

## Préparation simplifiée d'hématies-tests pour le groupage sanguin ABO dans un laboratoire malgache

Rasamiravaka T<sup>1</sup>, Andrianarivelo AM<sup>2</sup>, Ramarison G<sup>1</sup>, Rakoto-Alson AO<sup>3</sup>, Rasamindrakotroka A<sup>4</sup>

Laboratoire de Formation et de Recherche en Biologie Médicale, Antananarivo, Madagascar

*Med Trop* 2011 ; 71 : 460-463

**RÉSUMÉ • Introduction.** Dans la perspective d'assurer une autosuffisance en matière de réactifs de groupage sanguin érythrocytaires et dans un objectif de rentabilité, certains laboratoires d'analyses médicales produisent leurs propres hématies-tests ABO pour l'épreuve plasmatique. Cependant, la question de la fiabilité de ces hématies-tests doit être soulevée car c'est un test d'enjeu vital. Une étude a donc été menée afin d'apprécier la qualité de ces hématies-tests de fabrication simplifiée. **Matériels et méthodes.** C'est une étude comparative, entre des hématies-tests maisons et des hématies-tests de préparation commerciale, réalisée au Laboratoire de Formation et de Recherche en Biologie Médicale de Madagascar sur une population fréquentant ce dernier pour l'obtention de leur carte de groupe sanguin. **Résultats.** Dans cette population, le test de groupage sanguin n'a révélé aucune discordance entre l'épreuve globulaire et plasmatique. La comparaison entre les deux hématies-tests a montré une réactivité équivalente les quatre premiers jours mais une diminution de cette réactivité au 5<sup>ème</sup> jour de la conservation des hématies-tests préparées. **Conclusion.** Les hématies-tests maisons sont beaucoup moins chères que les réactifs commerciaux équivalents du fait, en grande partie de leur préparation plus simplifiée. Cependant, leur perte progressive de réactivité antigénique exige une préparation régulière ainsi qu'un bon contrôle de qualité interne pour en assurer la fiabilité.

**MOTS-CLÉS •** Hématies-tests. Groupage ABO. Madagascar.

### SIMPLIFIED PREPARATION OF TEST-RED BLOOD CELLS FOR ABO BLOOD GROUPING IN A LABORATORY IN MADAGASCAR

**ABSTRACT • Introduction.** To ensure self-sufficiency and lower costs associated with reagent red blood cells, some medical laboratories produce their own test-red blood cells for plasma ABO blood grouping. However, given the vital importance of blood group testing, it is essential to verify the reliability of these cells. The purpose of this study was to assess the quality of laboratory-made ABO test-red blood cells. **Material and methods.** This study comparing house made and commercially available test-red blood cells was carried out at the Medical Biology Training and Research Laboratory in Madagascar. This laboratory is attended by people wishing to obtain their blood group card. **Results.** In this population, no discrepancy was found between the red cell and plasma tests. Comparison of test-red blood cells with commercially available reagent red blood cells showed no difference in reactivity in the first four days of conservation. However a decrease in the reactivity of house made cells appeared on the 5<sup>th</sup> day. **Conclusion.** House made red blood cells are costless than commercially available reagent red blood cells mainly due to the simplified method of preparation. However, since laboratory-made cells progressively lose antigenic reactivity quickly, production must be repeated regularly and good internal quality control is necessary to ensure reliability.

**KEY WORDS •** ABO grouping. Test-red blood cells. Madagascar.

Une réalisation de groupage sanguin érythrocytaires ABO-RH1 repose sur deux épreuves complémentaires : une épreuve globulaire (Beth-Vincent) qui consiste à rechercher les antigènes A et B et une épreuve plasmatique (Simonin) qui consiste à rechercher les anticorps anti-A et anti B avec les hématies tests A1 et B (une de ces hématies doit être de phénotype RH : -1). Que les hématies soient de préparation commerciale ou « maison », les deux épreuves, globulaire et plasmatique, sont obligatoires en techniques manuelles.

Les hématies-tests de préparation commerciale sont sensibles et ont une durée de conservation plus longue d'environ cinq semaines par rapport aux hématies-tests préparées localement. Cependant devant leur coût élevé, dû principalement aux substances utilisées pour leur conditionnement, mais aussi dans un souci d'autosuffisance, certains laboratoires s'orientent vers une préparation interne (1).

L'objectif de ce travail est de présenter les différentes étapes de la préparation interne simplifiée des hématies-tests répondant aux normes minimales dans la détermination des groupes sanguins du système ABO ainsi que les résultats d'une étude comparative avec des hématies-tests de préparations commerciales.

### Matériel et méthode

Le Laboratoire de Formation et de Recherche en Biologie Médicale de Madagascar (LBM) a entrepris de préparer des hématies-tests ABO simplifiées utiles pour l'épreuve plasmatique. Afin d'évaluer la fiabilité de ces hématies-tests, une étude prospective et comparative avec des hématies-tests commercialisés a été réalisée.

• Correspondance : travaka@yahoo.fr

• Article reçu le 08/05/2010, définitivement accepté le 4/07/2011.

Tableau 1. Description des volumes des hématies-tests et de plasma utilisés pour la réalisation des groupages sanguins.

| Volumes (µL)       |                      | Epreuve plasmatique ABO |                    | Temps d'incubation (min) | Température d'incubation (°C) |
|--------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Epreuve globulaire |                      | Epreuve plasmatique ABO |                    |                          |                               |
| Sérums-tests       | Hématies échantillon | Hématies-tests          | Plasma échantillon |                          |                               |
| 40                 | 40                   | 30                      | 60                 | 2                        | 18-25                         |

### Sélection des échantillons servant à la préparation des hématies tests

La collecte des échantillons a été réalisée pendant 20 semaines, de Novembre 2009 à Mars 2010. Les échantillons de sang proviennent de patients (adultes et sans grossesse) prélevés au laboratoire ayant fait l'objet d'une demande de groupage sanguin, le prélèvement étant recueilli sur tube EDTA.

Seuls les échantillons ayant des hématies considérées comme saines jugées à partir des données de la NF et après réalisation systématique d'un frottis sanguin ont été sélectionnés. Ainsi, les échantillons présentant une anomalie érythrocytaire qualitative et quantitative ont été écartés car ils pourraient être source de faux négatif (par hémolyse, perte d'antigène) et de faux positif (par aggrégation érythrocytaire). Cette sélection préalable a permis d'exclure en moyenne un échantillon sur 20 qui présentait principalement des schizocytes, des rouleaux d'hématies ainsi que des schizontes de *Plasmodium sp.* dans les hématies.

### Préparation des hématies-tests

La préparation a été réalisée à partir d'échantillons de sang de groupe connu A, B, O.

Après centrifugation du sang total (1000 tr/mn pendant 5 minutes), pour permettre d'enlever le plasma ainsi que la couche leucocytaire à la surface des hématies, trois étapes de lavage des globules rouges par la solution P.B.S. (Phosphate Buffer Saline, pH = 7.4) sont effectuées puis les globules rouges sont conservés en suspension à 5 % dans cette même solution de lavage (2, 3). Les échantillons présentant des signes d'hémolyse après les étapes de lavage (2, 4) ont été éliminés.

Pour éviter la dégradation prématurée de la préparation (par contamination et variations de température), les hématies-tests sont immédiatement aliquotés et conservés à + 4°C pour une durée prévisionnelle de 7 jours.

### Etude comparative

Tous les échantillons de patients prélevés au laboratoire ayant fait l'objet d'une demande de groupage sanguin ont été analy-

Tableau 2. Répartition phénotypique selon le sexe des échantillons testés.

|       | Phénotype |     |    |     |
|-------|-----------|-----|----|-----|
|       | A         | B   | AB | O   |
| Femme | 60        | 64  | 16 | 86  |
| Homme | 46        | 48  | 12 | 74  |
| Total | 106       | 112 | 28 | 160 |

sés. Sur ces échantillons, le groupage sanguin a été réalisé en technique manuelle sur plaque d'opaline à température ambiante (environ 25°C) associant l'épreuve globulaire de Beth Vincent réalisée avec des sérums anti-A, anti-B et anti-AB de préparation commerciale (Institut de biotechnologie Jacques Boy) et la contre épreuve sérique de Simonin pour laquelle on a utilisé les hématies-tests 5 % A, B et O de préparation commerciale (Institut de biotechnologie Jacques Boy) *versus* les hématies-tests préparées localement (4).

Ces deux épreuves ont été réalisées selon la procédure décrite dans le tableau 1 et effectuées en double aveugle par deux techniciens différents selon les recommandations du GBEA pendant toute la durée de l'étude (5).

Pour ce qui est du contrôle qualité de nos hématies-tests, celles-ci ont été testées sur leur sérum-test de préparation commerciale correspondant, avant leur utilisation sur le sérum des patients. Ainsi, celles qui ne présentent plus de réaction à l'œil nu sont immédiatement éliminées. De plus, chaque aliquot d'hématies-tests déjà utilisé n'est plus utilisé le lendemain, même s'il reste une quantité suffisante pour plusieurs tests.

## Résultats

406 patients ont été groupés, 226 de sexe féminin et 180 de sexe masculin (âge compris entre 3 et 55 ans).

La répartition phénotypique montre la prédominance du groupe O (tableau 2) et tous les groupes rencontrés sont Rhésus positif sauf un groupe A de sexe masculin RH : -1.

Pour la contre-épreuve sur des hématies-tests de préparation commerciale, aucune discordance n'a été retrouvée avec l'épreuve de Beth Vincent et toutes les agglutinations attendues ont montré une forte réactivité (4+) avant la deuxième minute (tableau 3).

Tableau 3. Réactivité des hématies-tests ABO.

|                              | Intensité à 1j | Intensité à 2j | Intensité à 3j | Intensité à 4j | Intensité à 5j | Intensité à 6j | Intensité à 7j |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Hématies-test A Interne      | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 3+             | 2+             | 2+             |
| Hématies-test A <sup>®</sup> | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             |
| Hématies-test B Interne      | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 3+             | 2+             | 2+             |
| Hématies-test B <sup>®</sup> | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             | 4+             |
| Hématies-test O Interne      | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        |
| Hématies-test O <sup>®</sup> | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        | Négatif        |

4+ : Agglutination complète de toutes les cellules

3+ : Agglutination de la plupart des cellules

2+ : Agglutination limitée visible à l'œil nu

1+ : Agglutination faiblement positive à l'œil nu, visible en loupe

Négatif : Pas d'agglutination

Pour la contre-épreuve sur hématies tests de préparation interne, l'agglutination est également obtenue avant la deuxième minute sans aucune discordance ni difficulté d'interprétation. Toutefois la réactivité diminue au 5<sup>ème</sup> jour d'utilisation des hématies-tests préparées en comparaison aux hématies-tests commerciales (tableau 3).

### Discussion

La perte progressive de réactivité antigénique des hématies tests « maison » utilisés pour l'épreuve globale est l'un des problèmes majeurs de leur conservation prolongée en milieu liquide, notamment à cause de la contamination et de l'hémolyse. Même si chaque aliquot d'hématies préparées a été conçue pour un usage unique afin de diminuer ces risques de contamination et d'éviter les fréquentes variations de température qui pourraient favoriser la lyse des hématies-tests, ces risques ne sont pas totalement écartés car le milieu utilisé ne contient pas d'antibiotique contrairement à celui retrouvé dans les kits commercialisés (4).

Cette durée de conservation peut être certainement améliorée par l'ajout d'antibiotique (20/2 µg de sulfaméthoxazole/triméthoprime pour 1 mL d'hématies-tests) qui diminue le risque de contamination et l'association du P.B.S. au glucose anhydre (10 mmol de glucose), afin d'augmenter la viabilité des hématies (2). Ces caractéristiques sont retrouvées sur des solutions de conservation type ALSEVER (6).

Les étapes de lavage constituent la partie essentielle mais aussi la plus lourde de la préparation de nos réactifs car aucun traitement enzymatique, même partiel, n'a été utilisé. Si ce dernier a pour objectif d'optimiser la sensibilité des hématies-tests, les étapes de lavage sont importantes pour éviter l'inhibition d'hémagglutination en raison des impuretés qui pourraient masquer les antigènes du système ABO (4). Elles permettent également de diminuer l'agrégation rapide des hématies au profit de l'agglutination (2). Par ailleurs, nous n'avons pas pu respecter les recommandations du GBEA quant à l'utilisation d'au moins une hématies-tests ABO de phénotype RH : -1 (7, 8) étant donné la faible prévalence dans notre recrutement. Cependant, dans une préparation maison, le respect stricto-sensu du GBEA sur ce point n'est pas à notre avis fondamental.

Ainsi, cette diminution de la force d'agglutination qui peut être prise à tort pour une absence d'agglutinine dans le sérum du patient amenant à une discordance Beth-Vincent/Simonin, incite à ne pas utiliser les hématies-tests après le quatrième jour de conservation.

Dans cette étude, aucune discordance et aucune difficulté d'interprétation n'ont été rencontrées, ce qui semble encourageant ; cependant, les échantillons testés durant cette courte période ne reflètent pas toute la population, tant sur la tranche d'âge que sur l'état sanitaire.

En cas de discordance ou de faible réaction d'agglutination, nous avons prévu de faire une nouvelle détermination avec de nouveaux lots d'hématies-tests « maison ». La répétition de cette discordance nous oblige à demander un deuxième prélèvement à partir duquel ont effectuera une nouvelle détermination et qui sera considérée comme une première détermination sur la carte de groupe du patient.

En terme de coût, les dépenses se limitent à l'achat des aliquots et de la solution P.B.S. Cette préparation maison coûte donc forcément moins cher que les hématies-tests commerciales

Tableau 4. Dépenses pour la préparation hématies-tests simplifiés et hématies-tests type commercial.

| Consommables pour 10 mL d'hématies-tests (A1-B) | Dépenses pour la préparation des hématies-tests |                         |
|---|---|-------------------------|
|   | Simplifiées (Euros)                             | Type commercial (Euros) |
| Solution PBS* (100 mL)                          | 2   | 2                       |
| Aliquot eppendorf stérile*                      | 3   | 3                       |
| Cônes*  | 0,5   | 0,5                     |
| Solution ALSEVER* (100 mL)                      | 0   | 6                       |
| Antibiotiques/conservateurs                     | 0   | 1                       |
| Total   | 5,5   | 12,5                    |

\* Source VWR, Sordalab.

dont le kit de 10 mL est évalué à 21 euros selon les renseignements de l'institut de biotechnologie Jacques Boy. L'ajout de conservateur antibiotique et de solution glucosée augmenterait évidemment le coût de production alors que son apport quant à la durée de conservation reste à préciser. Le tableau 4 montre l'estimation des dépenses liées à la production d'hématies-tests simplifiées et d'hématies-tests telles que les laboratoires commerciaux le réaliseraient ; cette dernière est deux fois plus chère. La consommation d'énergie, relative à l'utilisation de la centrifugeuse et des agitateurs, n'a pas été intégrée dans ce comparatif ainsi que le temps dépensé qui est identique dans les deux préparations sauf en cas de traitement enzymatique, augmentant par la même occasion le coût de production.

Si ces hématies-tests maison sont moins onéreuses, elles nécessitent une organisation de l'activité du plateau responsable du test de groupage sanguin dans laboratoire. En effet, il ne faut pas oublier que le temps nécessaire à leur préparation va mobiliser du personnel de façon bihebdomadaire pour pouvoir disposer en permanence d'hématies-tests de moins de cinq jours. De plus, en termes d'hygiène et sécurité, ces produits n'ont pas subi de sérologie de dépistage pour les Anticorps anti-VIH 1+2 et antigène HBs comme pour les kits commercialisés, ce qui impose au manipulateur une vigilance accrue pour sa sécurité (4). Dans un laboratoire où le volume d'activité est modeste (en moyenne 5 groupages par jour), cette stratégie présente une meilleure rentabilité car évite de jeter des réactifs périmés faute de demande. La réalisation de groupages en série permettrait en théorie de préserver les hématies de commerce plus longtemps mais elle pourrait avoir un impact négatif sur le plan marketing.

### Conclusion

Pour des pays en développement et en quête d'indépendance en matière de réactifs de laboratoire, la mise en œuvre d'une politique d'autosuffisance en réactifs de première nécessité est à prendre en considération.

C'est dans cette optique que nous avons opté pour la préparation interne simplifiée des hématies-tests et essayé d'évaluer sa fiabilité. Les hématies-tests obtenues sur des sujets supposés indemnes d'anomalie érythrocytaire sont de qualité satisfaisante et de coût quatre fois moins élevé comparé aux hématies-tests préparation commerciale. Cependant, leur utilisation nécessite une préparation régulière ainsi qu'un bon contrôle de qualité interne pour en assurer la fiabilité.

Malgré ces inconvénients, dans un pays en développement comme Madagascar, ces réactifs de préparation interne s'avèrent

fort utiles pour les nombreuses régions encore difficilement accessibles et parfois délaissés par les fournisseurs de réactifs.

Bien que le recours aux réactifs commerciaux soit apprécié devant toute difficulté d'interprétation et devant les sujets à fort probabilité de discordance (9), nous avons préféré abandonner leur usage privilégiant des rares résultats discordants en sous-traitance dans un laboratoire à fort taux de demande en groupage sanguin.

Enfin, nous estimons qu'il serait également intéressant d'envisager cette autosuffisance aux sérums-tests d'origine animale ou humaine comme le font déjà certains laboratoires des pays d'Afrique (10, 11).

### Références

1. Loua A, Lamah MR, Haba NY, Camara M. Fréquence des groupes sanguins ABO et rhésus D dans la population guinéenne. *Transfus Clin Biol* 2007 ; 14 : 435.
2. Deverge M. Etude d'une suspension de globules rouges par interférométrie ultrasonore. Université Paris V – UFR Biomédicale ed, Paris, 2001, p. 43 p. <http://mickael.deverge.free.fr/rapportgrpb.pdf>
3. Mitrofan-Oprea L, Paliu C, Tissier JP, Héron A, Verpoort T, Behague M *et al.* Nouveaux critères d'évaluation de la viabilité des hématies destinées à la transfusion. *Transfus Clin Biol* 2007 ; 14 : 393.
4. Institut de Biotechnologie Jacques Boy. Hématies-tests à 5 % pour épreuve plasmaticque prêtes à l'emploi à usage in vitro. Fiche technique 2004, France.
5. Arrêté du 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 Relatif au Guide de Bonne Exécution des Analyses de Biologie Médicale. *Journal officiel*, article 2 : page 8376.
6. Alsever J, Ainslie R. A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of a complete transfusion service. *NY State J Med* 1941 ; 41 : 126.
7. Chiaroni J. Les bonnes pratiques d'immunohématologie clinique Guidelines in clinical immunohaematology. *Transfus Clin Biol* 2003 ; 10 : 244.
8. Habibi B, Salmon C. Contrôle de qualité des groupages sanguins. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1979 ; 22 : 83.
9. Roubinet F, Mannessier L, Chiaroni J. Les difficultés techniques en immunohématologie clinique Technical difficulties in clinical immunohaematology. *Transfus Clin Biol* 2003 ; 10 : 252.
10. Bigot A, Zohoun I, Seclonde C, Lafia E, Kodjoh N, Guerrieri C *et al.* Production expérimentale des réactifs de groupage ABO au CNTS de Cotonou. *Med Afr Noire* 1994 ; 41 : 408-11.
11. Tissant A, Habti N, Sadiq F, El Amrani N, Benchemsi N. Production d'un réactif monoclonal anti-B humain pour la détection des groupes sanguins ABO. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2007 ; 22 : 68.



Grenier à céréales, Burkina Faso (coll JJ Morand).