1. **Principe**

Pour faire simultanément un groupage globulaire et un groupage sérique en se servant d’une seule carte de gel.

La procédure en gel se fonde sur le principe de l’hémagglutination dans lequel les antigènes des globules rouges réagissent aux anticorps correspondants qui ont été intégrés au gel. Chaque tube est prérempli de gel et de son anticorps correspondant. Quand les globules rouges passent à travers le gel, une réaction antigène-anticorps se produit et provoque une agglutination.

L’agglutination indique la présence d’une réaction antigène/anticorps alors que l’absence d’agglutination indique l’absence de réaction antigène/anticorps. Pour assurer la validité des résultats, le microtube témoin doit être négatif.

1. **Portée et politiques connexes**

N.B. Le groupage sanguin ABO, la détermination du facteur Rh et le dépistage d’anticorps forment ensemble une procédure dite de groupage et dépistage.

* 1. Le groupe sanguin ABO est déterminé en testant les globules rouges du patient avec des réactifs anti-A et anti-B9.1. Le facteur Rh est déterminé en soumettant les globules rouges du patient à deux sources différentes de réactif anti-D9.1.
	2. Le plasma du patient sera soumis à des globules rouges commerciaux A1 et B. Ce test doit être omis chez les nouveau-nés9.1.
	3. Les résultats des épreuves globulaires et des épreuves sériques devraient concorder. Toute divergence doit être étudiée et clarifiée; les résultats pertinents seront notés avant la mise en circulation des globules rouges9.1. Voir EC.003 - Résolution de problèmes liés au groupe sanguin ABO.
	4. Si la détermination du facteur Rh occasionne un problème et qu’il faut procéder à une transfusion sans délai, il faut mettre en circulation des produits sanguins Rh négatif pour les femmes avant préménopausiques et les enfants jusqu’à la résolution du problème. Les autres patients, en l’absence d’un anti-D connu, peuvent recevoir du sang Rh positif dans les situations d’urgence ou s’il y a une pénurie de sang Rh négatif.
	5. Lorsque des receveurs éventuels de produits sanguins font l’objet d’analyses, il est inutile de procéder à la recherche de l’antigène D faible, à l’exception de ce qui est indiqué en 2.119.1.
	6. Les patientes en obstétrique qui se démarquent comme étant Rh positif ou D faible positif doivent être désignées comme étant Rh positif. Les patients dont les globules rouges sont de type Rh négatif doivent être désignés comme étant Rh négatif9.1.
	7. Il faut revoir les dossiers de transfusion antérieurs et comparer les résultats passés aux résultats courants9.2.
	8. Tous les réactifs doivent être utilisés et vérifiés conformément aux recommandations et procédures du fournisseur.9.1
		1. Quoique certains fabricants ne recommandent pas de témoin Rh, ils mentionnent tous comme limite de l’épreuve la possibilité de faux résultats positifs si les globules rouges du tube sont fortement agglutinés avant l’ajout du réactif. La contamination bactérienne de l’échantillon constitue une autre limite. Conséquemment, un témoin Rh doit faire l’objet d’une épreuve en parallèle avec l’antisérum anti-D.
		2. L’épreuve doit comporter un témoin spécifique du réactif anti-D employé9.1.
	9. S’il y a divergence entre le groupage globulaire et le groupage sérique ABO et qu’une transfusion est nécessaire avant la résolution du problème, on mettra en circulation uniquement des globules rouges de groupe O9.2.
	10. Nouveau-nés :

2.10.1 La recherche du D faible doit être faite chez les nourrissons ayant un Rh négatif si leur mère est Rh négatif et ne présente aucun signe d’alloimmunisation Rh9.1.

* + 1. Toutes les épreuves prétransfusionnelles doivent se faire sur du sang prélevé par voie veineuse ou capillaire. On ne doit jamais utiliser du sang de cordon pour des épreuves prétransfusionnelles9.3.
			1. Dans d’autres situations (p. ex. dépistage de la maladie hémolytique du nouveau-né ou détermination du besoin d’injecter l’immunoglobuline Rh à la mère), on peut utiliser du sang de cordon ou un échantillon périphérique pour déterminer le facteur Rh.
		2. Les épreuves sur l’échantillon prétransfusionnel initial doivent inclure la détermination du groupe ABO et du facteur Rh et le dépistage des anticorps cliniquement significatifs9.1. Lorsqu’un échantillon néonatal n’est pas disponible, on peut utiliser un échantillon maternel.
		3. Pour le groupage ABO, seuls les réactifs anti-A et anti-B sont nécessaires9.2 c.-à-d. groupage globulaire seulement.
		4. Durant une période d’hospitalisation donnée, il n’est pas nécessaire de répéter le groupage ABO et la détermination du facteur Rh chez le nourrisson, pourvu que les globules rouges transfusés soient du groupe O9.1.
		5. Quand c’est indiqué, c.-à-d. TDA positif, procéder au dépistage des anticorps IgG anti-A et anti-B.
	1. Il faut faire la recherche du D faible chez les patientes en obstétrique ayant un Rh négatif apparent.
1. **Échantillon**

Sang total anticoagulé – tube EDTA prélevé dans les cinq (5) jours précédant l’analyse de préférence, mais on peut aussi se servir de sérum.

Dans certains échantillons sanguins, par exemple, le sang de cordon, la dilution peut faire apparaître des caillots de fibrine. Avant la dilution, on peut laver ces échantillons avec du MTS Diluent 2 PlusMC.

Les échantillons hémolysés et nettement ictériques peuvent compliquer l’interprétation des résultats. Voir la remarque 8.10.

On peut éclaircir par centrifugation ou par filtration et ensuite tester à nouveau les échantillons nettement lipémiques contenant des particules qui obstruent le gel et dont la présence forme des taches diffuses de globules rouges.

1. **Matériel**

**Équipement :** ID – Micro Typing SystemMC :

 centrifugeuse

 incubateur

 pipetteur

 distributeur

 poste de préparation, facultatif

**Fournitures :** ID-Tips (embouts de pipettes)

 tubes 10 x 75 mm

 pipettes sérologiques

 dépliant du fournisseur

**Réactifs :** cellules A1 et B (4±1 %)

 MTS Diluent 2 PLUS, solution saline hypotonique tamponnée contenant de l’EDTA

 carte de groupage globulaire monoclonal et de groupage sérique A/B/D (anticorps monoclonaux anti-A murins, anticorps monoclonaux anti-B murins, anticorps monoclonaux anti-D, gel témoin, gel tamponné et gel tamponné, en séquence)

Ne pas utiliser après la date de péremption. Entreposer les cartes entre 2 °C et 25 °C. Entreposer les diluants et les globules rouges entre 2 °C et 8 °C. Amener les réactifs à la température ambiante (18 °C à 25 °C) avant l’utilisation.

1. **Contrôle de la qualité**
	1. Pour confirmer la spécificité et la réactivité des anti-A, anti-B MTS, anti-D et cartes de gel témoins MTS, on recommande de tester chaque lot chaque jour d’utilisation avec des témoins positifs et négatifs connus. La réactivité escomptée doit se produire avec les témoins. Il doit y avoir réactivité uniquement avec les échantillons positifs.
	2. Ne pas congeler ni exposer les cartes à une chaleur excessive. Entreposer en position verticale entre 2 °C et 25 °C. Si les cartes n’ont pas été entreposées en position verticale, il faut les centrifuger avant l’utilisation.
	3. Ne pas utiliser les cartes qui présentent des signes de dessiccation. Il doit y avoir une couche liquide nette par-dessus le gel dans chaque microtube.
	4. Ne pas utiliser les cartes en cas de décoloration ou de présence de bulles ou de cristaux.
	5. Ne pas utiliser les cartes de microtubes si l’opercule du microtube semble endommagé ou ouvert.
	6. Ne pas enlever l’opercule en aluminium des microtubes avant l’utilisation.
	7. Il faut inspecter à l’œil nu le MTS Diluent 2 PlusMC chaque jour d’utilisation pour s’assurer qu’il n’y a ni décoloration ou turbidité, ni signe de contamination bactérienne. Les globules rouges doivent être en suspension dans le MTS Diluent 2 PlusMC; il peut aussi s’agir de globules rouges commerciaux à 0,8 % dans une solution à faible concentration ionique dont l’usage avec le système ID-Micro TypingMC est approuvé.
	8. Le fabricant recommande de faire la lecture des épreuves immédiatement après la centrifugation. La dessiccation du gel, l’hémolyse des globules rouges et l’inclinaison des motifs de réactions due à un entreposage autre qu’à la verticale peuvent modifier les résultats.
2. **Procédure**
	1. Exemple de préparation d’une suspension cellulaire à 4 % ± 1 % des globules rouges du patient ou du donneur dans du MTS Diluent 2 PLUS pour le groupage globulaire : (Remarque : on peut utiliser d’autres volumes proportionnels.)
		1. Dans un tube étiqueté pour l’échantillon de suspension cellulaire de l’épreuve, mettre 0,5 mL de MTS Diluent 2 PLUS.
		2. Ajouter 50 µL de sang total provenant d’un échantillon anticoagulé bien mélangé ou 25 μL de globules rouges concentrés.
		3. Mélanger doucement. La suspension cellulaire finale devrait avoir une concentration d’environ 4 %.

Préparation d’une suspension de cellules A1 et B à 0,8 % dans du MTS Diluent 2 PLUS pour le groupage sérique ABO.

* 1. Méthode 1 (Volume suffisant pour 60 épreuves, avec suspension cellulaire à 3 %)
		1. Étiqueter deux tubes A1 et B; inclure le numéro de lot, la date et l’heure de préparation.
		2. Avec une pipette adéquate, ajouter 1,0 mL de chaque globule rouge commercial aux tubes bien étiquetés et centrifuger pour concentrer.
		3. Décanter le surnageant et ajouter 3,0 mL de MTS Diluent 2 PLUS à chaque tube.
		4. Mélanger doucement. Les suspensions cellulaires finales devraient avoir une concentration d’environ 0,8 %; elles sont stables pendant 24 heures. Pour de meilleurs résultats, la concentration des suspensions devrait se situer entre 0,6 % et 1,0 %.

* 1. Méthode 2 (Volume suffisant pour 20 épreuves, avec globules rouges concentrés)
		1. Dans des tubes différents et étiquetés, préparer un volume suffisant de cellules A1 et B pour obtenir 10 µL de globules rouges concentrés.
		2. Étiqueter deux tubes A1 et B; inclure le numéro de lot, la date et l’heure de préparation. Mettre 1,0 mL de MTS Diluent 2 PLUS dans chaque tube. Ajouter 10 µL de l’échantillon approprié de globules rouges commerciaux.
		3. Mélanger doucement. Les suspensions cellulaires finales devraient avoir une concentration d’environ 0,8 %; elles sont stables pendant 24 heures. Pour de meilleurs résultats, la concentration des suspensions devrait se situer entre 0,6 % et 1,0 %.
	2. Procédure de groupage sanguin ABO et de détermination du facteur Rh
		1. Laisser les échantillons et les réactifs atteindre la température ambiante (18-25 oC).
		2. Inspecter visuellement chaque tube de gel avant de s’en servir. Il doit y avoir un liquide transparent au-dessus et un gel opaque.
		3. Étiqueter la carte de groupage globulaire monoclonal et de groupage sérique A/B/D avec les renseignements d’identification pertinents du patient ou du donneur.
		4. Enlever l’opercule en aluminium des microtubes.

Remarque : l’opercule doit être retiré juste avant le test ou dans l’heure qui le précède. Une fois l’aluminium retiré, le gel peut commencer à sécher, ce qui affecterait les résultats. On doit s’assurer qu’il ne reste aucun morceau d’aluminium obstruant l’ouverture d’un microtube.

* + 1. À l’aide de la pipette appropriée, ajouter 50 µL de chacune des cellules du groupage sérique à 0,8 % aux microtubes étiquetés de gel tamponné. Ajouter 50 µL de sérum ou de plasma aux microtubes à gel tamponné.
		2. À l’aide de la pipette appropriée, ajouter 10 à 12,5 µL de globules rouges à 4 % ± 1 % dilués dans le MTS Diluent 2 PLUS aux microtubes anti-A/-B/-D et aux microtubes témoins. La pipette ne doit pas toucher la carte de gel.
		3. Centrifuger la carte de gel à la valeur prédéfinie de 895 ± 25 rpm pendant 10 minutes.
		4. Après la centrifugation, retirer la ou les cartes de la centrifugeuse et faire une lecture macroscopique de chaque carte à la recherche des signes suivants :
* La présence de globules rouges non agglutinés dans le gel est habituellement due à une interruption du cycle de centrifugation. Ces globules rouges sont rose foncé et flous.
* La présence d’une traînée de globules rouges qui forme une sorte de « J » le long d’une paroi est due à une mauvaise disposition des cartes dans le support à cartes.
* Si la ou les cartes semblent mal centrifugées, répéter le test. Ne jamais centrifuger une autre fois la ou les cartes.
	+ 1. Lire l’avant et l’arrière de chaque microtube.
		2. Inscrire les réactions conformément au tableau suivant.

|  |  |
| --- | --- |
| **Code** | **Description de la réaction\*** |
| Nég | Pas d’agglutination ni d’hémolyse; des globules rouges non agglutinés forment un culot bien défini au fond du microtube. Voir Remarque 8.1 si quelques cellules non agglutinées sont piégées à la surface ou sur les côtés du gel. |
| 1  | Agglutination surtout observée dans la moitié inférieure du microtube. Les globules rouges non agglutinés forment un culot au fond du microtube. |
| 2  | Agglutinats dispersés tout le long de la colonne de gel. Quelques agglutinats peuvent être présents au fond du microtube.  |
| 3  | La plupart des agglutinats sont piégés dans la moitié supérieure du microtube. Voir Remarque 8.3. |
| 4  | Bande solide de globules rouges agglutinés à la surface du gel. Quelques agglutinats peuvent descendre dans le gel, mais restent à proximité de la bande principale.  |
| H | Hémolyse et absence ou presque de globules rouges dans le gel. Inscrivez la présence d’hémolyse dans le microtube, mais non dans l’échantillon.  |
| cm | Bande de globules rouges agglutinés à la surface du gel et culot de globules rouges non agglutinés au fond du microtube.  |
| NT ou NF | Non testé ou non fait |
| \* Ne pas utiliser de demi-niveau, d’exposant ou de signes « plus ». Voir la section de discussion sur chaque niveau dans le guide d’interprétation MTS pour plus d’information.  |

1. **Documentation**
	1. L’agglutination des globules rouges dans un microtube spécifique contenant un antisérum commercial indique la présence de l’antigène correspondant.

* 1. L’agglutination des globules rouges dans un microtube de la carte de gel contenant les cellules A1 et/ou B commerciales indique la réaction d’un anticorps à un antigène présent dans l’échantillon de globules rouges commerciaux.
	2. L’absence d’agglutination dans un microtube de la carte de gel correspond à un résultat négatif et indique l’absence de réaction antigène/anticorps.
	3. On ne peut pas interpréter l’épreuve s’il y a agglutination dans le microtube de gel témoin.
	4. Interprétation

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Globules rouges | Groupage sérique | Groupe sanguin |
| Microtube anti-A | Microtube anti-B | Microtube anti-D | Microtube témoin | Microtube à gel tamponné avec cellules A1  | Microtube à gel tamponné avec cellules B  |  |
| 0 | 0 | + | 0 | + | + | O positif |
| 0 | 0 | 0 | 0 | + | + | O négatif |
| + | 0 | + | 0 | 0 | + | A positif |
| + | 0 | 0 | 0 | 0 | + | A négatif |
| 0 | + | + | 0 | + | 0 | B positif |
| 0 | + | 0 | 0 | + | 0 | B négatif |
| + | + | + | 0 | 0 | 0 | AB positif |
| + | + | 0 | 0 | 0 | 0 | AB négatif |

* 1. Les groupages sériques ABO effectués conjointement avec les groupages globulaires ABO doivent concorder. Les divergences entre groupage sérique et groupage globulaire doivent être clarifiées selon les politiques et les procédures en cas de divergence ABO avant de procéder à l’interprétation du groupe sanguin. Le microtube témoin doit être négatif pour permettre une interprétation valide des épreuves ABO et Rh.
	2. Une réaction très faible n’est pas un résultat attendu et peut représenter un faux positif ou une expression antigénique faible. On doit étudier la question plus à fond avant d’interpréter les résultats.
1. **Remarques**
	1. Les anticorps ABO de certains immunodéprimés, patients âgés ou nouveau-nés peuvent être affaiblis ou absents.
	2. De faux résultats positifs peuvent survenir si un anticorps, un médicament, un état pathologique, une infection, de la gelée de Wharton et/ou une contamination croisée contribuent à des réactions dans les microtubes.
	3. Il peut être impossible de détecter des antigènes A ou B dont l’expression est faible. En cas de faible expression antigénique, on peut améliorer la réactivité en utilisant la carte de groupage monoclonal anti-A,B de MTS.
	4. Il est impossible de détecter l’antigène D en cas d’expression très faible. Ce réactif ne permet pas la détection de l’expression de l’épitope DVI de l’antigène D. On peut confirmer l’absence de l’antigène D en utilisant un utilisant une carte de groupage monoclonal anti-D de MTS.
	5. Les anticorps du groupage sérique ABO présents dans les échantillons de sang de cordon peuvent être d’origine maternelle. Dans les groupages globulaires ABO, des échantillons de sang de cordon peuvent mener à des réactions plus faibles que la normale, car les antigènes ABH sont immatures à la naissance.
	6. Si l’identification du groupe ABO et du facteur Rh occasionne des problèmes, consulter : EC.003 Résolution de problèmes liés au groupe sanguin ABO ou EC.004 Résolution de problèmes liés à la détermination du facteur Rh.
	7. On doit procéder avec soin à l’interprétation des réactions de type champ mixte. La présence de fibrine, de caillots ou de particules peut entraîner la formation d’une couche de cellules par-dessus le gel. Habituellement, on observe des réactions de type champ mixte uniquement dans les épreuves qui contiennent deux populations de globules rouges, comme chez les transfusés et les receveurs de moelle osseuse ou quand on utilise un échantillon de cellules mises en pool. Toutefois, on ne peut pas détecter toutes les situations où il y a présence de cellules mixtes, car la population mineure est parfois trop petite.
	8. La présence de trop ou de trop peu de cellules dans le microtube peut susciter des réactions faussement positives ou faussement négatives. Cette situation peut être due à l’une ou aux deux erreurs suivantes :
* suspension de cellules mal préparée
* ajout d’une mauvaise quantité de cellules dans la partie supérieure du micro tube

Si c’est le cas, répéter le ou les tests en s’assurant que les quantités sont bonnes et à l’aide de nouvelles suspensions de cellules.

* 1. Les rouleaux constituent une caractéristique du sérum ou plasma qui correspond à une disposition précise de l’agrégat globulaire. Ces rouleaux peuvent se former en présence d’une quantité suffisante de protéines irrégulières dans l’échantillon et peuvent – quoique rarement – compliquer l’interprétation du test en gel. Il faut confirmer la présence de rouleaux à l’aide de méthodes d’hémagglutination en tube et d’un remplacement par une solution saline, au besoin.
	2. La présence de globules rouges dans le gel et d’une hémolyse dans la portion liquide est habituellement due au fait que l’échantillon est hémolysé. Dans ce cas, l’hémolyse ne doit pas être inscrite comme un résultat positif du test. Si l’hémolyse survient pendant la centrifugation, la partie liquide au-dessus du gel semblera rose ou rouge, mais il n’y aura pas ou presque pas de globules dans le gel.
	3. Des variations importantes dans la concentration des suspensions de globules rouges (<0,6 % ou >1,0 %) peuvent entraîner de faux résultats positifs ou négatifs
	4. De faux résultats positifs peuvent survenir dans le cas de cartes de gel qui présentent des signes de dessiccation.
	5. Le sérum frais, la présence de fibrine ou de particules dans le sérum ou le plasma, ou l’adhérence de globules rouges aux parois du microtube peut entraîner des résultats anormaux. L’emploi de plasma EDTA minimisera ce problème.
	6. Pour assurer le bon déroulement de l’épreuve, il est essentiel de respecter les directives du dépliant du fournisseur.
1. **Références**
	1. Standards for Hospital Transfusion Services version 3 (février 2011). Société canadienne de médecine transfusionnelle, 5.3.2., 5.3.3.
	2. Roback JD, éd. American Association of Blood Banks Technical Manual, 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2011:545-546
	3. CSA Z902-10 Sang et produits sanguins labiles, Mississauga, ON : Association canadienne de normalisation (février 2010); 10.9.1
	4. ID-Micro Typing System MC –Implementation Guide and Procedures. Procedure 2 ABO Forward and Reverse Grouping/D Typing, version 5 (2010-05-31), Ortho Clinical Diagnostics.
	5. ID-Micro Typing SystemMC - Guide d’interprétation 2010-06-04
2. **Suivi des révisions**

|  |  |
| --- | --- |
| **Date de la révision** | **Résumé des changements** |
| 30 avril 2014 | * Changement du nom du manuel
* Changement du numéro du document anciennement TG.001, maintenant TG.002
* Modification du libellé de la section 1.0
* Mise à jour de la référence de la section 2.7, de 9.1 à 9.2
* Mise à jour de la référence de la section 2.9, de 9.2 à 9.1
* Mise à jour de la référence de la section 2.10, de 9.1 à 9.3
* Ajout de « Voir la remarque 8.10 » à la section 3.0
* Section 4.0 *Réactifs –* changement de 3±1 % à 4±1 %
* Renumérotation de la section 5.0
* Modification du libellé de la 5.3 pour préciser « une couche liquide nette ».
* Révision et renumérotation de la section 6.0
* Révision et renumérotation de la section 8.0
* Mise à jour des références
 |