1. **Principe**

La détermination du titre d'un anticorps dans l'échantillon de sang de la patiente se fait par une simple série de dilutions du plasma. Il en résulte une estimation semi-quantitative de la concentration de l’anticorps étudié, donnée suffisante dans la plupart des cas. Cette procédure ne mesure pas la force totale de l’anticorps dans le plasma; la période relativement courte d’incubation et le rapport entre le plasma et les cellules ne permettent pas d’atteindre un équilibre entre l’antigène et l’anticorps. Malgré ces limites, un titrage effectué en parallèle à l’aide de la même technique et des mêmes cellules permet de déterminer s’il y a eu une augmentation ou une baisse de l’anticorps. Cette donnée pourrait aider le médecin à déterminer si des épreuves supplémentaires sont nécessaires pour faire le suivi de l’état du fœtus *in utero*.

1. **Portée et politiques connexes**
   1. Le titrage d’anticorps IgG cliniquement significatifs se fera à l’aide d’une cellule homozygote (si possible) pour l’antigène correspondant à l’anticorps étudié.
   2. Il faut, dans la mesure du possible, utiliser le même phénotype pour les cellules témoins utilisées dans le titrage. Voir Remarque 8.1.
   3. Tout titrage se fera en parallèle avec le plasma congelé du titrage précédent (s’il est disponible). Toute divergence doit être signalée au superviseur technique ou à la personne désignée. On doit avertir le médecin par téléphone de toute augmentation importante et inscrire l’appel sur la demande. Si la différence de titrage est de +/- 1 tube, on inscrira qu’il n’y a pas de changement.
   4. L’épreuve de titrage n’est pas requise au moment de l’accouchement à moins que la patiente ne soit pas connue ou qu’il n’y ait eu aucun dépistage antérieur de l’anticorps

* 1. Avortement thérapeutique : les titres ne s’appliquent pas.
  2. Cette méthode de titrage peut aussi servir pour l’inhibition des anti-Chido et des anti-Rodgers ainsi que pour la détermination des anticorps de titre élevé et de faible avidité (*high titer low avidity* ou *HTLA*).

1. **Échantillons**

Sang total anticoagulé (tube EDTA) prélevé de préférence moins de 72 heures auparavant.

1. **Matériel**

**Équipement**: laveur de cellules

centrifugeuse sérologique

support à tubes

microscope

bain-marie/bloc chauffant à 37°C

**Fournitures**: tubes – 10 x 75 mm et 12 x 75 mm

pipettes sérologiques

**Réactifs**: solution saline normale

anti-IgG

cellules recouvertes d’IgG

suspension à 3 % de cellules lavées deux fois (0,3 mL de globules rouges concentrés dans 9,7 mL de solution saline normale à 0,9 %)

1. **Contrôle de la qualité - S.O.**
2. **Procédure**
   1. Centrifuger l’échantillon pendant 5 minutes à 3500 rpm ou l’équivalent.
   2. Après la centrifugation, transférer tout le plasma dans un tube propre étiqueté au nom complet de la patiente. Transcrire les données à partir de l’étiquette de l’échantillon de la patiente (et non du formulaire de demande).

On peut se servir d’étiquettes d’échantillon de la patiente (s’assurer que les données correspondent exactement à l’étiquette de l’échantillon).

* 1. Étiqueter le nombre requis de tubes de 12 x 75 mm de 1 à 13 en mettant aussi les trois premières lettres du nom de famille de la patiente. Voir à la Remarque 8.2. le nombre de tubes requis.
  2. Mettre 0,5 ml de solution saline normale dans tous les tubes, sauf le premier.
  3. Mettre 0,5 ml de plasma à l’étude dans les tubes 1 et 2.
  4. Mélanger dix (10) fois le contenu du tube 2 en évitant d’y former des bulles d’air. À l’aide d’une pipette propre, transférer 0,5 mL du tube 2 au tube 3.
  5. Répéter l’étape 6.6 avec chaque tube et continuer ainsi jusqu’au dernier tube. Réserver ce dernier tube au cas où le titrage final devrait se poursuivre au-delà de la dernière dilution.
  6. Numéroter le nombre requis de tubes de 10 x 75 mm en mettant aussi les trois premières lettres du nom de famille de la patiente. Si l’échantillon précédent est analysé en parallèle, numéroter et étiqueter un autre ensemble de tubes en y ajoutant « PRÉ » pour le distinguer.
  7. Pipetter 2 gouttes de chaque sérum dilué dans les tubes étiquetés appropriés.
  8. Mettre à la verticale 1 goutte de suspension de globules rouges à 3 % dans chacun des tubes. Mélanger doucement.
  9. Incuber à 37°C pendant 60 minutes.
  10. Laver quatre fois manuellement avec une solution saline normale à 0,9 % ou procéder à un lavage dans un laveur de cellules, ajouter 2 gouttes d’immunoglobuline humaine (anti-IgG) et mélanger.
  11. Centrifuger à 3400 rpm pendant 10 à 15 secondes, faire des lectures macroscopique et microscopique de chaque tube à la recherche d’agglutinat (en commençant par la dilution la plus élevée), et inscrire les résultats. Voir AR.001 – Lecture et inscription des réactions d’hémagglutination.
  12. Tout résultat négatif doit être confirmé par l’ajout de cellules témoins d’IgG. Si une réaction négative est obtenue aux cellules témoins, répéter l’épreuve sur ce tube avant d’inscrire les résultats.
  13. Inscrire les résultats. Voir 7.0.

1. **Documentation** 
   1. Le tube le plus dilué ayant une réaction de niveau 1 est considéré comme étant le point final de la procédure de titrage.

7.2 L’inverse sera inscrit pour tout titre, p. ex. 256 et non 1/256.

7.3 Une augmentation de deux tubes dans la procédure de titrage comparativement à l’échantillon précédent est considérée comme étant une augmentation importante du titre. En présence d’une différence de plus d’un tube, il ne faut pas signaler les résultats tant que les résultats de l’échantillon précédent n’ont pas été revus et confirmés.

1. **Remarques**
   1. Les cellules indicatrices sont choisies pour être homozygotes pour l’antigène correspondant à l’anticorps maternel. Il importe que le phénotype de la cellule indicatrice reste le même, p. ex. lors d’une épreuve de titrage de l’anti-D, si l’on se sert d’une cellule R1 R1 pour le premier titrage, il ne faut pas se servir d’une cellule R1R2 pour les titrages subséquents.
   2. S’il s’agit d’anticorps nouvellement identifiés dont le titre est inconnu, il faut prévoir 12 tubes pour le titrage initial. Par la suite, le nombre de tubes peut être déterminé par les résultats antérieurs.
2. **Références**
   1. ROBACK, JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical manual*, 17e éd. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks (2008), p. 935-937.
3. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 1er septembre 2014 | * Changement du nom du manuel * Ajout de la section 2.6 * Changement du libellé de la section 3; de « globules rouges » à « sang total » * Changement du libellé de la section 6. * Modification du numéro de la procédure de PA.006 à AR.001 * Ajout de la section 8.2 * Mise à jour des références |
| 5 mai 2016 | * Ajout en 2.6 d’une mention sur l’utilisation pour la détermination d’anticorps HTLA |