

PLACE ET INTÉRÊT DE LA DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-HLA DE CLASSE I LORS DE LA RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES

Pierre Moncharmont ^{a,*}, Valérie Dubois ^a, Martine Vignal ^a, Yves Mérieux ^a, Lucette Gebuhrer ^a, Dominique Rigal ^a

Résumé

Lors de la recherche des anticorps (Acs) anti-plaquettes (PS), la mise en évidence d'Acs anti-HLA de classe I est possible. Ces Acs ont été recherchés avec le test de « Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen » (MAIPA) à l'aide d'un Acs monoclonal anti-β2 microglobuline. En cas de résultat positif, le dépistage des Acs anti-HLA a été pratiqué avec un test spécifique (ELISA) et la confirmation effectuée par lymphocytotoxicité. Sur 263 patients positifs avec l'Acs anti-β2 microglobuline, 223 (84,8 %) sont positifs au dépistage des Acs anti-HLA et 159 (71,3 %) confirmés en lymphocytotoxicité. Parmi ces 159 échantillons, 6 ont une densité optique faible, située entre 0,100 et 0,149 pour 3 et, entre 0,150 et 0,199, pour les 3 autres. Les 60 échantillons avec une densité optique supérieure ou égale à 1,500 au MAIPA sont tous positifs au dépistage des Acs anti-HLA et 54 (90 %) sont confirmés en lymphocytotoxicité. Parmi 50 sujets contrôles négatifs en MAIPA, 4 (8,0 %) ont des Acs anti-HLA en lymphocytotoxicité. En clinique, dans certaines pathologies, la détection d'Acs anti-HLA de classe I représente un élément d'information utile pour le diagnostic et le traitement. En présence d'une densité optique même faible (< 0,150) au test de MAIPA, la réalisation de tests spécifiques de recherche des Acs anti-HLA est recommandée.

Anticorps - plaquettes - HLA - classe I - dépistage.

Summary : Place and interest of the detection of the class I HLA antibodies in platelet antibody testing.

In platelet antibody testing, detection of Class I HLA antibody is possible. Presence of HLA antibody was screened by

^a Établissement français du sang Rhône Alpes – Site de Lyon
1-3, rue du Vercors
69364 Lyon cedex 07

* Correspondance
pierre.moncharmont@efs.sante.fr

article reçu le 2 décembre, accepté le 30 juin 2004.

© Elsevier SAS.

introducing a monoclonal anti-β2 microglobulin antibody in a « Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen » (MAIPA) assay. When a positive result was obtained, the sample was tested with a specific ELISA screening test and confirmed by a lymphocytotoxicity assay. Among 263 patients positive with the anti-β2 microglobulin antibody, 223 (84,8 %) are positive on the HLA antibody screening test and 159 (71,3 %) are confirmed by the lymphocytotoxicity assay. Among the 159 samples positive on the lymphocytotoxicity assay, 6 have a low optical density, 3 between 0,100 and 0,149 and 3 between 0,150 and 0,199. All the 60 samples with an optical density at 1 500 or more are positive on the HLA antibody specific screening test and 54 (90,0 %) are confirmed by the lymphocytotoxicity assay. Among 50 subjects MAIPA negative, 4 (8,0 %) have HLA specific antibody on the lymphocytotoxicity assay. In several diseases, detection of anti-HLA antibody is informative for diagnosis and treatment. Specific testing of HLA antibody is recommended even when a weak (< 0,150) optical density is observed on the MAIPA assay.

Antibody - platelet - HLA - class I - screening.

1. Introduction

Après transfusion de plaquettes (PS), la présence d'anticorps (Acs) anti-HLA de classe I représente une des causes majeures des états réfractaires ou d'inefficacité transfusionnelle observés [4]. De plus, l'existence d'Acs anti-PS spécifiques associés à des Acs anti-HLA accroît le risque d'inefficacité transfusionnelle [10, 12]. Les femmes sont fréquemment porteuses d'Acs anti-HLA, jusqu'à 31 % selon les études [3, 6]. Ces Acs anti-HLA proviennent d'une immunisation secondaire à une grossesse, une transfusion ou une transplantation. Le rôle des Acs anti-HLA a été suspecté dans certains cas de thrombopénies fœtales et néonatales [1, 9, 11, 14] mais cette donnée demeure controversée [13]. Les antigènes HLA de classe I sont présents à la surface des PS [8] et, lors de la recherche d'Acs anti-PS spécifiques, la détection d'Acs anti-HLA de classe I est possible [5]. Afin de préciser si la positivité pour les Acs anti-HLA observée au cours de la réalisation d'un test utilisé pour la recherche des Acs anti-PS présentait un caractère informatif ou non, une confrontation aux résultats obtenus avec les tests spécifiques de recherche des Acs anti-HLA a été réalisée.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel

Les tests ont été effectués à partir de sang périphérique prélevé sur tubes secs et EDTA chez des patients où une recherche d'Acs anti-PS spécifiques avait été prescrite.

Pour chaque patient, il a été demandé au prescripteur d'apporter des renseignements cliniques succincts mais informatifs, tels que des antécédents transfusionnels, une grossesse en cours, la détection antérieure d'Acs anti-PS, des antécédents de thrombopénie fœtale ou néonatale, la (les) pathologie(s) actuelle(s).

2.2. Méthodes

2.2.1. Dépistage et identification des Acs anti-PS spécifiques – dépistage associé des Acs anti-HLA de classe I

Les conditions de réalisation du dépistage et de l'identification des Acs anti-PS spécifiques ont été exposées antérieurement [7]. Brièvement, le dépistage des allo-Acs et auto-Acs anti-PS a été effectué par immunocapture (Modified Capture P, Immucor, États-Unis, distribué par Biorad, France) en respectant les instructions fixées par le fabricant. Ce test détecte, dans le sérum ou le plasma, les Acs anti-PS spécifiques mais également les Acs dirigés contre les antigènes HLA de classe I portés par les PS [5]. Un échantillon trouvé positif au dépistage est soumis à une identification avec le test immunoenzymatique sur microplaque « *Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen* » (MAIPA) [2]. Trois glycoprotéines (GP) plaquettaires majeures ont été testées, les GP Ia, GP IIb/IIIa et GP Ib/IX et trois systèmes de groupes plaquettaires explorés : Human Platelet Antigen (HPA) 1, 3 et 5.

Pour le test de MAIPA indirect, un pool de plaquettes prélevées chez dix donneurs de sang de groupes HPA-1, 3 et 5 connus est employé. Les plaquettes de donneurs utilisées dans le pool et le panel d'identification ont été choisies et associées pour la recherche des Acs anti-PS spécifiques et non celle des Acs anti-HLA de classe I. Les donneurs sélectionnés n'ont pas été typés pour les antigènes HLA. Les propres plaquettes du patient, sous réserve qu'elles soient en quantité suffisante, sont employées dans le test de MAIPA direct.

En parallèle, pour détecter la présence d'Acs anti-HLA de classe I, un Acs monoclonal murin anti- β 2 microglobuline (anti- β 2m) (Clone B1G6, Immunotech, France) a été introduit dans le test de MAIPA indirect. Cet Acs reconnaît le complexe HLA- β 2m libre ou associé à une membrane cellulaire.

La mise en évidence des Acs anti-PS et/ou anti-HLA fixés sur les plaquettes du pool est réalisée à l'aide d'un Acs de chèvre anti-immunoglobulines G humaines couplé à de la peroxydase (Peroxydase-conjugated AffinPure F(ab)', Fragment Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, États-Unis).

Que ce soit pour les Acs anti-PS spécifiques ou pour les Acs anti-HLA de classe I, une réaction est positive au test de MAIPA indirect pour une densité optique (DO) égale ou supérieure à 0,100.

Des contrôles internes ont été placés dans chaque série de tests (deux sérums contenant des Acs anti-PS spécifiques, un sérum positif pour les Acs anti-HLA et un sérum négatif pour les deux catégories d'Acs).

2.2.2. Dépistage et identification des Acs anti-HLA de classe I par les tests spécifiques

Les échantillons positifs avec l'Acs monoclonal anti- β 2m au test MAIPA indirect ont été soumis à un test immunoenzymatique de dépistage des Acs anti-HLA spécifiques (LAT-M™, One Lambda, Canoga Park, CA, États-Unis, distribué par Ingen, France). Ce réactif détecte uniquement des Acs anti-HLA de classe G. Des quantités définies d'an-

tigènes HLA purifiés ont été placés dans différents puits de plaques de Terazaki. La fixation des Acs spécifiques contenus dans l'échantillon testé avec un ou plusieurs antigènes HLA présents dans le pool a été détectée par une incubation en présence d'un Acs anti-immunoglobuline G humaine conjugué à la phosphatase alcaline. L'intensité de la réaction colorée a été mesurée par spectrophotométrie après addition du substrat approprié. Le test a été réalisé en suivant les instructions données par le fabricant. Le seuil de positivité de la réaction a été calculé à partir de l'équation définie par le fabricant. Un contrôle interne (sérum positif humain connu) a été placé dans chaque série et utilisé pour la valider.

Chaque échantillon dépisté positif a été confirmé par un test de lymphocytotoxicité (LCT) composé d'un panel incluant 34 lymphocytes T différents, phénotypés pour les antigènes HLA-A, -B, -Cw issus de donneurs. Ce test a été réalisé sur des plaques de Terazaki : 1 μ L de chaque sérum et 1 μ L de lymphocytes T (3×10^6 cellules/mL) ont été déposés dans chaque puits des plaques. Après incubation, le complément a été ajouté. La lyse cellulaire a été révélée par incorporation d'éosine et la lecture effectuée au microscope inversé. Dans chaque puits, la positivité de la réaction a été déterminée par le pourcentage de cellules lysées rapporté au puits de contrôle négatif. En fonction du nombre de cellules trouvées positives, un pourcentage de réactivité, « *percent reactive antigen* » (PRA) est défini pour chaque sérum positif en LCT (par exemple, 12 cellules positives sur 34 cellules testées ; PRA 35,0 %).

Afin de vérifier le caractère informatif et les limites de l'addition d'un Acs monoclonal anti- β 2m dans le test de MAIPA indirect, des échantillons trouvés positifs au test d'immunocapture indirect, mais négatifs au test de MAIPA indirect ont été utilisés comme contrôles.

3. Résultats

Sur 263 patients, 243 femmes (92,4 %) et 20 hommes (7,6 %) positifs avec l'Acs anti- β 2m au test de MAIPA indirect, 223 (84,8 %) sont positifs avec le test immunoenzymatique de dépistage des Acs anti-HLA spécifiques et 159 sur ces 223 (71,3 %) sont trouvés porteurs d'Acs anti-HLA de classe I au test de LCT. Parmi les 159 patients avec Acs anti-HLA confirmés, 89 (56,0 %) ont des Acs avec une ou des spécificités définies, 20 (12,6 %) ont des Acs polyspécifiques et 50 (31,4%) ont des Acs pour lesquels aucune spécificité n'a pu être établie avec le panel utilisé. La répartition des échantillons en fonction de la DO est récapitulée sur le *tableau I*.

Parmi les 37 échantillons avec une DO faible, inférieure à 0,200 au test de MAIPA indirect pour l'Acs monoclonal anti- β 2m, 6 (16,2 %) sont trouvés porteurs d'Acs anti-HLA au test de LCT (*tableau II*). À l'opposé, lorsque la DO est supérieure ou égale à 1,500, tous les échantillons positifs avec le test de MAIPA indirect sont trouvés positifs avec le test de dépistage des Acs anti-HLA spécifiques. La présence d'Acs anti-HLA est de plus, très fréquemment confirmée en LCT, puisque sur 60 échantillons dépistés positifs, 54 (90,0%) sont porteurs d'Acs anti-HLA. Un phénomène analogue est constaté pour les échantillons dont la DO au test de MAIPA indirect est comprise entre 1,000 et 1,499. Sur 31 échantillons dépistés, 20 sont confirmés en LCT (64,5 %).

Sur les 50 échantillons contrôles incluant 24 femmes (48,0 %) et 26 hommes (52,0 %), 7 (14,0 %) ont été détectés positifs avec le test immunoenzymatique de dépistage des Acs anti-HLA. Quatre ont été confirmés positifs en LCT. Un présente un PRA de 42,0 % et les trois autres des PRA de 6,0 %, 3,0 % et 3,0 % respectivement. Aucune spécificité HLA n'a pu être établie pour ces 4 échantillons.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/9755338>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/9755338>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)