

Rôle du laboratoire dans la détection et l'identification des anticorps anti-HLA et anti-HPA

Corentin Streef

29 septembre 2022



Systeme HLA

Introduction

Rappels

HLA = Human Leukocyte Antigen

Noyau central de l'immunologie humaine

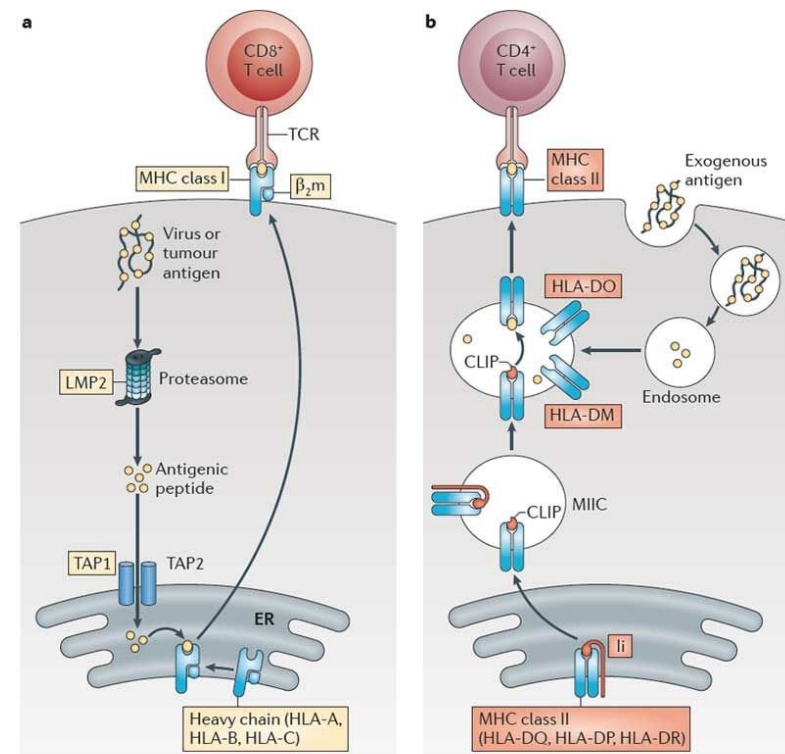
Reconnaissance du soi et du non soi

Rôles principaux :

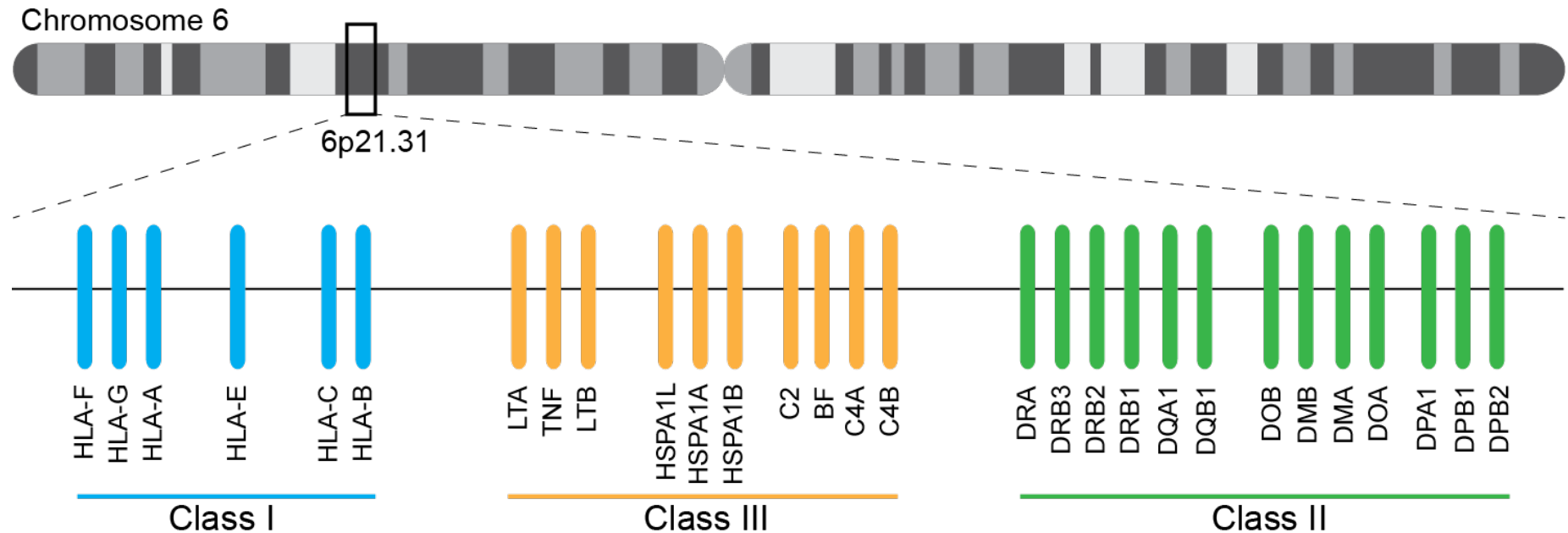
- Présentation des peptides au système immunitaire
- Coordination de la réponse humorale et cellulaire

Implications cliniques multiples :

- Transplantation d'organes solides
- Greffes de cellules souches hématopoïétiques
- Transfusion sanguine
- Prédisposition à différentes maladies



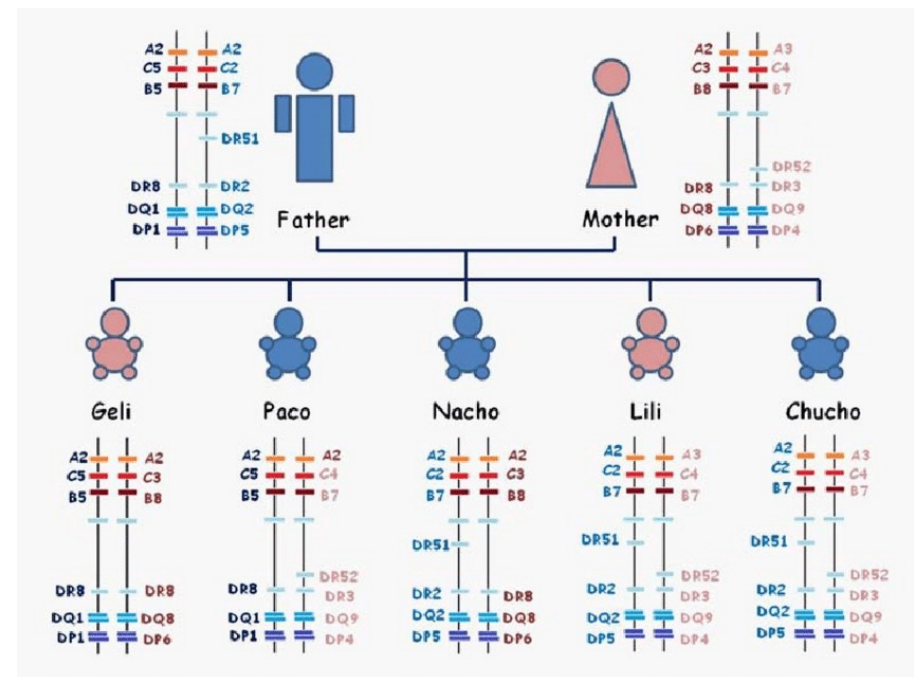
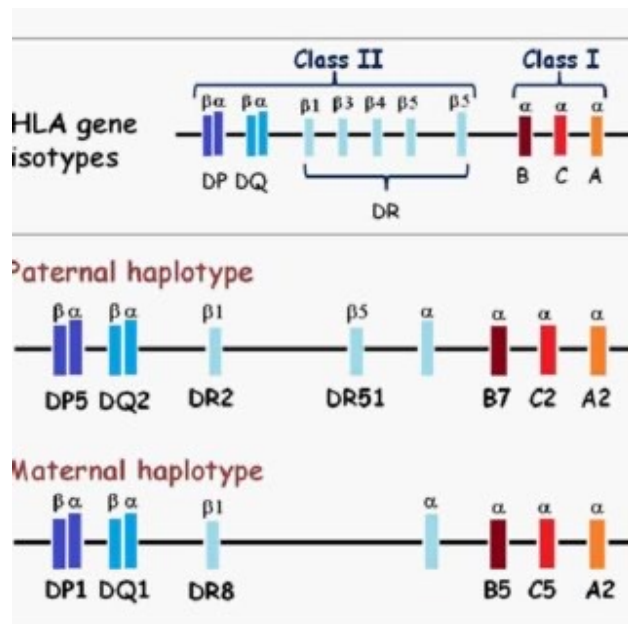
Structure générale du système HLA



<http://www.biorigami.com/?tag=hla>

Structure générale du système HLA

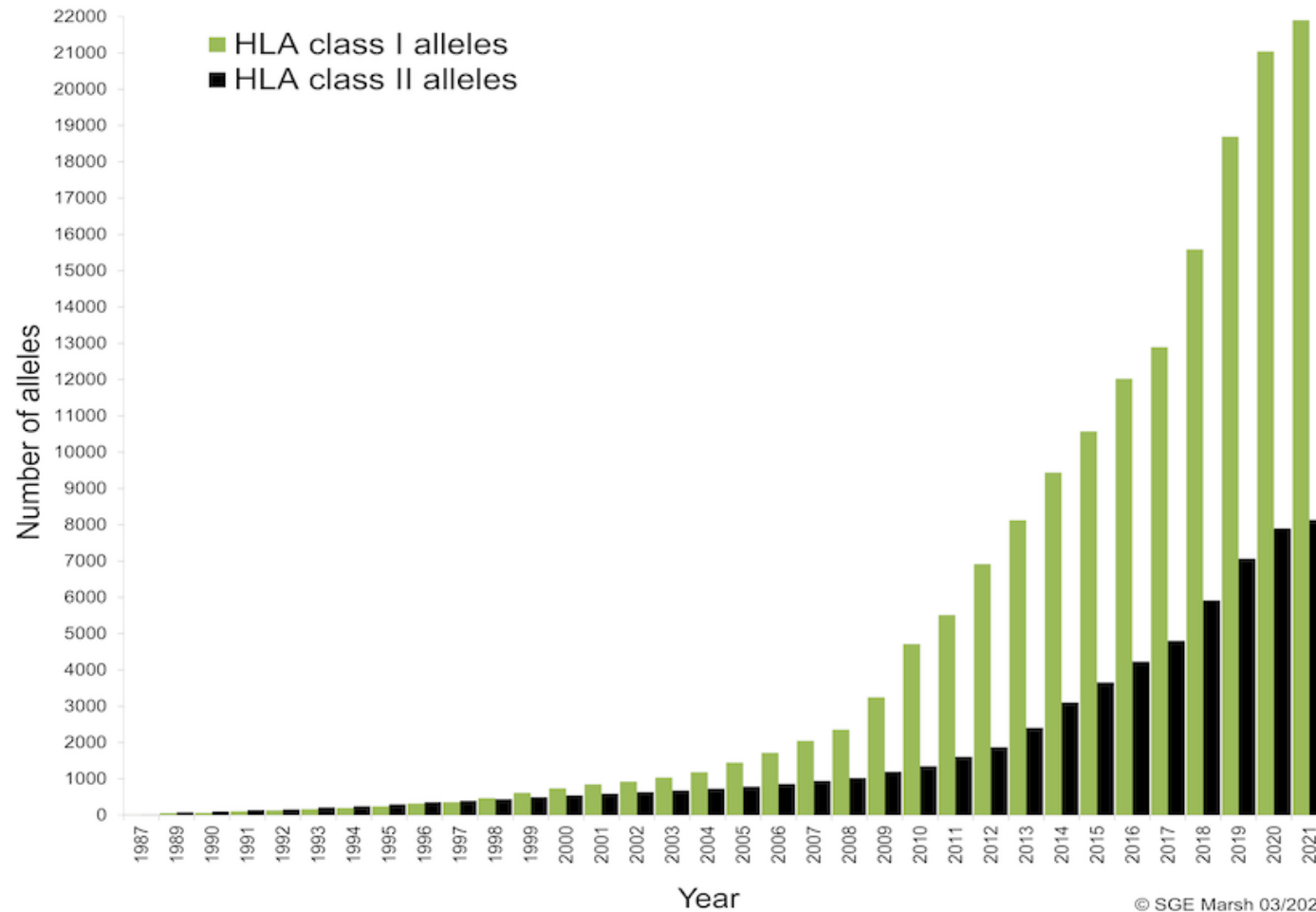
Transmission en bloc (**haplotype**) selon les lois de Mendel



Salcido-Ochoa, Francisco. (2015). Human Leukocyte Antigen (HLA) System in Solid Organ Transplantation and Few Novel Concepts on HLA Matching.

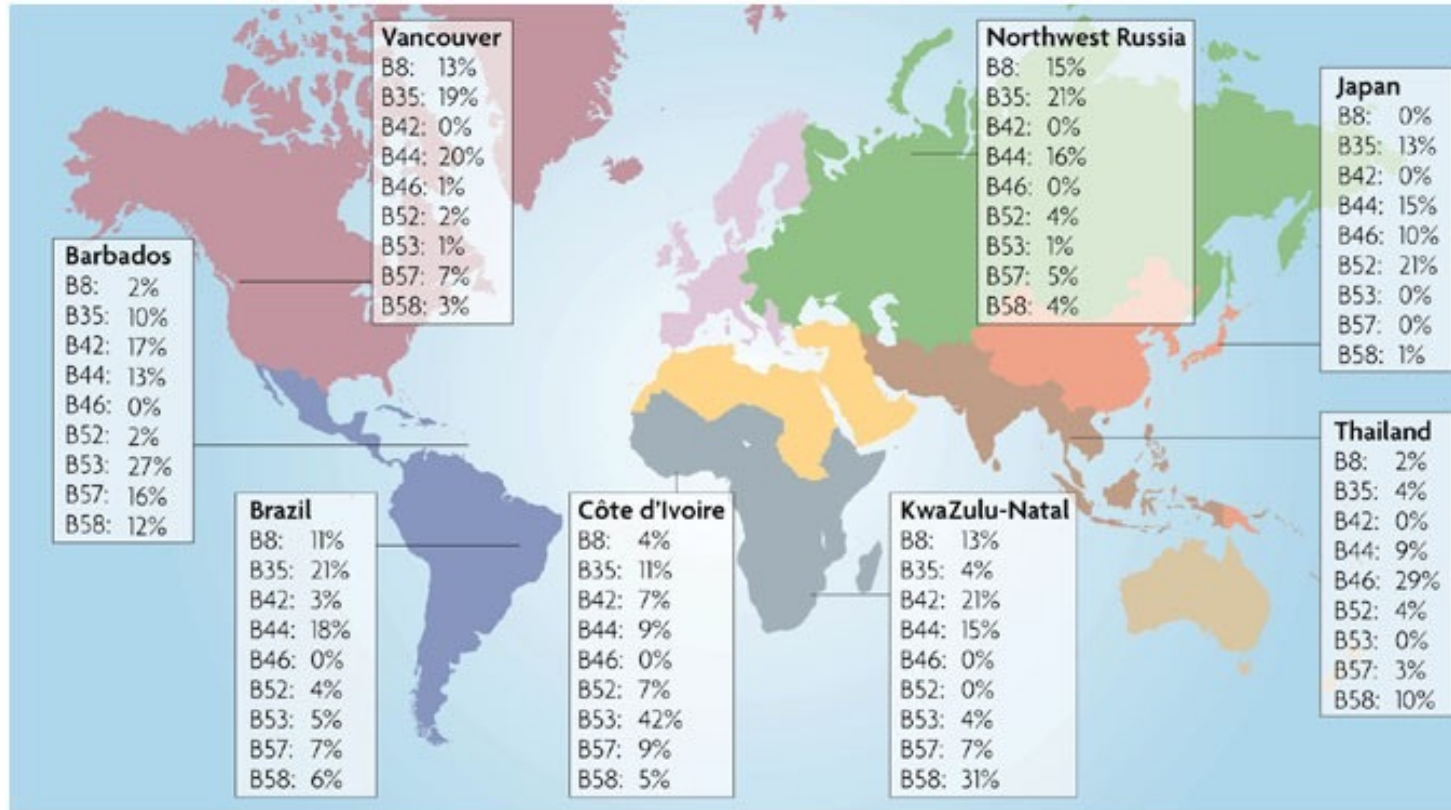
Caractéristiques du système HLA

- 1) Expression codominante
- 2) Déséquilibre de liaison
- 3) Polymorphisme



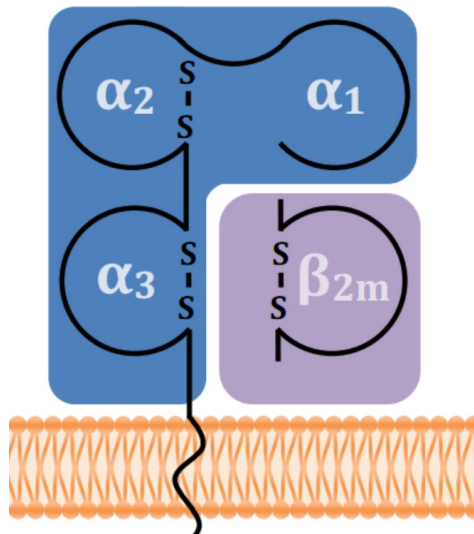
	Nombre d'allèles (2019)
HLA-A	5266
HLA-B	6537
HLA-C	5140
HLA-DRB1	2581
HLA-DQB1	1718
HLA-DPB1	1449

Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JH, Flicek P, Parham P, Marsh SGE
 The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases
Nucleic Acids Research (2015) **43**:D423-431



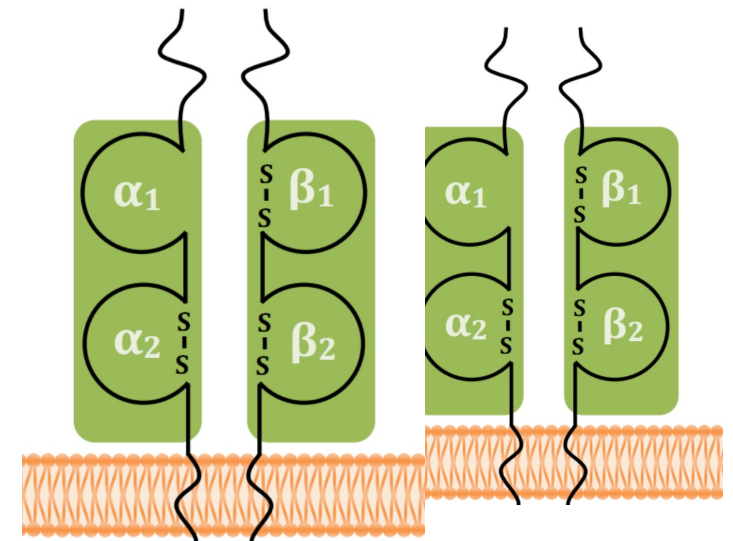
Structure des molécules HLA

Molécules HLA de classe I



≠

Molécules HLA de classe II



Distribution tissulaire des molécules HLA

Molécules HLA de classe I

Expression **ubiquitaire** :

- Cellules nucléées dont
 - Lymphocytes B
 - Lymphocytes T
- Plaquettes

Molécules HLA de classe II

Expression restreinte à certaines cellules :

- **Cellules présentatrices d'antigènes** :
 - Cellules dendritiques
 - Lymphocytes B
 - Macrophages
- Cellules myéloïdes et érythroblastiques médullaires
- Epithélium thymique
- Endothélium vasculaire
- **Lymphocytes T ACTIVES**

ALLO-IMMUNISATION ANTI-HLA

Allo-immunisation anti-HLA

= formation d'anticorps immuns contre les antigènes HLA de classe I et/ou de classe II présents sur les cellules nucléées et les plaquettes.

- Transfusion sanguine
- Grossesse
- Transplantation
 - d'organes
 - HSCT

Allo-immunisation anti-HLA

= formation d'anticorps immuns contre les antigènes HLA de classe I et/ou de classe II présents sur les cellules nucléés et les plaquettes.

- **Transfusion sanguine**
- **Grossesse**
- **Transplantation**
 - d'organes
 - HSCT

Auteurs	Groupe de patients	Alloimmunisation		Etat réfractaire	
		Standard	Déleucocyté	Standard	Déleucocyté
Etude T.R.A.P. 1997	LMA	45%	17%	13%	3%
Killick 1997	Aplasiques	50%	12%	-	0%
	Anémiques				
Novotney 1995	Aplasiques	-	12%	-	5%
	Thrombopéniques				
Adamzik 1995	Cancer	27%	0%	27%	0%
	LMA	-	-	-	-
Blumberg 1995	LMA	-	-	-	-
	Lymphome	-	-	-	-
Williamson 1994	Cancer	37.5%	22.4%	31%	24%
	LMA	63%	31%	-	-
Oksanen 1994	LMA	38%	17%	21%	3%
Saarinen 1993	Leucémiques	30%	0%	10%	0%
Bedford-Russell 1993	Nouveau-nés	30.4%	0%	-	-
Mylyla 1993	G. Rénale	67%	19%	-	-
	Leucémiques	-	-	52%	0%
	LMA	-	-	18%	2.9%
Al-Momen 1992	Leucémiques	-	-	-	-
Van Prooijen 1991	Leucémiques	-	7.8%	-	7.8%
Van Marwijk Kooy 1991	Leucémiques	42%	7%	46%	11%
Synthèse		42.6%	12.3%	30.1%	6.1%

Allo-immunisation anti-HLA

= formation d'anticorps immuns contre les antigènes HLA de classe I et/ou de classe II présents sur les cellules nucléés et les plaquettes.

- Transfusion sanguine
- **Grossesse**
- Transplantation
 - d'organes
 - HSCT

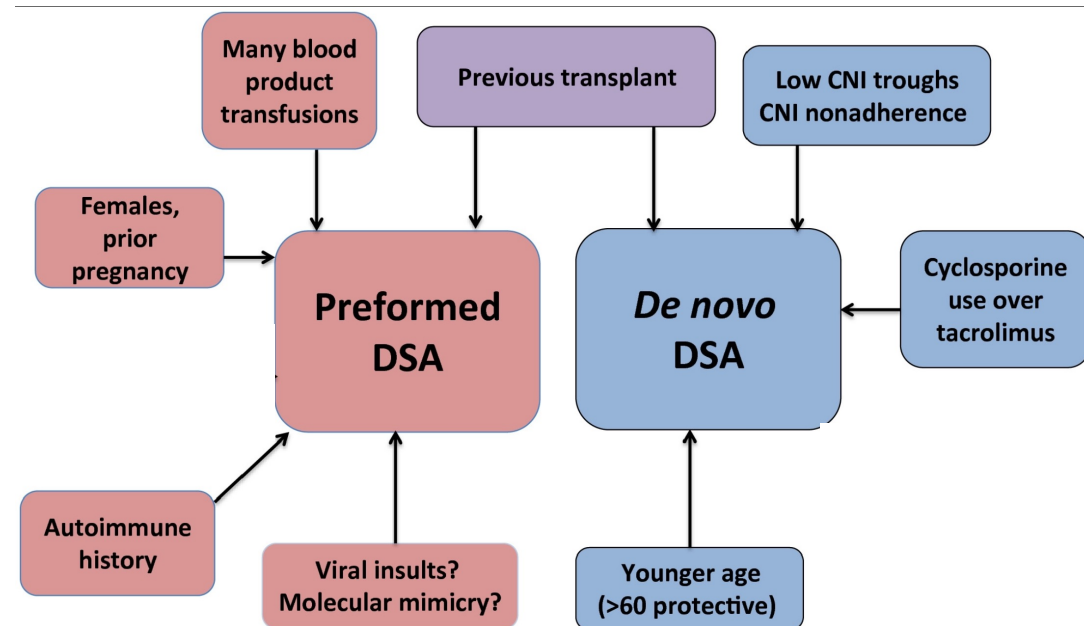
Nombre de grossesses	% de patientes immunisées anti-HLA
0	1,7
1	11,2
2	22,5
3	27,5
>3	32,2

Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, Busch MP, Norris PJ, Steele WR, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. *Transfusion (Paris)*. sept 2009;49(9):1825-35

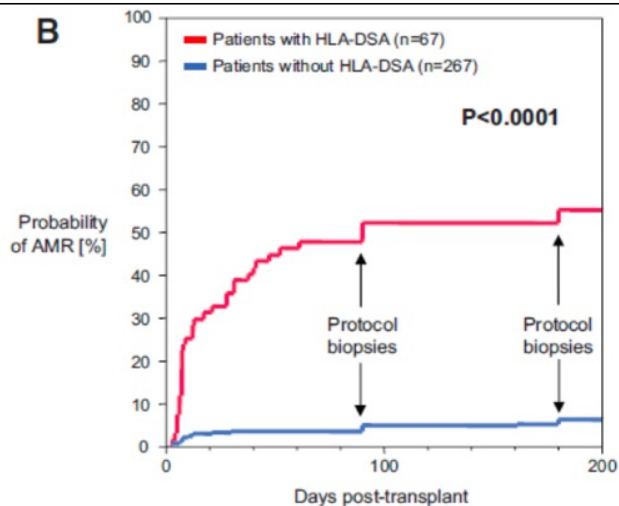
Allo-immunisation anti-HLA

= formation d'anticorps immuns contre les antigènes HLA de classe I et/ou de classe II présents sur les cellules nucléés et les plaquettes.

- Transfusion sanguine
- ,Grossesse
- Transplantation
 - d'organes
 - HSCT



Probabilité de rejet médié par les anticorps selon la présence ou non de DSA.

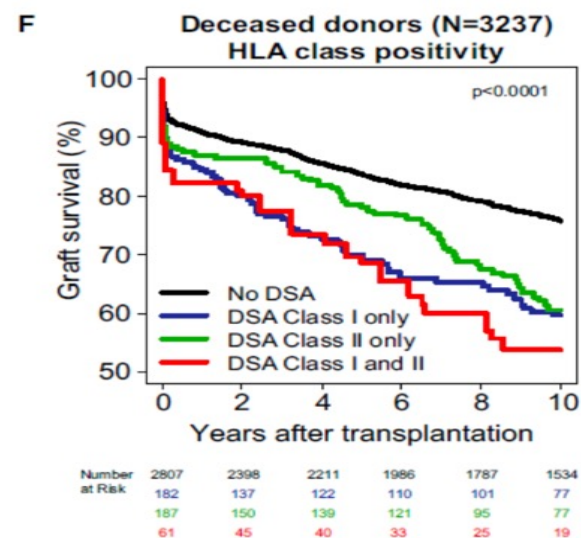


Clinical Relevance of Pretransplant Donor-Specific HLA Antibodies Detected by Single-Antigen Flow-Beads

Patrizia Amico,¹ Gideon Hönger,¹ Michael Mayr,¹ Jürg Steiger,¹ Helmut Hopfer,² and Stefan Schaub^{1,3}

Transplantation • Volume 87, Number 11, June 15, 2009

Etude de la survie des greffons en fonction de la présence de DSA de classe I et/ou de classe II.



Differential effects of donor-specific HLA antibodies in living versus deceased donor transplant

E. G. Kamburova¹ D. L. Roelen¹⁶ | F. H. Claas¹⁶ | H. G. Otten¹

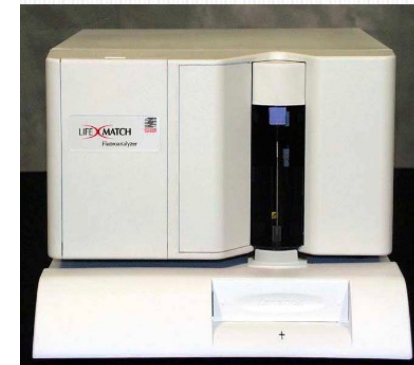
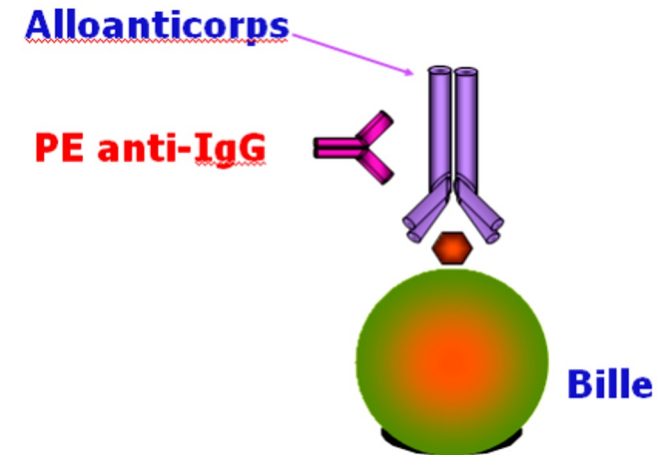
Am J Transplant. 2018;1-11.

MÉTHODES DE DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-HLA AU LABORATOIRE

Technologie Luminex

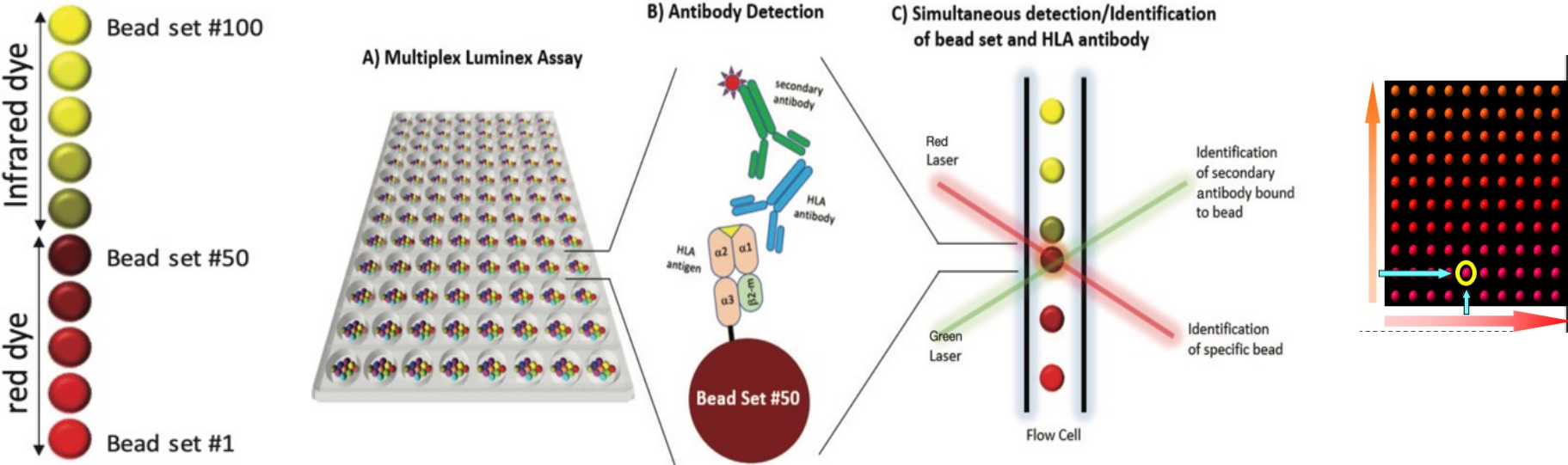
Principes généraux

1. Antigènes HLA/HPA purifiés fixés sur des microsphères en polystyrène
2. Fixation sur la microsphère de l'anticorps anti-HLA/HPA contenu dans le sérum
3. Mise en évidence du complexe Antigène/Anticorps par une anti-IgG humaine couplée à la PE (phycoérythrine)
4. Lecture sur système LUMINEX-fluoroanalyseur mesurant la fluorescence des microsphères en flux



Technologie Luminex

Principes généraux



Technologie Luminex

Principes généraux

Il existe plusieurs types de microbilles avec des buts différents :

- **Dépistage des anticorps anti-HLA**

- Un seul test pour anticorps anti-HLA de classe I et/ou de classe II.
- 10 à 17 billes recouvertes d'un mélange d'antigène HLA purifiés
- Origine des Ag : lignées cellulaires lymphocytaires de plusieurs individus → Ag natifs

- **Identification des spécificités des anticorps anti-HLA (SAB)**

- Chaque bille est recouverte avec un seul antigène HLA recombinant → 1 seule spécificité allélique HLA
- Test le plus sensible et le plus spécifique

Technologie Luminex

Avantages

- Technique simple, rapide et très sensible
- Pas de détection théorique d'anticorps non HLA.
- Toujours disponible (pas de cellules à décongeler)
- Diminution des contraintes humaines
- Antigènes hautement purifiés voire recombinants permettant la détection des Ac anti HLA-A, B, Cw, DRB1*, DRB3*, DRB4*, DRB5*, DQA-DQB, DPA-DPB

- Utilisation en **pré-transplantation**
 - Définition fine de l'allo-immunisation
 - Définition des Ag HLA permis et des Ag interdits
- Utilisation en **monitoring post-transplantation**
- Utilisation en **transfusion**

Inconvénients

- Coût reste élevé pour les tests d'identification «SAB»
- Pas de consensus sur la valeur seuil de MFI
- Acquisition d'un Luminex (cytomètre dédié)

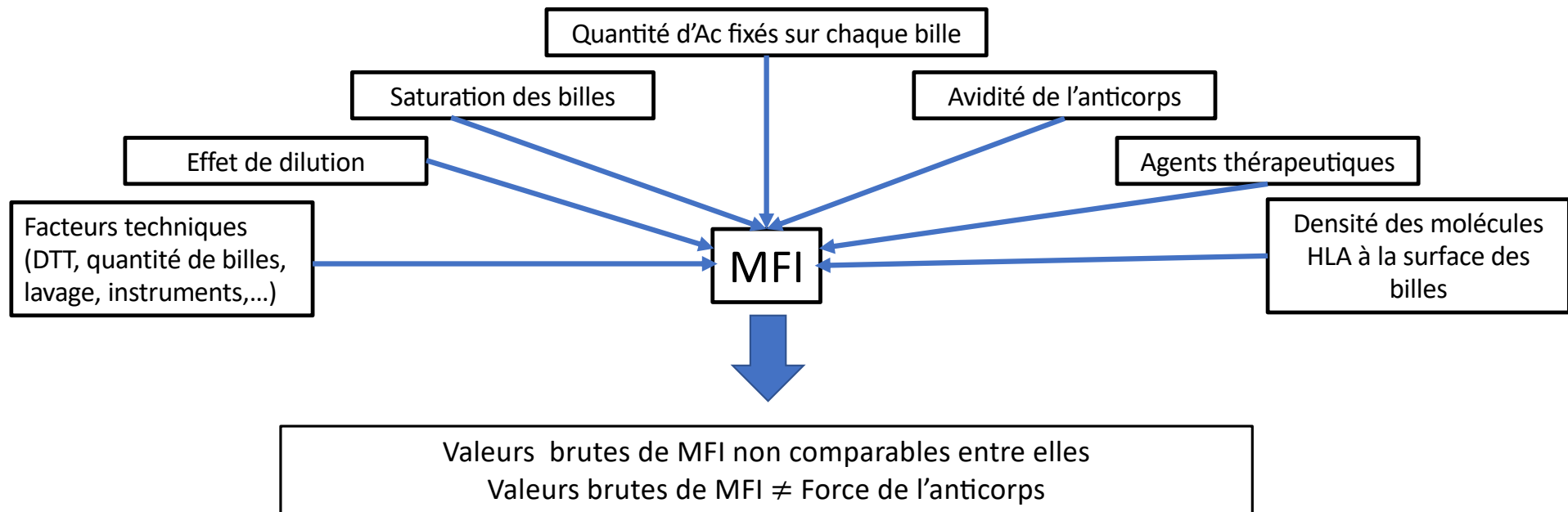
Technologie Luminex

Limites du test

- Pas de consensus formel sur l'interprétation technique des résultats et leur implication clinique.
- Fixation d'une valeur seuil de MFI propre à chaque laboratoire en fonction de son expérience clinique.

Technologie Luminex

Limites du test

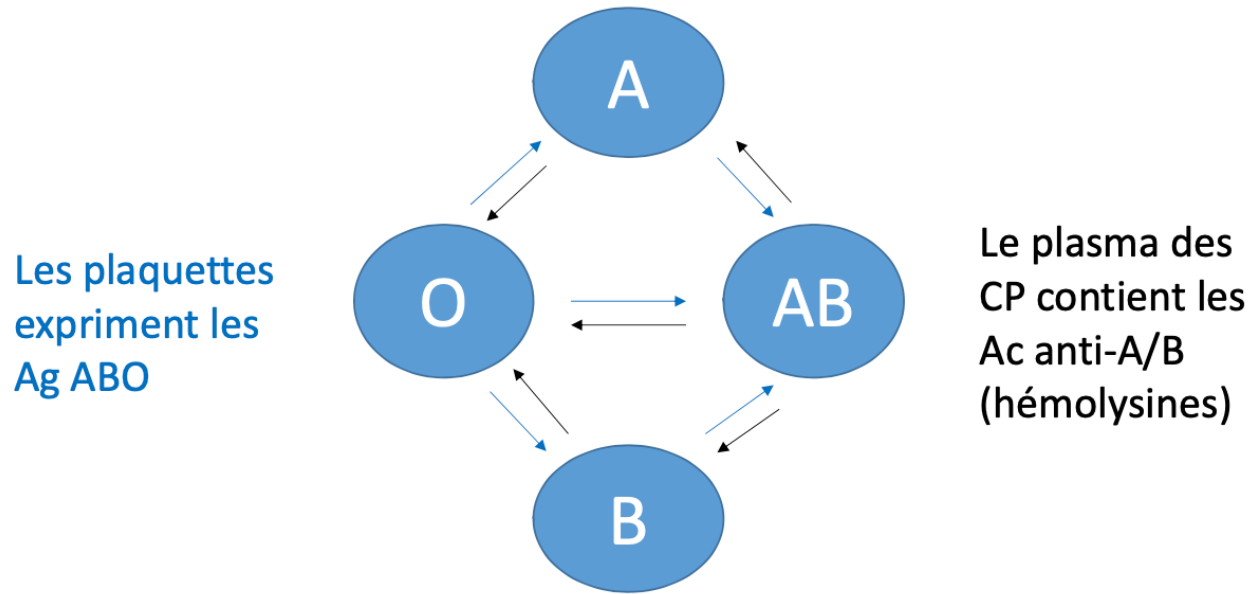


APPLICATIONS CLINIQUES

Transfusions de plaquettes inefficaces (TPI)

TPI

Rappels : transfusion plaquettaire



Transfuser en ABO-identique ou ABO-compatible « hémolysines négatives »

Les règles sont identiques à celles pour les *globules rouges*

TPI

Rappels : transfusion plaquettaire

Les règles sont identiques à celles pour les *globules rouges*

1^{er} choix : plaquettes iso-groupes (difficile pour les groupes B et AB)

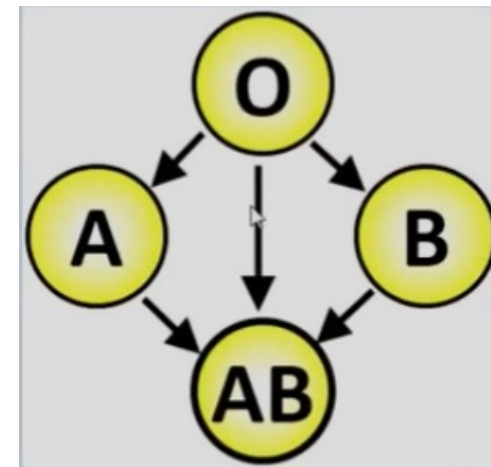
Choix acceptables :

1. Plaquettes non « isogroupes » ABO compatibles

Attention : CP hémolysines positives → isogroupe

2. Plaquettes ABO « incompatibles »

→ Transfusion moins efficace (+/- 20%) mais non dangereuse



TPI

Composition des concentrés plaquettaires (CP)



Concentré plaquettaire d'aphérèse (CPA)

- Extraction sélective de plaquettes chez un seul donneur par aphérèse
- Contient environ $4 \cdot 10^{11}$ plaquettes

Mélange de concentrés plaquettaires (MCP, pool)

- Couches leuco-plaquettaires de 4-6 donneurs de même groupe ABOD
- Contient 2,5 à $4 \cdot 10^{11}$ plaquettes

Caractéristiques

- Pathogènes-réduits (Amotosalen-UVA)
- Volume 300-500ml
- Déleucocytation systématique $< 1 \cdot 10^6$ leucocytes/CP
- Globules rouges résiduels en faible quantité
- Conservation 20-24°C, sous agitation, 5 jours maximum

TPI

Evaluation de l'efficacité transfusionnelle plaquettaire

Inefficacité transfusionnelle = après une **2^{ème}** **transfusion** de concentré plaquettaire:

- ABO compatible
- Adapté au poids du patient (cfr CCI)
- Conservé depuis < 72h
- Avec un contrôle plaquettaire réalisé 1h et 24h après la transfusion
- Présentant un rendement anormal

TPI

Evaluation de l'efficacité transfusionnelle plaquettaire



Calcul du rendement transfusionnel

- Calcul du CCI (corrected count increment)

$$\frac{\text{plaquettes post-transf } (/ \mu\text{l}) - \text{plaquettes pre-transf } (/ \mu\text{l}) * \text{surf corp } (\text{m}^2)}{\text{nombre de plaquettes transfusées } (* 10^{11})}$$

$SC = \sqrt{((T \text{ cm} \times P \text{ kg})/3600)}$

TPI :
si CCI < 7500 à 1h
si CCI < 5000 à 18-24h

- Définition « opérationnelle »

Pour un adulte de taille moyenne : TPI si augmentation inférieure à **10 000/μl** après transfusion

TPI

Etiologies des TPI

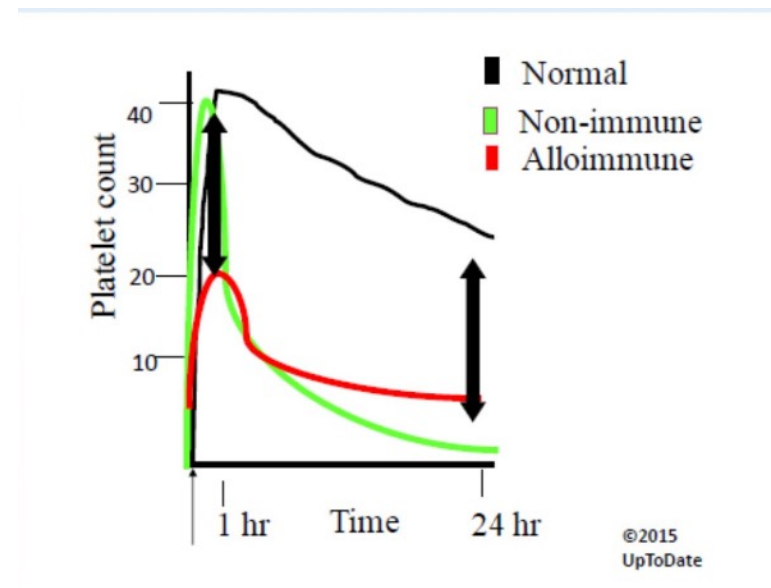
Non allo-immunes (80%)	Allo-immunes (20%)
Sepsis	Anticorps anti-HLA classe I (anti-HLA-A et anti-HLA-B)
Fièvre	Anticorps anti-HPA (anti-HPA1b, anti-HPA2b, anti-HPA5b)
Splénomégalie	Anticorps anti-ABH (+/- 20%)
CIVD	
Médicaments	
Greffe de CSH	

TPI

Evaluation de l'efficacité transfusionnelle plaquettaire

Interprétation des CCI à 1h et 24h

- CCI à 1h : rendement initial
- CCI à 24h : survie des plaquettes transfusées
- Si diminution du CCI à 24h → regarder le CCI à 1h
 - Si diminution du CCI à 1h : état réfractaire immun ou splénomégalie
 - Si CCI à 1h OK : destruction non immune



TPI

Etiologies des TPI

Immunsation anti-HLA

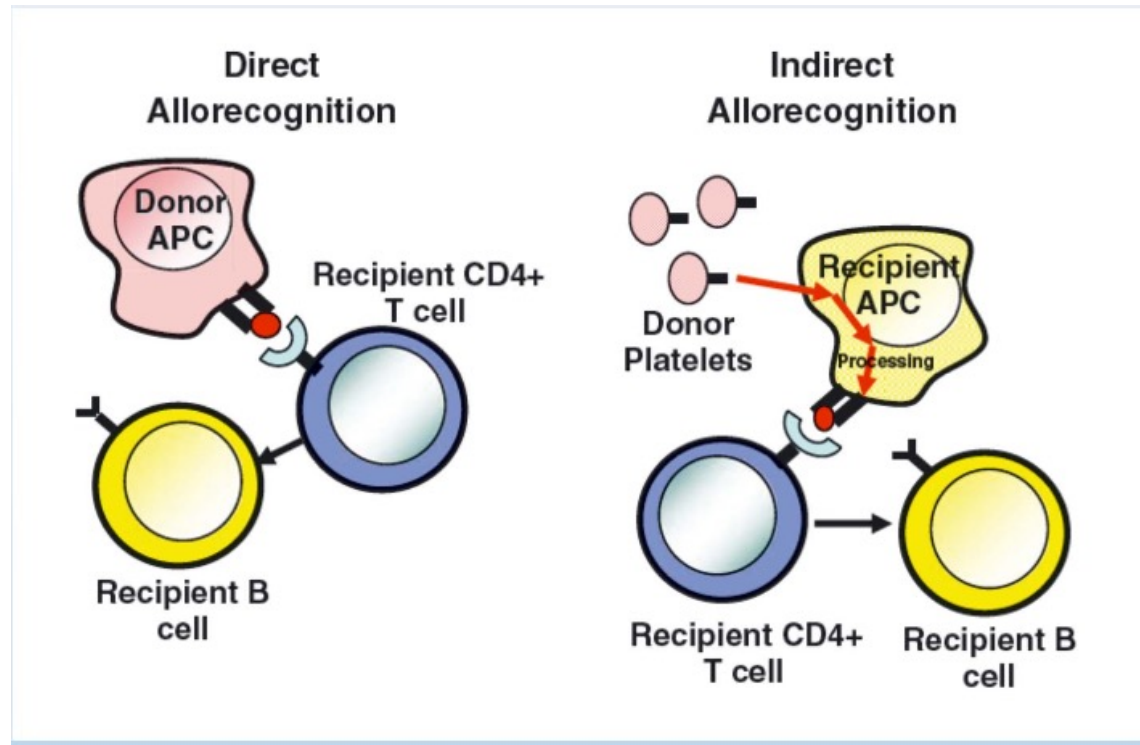
- Anticorps anti-HLA de classe I, locus A et B (Pas HLA-C ni de classe II)
- La majorité des receveurs ne s'immunisent pas.
- La présence d'Ac anti-HLA n'implique pas toujours un état réfractaire
 - 30-50% des patients immunisés sont réfractaires
- Les pools et les CUP leuco-réduits sont aussi efficaces pour prévenir l'allo-immunsation anti-HLA
 - Il n'est pas nécessaire d'utiliser des CUP en prophylaxie
- Apparition **2-5 semaines** après 1er contact (4 jours si réactivation)
- Persistance **14 semaines** en moyenne
 - 70% disparaissent après un an
 - 50% des anti-HLA ne réapparaissent pas si contact ultérieur
 - Persistance à long terme associée à grossesse

TPI

Etiologies des TPI

Immunisation anti-HLA

La voie directe est fortement diminuée par la **leucoréduction**



TPI

Etiologies des TPI

Immunisation anti-HPA

- Fréquents: HPA-1b, -2b, -5b, -15b (≠ TNAI)
- Echec de transfusions plaquettaires HLA-compatibles
- Prévalence anti-HPA plus faible qu'anti-HLA, mais pas exceptionnelle
- Estimation de la fréquence d'anti-HPA cliniquement significatifs ~ 3% des patients réfractaires (Vassalo, Immunohematology, 25-119 (2009))

Table 2. Prevalence of HPA antibodies*

A. Single determination per patient, only identifiable HPA specificities counted

HPA only	HPA+HLA	HLA only	Patients	Reference
1	1	21	117	Taaning et al. ²⁰
5	15	93	252	Kiefel et al. ²¹
0	6	58	293	Kickler et al. ²²
0	3	12	145	Legler et al. ²³
7	4	32	81	Kurz et al. ²⁴
0	0	11	50	Godeau et al. ²⁵
13 (1.4%)	29 (3.1%)	227 (24.2%)	938	

TPI

Exploration d'une TPI

1. S'assurer de l'absence de causes **non** immunologiques
2. Calculer le rendement transfusionnel
3. Recherche d'anticorps anti-HLA classe I + Typage HLA classe I
4. Recherche d'anticorps anti-HPA et typage anti-HPA si recherche d'Ac anti-HLA négative

TPI

Conduites à tenir



1. Utiliser des **plaquettes ABO compatibles**
 - En cas d'incompatibilité ABO, le CCI diminue
2. Utiliser des **plaquettes de ≤ 3 jours**
 - Avec des plaquettes de 4-5 jours, le CCI diminue
3. Tester 2 transfusions de plaquettes ABO compatibles et ≤ 3 jours pour s'assurer que le CCI reste faible

Estimation: 4-5% des patients onco-hémato nécessitent des **plaquettes HLA-compatibles**

TPI

Stratégies de choix d'un CP compatible



1. Choix basé sur le cross match plaquettaire : non utilisé en Belgique
2. CP HLA-compatible à partir du typage classe I du patient (basse résolution)
3. **Choix à partir de l'identification des anticorps anti-HLA du patient (crossmatch virtuel)**
= stratégie la plus utilisée

Systeme HPA

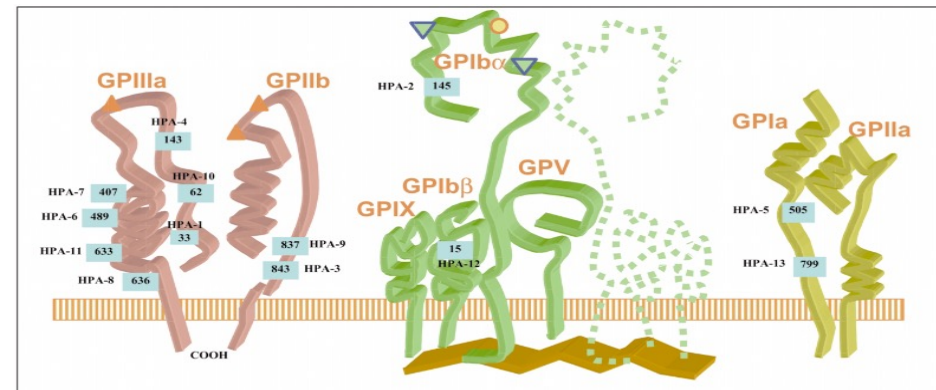
Structure et antigènes plaquettaires

Structure de la membrane plaquettaire

Double couche phospholipidiques dans laquelle sont enchâssées, plus ou moins profondément, les glycoprotéines plaquettaires.

Les glycoprotéines plaquettaires portent des numéros en fonction de l'ordre de leurs découvertes:

GpIa, Ib, Ic, IIb, IIIa, IIIb,...



Only one half of the GPIIb-IX-V complex is shown. The HPA polymorphisms and hereditary defects are schematised according to the legend:

Glanzmann's thrombasthenia: ▲ Bernard-Soulier syndrome: ▼
 von Willebrand's disease-platelet form: ● HPA polymorphism: 837

Structure et antigènes plaquettaires

Antigènes plaquettaires

Non spécifiques des plaquettes

- Antigènes du système **ABO** : A et B (expression variable)
- Antigènes du système **LE** et **P**
- Antigènes du système **HLA** (molécules de classe I)
HLA-A et HLA-B >>> HLA-C

! Pas le RH ni le KEL

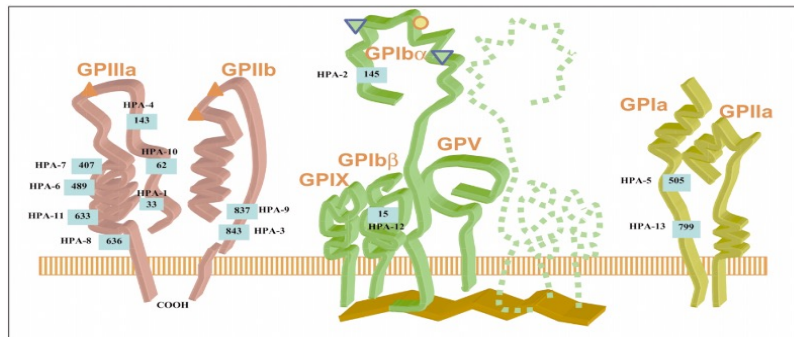
Spécifiques des plaquettes

- Antigènes plaquettaires HPA

Structure et antigènes plaquettaire

HPA

- 24 Ag spécifiques pour les plaquettes
- 12 principaux dans 6 systèmes (HPA-1,-2,-3,-4,-5,-15)
- SNP (single nucleotide polymorphism) dans le gène codant
- Système **bi-allélique** :
 - **Allèle a** = haute fréquence
 - **Allèle b** = basse fréquence



Only one half of the GPIIb-IX-V complex is shown. The HPA polymorphisms and hereditary defects are schematised according to the legend:

Glanzmann's thrombasthenia: ▲ Bernard-Soulier syndrome: ▼
von Willebrand's disease-platelet form: ○ HPA polymorphism: 837

Système	Antigène	Nom original	GP	CD	
HPA-1	HPA-1a	ZW ^a , PI ^{A1}	GPIIIa	CD61	
	HPA-1b	ZW ^b , PI ^{A2}			
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b	GPIIb α	CD42b	
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a			
HPA-3	HPA-3a	Bak ^A , Lek ^a	GPIIb	CD41	
	HPA-3b	Bak ^b			
HPA-4	HPA-4a	Yuk ^B , Pen ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b			
HPA-5	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	CD49b	
	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a			
	HPA-6bw	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA-7bw	Mo ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA-8bw	Sr ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA-9bw	Max ^a	GPIIb	CD41	
	HPA10bw	La ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA11bw	Gro ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA12bw	Ly ^a	GPIIb β	CD42c	
	HPA13bw	Sit ^a	GPIa	CD49b	
	HPA14bw	Oe ^a	GPIIIa	CD61	
	HPA-15	HPA-15a	Gov ^b	CD109	CD109
		HPA-15b	Gov ^a	GPIIIa	CD61
		HPA-16bw	Duv ^a ₁₃		

Structure et antigènes plaquettaires

HPA – fréquence chez les caucasiens

Systeme	Antigène		Fréquence phénotypique
HPA-1	HPA-1a		98%
	HPA-1b		27%
		HPA-1a-b+ 2%	
		HPA-1a+b+	
		HPA-1a+b-	
HPA-3	HPA-3a		85%
	HPA-3b		63%
HPA-5	HPA-5a		99%
	HPA-5b		20%
HPA-15	HPA-15a		80%
	HPA-15b		60%

IMMUNISATION PLAQUETTAIRE

Immunsation plaquettaire

Type d'anticorps

- **Auto-anticorps** : anticorps contre des antigènes du « soi ».
 - Fixation aux plaquettes du patient → destruction → thrombopénie auto-immune.

- **Allo-anticorps** : anticorps contre des antigènes du « non soi ».
 - Fixation sur des plaquettes transfusées → **inefficacité des transfusion de plaquettes.**
 - Fixation sur des plaquettes du fœtus en cas de grossesse → **thrombopénie néonatale.**



Immunisation plaquettaire

Allo-immunisation anti-HPA

Allo-immunisation = réponse **immune** dirigée contre des antigènes d'un individu de la même espèce mais **génétiquement distinct**.

Origines :

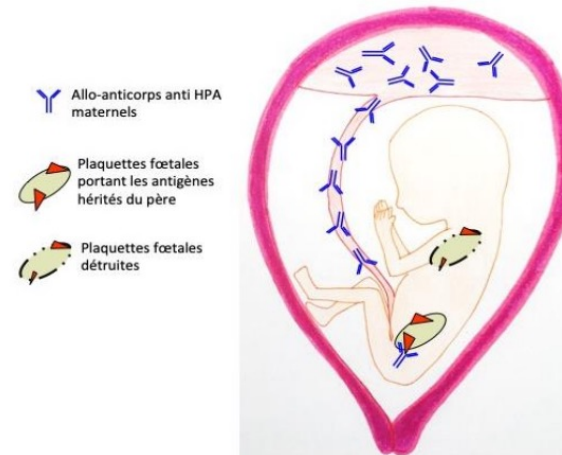
- Grossesse
- Transfusion
- (Greffe d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques)

Immunsation plaquettaire

Allo-immunsation anti-HPA

Origines :

- **Grossesse**
- Transfusion (transfusion de 13 CP)



Dès 14^{ème} semaine : Passage plaquettaire (spontané) du fœtus → mère.

Vers 18^{ème} semaine : Expression des Ag HPA-1 et HPA-3 vers 18^{ème} semaine.

Si incompatibilité → immunisation anti-plaquettaire → destruction → thrombopénie.

Immunsation plaquettaire

Allo-immunsation anti-HPA

Fréquence :

Anti-HLA
30%



Anti-érythrocytes
5%



Anti-HPA
<1%

- Un patient immunisé anti-HPA a une probabilité beaucoup plus grande de produire d'autres anticorps (anti-HPA mais aussi anti-érythrocytaires, anti-HLA, etc.) qu'un patient non immunisé anti-HPA.
- Répondeurs / Non Répondeurs face à l'immunsation.

MÉTHODES DE DÉTECTION DES ANTICORPS ANTI-PLAQUETTES AU LABORATOIRE

Anticorps anti-plaquettes au labo

Principes généraux

Allo-immunisation

- Dépister la présence d'anticorps anti-plaquettes (auto-, allo-)
- Identifier leur(s) spécificité(s)
- Typage des antigènes plaquettaires pour s'assurer que la spécificité identifiée est permise.

Auto-immunité

- Mise en évidence d'auto-anticorps spécifiquement anti-plaquettaires, libres ou fixés.
- Un génotypage HPA est inutile.

Anticorps anti-plaquettes au labo

Méthodes spécifiques

→ Identification du type d'anticorps (allo, auto) et sa spécificité

Technique	Auto-Ac	Allo-Ac	Cross-match
MASPAT	X	X	X
MAIPA	X	X	(X)
CMF	(X)	X	X
MACE		X	
Luminex		X	

Anticorps anti-plaquettes au labo

Principes généraux

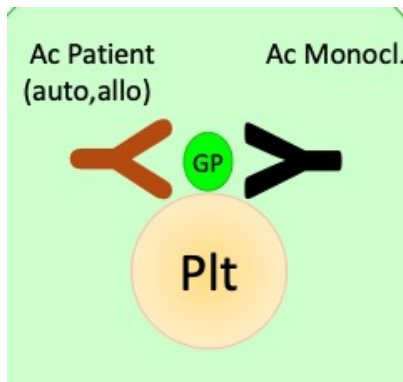
Les **antigènes cibles** des différentes techniques sont :

- Soit des **plaquettes typées** de donneurs ou du patient.
- Soit des préparations de **glycoprotéines purifiées**.

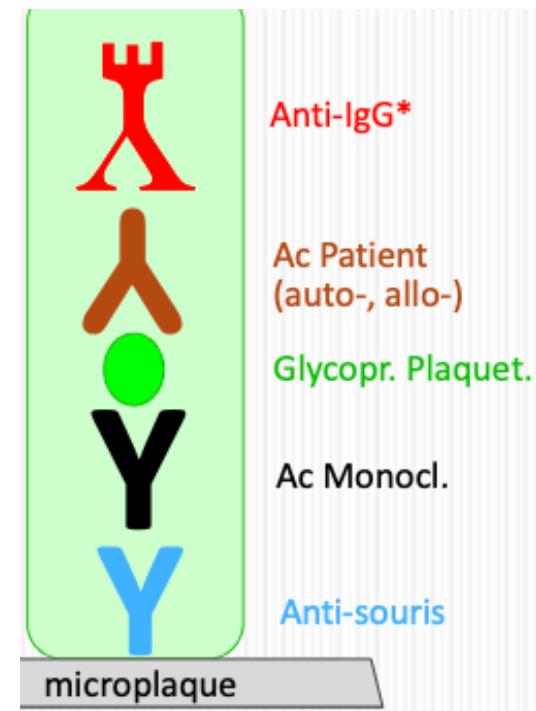
Anticorps anti-plaquettes au labo

MAIPA = Monoclonal specific Antibody Immobilization of Platelet Antigen

= **méthode de référence**



Lyse cellulaire



PLT =

- Plaquettes patient (auto-Ac)
- Plaquettes donneur (allo-Ac)
- Plaquettes du père (TNAI)

Anticorps anti-plaquettes au labo

MAIPA

Autant de tests que de cibles à étudier → **Lourdeur technique** ++++

Dépistage : plaquettes de donneurs HPA-hétérozygotes

Identification : plaquettes de donneurs HPA-homozygotes

Faux négatifs

Anticorps monoclonal et allo/auto-anticorps se fixent sur le même épitope GP → utiliser des anticorps monoclonaux différents

Faux positif

Anticorps anti-souris → incubation séquentielle

Allo-Ac : très spécifique, sensible

Auto-Ac : 70-80% de Sn et Sp

2/3 des PTI sans Ac détectables (hétérogénéité des cibles antigéniques + difficultés méthodologiques)

Anticorps anti-plaquettes au labo

Luminex®: Pak Lx (Immucor®) aux CUSL

= test immunologique qualitatif conçu pour détecter et différencier les anticorps IgG HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, GPIV et HLA classe I présents dans le sérum humain.

L'intensité du signal provenant de chaque microbille est comparée à l'intensité du signal de 3 microbilles contrôle négatif (Con) comprises dans le mélange de microbilles, pour déterminer sa positivité ou sa négativité à l'anticorps associé.

L'anticorps anti-HPA-15 n'est pas détectable par cette technique.

PAK Lx SAMPLE ANALYSIS AND RESULTS				Batch Name: 251016 PAK		Assay Date: 10.25.16			
PAK Lx Kit Lot #: 3003013-PLX		Assay Tech:		Analysis Date: 1/2/2017					
SAMPLE ID: 16-161025-0053				Antibody Target	GPIV	HLA	GPIIbIIIa (HPA-1,-3,-4)	GPIbIX (HPA-2)	GPIIaIIa (HPA-5)
Minimum Cutoff (MC). If the MFI of the Con beads is < MC, the Adjusted Ratios are calculated using MC.				Result	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
			73						
Bead Region	Glycoprotein Group	Antigen	MFI	Bead Reactivity	Adjusted Ratio 1	Adjusted Ratio 2	Adjusted Ratio 3		
13	Con1	Con1	61						
17	Con2	Con2	51						
19	Con3	Con3	49						
10	POS	POS	18398						
5	GPIV	GPIV	18	Negative	-2.77	-3.64	-2.97		
6	HLA Class I	HLA Class I	101	Negative	-2.26	-2.9	-2.49		
20	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3a-4a	224	Negative	-5.04	-6.56	-5.93		
21	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3b-4a	186	Negative	-5.7	-6.22	-5.99		
22	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3a-4a	152	Negative	-4.51	-6.13	-5.33		
23	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3b-4a	184	Negative	-6	-7.73	-6.93		
24	GPIIb-IIIa	HPA - 1ab-3ab-4a	236	Negative	-5.21	-7.06	-5.83		
25	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3ab-4b	249	Negative	-5.76	-6.44	-6.19		
28	GPIb/IX	HPA - 2a	69	Negative	-3.76	-4.48	-4.2		
32	GPIb/IX	HPA - 2a	150	Negative	-2.68	-3.96	-3.05		
34	GPIb/IX	HPA - 2ab	75	Negative	-3.23	-3.86	-3.62		
46	GPIb/IX	HPA - 2b	86	Negative	-3.42	-3.89	-3.49		
48	GPIb/IX	HPA - 2b	86	Negative	-3.27	-3.86	-3.47		
36	GPIa-IIa	HPA - 5a	169	Negative	-3.36	-4.17	-3.94		
39	GPIa-IIa	HPA - 5a	194	Negative	-3.44	-3.84	-4.02		
40	GPIa-IIa	HPA - 5ab	210	Negative	-2.99	-3.14	-3.32		
41	GPIa-IIa	HPA - 5b	189	Negative	-3.22	-3.63	-3.48		
45	GPIa-IIa	HPA - 5b	177	Negative	-3.06	-3.82	-3.27		

PAK Lx SAMPLE ANALYSIS AND RESULTS				Batch Name: 301116 PAK		Assay Date: 11.30.16	
PAK Lx Kit Lot #: 3003013-PLX		Assay Tech:			Analysis Date: 1/2/2017		
SAMPLE ID: 16-161130-0022		Antibody Target	GPIV	HLA	GPIIbIIIa (HPA-1,-3,-4)	GPIbIX (HPA-2)	GPIaIIa (HPA-5)
Minimum Cutoff (MC). If the MFI of the Con beads is < MC, the Adjusted Ratios are calculated using MC.		73	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos
Bead Region	Glycoprotein Group	Antigen	MFI	Bead Reactivity	Adjusted Ratio 1	Adjusted Ratio 2	Adjusted Ratio 3
13	Con1	Con1	48				
17	Con2	Con2	52				
19	Con3	Con3	50				
10	POS	POS	14663				
5	GPIV	GPIV	22	Negative	-2.72	-3.59	-2.92
6	HLA Class I	HLA Class I	300	Positive	0.47	-0.17	0.24
20	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3a-4a	118	Negative	-6.49	-8.01	-7.38
21	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3b-4a	114	Negative	-6.69	-7.21	-6.98
22	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3a-4a	94	Negative	-5.3	-6.92	-6.12
23	GPIIb-IIIa	HPA - 1b-3b-4a	121	Negative	-6.86	-8.59	-7.79
24	GPIIb-IIIa	HPA - 1ab-3ab-4a	130	Negative	-6.66	-8.51	-7.28
25	GPIIb-IIIa	HPA - 1a-3ab-4b	156	Negative	-7.03	-7.71	-7.46
28	GPIb/IX	HPA - 2a	85	Negative	-3.55	-4.27	-3.99
32	GPIb/IX	HPA - 2a	83	Negative	-3.59	-4.67	-3.96
34	GPIb/IX	HPA - 2ab	49	Negative	-3.58	-4.21	-3.97
46	GPIb/IX	HPA - 2b	65	Negative	-3.71	-4.18	-3.78
48	GPIb/IX	HPA - 2b	64	Negative	-3.57	-4.16	-3.77
36	GPIa-IIa	HPA - 5a	316	Negative	-1.35	-2.16	-1.93
39	GPIa-IIa	HPA - 5a	335	Negative	-1.51	-1.91	-2.09
40	GPIa-IIa	HPA - 5ab	2635	Positive	30.23	30.08	29.9
41	GPIa-IIa	HPA - 5b	5937	Positive	75.52	75.11	75.26
45	GPIa-IIa	HPA - 5b	5835	Positive	74.44	73.68	74.23

Tech/Supervisor/Physician/Lab Director :

Date: 30/11/16

Anti-HLA + anti-HPA-5b

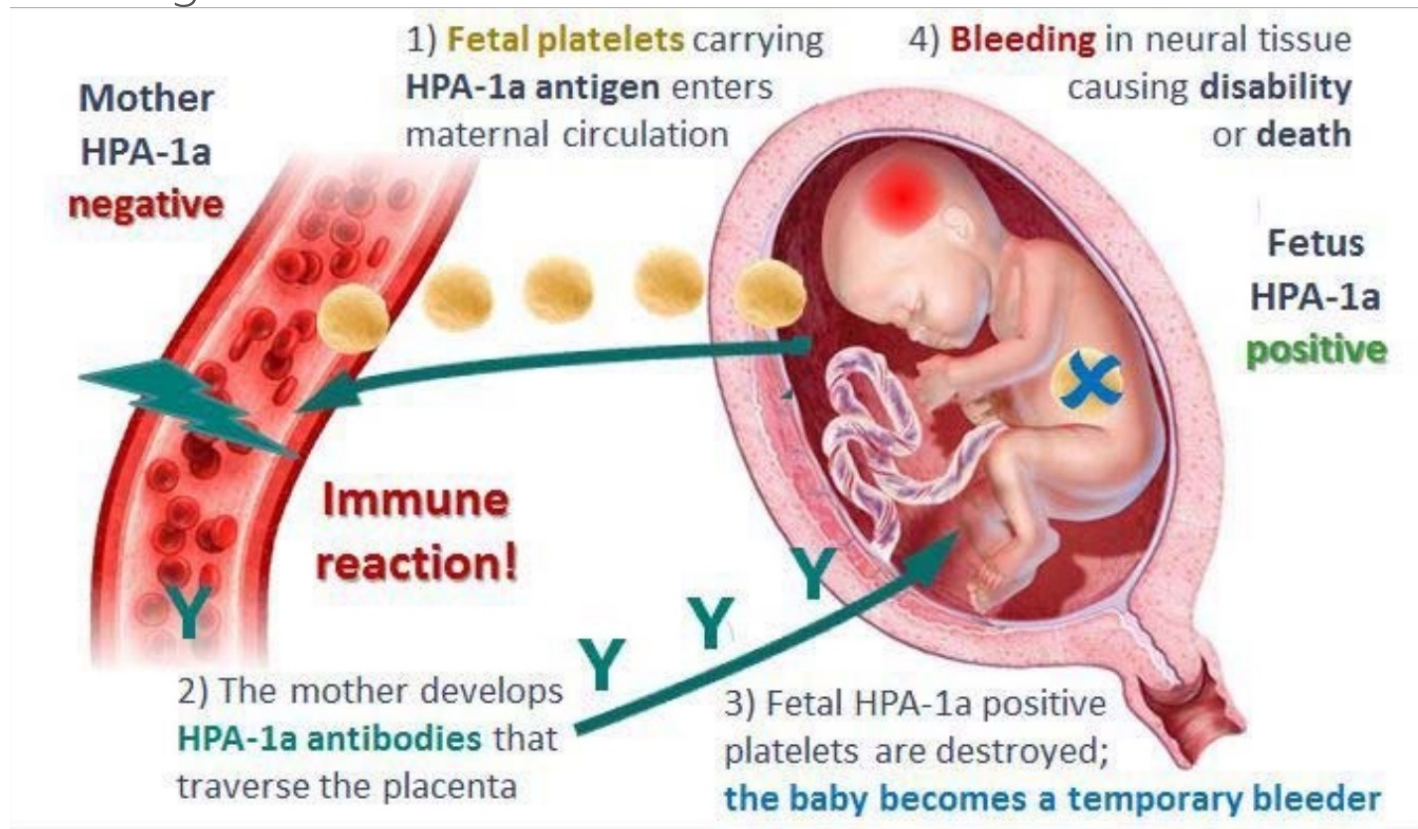


APPLICATIONS CLINIQUES

Thrombopénie néonatale allo-immune

TNAI

Physiopathologie



TNAI

Incidence

- 1/1000 naissances vivantes mais sous-estimation
- Dès la **1^{ère} grossesse** (25% des cas)
- **Spectre clinique large** chez le NN :

thrombopénie fortuite chez un NN sain → hémorragie intracrânienne

= cause **la plus fréquente** de thrombopénie sévère et d'HIC chez le NN

- Durée : 1 à 3 semaines (jusqu'à 3 mois)

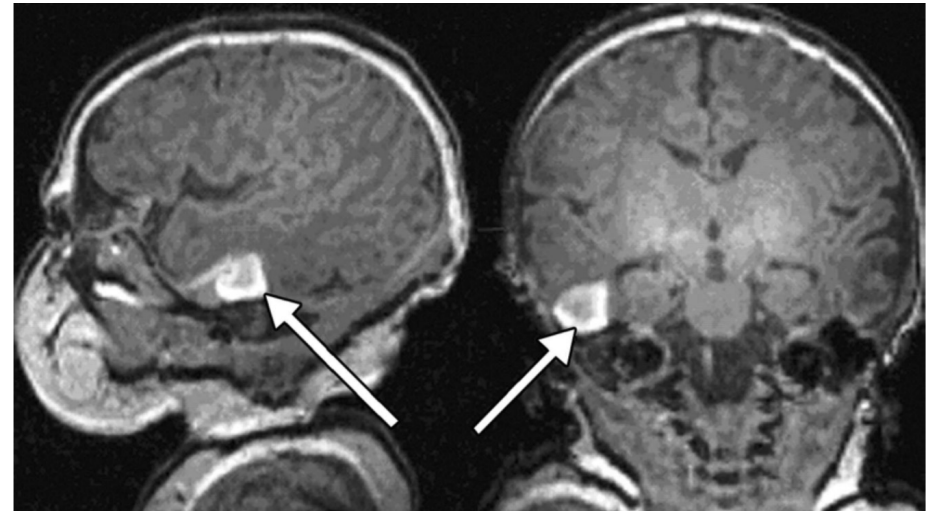
TNAI

Manifestations cliniques - HIC

- Souvent in utero (50-80% des cas)
 - Parfois précoce avant 30 SA
 - +++ entre 30 et 37 SA
- En période immédiatement post-natale
- Mort dans 35% des cas
- Troubles neurologiques sévères jusqu'à 80% des cas

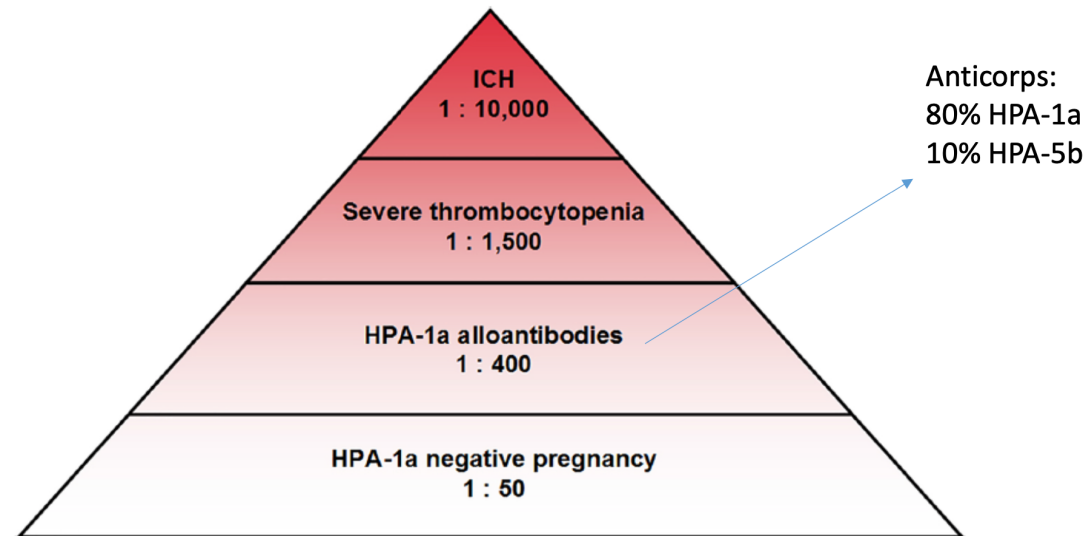
Facteurs de risque :

- Titre de l'anticorps
- Thrombopénie
- Lésions endothéliales (fixation de l'Ac)



Phénotype HPA-1a(-) ~ 2,5 % dans la population caucasienne

- 30% individus porteurs de HLA DRB3*0101: risque d'immunisation contre un fœtus porteur de HPA-1a
 - Immunisation dans 1/3 cas
 - Thrombocytopénie significative (< 50,000 plaquettes/ μ l) dans 1/3 cas



TNAI

Spécificités des allo-Ac

Dans la **population caucasienne** : anti-HPA1a et anti-HPA5b

	< 30.10 ⁹ /L	<10.10 ⁹ /L	GRAVITE
Anti HPA 1a	75%	30 %	+++
Anti HPA 5b	15%	< 2 %	- (+ ?) formes sévères existent

Attention : anti-HPA3a, anti-HPA-15 et anti-HPA-9b sont très rares mais peuvent être sévères

HPA-5b : ++ dans la population asiatique

	a/a	a/b	b/b
HPA1	69,13	28,54	2,33
HPA2	88,19	11,6	0,21
HPA3	37,15	48,94	13,91
HPA4	> 99,9	< 0,1	< 0,1
HPA5	79,02	19,67	1,22

Fréquence dans la population caucasienne

TNAI

Diagnostic

Quand explorer une TNAI ?

- **Pas de screening systématique** des femmes HPA-1a négatives
- Dépistage justifié si antécédents familiaux (exemple : TNAI chez une sœur)
- Exploration si NN avec pétéchies, saignements, HIC
- Exploration recommandée même si thrombopénie modérée
- Prévention futures grossesses

TNAI

Diagnostic – principes généraux



- Détection d'Ac anti-plaquettes par cross-match avec plaquettes intactes
- Identification de l'Ag impliqué par un test de capture antigénique (MAIPA) ou un test en phase solide (Luminex)
- Génotypage plaquettaire parents et NN

TNAI

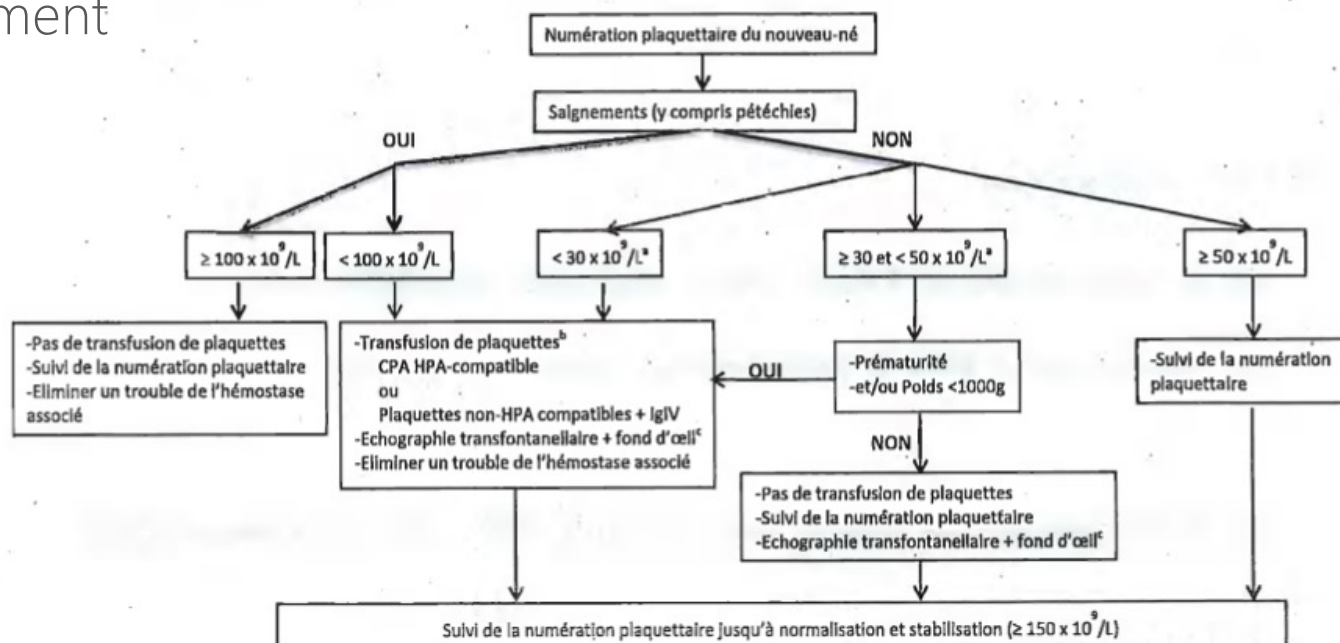
Diagnostic – Interprétation

Diagnostic de TNAI si :

- Réaction du sérum maternel avec les plaquettes du père mais pas de la mère
- Identification d'un anti-HPA par le test MAIPA ou Luminex
- Confirmation par génotypage
- Exclusion des anti-HLA (controversé)

Dans 2/3 des cas : diagnostic de TNAI non confirmé :

- Thrombocytopénie non immune
- PTI maternel (auto-Ac passant la barrière placentaire)
- Anti-HLA?
- Limites des tests biologiques :
 - Antigènes labiles
 - Anticorps de faible affinité
 - Antigènes rares...



- Il est conseillé de contrôler toute numération plaquettaire inférieure à $50 \times 10^9/L$.
- La transfusion de plaquettes maternelles déplasmatisées et irradiées est aussi une possibilité (mais rarement utilisée).
- Selon disponibilité d'une personne compétente pour cet examen.

Approuvé par la Société Française de Néonatalogie et la Société Française d'Hématologie et d'Immunologie Pédiatrique.
Bertrand et al., Archives de Pédiatrie, 2019

Transfusion d'un **pool de plaquettes ABO-compatibles** :

- élévation transitoire de la numération plaquettaire
- Réduction du risque de saignement
- Traitement recommandé en 1ère ligne dans un contexte non prévisible en urgence

Dès que possible, transfusion de **CUP HPA compatibles** d'un donneur typé

Systématiquement: **IV Ig** 1g/kg pendant 1 à 2 jours

+ Suivi du NN par échographie

Transfusions plaquettaires du NN:

- $0,2 \times 10^{11}$ plaquettes /kg
- 15ml/kg (<20ml/Kg; <50ml)
- contrôle taux de plaquettes à 12 h post transfusion

! Ne pas attendre les résultats biologiques de l'exploration d'immunologie plaquettaire pour traiter !

1. Incompatibilité avec l'anticorps déjà mis en évidence?

- Père homozygote: oui
- Père hétérozygote: génotypage plaquettaire foetal
 - Liquide amniotique
 - Villosité chorale
 - ADN foetal circulant

2. Estimation du risque d'HIC

Typage HPA chez les sœurs de la mère

Il faut absolument **préparer** et **programmer** la naissance avec une équipe spécialisée

- Pour certaines équipes obstétricales : **césarienne obligatoire**
- Préparer CUP HPA compatibles à la BDS
- Eviter les ventouses et forceps
- Numération plaquettaire sur le sang de cordon, J2, J3, J5

Merci !

