1. **Principe**

Pour identifier les anticorps irréguliers dépistés lors de la recherche d’anticorps.

Le plasma est habituellement mis à l’épreuve contre un panel de huit cellules de groupe O ou plus dont la composition antigénique est connue, en utilisant la technique par laquelle l’anticorps a d’abord été dépisté. Les réactions positives sont comparées au schéma de réactions des antigènes présents sur les cellules du panel. Ces réactions sont étudiées pour identifier le ou les anticorps présents.

1. **Portée et politiques connexes**
	1. On teste un panel de cellules quand le dépistage d'anticorps initial est positif.
	2. Lorsqu'un patient a un anticorps cliniquement significatif ou des antécédents d'anticorps cliniquement significatifs, les globules rouges dénués de l'antigène correspondant devraient être mis à l'épreuve à l'aide d'une technique à l’antiglobuline (ou comparable)9.1.
	3. Des « cellules choisies » provenant d'un panel sont testées pour exclure la présence d'autres anticorps cliniquement significatifs dans les circonstances suivantes :
* un anticorps déjà identifié réagit avec les cellules de dépistage.
* des cellules supplémentaires sont nécessaires pour exclure un anticorps (c.-à-d. après une procédure d'exclusion sur un panel d'anticorps initial).
1. **Échantillons**

Sang total anticoagulé - tube EDTA

1. **Matériel**

**Équipement** : centrifugeuse sérologique

 laveur de cellules

 support à tubes

 bain-marie/bloc chauffant à 37°C

 microscope

**Fournitures** : tubes 10 x 75 mm

 pipettes sérologiques

**Réactifs :** panel de cellules avec la feuille d’antigramme correspondante

 Anti-IgG

 cellules recouvertes d'IgG

 solution saline normale

 réactifs de potentialisation, le cas échéant :

* polyéthylène glycol (PEG)
* solution à faible concentration ionique - (SFCI)
1. **Contrôle de la qualité**
	1. Faire un autocontrôle en parallèle au panel pour aider à déterminer si les anticorps dépistés sont des alloanticorps ou des autoanticorps9.2.
	2. Voir CAQ.001 - Contrôle de la qualité des globules rouges et des antisérums commerciaux.
2. **Procédure**
	1. Vérifier l'acceptabilité des échantillons. Voir PA.002 - Acceptation ou rejet des échantillons.
	2. Inscrire les données suivantes sur la feuille d’antigramme :
		1. Transcrire les données suivantes à partir de l’étiquette de l’échantillon :
* nom de famille et prénom du patient
* numéro d'identification du patient
* date du prélèvement (heure facultative)

ou mettre une étiquette informatisée.

* + 1. Date du jour de l’épreuve
		2. Méthode utilisée pour faire le test (p. ex. SIAT). Ce renseignement est habituellement écrit au-dessus de la colonne dans laquelle les résultats seront inscrits.
	1. Centrifuger le ou les échantillons 5 minutes à 3500 rpm ou l’équivalent.
	2. S’assurer que la feuille d’antigramme correspond au panel de cellules en comparant le numéro de lot sur la feuille d’antigramme et sur les flacons de cellules du panel. Vérifier la date de péremption des cellules.
	3. Préparer une suspension à 3 % de cellules du patient.
		1. Inscrire le nom de famille complet du patient sur le tube; copier les renseignements àpartir de l'échantillon et non du formulaire de demande. On peut se servir d’une étiquette préimprimée (s’assurer que les données sont identiques à celles du formulaire de demande).
		2. Placer 2 gouttes de sang total (ou l'équivalent : 1 goutte de culot globulaire) dans le tube étiqueté.
		3. Ajouter 0,5 à 1,0 ml de solution saline normale et mélanger pour remettre en suspension à 3 %.
		4. Comparer à une suspension cellulaire commerciale à 3 % et ajuster au besoin la concentration de la suspension.
	4. Étiqueter le nombre nécessaire de tubes à préparer en y inscrivant le nom de famille et le numéro de cellule du panel. Raccourcir au besoin le nom de famille aux trois premières lettres. Placer les tubes en ordre numérique dans le support.
	5. Étiqueter un tube en y mettant le nom de famille et « auto ». Placer le tube dans le support.
	6. Comparer le nom et le numéro d’identification de l’échantillon aux données correspondantes sur la feuille d’antigramme.
	7. Pipetter 3 gouttes9.3 de plasma dans chaque tube étiqueté. Si une solution de potentialisation est utilisée, ajouter 2 gouttes de plasma.
	8. Ajouter 1 goutte de suspension à 3 % de cellules du patient dans le tube étiqueté « auto »
	9. Ajouter 1 goutte de la cellule de panel appropriée au tube correspondant.
	10. Si l’on s’en sert, ajouter 2 gouttes de solution de potentialisation à chaque tube.
	11. Mélanger le contenu de chaque tube. Comparer le volume de chaque tube qui devrait être le même.
	12. Incuber à 37ºC pendant 30 à 60 minutes (15 minutes si l’on se sert de solution de potentialisation.)
	13. Vérifier la température du bain-marie ou du bloc chauffant et l’inscrire sur le formulaire CAQ.006F.
	14. Après l’incubation :
		1. Retirer les tubes du bain-marie et vérifier la présence d’hémolyse. Le cas échéant, l’inscrire.
		2. Mélanger délicatement les tubes et vérifier s’il y a agglutination. Le cas échéant, l’inscrire. (Si on s’est servi de PEG, omettre les étapes 6.16.3 et 6.16.4.)
		3. Centrifuger les tubes à 3400 rpm pendant 10 à 15 secondes.
		4. Remettre en suspension et faire une lecture macroscopique seulement. Interpréter et inscrire les résultats obtenus à 37ºC sur la feuille d’antigramme.
		5. Effectuer un test à l'antiglobuline sur tous les tubes :
* Laver les tubes 4 fois si on se sert d’un laveur de cellules.
* Ajouter 2 gouttes d’anti-IgG.
* Mélanger les tubes immédiatement et centrifuger à 3400 rpm pendant 10 à 15 secondes.
* 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 8.1.
* Interpréter et inscrire les résultats. Voir AR.001 - Lecture et inscription des réactions d'hémagglutination.
* Ajouter 1 goutte de globules rouges recouverts d'IgG aux tubes dont le résultat est négatif. Centrifuger, remettre les cellules en suspension, faire une lecture macroscopique et inscrire les résultats.
	1. Procéder à une exclusion d’anticorps. Voir EC.008 - Exclusion d'anticorps.
		1. En l’absence de spécificité évidente, envisager des causes comme le dosage de l’antigène. Les globules rouges de personnes hétérozygotes quant au gène qui détermine l’antigène peuvent exprimer moins d’antigène et réagir faiblement ou pas du tout.
		2. Si les résultats obtenus avec le panel sont **non concluants**, une identification d’anticorps réactifs froids peut être utile pour préciser la spécificité de l’anticorps (en particulier si les réactions à 37ºC sont nettement plus fortes que les réactions au TIA). Voir EC.006 - Identification d'anticorps réactifs froids.
		3. En cas de soupçon d’anti-D faible, voir la Remarque 8.2.
		4. Si les épreuves requises pour compléter l’identification d’anticorps sont faites ailleurs que dans votre laboratoire, envoyer l’échantillon et une copie des feuilles de travail (formulaire de demande, feuilles d’antigramme, typage d’antigène, etc.) à un laboratoire de référence.
		5. Si le panel est négatif contre toute attente, répéter le dépistage d’anticorps. Si le dépistage d’anticorps est négatif, s’assurer qu’il n’y a pas eu d’erreur de transcription.
	2. Revoir le diagnostic, les antécédents transfusionnels et obstétriques (ainsi que la médication si l’autocontrôle ou le TDA est positif). Inscrire les antécédents sur la feuille d’antigramme.

|  |  |
| --- | --- |
| ***Si…*** | ***Vous devez…*** |
| le patient n’a pas reçu de transfusion au cours des 3 derniers mois, | faire un phénotypage des cellules du patient pour l’antigène correspondant. Les cellules du patient devraient être négatives pour l’antigène dont le patient possède l’alloanticorps identifié.Voir la Remarque 8.3 et EC.009 – Typage des antigènes - agglutination directe et indirecte. |
| le patient a reçu une transfusion au cours des 3 derniers mois, | ne pas procéder au phénotypage de l’échantillon courant. Faire la procédure de phénotypage sur l’échantillon prétransfusionnel, si disponible. Voir la Remarque 8.4. |

* 1. Remplir la feuille de contrôle du formulaire EC.007F pour s’assurer que toutes les étapes ont été suivies.
	2. Mettre ses initiales ou signer l’antigramme et la ou les feuilles de travail.
	3. Inscrire le résultat de l’identification d’anticorps. Voir 7.0 – Documentation.
1. **Documentation**
	1. Noter le nom du ou des anticorps identifiés. Ajouter au besoin un commentaire sur la pertinence clinique de l’anticorps. Exemples d’anticorps réactifs chauds cliniquement significatifs le plus fréquemment rencontrés: anti-D, anti-C, anti-E, anti-c, anti-e, anti-K, anti-Fya, anti-Fyb, anti-Jka, anti-Jkb, anti-S, anti-s9.3.

		1. Si on ne dispose pas de l’antisérum commercial nécessaire, il faut obtenir du fournisseur de sang des unités de donneur exemptes de l’antigène. Voir la Remarque 8.3.2.
		2. Préparer les documents suivants :
* Un registre ou une fiche d’anticorps à garder à l’interne
* Une carte d’anticorps pour patient (format porte-monnaie)
* Un rapport pour le médecin traitant avec copie au dossier médical.
	+ 1. Garder toutes les feuilles de travail (c.-à.d. antigramme, feuilles de phénotypage, etc.) conformément aux règles provinciales.
	1. Si un anti-D passif a été identifié chez une femme Rh négativequi a reçu une immunoglobuline Rh (RhIG) au cours des 12 dernières semaines, voir la Remarque 8.2. Inscrire : Anti-D passif probablement à cause de l’injection de RhIG faite le \_\_\_\_(date de l’injection). »
	2. Si un anticorps sans importance clinique a été identifié, inscrire : « Identification d’anti-\_\_\_\_ sans importance clinique. Les unités de donneur doivent être testées au moyen d’un test à l’antiglobuline (ou un test comparable); les unités de donneur compatibles peuvent être transfusées. Une technique de préréchauffement peut être utile pour trouver des unités de donneur compatibles. Si l’épreuve de compatibilité avec technique de préréchauffement ne permet pas de trouver d’unité de donneur compatible, on peut envisager la possibilité de procéder à un phénotypage des unités de sang.

Exemples d’anticorps sans importance clinique: anti-HI, anti-P1, anti-Leb, anti-M, anti-N, anti-Lua, anti-Bg, anti-Sda, la plupart des exemples d’ anti-Lea et anti-A1.

1. **Remarques**
	1. Il faut lire les résultats immédiatement après la centrifugation. Toute interruption de l'épreuve 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.
	2. Habituellement, la réaction d’un anti-D passif en présence de cellules D positives est de niveau inférieur à 2 quand on se sert de la méthode d’hémagglutination. Cela dépend toutefois de la date à laquelle l’IgG Rh a été administrée; de 3 à 5 jours après l’administration, la réaction peut être nettement plus forte. Il faut vérifier le dossier du patient pour confirmer une injection récente d’IgG.
	3. Certains établissements procèdent au phénotypage des antigènes correspondants et antithétiques (p. ex. phénotypage de l’antigène Fyb en même temps que celui de l’antigène Fya). Même si c’est désirable en certaines circonstances (le patient qui recevra des transfusions de façon chronique), ce n’est pas nécessaire pour l’identification des anticorps. Voir EC.009 - Typage des antigènes – Agglutination directe et indirecte.
		1. Le phénotypage d’antigènes Lea et Leb peut être fait si un anti-Lea ou un anti-Leb a été identifié. Les patients ayant un anticorps du système Lewis auront comme résultat Le (a-b-), sauf en cas de grossesse. Le typage des antigènes de type Lewis n’est pas inscrit au cours de la grossesse puisque leur expression est faible ou absente.
		2. Il faudra peut-être envoyer l’échantillon à un laboratoire de référence qui procédera à un phénotypage, si des anticorps à des antigènes de faible ou de forte incidence sont identifiés :

Exemples : anti-k, anti-Kpa, anti-Cw, anti-Lua, anti-Lub

* + 1. Ne pas retarder la transfusion en attente des résultats du phénotypage si l’anticorps soupçonné est dirigé contre un antigène de faible incidence. Consulter la politique de l’établissement pour voir s’il est nécessaire de connaître le type d’antigène du patient.
		2. Lorsqu’un anti-D est identifié, il est rarement possible de trouver les bonnes cellules de panel (homozygotes pour C ou E) afin d’exclure les anti-C ou les anti-E. Dans un tel cas, envisager la possibilité de faire un test de compatibilité sur des unités de donneur négatives pour CDE.
		3. Si les globules rouges sont couvertes d’autoanticorps IgG, il faudra les retirer des globules avant de faire un typage à l’aide d’antisérums utilisés dans une technique indirecte. On peut modifier chimiquement les globules rouges par EGA (p. ex. chloroquine). Une autre solution serait d’utiliser des antisérums monoclonaux.
	1. Si le patient a reçu une transfusion au cours des 3 derniers mois, procéder à une épreuve interne de génotypage ou envoyer l’échantillon à un laboratoire externe.
1. **Références**
	1. *Standards for Hospital Transfusion Services*, version 3, février 2011 Société canadienne de médecine transfusionnelle : 5.3.4.3, 5.3.7.2.3.
	2. ROBACK JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical Manual*, 17e éd, Bethesda, MD, American Association of Blood Banks (2011) : 469, 475.
	3. JUDD WJ. *Methods in immunohematology*, 3e éd. Durham, NC: Montgomery Scientific Publications (1998) : 72-73, 290-293.
2. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 1er mars 2014 | * Changement du nom du manuel
* Modification du libellé de la section 6.3 pour préciser : « Centrifuger le ou les échantillons 5 minutes à 3500 rpm ou l’équivalent ».
* Changement du libellé de la section 6.9 à « Pipetter 3 gouttes » conformément à la référence 9.3.
 |
|  | * À la section, 6.16.5 – changé PA.006 pour AR.001
* Renumérotation de la section 7.0
* Ajout à la section 8.2 : « Il faut vérifier le dossier du patient pour confirmer une injection récente d’IgG.
* Modification au libellé des sections 8.3.5 et 8.4
* Mise à jour des références
 |