1. **Principe**

La détermination du titre d'un anticorps dans l'échantillon de sang du patient se fait par une simple série de dilutions du plasma. Si des autoanticorps froids réagissent à un titre élevé, on peut penser à une maladie pathologique des agglutinines froides.

1. **Portée et politiques connexes** 
   1. Toutes les épreuves seront montées en se servant de plasma séparé à chaud (37ºC).
   2. Il faut que le dépistage d’anticorps – agglutinines froides soit positif pour effectuer cette procédure.
2. **Échantillons**

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

1. **Matériel**

**Équipement** : centrifugeuse sérologique

support à tubes

microscope

réfrigérateur à 4ºC

bain-marie ou incubateur à 37ºC

**Fournitures** : tubes 10 x 75 mm

tubes 12 x 75 mm

pipettes sérologiques

**Réactifs** : solution saline

suspension à 3 % de cellules O d’adulte (1) (cellules de dépistages exemptes de P1). Voir Remarque 8.5.

1. **Contrôle de la qualité - S.O.**
2. **Procédure**
   1. Vérifier l’acceptabilité de l’échantillon pour s’assurer que les renseignements sur l’étiquette de l’échantillon correspondent au formulaire de demande. Voir PA.002 - Acceptation ou rejet des échantillons.
   2. Séparer à chaud l’échantillon du patient en le plaçant dans un bain-marie ou bloc chauffant à 37ºC pendant au moins 15 minutes et en le mélangeant de temps à autre. Réchauffer aussi les paniers de centrifugation dans un bain-marie à 37ºC. Centrifuger l’échantillon dans les paniers réchauffés environ 2 à 5 minutes à 3000 rpm et le placer dans un bain-marie à 37ºC immédiatement après la centrifugation. Avec une pipette réchauffée à 37ºC, transférer le plasma dans un tube propre et étiqueté en évitant toutes les cellules.Centrifuger encore l’échantillon de plasma pour le rendre limpide.
   3. Préparer une dilution maîtresse du plasma à l’étude. Étiqueter le nombre requis de tubes de 12 x 75 mm et le numéroter en mettant aussi les trois premières lettres du nom de famille du patient. Voir Remarque 8.1.

6.4 Pipetter 1mL de solution saline dans chaque tube, sauf le no 1. Voir Remarque 8.2.

* 1. Pipetter 1mL du plasma à l’étude dans les tubes no 1 et 2.

6.6 Mélanger 10 fois le contenu du tube no 2 en évitant les bulles d’air. Avec un embout de pipette propre, transférer 0,5 mL du contenu du tube no 2 au tube no 3. Voir Remarque 8.3.

* 1. Répéter l’étape 6.6 jusqu’au dernier tube.

6.8 Étiqueter le nombre requis de 12 tubes de 10 x 75 mm en les numérotant et en ajoutant les trois premières lettres du nom famille du patient.

6.9 Mettre 2 gouttes de plasma dilué dans les tubes bien étiquetés.

6.10 Mettre à la verticale 1 goutte de cellules OI P1 négatives dans chaque tube.

6.11 Mélanger et incuber à 4ºC pendant 1 à 2 heures. Centrifuger à 3400 rpm pendant 10 à 15 secondes.

6.12 Faire une lecture macroscopique de chaque tube à la recherche d’agglutinat et inscrire les résultats.

1. **Documentation** 
   1. Inscrire la température et l’inverse de la dilution la plus élevée suscitant une réaction de niveau 1 (p. ex. titre 16 de cellules OI à 4ºC)

7.2 Lire la Remarque 8.4 pour connaître la portée clinique.

1. **Remarques**
   1. Les épreuves de titrages sont souvent établies de façon à atteindre à la fin un titre de 4096. Cela suppose l’utilisation de 13 tubes (1:1, 1:2, 1:4; 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1 ::2048, 1:4096) 9.1.
   2. Ne pas diluer des volumes de moins de 0,5 mL; l’emploi de volumes moindres peut entraîner des inexactitudes9.1.
   3. Il est essentiel de prendre des embouts de pipette séparés pour transférer le plasma dilué afin de minimiser le transfert d’anticorps (contamination).
   4. Si le titre est supérieur à 64, il est jugé d’importance clinique; un titre supérieur à 1000 provoquerait probablement l’hémolyse et un titre inférieur à 64 n’aurait probablement pas de portée clinique9.1,9.2.
   5. Si la spécificité de l’anticorps n’est pas anti-I, il faut choisir des cellules qui ont l’antigène pertinent (au lieu de ou en plus des cellules OI) pour faire le titrage, p. ex. anti-i9.2.
2. **Références**
   1. ROBACK, JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical manual*, 17e éd. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks (2011) :  923-924.
   2. Judd WJ, éd. *Judd’s Methods in Immunohematology*, 3e éd, Bethesda, MD (2008) : 439.
3. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 1er septembre 2014 | * Changement du nom du manuel * À la section 3.0, changement du libellé de « globules rouges » à « sang total » * Ajout à la section 4.0 Équipement : bain-marie ou incubateur à 37ºC * Révision et renumérotation de la section 6.0 * Ajout de la section 7.2 * Révision et renumérotation de la section 8.0 * Mise à jour des références |