1. **Principe**

Pour dépister la sensibilisation des globules rouges in vivo et identifier les protéines fixées à la surface des globules rouges.

Il faut d'abord laver à l'aide d'une solution saline une suspension à 3 % des cellules à tester. Ensuite, il faut ajouter les réactifs d'antiglobuline polyspécifiques (anti-IgG et C3) et/ou monospécifiques (anti-IgG et anti-C3) au culot de globules rouges lavés, mélanger, centrifuger et procéder à un examen microscopique.

1. **Portée et politiques connexes**
	1. On utilise le test direct à l'antiglobuline (TDA) dans l'investigation de plusieurs états :
* maladie hémolytique du nouveau-né
* anémie hémolytique autoimmune
* réactions transfusionnelles
* sensibilisation d'origine médicamenteuse.
	1. Le TDA est nécessaire :
* si l’identification de l’anticorps est nécessaire et qu’un auto-témoin est impossible (p. ex. volume limité de plasma);
* s’il faut procéder au typage d’antigènes par épreuve indirecte à l’antiglobuline.
	1. Le réactif d'antiglobuline utilisé pour l'épreuve directe à l'antiglobuline doit contenir des anticorps anti-IgG et le composant du complément anti-C3d. Pour le sang du cordon qui constitue la seule exception, une antiglobuline anti-IgG monospécifique peut être utilisée9.1. Voir Remarque 8.4.
	2. Si l'épreuve directe à l'antiglobuline faite à partir d'un échantillon sanguin coagulé met en évidence la présence de complément à la surface des globules rouges, l'épreuve doit être reprise sur un échantillon prélevé sur EDTA9.1. Voir Remarque 8.1.
	3. Tous les réactifs doivent être utilisés et vérifiés conformément aux recommandations et aux procédures du fournisseur9.1.
1. **Échantillons**

Sang anticoagulé - tube EDTA

* 1. On peut utiliser les cellules provenant d'un échantillon coagulé. Toutefois, si l'anti-C3 révèle la présence d'un complément, il faut reprendre le test sur un échantillon EDTA. Voir Remarque 8.1.
	2. Un TDA positif sur un échantillon de sang de cordon coagulé est un résultat valide. Il n’est pas nécessaire de confirmer avec un échantillon prélevé sur EDTA.
1. **Matériel**

Équipement : centrifugeuse sérologique

 laveur de cellules

 microscope

Fournitures : tubes 10 x 75 mm

 pipettes sérologiques

Réactifs : globuline anti-humaine (GAH) polyspécifique (anti-IgG, -C3)

 anti-IgG monospécifique

 anti-C3 monospécifique (anti-C3b, -C3d)

 cellules recouvertes d'IgG

 cellules recouvertes de C3

 albumine bovine sérique (ABS) à 6 %

1. **Contrôle de la qualité**

Au moment de l'utilisation ou une fois par jour, selon le cas, vérifier l'efficacité des réactifs polyspécifiques et à l'anti-IgG sur des cellules recouvertes d'IgG, de C3 et des cellules non sensibilisées.

1. **Procédure**
	1. Vérification de l’acceptabilité des échantillons
		1. Voir PA.002 - Acceptation ou rejet des échantillons.
	2. Vérification des antécédents médicaux du patient
		1. Voir PA.003 - Vérification des antécédents médicaux du patient.
	3. Étiquetage des tubes
		1. Étiqueter 2 tubes avec le nom du patient et le réactif correspondant. On peut abréger le nom du patient en utilisant les 3 premières lettres de son nom de famille :
* étiqueter le premier tube : poly (pour polyspécifique)
* étiqueter le deuxième tube : tem (pour témoin)
	1. Préparation d’une suspension cellulaire à 3 %
		1. Mélanger l’échantillon du patient et voir AR.003 – Préparation d’une suspension de globules rouges à 3 %.
		2. Mettre 1 goutte de suspension cellulaire du patient dans chaque tube étiqueté en 6.3.
	2. Exécution du test à l'antiglobuline
		1. Laver les tubes 4 fois avec la solution saline normale. Voir AR.002 – Lavage automatisé ou manuel des cellules.
		2. Ajouter 2 gouttes de réactif polyspécifique au tube « poly ».
		3. Ajouter 2 gouttes d'ABS à 6 % au tube « tem ».
		4. Mélanger les tubes immédiatement et centrifuger à 3400 rpm pendant 10 à 15 secondes.
		5. Immédiatement après la centrifugation, remettre les cellules en suspension et faire une lecture macroscopique. Si la lecture est négative, faire une lecture microscopique. Voir Remarque 8.2.
		6. Interpréter et inscrire les résultats. Voir AR.001 - Lecture et inscription des réactions d'hémagglutination.

|  |  |
| --- | --- |
| ***Si…*** | *vous devez…* |
| le résultat dans le tube qui contient le réactif polyspécifique est négatif, | * Incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Voir Remarque 8.3. et passer à l’étape 6.5.
 |
| le résultat dans le tube qui contient le réactif polyspécifique est négatif, | * Interpréter et inscrire les résultats. Voir PA.006 - Lecture et inscription des réactions d'hémagglutination.
 |

* 1. Incubation 5 minutes à température ambiante
		1. Incuber 5 minutes à température ambiante tous les tubes contenant le réactif polyspécifique où il n’y a pas d’agglutination
		2. Centrifuger, remettre en suspension, faire une lecture macroscopique et microscopique.
		3. Interpréter et inscrire les résultats. Voir AR.001 – Lecture et inscription des réactions d’hémagglutination.

|  |  |
| --- | --- |
| ***Si…*** | *vous devez…* |
| le tube contenant le réactif polyspécifique est négatif, | * Ajouter 1 goutte de cellules recouvertes d’IgG.
* Centrifuger, remettre en suspension, faire une lecture macroscopique et inscrire les résultats.
* En l'absence d'agglutination (à + 2), il faut répéter le test.
 |
| le résultat avec le réactif polyspécifique est négatif, | * Interpréter et inscrire les résultats. (voir 7.1 Documentation)
 |
| Si le résultat avec le réactif polyspécifique est positif et que le résultat avec le témoin est négatif lors de l’analyse d’un échantillon de nouveau-né, | * Voir Remarque 8.4.
* Interpréter et inscrire les résultats. (voir 7.1 Documentation)
 |
| Si le résultat avec le réactif polyspécifique est positif, que le résultat avec le témoin est négatif et qu’il ne s’agit pas d’un échantillon de nouveau-né, | * Étiqueter 2 tubes au nom du patient (l’un avec IgG et l’autre C3).
* Ajouter 1 goutte de suspension cellulaire du patient à 3 % à chaque tube, puis reprendre à 6.6.
 |

* 1. Exécution du test à l'antiglobuline avec de l’anti-IgG monospécifique et de l’anti-C3.

		1. Laver les tubes 4 fois avec de la solution saline normale.
		2. Ajouter 2 gouttes d'anti-IgG au tube « IgG » et mélanger.
		3. Ajouter 2 gouttes d'anti-C3 au tube « C3 » et mélanger.
		4. Centrifuger immédiatement à 3400 rpm pendant 10 à 15 secondes; remettre en suspension; faire une lecture macroscopique et, si c'est négatif, faire une lecture microscopique.

6.7.5 Interpréter et inscrire les résultats pour le tube contenant l’anti-IgG. Voir AR.001 - Lecture et inscription des réactions d'hémagglutination.

|  |  |
| --- | --- |
| ***Si…*** | *vous devez…* |
| le résultat dans le tube qui contient le réactif anti-IgG est négatif, | * ajouter 1 goutte de cellules recouvertes d'IgG au tube « IgG »; centrifuger, remettre en suspension, faire une lecture macroscopique et inscrire les résultats.

*En l'absence d'agglutination à + 2, il faut répéter le test.* |
| le résultat dans le tube qui contient le réactif anti-IgG est positif, | * interpréter et inscrire les résultats. Voir 7.1 - Documentation.
 |

6.7.6 Interpréter et inscrire les résultats pour le tube contenant l’anti-C3.

|  |  |
| --- | --- |
| ***Si…*** | *vous devez…* |
| le résultat dans le tube qui contient le réactif anti-C3 est négatif ou faiblement positif, | * Incuber à température ambiante pendant 5 minutes. Voir Remarque 8.3.
* Centrifuger le tube qui contient l'anti-C3, remettre en suspension, faire une lecture macroscopique et microscopique, interpréter et inscrire les résultats.
* Après l’incubation :
	+ si le tube contenant l’anti-C3 est négatif, ajouter 1 goutte de cellules recouvertes de C3 au tube C3, centrifuger, remettre en suspension, faire une lecture macroscopique et microscopique, puis inscrire les résultats. *En l'absence d'agglutination à + 2, répéter le test.*
	+ Si le tube contenant l’anti-C3 est positif, interpréter et inscrire les résultats (voir 7.1 - Documentation)
 |
| le résultat dans le tube qui contient le réactif anti-C3 est positif, | * interpréter et inscrire les résultats. Voir 7.1 - Documentation.
 |

* 1. Interprétation des résultats.
		1. Voir 7.1 - Documentation.
	2. Vérification.
		1. Pour chaque échantillon, il faut s'assurer des éléments suivants :
* Le nom du patient et le numéro d'identification sont identiques sur tous les échantillons et sur le formulaire de demande.
* Le nom du patient est identique sur tous les tubes et sur le formulaire de demande.
* Les résultats ont été interprétés et inscrits correctement.
	1. Conclusion de la procédure
		1. Mettre ses initiales ou signer et inscrire l'heure et la date de la conclusion de l'épreuve sur le formulaire de demande ou à l'ordinateur.
		2. Noter que les résultats ont été vérifiés. Voir 7.0 - Documentation
1. **Documentation**
	1. Interprétation

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Polyspécifique** | **Témoin**  | Anti-IgG | **Anti-C3** | **Interprétation du TDA**  |
| Négatif | Négatif | Non testé | Non testé | Négatif |
| Faiblement positif | Négatif | Négatif | Négatif | Négatif - Voir 7.3 |
|  |  |  |  |  |
| Positif | Négatif | Positif  | Positif  | Positif - Voir 7.2 |
| Positif | Négatif | Positif  | Négatif | Positif - Voir 7.2 |
| Positif | Négatif | Négatif | Positif  | Positif - voir 7.2 |
| Positif | Positif  | Positif  | Positif  | Inscription impossible Voir remarque 8.5. |
| Documentation relative aux nouveau-nés seulement |
| Positif | Négatif | Non testé | Non testé | Positif  |
| Non testé | Négatif | Positif | Non testé | Positif |
| Non testé | Négatif | Négatif | Non testé | Négatif |

* 1. Si le TDA est positif quant à la GAH polyspécifique, l'anti-IgG et/ou l'anti-C3 et que le témoin est négatif, obtenir la liste des médicaments que prend le patient et les antécédents récents de transfusion (trois derniers mois). Pour obtenir des antécédents précis, il faudra peut-être consulter le patient ou sa famille, l’infirmière et/ou le médecin. Voir AC.005 - Investigation d’un test direct à l’antiglobuline positif (TDA).
	2. Si le TDA est faiblement positif quant à la GAH polyspécifique mais négatif quant à l'anti-IgG, l'anti-C3 et le témoin, il faut répéter le test et s'assurer que la technique, l'ajout des réactifs et les durées d'incubation sont corrects. Si on peut reproduire les résultats, signaler un TDA négatif.
1. **Remarques**
	1. En effectuant le test avec un échantillon coagulé, il est possible de détecter des faux résultats positifs attribuables au revêtement in vitro des cellules par le complément.
	2. Il faut lire les résultats immédiatement après la centrifugation. Tout retard pourrait permettre aux IgG de se dissocier des globules rouges; leur concentration serait alors trop faible pour qu'on puisse les déceler ou les IgG pourraient neutraliser la GAH et donner un faux résultat négatif.
	3. Pour stimuler les réactions anti-complément faibles, il faut incuber les tubes qui contiennent les globules rouges / la GAH polyspécifique ou les globules rouges / l'anti-C3 pendant 5 minutes à température ambiante après la lecture initiale des résultats. Centrifuger et procéder à une autre lecture.
	4. Si le test porte sur un échantillon de nouveau-né ou de cordon, on peut se servir d’anti-IgG seulement, puisqu’on assiste rarement à un résultat de maladie hémolytique du nouveau-né en raison d’une sensibilisation aux anticorps anti IgG des cellules maternelles et à une activation du complément avec de tels échantillons9.1.
	5. La présence d’un témoin positif pourrait être attribuable à une forte agglutination froide dans le plasma du patient. Le cas échéant, répéter le TDA mais laver toutes les cellules à l’aide d’une solution saline normale à 37 °C avant d’ajouter les réactifs.
	6. Consulter à la page 9 le Tableau 1 regroupant les médicaments dont le lien avec un TDA positif est connu.
2. **Références**
	1. *Standards for Hospital Transfusion Services*, version 3 – février 2011 Société canadienne de médecine transfusionnelle, p. 5.3.6.1, 5.3.6.2, 5.3.1.1.
	2. ROBACK JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical Manual*, 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks (2008), p. 497-299; 905-906.
	3. JUDD, WJ. *Methods in Immunohematology*, 3e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks (2008), p. 418-420.
3. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 31 janvier 2014  | * Changement du nom du manuel
* Changement du numéro du document, maintenant AR.007 et mise à jour des références à d’autres procédures connexes.
* Section 2.2 – ajout d’une référence à la Remarque 8.4
* Section 6.0 – mise en page et correction des références 6.6 à 6.4; 6.9 et 6.10
* Modification du libellé de la section 8.4 pour inclure l’emploi approprié d’anti-IgG avec des échantillons de nouveau-né ou de cordon; modification de la page où se trouve le tableau 1.
* Mise à jour des références pour inclure les versions les plus récentes du document principal et du tableau 1
 |

Tableau 1

De nombreux médicaments sont associés à un TDA positif, dont les suivants :

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| MÉCANISME | MÉDICAMENT  | CATÉGORIE D’IMMUNOGLOBULINE  | ACTIVITÉ |
| Adsorption médicamenteuse | Pénicillines,Céphalosporines | IgG (parfois C3 aussi) | Réaction avec les globules rouges recouverts du médicament, mais non avec les globules rouges non traités  |
| Complexe immun | Phénacétine, quinidine, céphalosporines antihistaminiques de 3e génération  | C3 (parfois IgG aussi) | Le sérum réagit avec les globules rouges seulement en présence du médicament; l’éluat ne réagit pas |
| Adsorption protéinique non immunologique  | Céfalotine | IgG + C3 + albumine, etc. | Le sérum peut contenir une faible concentration d’anticorps au médicament; l’éluat ne réagit pas |
| Auto-immunité | α-méthyldopa(Aldomet), procaïnamide | IgG (rarement C3 aussi) | Réaction avec les globules rouges normaux en l’absence du médicament  |

Références spécifiques au TDA positif d’origine médicamenteuse.

1. REID M, LOMAS-FRANCIS C. *The Blood Group Antigen Facts Book*, 2e éd, Academic Press (2004).
2. ROBACK JD, éd. *American* *Association of Blood Banks Technical Manua*l, 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks (2008), p. 551-552.