1. **Principe**

L’incubation de sang total dans une solution de saccharose à faible concentration ionique facilite l’absorption de composants de complément sur les globules rouges. La trypsine scinde le C3b pour exposer les sites C3d et C4d. L’anti-C3d est utilisée dans des réactifs anti-GAH polyspécifiques et des réactifs anti-compléments monospécifiques pour dépister le complément qui enrobe les globules rouges *in vivo*.

1. **Portée et politiques connexes**
	1. Tout réactif préparé en laboratoire interne qui contient une substance contrôlée doit être étiqueté conformément au règlement du SIMDUT 9.1.
	2. Les cellules recouvertes de complément seront préparées au besoin pour l’évaluation des réactifs de GAH.
	3. Congelées dans du LN2, ces cellules seront bonnes pendant 10 ans.
	4. Pour les procédures exigeant des cellules témoins d’anti-C3d, par exemple, évaluation des réactifs anti-GAH ou pour confirmer l’ajout d’anti-C3 à l’épreuve9.2.
2. **Échantillons – S.O.**
3. **Matériel**

**Équipement :** centrifugeuse

 support à tubes

 agitateur mécanique et aimant

seau à glace

cuvette métallique

**Fournitures :** tubes – 10 x 75 mm

 pipettes sérologiques

erlenmeyer

bouteille pressable

glaçons
 bandelettes indicatrices de pH

**Réactifs :** solution saline normale à 0,9 %

sang total anticoagulé (*CPD* ou *ACD*)

\* Voir Remarque 8.1

Solution A

Saccharose – 23,1 g

Na2 EDTA 2H20 – 0,395 g

NaH2 PO4 H20 – 0,173 g

H20 distillée – pour faire un volume final de 250 mL

Solution B

Saccharose – 23,1 g

Na2 EDTA 2H20 – 0,395 g

Na2H PO4 – 0,178 g

H20 distillée – pour faire un volume final de 250 mL

Solution C

MgCl2 6H20 – 0,18 g dans 10 mL de H20 distillée

Trypsine à 0,1 % (Lab DIFCO)

1. **Contrôle de la qualité**
	1. Les pipettes sérologiques doivent être entretenues conformément aux recommandations du fabricant, y compris en ce qui concerne la précision du volume, la diminution des transferts et l’absence de contamination9.3.
	2. L’équipement de centrifugation sera entretenu conformément aux recommandations du fabricant, notamment en ce qui a trait à la vitesse de rotation et au mécanisme de minutage9.3.
2. **Procédure**

Procédure no 1 – préparation de globules rouges recouverts de C3b

* 1. Préparer les solutions ci-dessus, refroidir la bouteille pressable contenant de la solution saline normale à 9 % jusqu’à 0-1°C (dans le seau à glace).
	2. À 250 mL de solution A, ajouter une quantité suffisante de solution B, (habituellement 15-25 mL) pour produire un mélange ayant un pH de 5,1.
	3. Mettre 195 mL du mélange dans un erlenmeyer et insérer l’agitateur mécanique.
	4. Mettre de l’eau et quelques glaçons dans une cuvette métallique.
	5. Placer l’erlenmeyer dans la cuvette.
	6. Une fois le mélange refroidi, ajouter 1 mL de sang anticoagulé ACD ou CPD.
	7. Ajouter immédiatement 0,1 mL de solution C.
	8. Placer sur l’agitateur magnétique et agiter pendant 1 heure en gardant la température à 0-1°C par l’ajout de glaçons dans la cuvette.
	9. Laver et faire 3 succions avec de la solution saline normale à 0,9%.
	10. Préparer la suspension cellulaire appropriée à 3 à 5 %.

Procédure no 2 : préparation de globules rouges recouverts de C3d (et de C4d)

* 1. Concentrer les globules rouges recouverts de C3b préparés dans la procédure no 1, retirer la solution saline par succion.
	2. Pour chaque goutte de concentré globulaire recouvert de C3b, ajouter 1 goutte de trypsine à 0,1 % dans de la solution tamponnée au phosphate (pH 7,3) ratio 1:1. Voir Remarque 8.2.
	3. Incuber à 37°C pendant 30 minutes.
	4. Laver trois fois les globules rouges dans une solution saline normale à 0,9 %.
	5. Préparer la suspension cellulaire appropriée à 3 à 5 %.
	6. Congelées dans du LN2, ces cellules seront bonnes pendant 10 ans.
1. **Documentation – S.O.**
2. **Remarques**
	1. L’EDTA inhibe l’absorption du complément, c’est pourquoi il ne faut pas utiliser de sang anticoagulé par EDTA lors de cette procédure.
	2. La trypsine à 0,1 % est préparée à partir d’une solution-mère à 1 % congelée à -18ºC.
3. **Références**
	1. SIMDUT [www.whmis.ca](http://www.whmis.ca)
	2. Judd, WJ, éd. *Methods in Immunohematology*, 3e éd. Montgomery Scientific Publications (2008), p. 257-259.
	3. *Standards for Hospital Transfusion Services*, version 3, février 2011, Société canadienne de médecine transfusionnelle, 3.4.3.1;3.4.5.1.
	4. Hoffman et al. Reproducible *in vitro* preparation of intermediate C3d coated red blood cells. *Transfusion* (1982) 22(3), p.180-184.
4. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 1er décembre 2014  | * Changement du nom du manuel
* Révision et renumérotation des sections 2.0, 5.0 et 6.0
* Révision de la liste des équipements et fournitures à la section 4.0
* Mise à jour des références
 |