

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

*FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET
D'ODONTO-STOMATOLOGIE*



**MEMOIRE POUR LE CERTIFICAT D'ETUDES SPECIALES (C.E.S.)
D'HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE**

**ETUDE COMPARATIVE DU PHENOTYPAGE ABO/RHESUS
SUR GEL (DIAMED®) ET SUR PLAQUE D'OPALINE**

Présenté et soutenu

Par

Docteur Modou Oumy KANE

Directeur du C.E.S.: Professeur Lamine DIAKHATE

ANNEE UNIVERSITAIRE 1999-2000

A L'ÉTERNEL LE TOUT PUISSANT
LE MISERICORDIEUX

Créateur du ciel et de la terre,
Pour que règnent la paix, la justice et la liberté dans ce monde

A son Prophète Mouhamed (P.S.L.)

Et à son fidèle Serviteur Cheikh Ahmadou BAMBA

JE DÉDIE CE TRAVAIL...

A mes parents

A mes frères et sœurs

A tous les enseignants qui ont participé à ce CES
Merci pour votre enseignement riche en qualité

A tout le personnel du Centre National de Transfusion Sanguine

A tout le personnel du Département de Physiologie-Pharmacologie

A tout le personnel du Laboratoire de Biologie de l'Institut Pasteur de Dakar

A tous mes camarades de CES

Aux Professeurs Lamine DIAKHATE et Doudou THIAM
Pour m'avoir considéré comme un véritable membre du C.N.T.S

Aux Assistants Awa TOURE/FALL et Macoura GADJI

Au Professeur Aminata SALL/DIALLO
Pour m'avoir permis de trouver le temps de me consacrer à ce CES

Au Professeur Babacar FAYE

Au Professeur Doudou BA

A tous mes amis

REMERCIEMENTS

Aux

Membres de jury de ce C.E.S

Pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE</u> : Généralités	3
I- GROUPES SANGUINS ERYTHROCYTAIRES : <i>Historiques et notions générales</i>	4
II- GROUPES SANGUINS ERYTHROCYTAIRES : <i>Application en clinique et en thérapeutique</i>	5
II.1- <i>LA TRANSFUSION SANGUINE</i>	5
II.2- <i>MALADIE HEMOLYTIQUE NEO-NATALE ET PHENOTYPE RHESUS</i>	5
II.3- <i>ASSOCIATION ENTRE GROUPES SANGUINS ABO ET CERTAINES MALADIES</i> ..	5
II.4- <i>ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN ET MALIGNITE</i>	6
III- TESTS EN GEL : <i>Mise au point et évolution</i>	7
III.1- <i>LA MISE AU POINT DU GEL-TEST</i>	7
III.2- <i>LES TROIS PHASES DE SON EVOLUTION</i>	8
<u>DEUXIEME PARTIE</u> : Travail personnel	10
I- MATERIEL ET METHODE	11
I.1- <i>CADRE DE L'ETUDE</i>	11
I.2- <i>POPULATION D'ETUDE</i>	11
I.3- <i>MATERIEL</i>	11
<u>I.3.1- Groupage sur plaque d'opaline</u>	11
I.3.1.1- <i>Méthode globulaire de Beth Vincent</i>	11
I.3.1.2- <i>Méthode sérique de Simonin</i>	12
I.3.1.3- <i>Contrôles</i>	12
<u>I.3.2- Groupage sur gel</u>	12
<u>I.3.3- Tests de confirmation</u>	13
I.4- <i>METHODOLOGIE</i>	13
<u>I.4.1- Groupage sur plaque d'opaline</u>	14
I.4.1.1- <i>Méthode globulaire de Beth Vincent</i>	14
I.4.1.2- <i>Groupage dans le système rhésus</i>	15
I.4.1.3- <i>Méthode sérique de Simonin</i>	15
<u>I.4.2- Groupage sur gel</u>	17
I.4.2.1- <i>Méthode globulaire</i>	17
I.4.2.2- <i>Méthode sérique</i>	18
<u>I.4.3- Tests de confirmation</u>	19

1.4.3.1- <u>Test de Coombs</u>	19
1.4.3.2- <u>Réaction de Fixation-Elution (RFE)</u>	19
<u>RESULTATS</u>	21
I)- RESULTATS DES PHENOTYPAGES	22
II)- DUREE DES MANIPULATIONS	24
II.1- <i>METHODE SUR PLAQUE</i>	24
II.2- <i>METHODE SUR GEL</i>	25
III)- DIFFICULTES DIVERSES	25
III.1- <i>METHODE SUR PLAQUE</i>	25
III.2- <i>METHODE SUR GEL</i>	25
IV)- COÛT DES MATERIELS ET REACTIFS	26
V) - SENSIBILITE ET FIABILITE	28
<u>DISCUSSION</u>	29
1- <i>Fiabilité des résultats et Sensibilité</i>	30
2- <i>Manipulations</i>	30
3- <i>Le personnel</i>	30
4- <i>Durée des manipulations</i>	31
5- <i>Le coût des matériels et réactifs</i>	31
6- <i>La conservation des réactifs</i>	33
7- <i>Approvisionnement des réactifs</i>	33
<u>CONCLUSION</u>	34
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	36



INTRODUCTION

L'Immuno-hématologie et l'Immunogénétique sont les deux sœurs jumelles de ce siècle [4]. Elles sont nées en effet, en 1900 avec la découverte par Landsteiner des groupes sanguins.

Landsteiner observe que lorsque l'on met en présence le sérum et les hématies d'individus différents, des agglutinations apparaissent. Ceci prouve l'existence d'anticorps sériques définissant deux variétés d'antigènes principalement A et B. cette découverte est à la base des futurs moyens de détection des groupes sanguins érythrocytaires par la mise en œuvre de réactions d'agglutination entre anticorps sériques et antigènes globulaires. C'est ce que l'on appelle : le Groupage ou phénotypage [1, 4].

Ce phénotypage a connu une grande évolution dans le temps avec la mise au point d'anticorps-test de plus en plus monoclonaux et donc spécifiques ; mais également et surtout par des techniques sur gel qui ont apporté une dose supplémentaire de fiabilité et de précision, améliorant de façon indéniable la qualité et la sécurité des transfusions [15].

Dans ce travail, nous nous proposons de faire une étude comparative entre la méthode traditionnelle sur plaque de phénotypage ABO/Rhésus et la technique sur gel.

L'objectif de cette étude est de comparer respectivement pour ces deux méthodes, la fiabilité des résultats, la simplicité des actes, le rapport qualité/prix; ceci dans le but de voir s'il est possible d'appliquer éventuellement les tests sur gel en pratique courante dans nos laboratoires.



PREMIERE PARTIE :
GENERALITES

I- GROUPES SANGUINS ERYTHROCYTAIRES : *HISTORIQUES ET NOTIONS GENERALES*

Tout commence par Karl Landsteiner. En 1900, Karl Landsteiner découvre à Vienne, le premier système de groupe sanguin, ABO [4]. Les transfusions de sang sont bien supportées lorsque le donneur et le receveur sont compatibles [1]. La transfusion sanguine prend son essor. Emigré plus tard aux États-Unis, Karl Landsteiner découvre en 1927, au soir de sa vie un autre système de groupe sanguin, le système rhésus.

Ultérieurement, Landsteiner et Levine, en immunisant des animaux avec des hématies humaines, découvrent en 1939 deux autres systèmes de groupe sanguin : MN et P [4].

Dès les années qui avaient suivi sa première découverte, Landsteiner avait prédit que les groupes sanguins permettraient un jour d'identifier les hommes aussi parfaitement que les empreintes digitales.

Depuis trois quarts de siècle, notre connaissance de la mosaïque s'est complétée. Nous avons appris à connaître pavé après pavé, système de pavé après système de pavé, la constitution de la surface des globules rouges. Les pavés de la mosaïque du globule rouge, les facteurs de groupes sanguins sont les témoins des hérédités lointaines [1, 4].

II- GROUPES SANGUINS ERYTHROCYTAIRES : APPLICATION EN CLINIQUE ET EN THERAPEUTIQUE

II.1- LA TRANSFUSION SANGUINE

Le but de la transfusion est d'apporter au receveur, les constituants du sang qui lui font défaut. Le plus souvent, ce sont des hématies qui doivent être transférées en préservant leur intégrité fonctionnelle.

Pour cela, il est fondamental que la compatibilité immunologique soit aussi parfaite que possible entre donneur et receveur [3, 9].

Cette condition passe par un groupage sanguin correctement effectué pour déceler une éventuelle incompatibilité qui peut être à l'origine d'accidents immunologiques sous forme de destruction des érythrocytes du donneur par les anticorps du receveur [5].

II.2- MALADIE HEMOLYTIQUE NEO-NATALE ET PHENOTYPE RHESUS

La maladie hémolytique du nouveau-né représente l'exemple le plus évident du rôle direct d'un phénotype de groupe sanguin dans une maladie. Dans le système Dd, les femmes Rh négatif sont les seules qui puissent donner naissance à un enfant atteint de maladie hémolytique du nouveau-né ; encore faut-il que l'enfant soit Rh positif [3, 10].

II.3- ASSOCIATION ENTRE GROUPES SANGUINS ABO ET CERTAINES MALADIES

Le premier exemple d'une association entre phénotype ABO et une maladie a été la relation entre le groupe sanguin A et le cancer de l'estomac observé en 1955 dans la population anglaise. L'excès de groupe A parmi les sujets atteints de cette maladie est resté constamment significatif dans d'autres populations et cette relation est généralement considérée comme une donnée sûre.

Une autre association relativement bien établie est celle de la plus grande fréquence de sujets du groupe O non sécréteurs chez les malades atteints d'ulcère duodénal que chez les sujets normaux.

D'autres associations ont été rapportées : excès de A dans la maladie thrombo-embolique et la maladie de Biermer, excès de O dans le rhumatisme articulaire aigu [2, 4].

II.4- ANTIGENES DE GROUPE SANGUIN ET MALIGNITE

Les antigènes de groupes sanguins ont été longtemps considérés comme des produits génétiques, donc immuables sauf en cas de mutations et sensibles à l'environnement.

Néanmoins, on sait depuis une vingtaine d'années que des modifications indiscutablement acquises et somatiques peuvent être observées au niveau des antigènes portés par les globules rouges au cours d'affections malignes du tissu hématopoïétique. Il s'agit essentiellement de déficits ou de disparition des antigènes A₁, A, B ou H [2].

III- TESTS EN GEL : MISE AU POINT ET EVOLUTION

Le gel test est né fin 1984 début 1985, il y a maintenant plus de 15 ans. Si de ce fait, il fait un peu figure d'ancêtre dans une revue prospective, son histoire constitue malgré tout, une bonne introduction à une telle revue, d'une part parce qu'elle n'est pas terminée et que d'autres développements restent possibles, d'autre part parce qu'elle est tout à fait représentative de la naissance et de l'arrivée à maturité d'un nouveau produit.

Il serait intéressant de faire la lumière sur les faits marquants de son développement et sa place actuelle en Immuno-Hématologie [6].

III.1- LA MISE AU POINT DU GEL-TEST

En y regardant de près, il est étonnant que le gel-test ait mis si longtemps à apparaître : il ne fait appel à aucun outil, ni à aucune technologie complexe. Simplement il rapproche des procédés ou des substances utilisées dans des domaines différents et il les détourne de leur vocation première, utilisant ainsi des moyens bien connus de stimuler l'innovation.

Le gel de Sephadex par exemple, s'il est utilisé depuis longtemps en chromatographie, l'est à cause de la porosité de chacune de ses billes. Dans le gel-test, il n'agit que par sa granulométrie et peut être remplacé par d'autres supports, ce qui a permis à certains fabricants d'en proposer des variantes basées strictement sur le même procédé : les hématies libres arrivent à se frayer un passage à travers des billes, tandis que les agglutinas sont bloqués à la surface [6].

Le procédé est donc basé sur une modification de comportement des hématies agglutinées. Dans le passé, d'autres méthodes ont utilisé d'autres types de modifications du comportement des hématies agglutinées ou des hématies revêtues comme par exemple la lecture par coulage en microplaque ou la sédimentation d'hématies dans les microplaques [6, 7].

Une autre nouveauté apportée par le gel-test, déterminante, a été de permettre de s'affranchir des lavages précédant le test à l'antiglobuline, du fait des vitesses respectives de sédimentation des hématies et du plasma lors de la centrifugation [8, 13].

Au moment de sa description, le gel ne servait que pour réaliser des tests à l'antiglobuline. Les réactifs étaient préparés tous les jours, quelque fois deux fois par jour et utilisés dans des dispositifs artisanaux [6].

III.2- LES TROIS PHASES DE SON EVOLUTION

- La première phase d'évolution du gel-test a demandé près de trois ans, jusqu'à sa commercialisation en 1988 et abouti au système ID® de Diamed [6].

Cette période a notamment permis :

- de préciser la formulation des différents gels réactifs;
 - de définir les dispositifs permettant la mise en œuvre de carte avec plusieurs tubes et une centrifugeuse;
 - de résoudre le problème de la conservation [6, 8, 13].
- Dans une 2^{ème} phase, tous les éléments de la réaction ont été optimisés. La forme et la nature du plastique des cartes ont été améliorées. Parallèlement, les réactifs ont fait des progrès considérables et ces progrès ont été utilisés pour développer de nouvelles utilisations existantes. La meilleure connaissance du procédé, son appropriation par de nombreux laboratoires et le travail de technovigilance qu'ont effectué ces laboratoires ont également concouru à cette optimisation. Jusque là et à quelques anecdotes près, les tests en gel étaient exclusivement distribués par la firme DIAMED [6].

- La 3^{ème} phase d'évolution des méthodes en gel est plus récente puisqu'elle débute en 1992 avec la mise sur le marché de tests similaires par d'autres compagnies. En réalité, si l'on excepte quelques copies plus ou moins conformes du gel-test, comme celles des sociétés Diagast ou Jacques Boy, tests dont la distribution est encore limitée, la principale variante a été introduite par la firme

Ortho qui a repris un des supports testés à l'origine et abandonnés au profit du gel de Sephadex : les billes de verre ; et a commercialisé le test résultant sous le nom de Bio Vue® [6].

L'introduction de ces copies du test original est l'occasion d'une bataille juridique qui constitue une sorte de cas d'école en matière de propriété industrielle, même si ce genre d'événement semble de plus en plus fréquent au cours de la vie d'un nouveau produit [6].



DEUXIEME PARTIE :

TRAVAIL PERSONNEL

I- MATERIEL ET METHODE

I.1- CADRE DE L'ETUDE

Notre étude a été réalisée au Centre National de Transfusion Sanguine.

I.2- POPULATION D'ETUDE

Notre population d'étude est constituée par 150 donneurs de sang d'âge moyen 25 ans (extrêmes 19 à 53 ans). Le sex-ratio est de 1/8 en faveur des hommes. Avec cette population, nous avons procédé pour chaque sujet à un groupage sur plaque et un groupage sur gel.

I.3- MATERIEL

I.3.1- Groupage sur plaque d'opaline

I.3.1.1- Méthode globulaire de Beth Vincent

Réactifs

- Sérum-test anti A
- Sérum-test anti B
- Sérum-test anti A+B
- Sérum-test anti D
- Sérum-test anti-H

Matériel

- Plaque d'opaline
- Verre à pied
- Tube à hémolyse
- Pipette Pasteur
- Crayon gras
- Coton ou compresse
- Microscope
- Lames de microscope
- Rhéscope

1.3.1.2- Méthode sérique de Simonin

Réactifs

- Globules-test A₁
- Globules-test A₂
- Globules-test B

Matériel (Idem méthode globulaire)

1.3.1.3- Contrôles

Réactifs

- Témoin AB : sérum de sujet AB
- Témoin allo : globules rouges de sujet O
- Témoin auto : sérum de l'échantillon + globules rouges de l'échantillon

1.3.2- Groupage sur gel

Réactifs

• Carte-ID "ABO/Rh" contenant des anticorps polyclonaux anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D et anti-CDE d'origine humaine, inclus dans le gel. Le micotube CTL est le contrôle négatif.

• ID-Diluent 1 : solution de bromeline modifiée pour suspension d'hématies.

- Globules-test : A₁, B

Matériel

- ID-Dispenser
- ID-Pipetor
- Embouts ("ID tips")
- Tubes courts pour suspension
- Centrifugeuse type "ID Centrifuge 24 S"
- Portoir ("ID working table")

I.3.3- Tests de confirmation

I.3.3.1- Test de Coombs

☞ Réactifs

- Eau physiologique
- Sérum test anti D.
- Sérum de Coombs

☞ Matériel

- Tubes à hémolyse
- Centrifugeuse
- Pipettes Pasteur
- Bain-marie
- Microscope

I.3.3.2- Réaction de Fixation Elution (RFE)

☞ Réactifs

- Eau physiologique
- Anticorps homologues
- Hématies tests A, B, O⁻, O⁺

☞ Matériel

- Tubes à hémolyse
- Centrifugeuse
- Pipettes Pasteur
- Bain-marie
- Réfrigérateur
- Microscope

I.4- METHODOLOGIE

Les 50 premiers prélèvements ont été utilisés sur une durée de 5 jours à des fins d'entraînement pour nous familiariser avec la technique sur gel et pour mieux comparer les durées des manipulations.

1.4.1- Groupage sur plaque d'opaline

1.4.1.1- Méthode globulaire de Beth Vincent

☞ Déposer sur la plaque d'opaline déjà numérotée

- 1 goutte de sérum-test anti-A
- 1 goutte de sérum-test anti-B
- 1 goutte de sérum-test anti-A+B

☞ Ajouter sur chaque goutte de sérum-test 1 goutte de globules rouges et une goutte de sérum physiologique.

☞ Avec le fond d'un tube à hémolyse, mélanger soigneusement chaque goutte de sang avec la goutte de réactifs, de façon à former une tâche d'environ 2 cm de diamètre.

Il faut toujours nettoyer le fond du tube à hémolyse entre 2 manipulations, avec le coton (ou compresse).

☞ Imprimer à la plaque un lent mouvement circulaire.

Laisser reposer 30 secondes et lire les agglutinations en agitant la plaque.

Lecture

Une réaction antigène-anticorps se traduit par une agglutination notée par un signe positif (+).

Une absence de réaction antigène-anticorps se traduit par une absence d'agglutination notée par un signe négatif (-).

Validation

Toute détermination de groupe sanguin ABO se fait systématiquement en présence de témoins.

Le témoin auto et le témoin AB contrôlent l'épreuve globulaire de Beth Vincent.

- Témoin auto : sérum de l'échantillon + globules rouges de l'échantillon.
- Témoin AB : sérum d'un sujet AB + globules rouges de l'échantillon à grouper

La négativité de ces témoins valide la méthode de Beth Vincent.

La positivité du témoin auto témoignerait de la présence d'auto-anticorps.

La positivité du témoin AB témoignerait de la présence d'une polyagglutinativité.

Interprétation des résultats (voir tableau)

1.4.1.2- Groupage dans le système rhésus

La détermination des antigènes du système rhésus se fait par méthode globulaire. C'est une technique d'agglutination comme précédemment :

- ☞ Déposer une goutte de globules rouges de l'échantillon
- ☞ Déposer une goutte de sérum-test anti-D
- ☞ Mélanger avec l'extrémité d'un tube à hémolyse
- ☞ Noter l'absence ou la présence d'agglutination.

Cette réaction se fait surtout entre 37 et 40°C en utilisant un rhésuscope.

Toute réaction négative doit être confirmée par un test de Coombs et même une réaction de fixation-élution (RFE).

1.4.1.3- Méthode sérique de Simonin

☞ Sur une plaque d'opaline numérotée, mettre 3 gouttes de sérum de l'échantillon à grouper.

- Sur la 1^{ère} goutte, on met des globules-tests A1
- Sur la 2^{ème} goutte, on met des globules-test A2
- Sur la 3^{ème} goutte, on met des globules-tests B

☞ Avec le tube à hémolyse (ou agitateur en verre) on mélange le sérum et le globule-test de façon à former une tâche ovalaire d'environ 2 cm.

☞ Plaque au repos pendant 2 minutes

☞ Lecture : (comme méthode globulaire)

Validation : 2 tests

- Le témoin auto (voir méthode globulaire)
- Le témoin allo : 1 goutte de sérum du malade + 1 goutte de globules-tests O

La négativité de ces témoins valide la méthode sérique.

La positivité du témoin allo signifierait la présence d'allo-anticorps irréguliers en dehors du système ABO.

Interprétation des résultats

Tableau 1 : Résultats de groupage par la méthode de sur plaque d'opaline

Groupes	Méthode de Beth Vincent			Méthode de Simonin	
	Sérum anti-A	Anti B	Anti A+B	GR A	GR B
A	+	-	+	-	+
B	-	+	+	+	-
AB	+	+	+	-	-
O	-	-	-	+	+

Les sujets dont les globules rouges donneront une agglutination avec le sérum-test anti-D seront dites Rhésus positifs. A l'inverse, on parle de Rhésus négatif.

I.4.2- Groupage sur gel

I.4.2.1- Méthode globulaire

☞ Préparation de l'échantillon

• Préparer une suspension d'hématies du patient à 5% en ID-Diluent comme suit :

- Distribuer 0,5 ml d'ID-Diluent 1 dans un tube propre
- Ajouter 50µl de sang total ou 25µl de culot d'hématies
- Mélanger doucement
- Incuber 10 minutes à température ambiante.

☞ Contrôles

Des échantillons positifs et négatifs connus devront être inclus pour valider les résultats.

☞ Protocole

Ne pas utiliser les cartes-ID présentant des signes de déshydratation, des bulles d'air ou des fermetures endommagées.

- Identifier la carte-ID par le nom et ou le numéro du patient
- Enlever la feuille d'aluminium
- Distribuer 10µl-12µl de la suspension d'hématies du patient dans les microtubes de la carte-ID
- Centrifuger la carte-ID 10 minutes dans l'ID-centrifuge
- Lire et noter les réactions.

☞ Lecture et interprétation des résultats

- Positif : hématies agglutinées formant une ligne rouge à la surface du gel ou des agglutinats dispersés dans le gel.
- Négatif : hématies en culot au fond du microtube.

Tableau II : Résultats de groupage sur gel par la méthode globulaire

Groupes	Anti-A	Anti-B	Anti-AB
A	++++	-	++++
B	-	++++	++++
AB	++++	++++	++++
O	-	-	-

Le microtubectl (contrôle) doit toujours être négatif.

S'il est positif, la détermination ABO ne peut être validée. Il faudra alors renouveler le test. Ici également, comme dans la méthode sur plaque, les sujets Rhésus positifs seront détectés par une agglutination au gel sous forme d'un dépôt à la surface du microtube contenant les anticorps anti-D. Idem pour les antigènes associés au rhésus CDE qui pourront être détectés au niveau du microtube contenant les anticorps correspondants.

1.4.2.2- Méthode sérique

- Identifier les cartes-ID par le nom ou le numéro du patient.
- Enlever la feuille d'aluminium
- Distribuer 50µl de ID-Dia Cell A₁ (globules-test A₁) dans le microtube 5
- Distribuer 50µl de ID-Dia Cell (globules-test B) dans le microtube 6
- Ajouter 50µl de sérum du patient dans les microtubes 5 et 6
- Incuber à la température ambiante pendant 10 minutes
- Centrifuger pendant 10 minutes dans le ID-Centrifuge
- Lire et noter les réactions.

Groupes	Globules-test A ₁	Globules-test B
A	-	+
B	+	-

Remarque

Les sérums-test utilisés dans la méthode globulaire et les globules-tests utilisés dans la méthode sérique peuvent être contenus dans des microtubes d'une même carte-ID, nous dispensant d'une double centrifugation.

I.4.3- Tests de confirmation

I.4.3.1 Tests de Coombs indirect

- . Laver les hématies du malade 3 fois et en préparer une suspension de 5 % en solution physiologique
- . Déposer 3 gouttes de sérum-test anti D dans un tube propre
- . Ajouter une goutte de suspension d'hématies
- . Incuber pendant 15-30 minutes à 37 °C
- . Laver 3 fois le contenu du tube avec la solution physiologique et décanter le surnageant
- . Ajouter une goutte de sérum de Coombs
- . Mélanger par agitation et centrifuger une minute à 1000 tours/mn.
- . Resuspendre doucement les hématies et au dessus d'un éclairage indirect, observer l'agglutination macroscopique ou lire au microscope.

I.4.3.2 Réaction de Fixation-Elution (RFE)

- . Recueillir dans un tube de 10 cc au minimum 1 ml de culot globulaire
- . Effectuer 3 lavages successifs en sérum physiologique préalablement porté à 37 °C.
- . Ajouter au culot globulaire lavé un volume égal d'anticorps homologues à l'antigène recherché
- . Incuber 2 heures à 4°C pour les anticorps du système ABO, 1 heure à 37 °C pour les anticorps du système Rhésus
- . Effectuer 6 lavages en sérum physiologique

- . Vérifier l'absence de traces d'anticorps sur la dernière eau de lavage
- . Ajouter au culot globulaire bien égoutté un volume égal de solution d'élution :
sérum physiologique
- . Porter au bain-marie à 56 °C pendant 10 mn pour réaliser l'élution
- . Centrifuger immédiatement les tubes pendant 4 mn à 4000 tours/mn
- . Séparer immédiatement le surnageant (éluat du culot globulaire). Il est teinté de rouge résultant de l'hémolyse des globules rouges chauffés
- . Tester l'éluat et la 6ème eau de lavage sur une liste d'hématies-tests :
 - globules-tests O (témoin négatif du système ABO)
 - globules-tests A
 - globules-tests B
 - globules-tests O Rh-
 - globules-tests O Rh+.

Ces deux tests de confirmation nous ont servi de moyens d'arbitrage entre les deux techniques à comparer; et donc à ce titre, ne peuvent être elles-mêmes comparées à la technique sur gel ni ne peuvent être prises en compte dans l'appréciation des prix pour la méthode sur plaque.



RESULTATS

Les résultats seront appréciés sur le plan phénotypique, mais aussi sur le plan de la durée des manipulations et le coût.

1)- RESULTATS DES PHENOTYPAGES

Tableau III : Résultats comparatifs du groupage

Numéros d'échantillon	Groupes	
	<i>Sur Plaque</i>	<i>Sur Gel</i>
1	O+	O+
2	A+	A+
3	B+	B+
4	O+	O+
5	O ⁻	O ⁻
6	O+	O+
7	O+	O+
8	B+	B+
9	A+	A+
10	O+	O+
11*	O ⁻	O+
12	A+	A+
13	O+	O+
14	O+	O+
15	O+	O+
16	B+	B+
17	O+	O+
18	O+	O+
19	A+	A+
20	B+	B+
21	O+	O+
22	O+	O+
23	O+	O+
24	O+	O+
25	O+	O+
26	A+	A+
27	O+	O+
28*	B ⁻	B+

Numéros d'échantillon	Groupes	
	<i>Sur Plaque</i>	<i>Sur Gel</i>
29	A+	A+
30	AB+	AB+
31	B+	B+
32	O+	O+
33	O ⁻	O ⁻
34*	O ⁻	O+
35	O+	O+
36	O+	O+
37	A+	A+
38	B+	B+
39	O+	O+
40	B+	B+
41	B+	B+
42	A+	A+
43	O+	O+
44	B+	B+
45	B+	B+
46	B+	B+
47	O+	O+
48	O+	O+
49	O ⁻	O ⁻
50	O+	O+
51	O+	O+
52	O+	O+
53	A+	A+
54	A+	A+
55	B+	B+
56	A+	A+
57	O+	O+
58	O+	O+

Tableau III : Résultats comparatifs du groupage (suite et fin)

Numéros d'échantillon	Groupes		Numéros d'échantillon	Groupes	
	<i>Sur Plaque</i>	<i>Sur Gel</i>		<i>Sur Plaque</i>	<i>Sur Gel</i>
59	B+	B+	80	O+	O+
60	O+	O+	81	O+	O+
61	O+	O+	82	O+	O+
62	O+	O+	83	B+	B+
63	O+	O+	84	B+	B+
64	O+	O+	85	O+	O+
65	B+	B+	86	AB+	AB+
66	A+	A+	87	O+	O+
67*	O ⁻	O+	88	O+	O+
68	O+	O+	89	O+	O+
69*	O ⁻	O+	90	O+	O+
70	B+	B+	91	O+	O+
71	B+	B+	92	O ⁻	O ⁻
72	B ⁻	B ⁻	93	O+	O+
73	B+	B+	94	O+	O+
74	B+	B+	95	O+	O+
75	B+	B+	96	O+	O+
76	A+	A+	97*	A ⁻	A+
77	O+	O+	98	B+	B+
78	O+	O+	99	O+	O+
79	A+	A+	100	O+	O+

*/ Discordance entre les deux techniques (les tests de confirmation, Coombs ou RFE donnent raison au gel).

II)- DUREE DES MANIPULATIONS

II.1- METHODE SUR PLAQUE

1^{er} jour : sur 37 prélèvements

- Préparation des hématies test : 25 minutes
- Centrifugation des échantillons : 10 minutes
- Groupage à proprement parler :
 - Beth Vincent : 1 heure 15 minutes
 - Simonin : 1 heure 05 minutes
- Confrontation des résultats : 10 minutes

Temps total \approx 2 heures 5 minutes soit 3 minutes 23 secondes pour le groupage d'un échantillon.

NB : *on n'a pas comptabilisé le temps du Simonin qui se fait en même temps que le Beth Vincent*

2^{ème} jour : sur 30 prélèvements

Temps total : 1 heure 47 minutes soit 3 minutes 30 secondes pour le groupage d'un échantillon.

3^{ème} jour : sur 17 prélèvements

Temps total : 1 heure environ soit 3 minutes 29 secondes pour le groupage d'un échantillon.

4^{ème} jour : sur 16 prélèvements

Temps total : 1 heure environ soit 3 minutes 45 secondes pour le groupage d'un échantillon.

NB : *Les résultats qui donnent un rhésus négatif sur plaque feront l'objet d'une recherche de Du par le test de Coombs indirect qui dure environ 1 heure 15 minutes. Et si le test de Coombs se révèle négatif, on passe à la Réaction de Fixation Elution qui dure environ 2 heures 45 minutes*

II.2- METHODE SUR GEL

• **1^{er} jour** : sur 37 prélèvements

- Numérotation des tubes : 11 minutes
- Dilution des hématies et distribution : 1 heure 05 minutes
- Centrifugation : 10 minutes
- Lecture : 13 minutes

Temps total : 1 heure 39 minutes soit 2 minutes 40 secondes par échantillon.

• **2^{ème} jour** : sur 30 prélèvements

Temps total : 1 heure 12 minutes soit 2 minutes 24 secondes par échantillon.

• **3^{ème} jour** : sur 17 prélèvements

Temps total : 42 minutes soit 2 minutes 28 secondes par échantillon.

• **4^{ème} jour** : sur 16 prélèvements

Temps total : 35 minutes soit 2 minutes 11 secondes par échantillon.

III)- DIFFICULTES DIVERSES

III.1- METHODE SUR PLAQUE

- 3 discordances entre Beth Vincent et Simonin
- 1 discordance au Beth Vincent

Soit 4% d'erreurs avec la méthode sur plaque.

III.2- METHODE SUR GEL

Aucune discordance entre le test globulaire et le test sérique.

IV)- COÛT DES MATERIELS ET REACTIFS

IV.1- GROUPEMENT SUR PLAQUE D'OPALINE

☞ Matériel

Tableau IV: Prix du matériel pour technique sur plaque

DESIGNATIONS	PRIX (FCFA)
Centrifugeuse	900 000
Plaque d'opaline	7 000
Rhésuscope	70 000
Bain-marie (grand modèle)	600 000
Tubes à hémolyse (boîte de 1000)	18 000
Embouts (boîte de 1000)	7 000
Coton (1 paquet)	3 500
Réfrigérateur	900 000
Tige en verre	6 500
Gants (boîte de 100)	4 000
Pipette Pasteur (sachet de 100)	7 500
TOTAL	2 519 500

☞ Réactifs

Tableau V: Prix des réactifs pour technique sur plaque

DESIGNATIONS (1 flacon)	PRIX (FCFA)
Sérum-test anti-A	8 000
Sérum-test anti B	8 000
Sérum-test anti-AB	8 000
Sérum-test anti D	18 000
Sérum-test antiglobuline	12 000
Sérum-test anti H	9 000
TOTAL	63 000

IV.2- GROUPAGE SUR GEL

☛ Matériel

Tableau VI: Prix du matériel pour technique sur gel

DESIGNATIONS	PRIX (FCFA)
ID-Dispenser	108 000
ID-pipetor	316 000
Embouts "ID-tips" (boîte de 1000)	8 000
Tubes courts pour suspension (boîte de 1000)	8 000
Centrifugeuse type "ID-centrifuge 24S"	1 656 000
Portoir "ID-working table"	364 000
TOTAL	2 460 000

☛ Réactifs

Tableau VII: Prix des réactifs pour technique sur gel

DESIGNATIONS	PRIX (FCFA)
Cartes-ID "ABO/Rh/CDE/Ctl" (48 cartes)	51 200
ID-diluant (flacon de 100 ml)	24 000
Globules-tests A1, B (2 x 10 ml)	24 600
TOTAL	99 800

V/ Sensibilité et Fiabilité

Pour comparer la sensibilité entre les deux méthodes, nous avons pris comme référence les tests de confirmation de Coombs et la Réaction de Fixation-Elution (RFE).

Les sujets 11, 28, 34, 67, 69 et 97 qui étaient Rhésus négatifs avec la méthode sur plaque se sont révélés positifs avec la technique sur gel, positivités confirmées par le test de Coombs et la RFE.

Les échantillons 18, 43 et 45 ont fait l'objet de discordance entre la méthode globulaire et la méthode sérique sur plaque .

Avec le sujet 79, on a noté une différence au Beth-Vincent sur plaque.

Aucune discordance n'a été remarquée avec la technique sur gel.



DISCUSSION

Les résultats de l'étude comparative entre les deux méthodes peuvent être discutés sous plusieurs angles :

1)- Fiabilité des résultats et sensibilité.

Il apparaît clairement que la méthode sur gel est d'une fiabilité et d'une sensibilité supérieures à celle sur plaque d'opaline [13].

En effet, au cours de l'étude, aucun cas de discordance n'a été observé entre les tests globulaires et les tests sériques avec la méthode sur gels ; contrairement à la méthode traditionnelle (3 cas de discordance entre Beth Vincent et Simonin et un cas de discordance au Beth Vincent).

Par ailleurs, un résultat de rhésus négatif rendu avec la méthode sur gel est "sans équivoque" et jamais "démenti" par les tests de Coombs ou de Reaction Fixation Elution [15].

2)- Manipulations

Là également, il faut remarquer la simplicité des actes dans les deux méthodes, mais une amélioration de l'hygiène avec la méthode sur gel [6] de même qu'une lecture des résultats assez aisée pouvant même être différée [8, 15], un encombrement réduit et une standardisation de la méthode sur gel avec une moins grande dépendance vis à vis du technicien [6, 8, 14]

La méthode sur gel consomme moins de réactifs avec un protocole assez précis sur les volumes à utiliser [11, 15].

3)- Le personnel

La technique sur gel nécessite un personnel plus restreint (1 technicien suffit) que la technique sur plaque qui a besoin d'au moins deux techniciens pour la manipulation et surtout la comparaison des résultats.

4)- Durée des manipulations

La comparaison du temps nécessaire pour la mise en œuvre de ces deux méthodes montre nettement que la technique sur gel est considérablement plus rapide que la technique sur plaque d'opaline [7, 13].

En effet, il existe avec la méthode traditionnelle beaucoup d'autres tests supplémentaires à effectuer (Coombs, RFE) pour confirmer certains résultats comme par exemple le rhésus négatif ; contrairement à la méthode sur gel qui donne des résultats "tout faits" [10, 15].

5)- Le coût des matériels et réactifs

La comparaison pour le matériel montre un coût nettement plus élevé de la technique sur gel quand on soustrait le prix du réfrigérateur qui n'est pas un matériel propre à la méthode sur plaque, mais qui peut servir également pour la conservation des réactifs de la méthode sur gel et même d'autres réactifs de laboratoires. Dès lors, le matériel sur plaque reviendrait à 1 619 500 FCFA.

Le matériel pour la technique sur gel revient à 2 460 000 FCFA avec des articles qui sont tous spécifiques à cette technique.

En ce qui concerne les réactifs, il faut remarquer une différence notable des coûts que l'on peut dans un premier temps imputer au mode de conditionnement des réactifs. Aussi, serait-il intéressant de comparer les prix de revient d'un groupage par rapport au volume des réactifs et cartes utilisés pour un échantillon à grouper.

Ainsi, un flacon de sérum-test a un volume de 10 ml. Lorsque nous considérons que chaque échantillon nécessite une goutte de sérum-test d'environ 100 μ l, on peut dire qu'une gamme de flacons de sérums-tests (anti-A, anti-B, anti-AB et anti-D) permet de faire environ 100 groupages.

Si l'on divise le prix de la gamme (en plus de l'antiglobuline et de l'anti-H) qui est de 63 000 FCFA par 100, nous avons le prix de revient d'un groupage qui est en moyenne de 630 FCFA.

Bien entendu, un tel calcul reste marqué par une marge d'erreur difficile à apprécier. En effet, tout dépend du technicien qui manipule et qui n'est pas souvent soucieux des volumes à utiliser sans compter les groupages à reprendre çà et là.

Pour la technique sur gel, nous avons adopté le même procédé que précédemment (c'est à dire le groupage sur plaque) :

Chaque échantillon à grouper nécessite une carte ID. Le prix des 48 cartes est de 51 200 FCFA, soit 1 066 FCA par carte.

L'ID-diluant nécessaire pour la dilution des hématies de l'échantillon revient à 24 000 CFA pour un volume de 100 ml. Chaque échantillon nécessite un volume de 0,5 ml pour sa dilution. Donc un flacon d'ID-diluant permet de faire 200 groupages, soit 120 FCA pour un groupage.

Pour les globules-tests, on a des flacons de 10 ml avec une prise d'essai de 50µl pour chaque échantillon, soit la possibilité de 200 groupages par flacon. Donc si l'on rapporte au prix, cela revient à 123 FCA ($24\,600\text{ FCA} / 200$) pour un échantillon.

Au total, avec la technique sur gel, le groupage reviendrait à : 1 066 FCFA (prix moyen d'une carte) + 120 FCA (prix moyen d'une dilution) + 123 FCA (prix moyen d'un volume de globules-tests nécessaires), soit 1 309 FCA pour le groupage d'un échantillon.

Donc là également avec les réactifs, le coût est largement plus important pour la technique sur gel que la technique sur plaque d'opaline. Et cela aurait indéniablement une conséquence sur le prix de l'analyse que les patients devraient payer.

6)- La conservation des réactifs

Là également, il y a un inconvénient majeur de la technique sur gel.

En effet, si les cartes contenant les gels peuvent avoir une longue durée de conservation, les hématies-tests sont caractérisées par leur mauvaise conservation et leur grande disposition à l'hémolyse [6, 8]. Tandis qu'avec la méthode traditionnelle les hématies-tests peuvent être quotidiennement préparées à partir de sang de sujets de groupes connus.

Quand nous prenons en compte nos réalités climatiques (zone tropicale relativement chaude), économiques et infrastructurelles (chaîne de froid généralement défectueuse surtout dans les régions reculées), nous nous rendons compte de la difficulté à bien conserver ces réactifs de la technique sur gel.

7)- Approvisionnement des réactifs

A l'heure actuelle, il est plus facile de s'approvisionner en réactifs utilisés dans la technique sur plaque d'opaline. cela pose le problème de la dépendance vis à vis du fournisseur avec tous les inconvénients liés à un retard en cas d'urgence, ou de rupture de réactifs dans le laboratoire.

Cependant, cette situation peut changer avec une meilleure représentation dans notre pays, des laboratoires produisant ces réactifs.



CONCLUSION

En Immuno-Hématologie érythrocytaire, le gel est un "produit mûr" même s'il reste susceptible de subir au fil du temps de petites améliorations, notamment dans la formulation des réactifs inclus [6, 12].

Son utilisation dans le groupage ABO / Rh montre une plus grande fiabilité, une meilleure lecture et surtout une plus grande sensibilité par rapport à la méthode traditionnelle sur plaque d'opaline [13, 15].

Cette plus grande sensibilité, surtout dans la détection de l'antigène D faible (Du) par exemple, amène de plus en plus d'auteurs à reconsidérer la notion de "rhésus négatif". En effet, il semble plus raisonnable de considérer comme rhésus positif, tous les échantillons détectés par ces techniques modernes sur gel [10, 15].

Cependant, les difficultés de conservation des réactifs (surtout les hématies), mais surtout le coût assez élevé de ces réactifs du gel par rapport à ceux de la méthode traditionnelle constituent autant de facteurs limitants qui rendent timides les laboratoires quant à la systématisation des techniques sur gel, surtout dans un pays comme le Sénégal.

Sur le plan clinique, il n'y a pas un apport de la méthode sur gel qui peut justifier le remplacement systématique de la méthode traditionnelle. Par exemple, il n'est jamais dangereux de rendre un rhésus négatif pour un sujet qui est réellement rhésus positif [3, 9] (à condition que ce sujet soit un éventuel receveur et non donneur).

Toutes ces considérations, associées à nos réalités socio-économiques font que les méthodes traditionnelles ont encore de "beaux jours" devant elles, tout au moins en ce qui concerne le phénotypage dans les systèmes ABO / Rhésus ; laissant le champ libre à la technique sur gel, surtout dans la recherche des anticorps irréguliers et le phénotypage complet [6, 14].



BIBLIOGRAPHIE

1- BACH J.F.

Réaction antigènes-anticorps ; In Immunologie.

Paris 1979, Flammarion, 266

2- BATCHELOR J.R., COMPSTON A.,Mc DONNALD W.I :

HLA and multiple sclerosis

Brit. Med. Bull., 1978, 34, 279

3- GENETET B et MANNONI P.

La transfusion

Paris 1978, Flammarion ed, 680p.

4- GOUDEMANT M. et SALMON C.

Immuno-hématologie.

Flammarion ed 1980, 15, 17

5- HUESTIS D.W., BOWE J.R. et BUCH S.

Practical blood transfusion.

Boston, 1979, Little Brown, ed

6- LAPIERRE Y.

Les tests en gel et leur évolution

Mémoire original.

7- LAPIERRE Y.

Procédé de mise en évidence d'agglutinats érythrocytaires.

Bulletin officiel de propriétés industrielles, 1986, 33, 257-321

8- LAPIERRE Y.,RIGAL D., ADAM J., JOSEF D., MEYER F., GREBER S., DROT C.

The gel test : a new way to detect red cell antigen-anti body reactions.

Transfusion, 30, 109-113.

9- MOLLISON P.L.

Blood transfusion in clinical medicine

Oxford, 1972, Blackwell ed, 830p.

10- MOULINIER J.

Un test de sécurité pour la détermination du type Rh négatif.

Ann. Biol. Clin. 1954, 12, 21.

11- ROSENFELD R.E., SZYMANSKI I.O, HABER G.V and KOCHWA S

Automated methods for the detection and measurement of hemagglutination.

Proc 10th Congr. Int. Soc. Blood transf. Stockholm (1964).

Part 4 : Advances in blood transfusion-Basel, S.Karger, 1965, p.985

12- SALAMAA., BERGHÖFER H., MUELLER-ECKHARDT C.

Detection of cell drug (haptén)-antibody complexes by the gel test.

Transfusion, 1992, 32, 554-556

13- STURGEON P., CEDERGREN B. and Mc QUISTON D.

Automation of routine blood typing procedures.

Vox Sang. 1963, 8: 438

14- TILLS D., BUSHROD J., WARD D.J., JOSEF D.

Typing of normal and variant red cells with ABO, Rh, and kell typing reagents using a gel typing system

Immuno-hématologie, 1991, 7, 94-97

15- YVART J., GERBAL A., CARTON J. et SALMON C.

Etude comparée de diverses méthodes de mise en évidence de l'antigène Du.

Cent. Dep. Transf sang, Paris, 1995, 17, 23-28