 2005)



+ PBS



2 gouttes de drogue

2 gouttes de sérum frais (C')

+ GR 0 normaux (1 goutte 5%)

ou GR 0 normaux traités avec enzyme

incuber 1-2 heures à 37 °C, centrifuger et lire pour l'hémolyse et l'agglutination, Puis, faire IAT avec lecture finale



technique pour démontrer la présence de complexes immuns (Technical Manual AABB 2005)

- ⇒ l'hémolyse ou l'agglutination directe des tubes avec le sérum du patient en présence de la drogue et l'absence de réaction dans les tests de contrôle indique des anticorps anti-drogue
- ⇒ le sérum frais et les GR 0 traités avec de l'enzyme augmentent la sensibilité du test c-à-d l'agglutination éventuelle

technique pour démontrer l'adsorption médicamenteuse immune (Technical Manual AABB 2005)





2 gouttes sérum ou éluat du patient 1 goutte GR 0 traités avec drogue

incuber 60 min à 37 °C, centrifuger et lire pour hémolyse et agglutination, puis faire IAT

interprétation: l'hémolyse et l'agglutination du sérum ou de l'éluat du patient avec les GR traités avec le médicament (mais pas avec les GR non traités) témoigne de la présence d'anti-drogue



technique pour démontrer

ex-vivo la présence de complexes drogue / anti-drogue

Technical Manual AABB 2005)





2 gouttes sérum du patient + sérum (ou urine) du donneur ayant ingéré la drogue

GR 0 (5%) traités ou non à l'enzyme + Complément

incuber 1-2 heures à 37 °C, centrifuger et lire pour l'hémolyse et l'agglutination, puis faire IAT

Robert Royston Amos COOMBS (1921-2006)

