1. **Principe**

Les réactifs thiol, comme le DTT, scindent les liaisons disulfures interchaînes des molécules d’IgM et neutralisent la capacité d’agglutination des anticorps IgM, sans affecter les molécules IgG.

Le DTT permet de distinguer les anticorps IgM et les anticorps IgG ou d’inactiver les anticorps IgM pour permettre l’identification de tout anticorps IgG non affecté.

1. **Portée et politiques connexes**
   1. Le traitement par DDT de sérum, de plasma ou d’éluat à analyser peut aider à identifier des anticorps en présence d’un mélange d’anticorps IgM et IgG.
2. **Échantillon**

Plasma, sérum ou éluat

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

pipettes sérologiques

feuille de travail PS.029F – Traitement du plasma par DTT

**Réactifs**: solution saline tamponnée au phosphate (STP), pH 7.3

DTT à 0,01 M (0,154 g de DTT dilué jusqu’à 100 mL dans une STP). On peut aussi faire une dilution de 1 volume de DTT à 0,1 M dans 10 volumes de STP (0,154 g DTT dans 10 ml STP). Des aliquotes de DTT à 0,01 M peuvent être congelées dans des contenants de verre à -20oC pendant jusqu’à 6 mois.

anticorps IgM témoin, p. ex anti-I de haut titre

anticorps IgG témoin

hématies test appropriées (déterminées par la spécificité de l’anticorps à l’étude)

cellules témoins sensibilisées à l’IgG et à l’anti-IgG

1. **Contrôle de la qualité**
   1. Tester en parallèle au plasma à l’étude un anticorps IgM connu et un anticorps IgG connu pour confirmer que le réactif thiol fonctionne bien. La réactivité de l’anticorps IgM devrait être neutralisée et celle de l’anticorps IgG devrait toujours être dépistée.
   2. Répéter le traitement et les épreuves sur le plasma (à l’étude et témoins) si les témoins ne réagissent pas tel qu’attendu.
   3. Répéter le test si les cellules témoins d’antiglobuline ne réagissent pas.
   4. Inscrire les résultats sur la feuille de travail PS.029F -Traitement du plasma par DTT.
2. **Procédure**

# Pour chaque échantillon et chaque témoin, mélanger un volume égal de plasma et de DTT dans un tube (p. ex. 2 gouttes de plasma + 2 gouttes de DTT).

# Pour chaque échantillon et chaque témoin, mélanger dans un tube séparé un volume égal de plasma et de STP, comme dilution témoin (p. ex. 2 gouttes de plasma + 2 gouttes de STP).

* 1. Incuber à 37ºC pendant 30 minutes. On peut prolonger jusqu’à 2 heures le traitement par DTT.
  2. Tester 4 gouttes du plasma traité et du plasma de dilution témoin (en parallèle) avec 1 goutte des hématies appropriées.
  3. Si possible, tester les hématies négatives pour l’antigène avec le mélange DTT-plasma, si un TIA doit être effectué.
  4. Incuber les tubes pendant 30 à 60 minutes à la température qui convient pour la réactivité, p. ex. température ambiante ou 37oC, centrifuger et faire une lecture à la recherche d’agglutination. Inscrire les résultats.
  5. Si l’anticorps réagit à 37oC et/ou à l’antiglobuline, laver les hématies 4 fois pour le test à l’antiglobuline. Examiner à la recherche d’agglutination avant d’ajouter l’anti-IgG si une agglutination a été observée au cours d’une étape précédente.
  6. Ajouter l’anti-IgG, centrifuger et faire une lecture. Inscrire les résultats.
  7. Confirmer toutes les réactions négatives par l’addition de cellules témoins d’IgG. Si une réaction négative est obtenue avec les cellules témoins, répéter le test sur ce tube avant d’inscrire les résultats.

1. **Documentation**

# Interprétation :

# Une réactivité équivalente dans le plasma traité et le plasma dilué témoin signifie la présence d’un anticorps IgG. Cependant, un mélange d’anticorps IgM et IgG pourrait ne pas être évident par épreuve directe ; un titrage sera peut-être requis pour dépister une baisse d’activité d’un anticorps.

* 1. Une réactivité moindre dans le plasma traité que dans le plasma dilué témoin peut indiquer une simple inactivation partielle de l’IgM plutôt que la présence d’une composante IgG.

Exemples et interprétations avec le plasma dilué :

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Dilution du plasma | | | | | Interprétation |
| ½ | | 1/4 | 1/8 | 1/16 |  |
| Plasma + DTT | niveau 3 | | niveau 2 | niveau 1 | 0 | IgG |
| Plasma + STP | | niveau 3 | niveau 2 | niveau 1 | 0 | IgG | |
| Plasma + DTT | 0 | | 0 | 0 | 0 | IgM |
| Plasma + STP | | niveau 3 | niveau 2 | niveau 1 | 0 | IgM | |
| Plasma + DTT | niveau 1 | | 0 | 0 | 0 | IgG + IgM  ou inactivation partielle de l’IgM |
| Plasma + STP | niveau 3 | | niveau 2 | niveau 1 | 0 |

7.3 Une absence de réaction dans le plasma traité et une réaction dans le plasma dilué témoin indiquent la présence d’un anticorps IgM.

7.4 L’absence de réaction dans le plasma traité et le plasma dilué témoin est un indice de la dilution de l’anticorps ; aucune conclusion ne peut en être tirée.

7.5. Pour que le test soit valide, l’anticorps IgM témoin ne doit afficher aucune réaction alors que l’anticorps témoin IgG doit réagir.

1. **Remarques**
   1. Le traitement par DTT peut provoquer une gélification des échantillons de plasma si la concentration dépasse 0,01 M ou que l’incubation est prolongée. L’activité des anticorps ne peut pas être évaluée dans un échantillon gélifié. Si une gélification se produit, essayer de répéter le traitement avec du DTT à 0,005 M (diluer 1 volume de DDT à 0,01 M dans 2 volumes de STP) ; il importe de démontrer que l’anticorps IgM témoin est dénaturé à cette concentration de DTT.
   2. Tester 4 gouttes de plasma traité et de plasma dilué témoin pour compenser l’effet de dilution.
   3. Le DTT dans une STP perd sa capacité de réduction lorsqu’il est entreposé à 4oC, mais il est stable à -20oC pendant au moins 6 mois. La stabilité du produit est meilleure quand il est entreposé dans du verre plutôt que du plastique9.2.
   4. Les réactifs thiols réduisent l’activité de liaison au complément des anticorps. S’il importe de démontrer que le complément est lié, incuber le plasma traité par DTT avec les hématies appropriées, laver les hématies et les incuber de nouveau avec du plasma frais normal comme source de complément, puis procéder à l’épreuve d’antiglobuline avec de l’anti-C3 ou de l’antiglobuline humaine. On pourrait aussi faire une dialyse pendant la nuit du plasma traité et du plasma de dilution témoin et les tester avec et sans addition de plasma frais normal comme source de complément.
2. **Références**
   1. Roback, JD. éd. *AABB Technical Manual*, 17e éd. (2011). Bethesda, MD: American Association of Blood Banks : pp. 912-913
   2. Pirofsky B, Rosner ER. *A new method to differentiate IgM and IgG erythrocyte antibodies*. Vox Sang (1974); 27:480-488.
3. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 1er septembre 2014 | * Changement du nom du manuel * Révision des sections 1.0 et 2.0 * À la section 4, précision « sensibilisées à l’IgG et à l’anti-IgG » * Ajout au paragraphe 6.2 de « (p. ex. 2 gouttes de plasma + 2 gouttes de STP) »**.** * Ajout de la dernière ligne au tableau en 7.2. * Mise à jour des références |