1. **Principe**

Le dépistage d'anticorps suppose la comparaison du plasma du patient à un ensemble de cellules de dépistage dont la composition antigénique est connue.

On utilise le dépistage d’anticorps pour détecter des anticorps sanguins irréguliers. Dans cette épreuve, on mélange les globules rouges commerciaux mis en solution saline hypotonique tamponnée avec le plasma du patient pour entraîner une réaction antigène/anticorps dans la chambre supérieure du microtube. On incube ensuite la carte pour stimuler l’interaction antigènes-anticorps. Si les globules rouges sont sensibilisés, ils réagiront à l’anti-IgG intégré au gel pendant la centrifugation. L’agglutination indique la présence d’une réaction antigène-anticorps. L’absence d’agglutination indique l’absence de réaction antigène-anticorps.

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 dépistage d’anticorps doit se faire à 37 °C et comprendre un test indirect à l’antiglobuline dont la sensibilité est connue. On peut recourir à d'autres méthodes pourvu que leur sensibilité soit documentée et que l'on respecte les instructions du fournisseur. L’utilisation d’un réactif d’antiglobuline composé uniquement d’IgG est acceptable pour un dépistage d’anticorps9.1.
  2. Pour le dépistage d'anticorps irréguliers, on doit utiliser au moins deux préparations de globules rouges commerciaux qui expriment une grande variété d'antigènes sanguins. On doit utiliser des globules rouges homozygotes pour les antigènes qu’ils portent9.1.
  3. Il ne faut pas mettre en pool les préparations globulaires utilisées pour le dépistage d’anticorps au cours d'une grossesse et lors des épreuves prétransfusionnelles9.1.
  4. En ce qui concerne les exigences en matière de dépistage d’anticorps chez les nouveau-nés, voir AR.008 - Dépistage d’anticorps.
  5. En cas de transfusion récente ou de grossesse, il peut y avoir synthèse d’anticorps dans les trois (3) jours suivant l’exposition à des antigènes étrangers. Un nouvel échantillon doit être prélevé après 96 heures en cas de grossesse ou de transfusion récente.
  6. On réalise habituellement une technique de pré-réchauffement en cas de présence avérée ou soupçonnée d’un anticorps réactif froid cliniquement non significatif dans l’échantillon du patient. Voir TG.004 - Identification d'anticorps.

1. **Échantillons**

Sang total anticoagulé – tube EDTA, idéalement prélevé dans les quatorze (14) jours précédant l’analyse, le sérum est aussi acceptable.

En cas de transfusion récente ou de grossesse, il faut tester l’échantillon dans les 96 heures suivant son prélèvement.

Les échantillons hémolysés et nettement ictériques peuvent compliquer l'interprétation des résultats. Voir la remarque 8.8.

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 SystemMD :

centrifugeuse

incubateur

pipetteur

distributeur

poste de préparation, facultatif

centrifugeuse sérologique

Fournitures : ID-tips (embouts de pipettes)

tubes 10 x 75 mm

pipettes sérologiques

dépliant du fournisseur

**Réactifs : c**arte MTS anti-IgG, anti-IgG (lapin) en suspension dans le gel

cellules de dépistage d’anticorps en trois flacons de globules rouges humains comme suit :

solution à 0,8 %, prête à l’utilisation pour le dépistage en gel anti-IgG MTS ou,

solution à 3,0 % à préparer sur place pour le dépistage anti-IgG MTS

MTS Diluent 2, solution saline hypotonique tamponnée (pour préparation sur place seulement)

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. Il faut inspecter à l’œil nu le MTS Diluent 2MD pour s’assurer qu’il n’y a pas décoloration, turbidité ou signe quelconque de contamination bactérienne du liquide. 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.
   2. Pour confirmer la spécificité et la réactivité des cartes anti-IgG MTS, on recommande de tester chaque lot chaque jour d’utilisation avec des échantillons d’anticorps positifs et négatifs connus et les globules rouges appropriés. Il doit y avoir réactivité uniquement avec les échantillons positifs.
   3. Ne pas congeler ou 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.
   4. Ne pas utiliser les cartes qui présentent des signes de dessiccation. Il doit y avoir une couche liquide par-dessus le gel dans chaque microtube.
   5. Ne pas utiliser les cartes en cas de décoloration ou de présence de bulles ou de cristaux dans les microtubes.
   6. Ne pas utiliser les cartes de microtubes si l'opercule du microtube semble endommagé ou ouvert.
   7. Ne pas enlever l'opercule en aluminium des microtubes avant l'utilisation.
   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. **Procédures**
   1. Vérifier l’acceptabilité des échantillons. Voir PA.002 - Acceptation ou rejet des échantillons.
   2. Centrifuger l’échantillon pendant 5 minutes à 3500 rpm ou l’équivalent.
   3. Vérifier les antécédents médicaux du patient. Voir PA.003 – Vérification des antécédents du patient.
   4. Préparation des cellules de dépistage d’anticorps, si nécessaire :
      1. Méthode 1 (Pour 60 épreuves, avec une suspension à 3 %)
         * Étiqueter trois tubes 1, 2 et 3 : inclure le numéro de lot, la date et l’heure de préparation.
         * Avec une pipette appropriée, mettre 1,0 mL de chaque échantillon de cellules de dépistage d’anticorps dans le tube correspondant et centrifuger pendant une (1) minute pour concentrer les globules rouges.
         * Retirer le surnageant et ajouter 3,0 mL de MTS Diluent 2 à chaque tube. Mélanger doucement. La suspension cellulaire finale devrait avoir une concentration d’environ 0,8 %; elle est stable pendant 24 heures. Pour de meilleurs résultats, la concentration des suspensions devrait se situer entre 0,6 % et 1,0 %.
      2. Méthode 2 (Pour 20 épreuves, avec des cellules concentrées)
         * Étiqueter trois tubes 1, 2 et 3; inclure le numéro de lot, la date et l’heure de préparation. Préparer un volume suffisant de cellules pour obtenir 10 μL de globules rouges concentrés de chacun des échantillons de dépistage d’anticorps.
         * Dans d’autres tubes étiquetés, mettre 1,0 mL de MTS Diluent 2. Ajouter 10 μL de chacun des échantillons de cellules concentrées de dépistage d’anticorps au tube correspondant.
         * Mélanger doucement. La suspension cellulaire finale devrait avoir une concentration d’environ 0,8 %; elle est stable pendant 24 heures. Pour de meilleurs résultats, la concentration de la suspension devrait se situer entre 0,6 % et 1,0 %.
   5. Amener les échantillons et les réactifs à la température ambiante (18 °C à 25 °C) avant leur utilisation.
   6. Récupérer l’échantillon du patient dans la centrifugeuse et vérifier s’il est d’apparence normale. Voir PA.002 – Acceptation ou rejet des échantillons, étape 6.5.
   7. Comparer le nom et le numéro d’identification du patient sur l’échantillon à ce qui figure sur la carte, sur le formulaire de demande et à l’écran d’ordinateur, le cas échéant.
   8. Procédure de dépistage d’anticorps
      1. Étiqueter la carte anti-IgG MTS avec les renseignements appropriés d’identification du patient et de l’épreuve.

En cas d’utilisation d’un dépistage à trois cellules, on peut tester les échantillons de deux patients sur la même carte :

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| I | II | III | I | II | III |
| Nom du patient no 1  numéro d’identification | | | Nom du patient no 2  numéro d’identification | | |
|  |  |  |  |  |  |

* + 1. Enlever l'opercule en aluminium des microtubes à utiliser.

**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 d’une pipette appropriée, ajouter 50 μL de chacune des suspensions de cellules de dépistage d’anticorps à 0,8 % au tube correspondant. La pipette ne doit pas toucher la carte de gel. Mise en garde : l’embout de la pipette ne doit pas toucher la carte de gel.

* + 1. À l’aide d’une pipette appropriée, ajouter 25 μL de plasma aux tubes étiquetés. Mise en garde : l’embout de la pipette ne doit pas toucher la carte de gel.
       - Si le volume ou l’aspect semble anormal, il ne faut pas lire les microtubes, mais bien reprendre tous les tests avec de nouveaux microtubes.
    2. Incuber à 37±2 oC pendant 15 minutes. Consulter le dépliant pour des détails sur la prolongation du temps d’incubation et la Remarque 8.9.
    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’absence d’agglutination ou d’hémolyse des cellules de dépistage dans la carte de gel signale un résultat négatif et l’absence de réaction antigène-anticorps. Si les réactions sont négatives, il y avait absence ou non-détection d’anticorps irréguliers. Interpréter et inscrire le résultat de l’épreuve comme étant négatif.
   2. En cas de réaction positive, des anticorps irréguliers pourraient être présents. Interpréter et inscrire le résultat de l’épreuve comme étant positif. Identifier l’anticorps. Voir TG.004 – Identification de l’anticorps – Carte de gel anti-IgG. On peut aussi recourir à un laboratoire de référence conformément à la procédure établie.
   3. L’hémolyse en l’absence d’un échantillon hémolysé ou l’agglutination de tout globule rouge dans la carte de gel signale la présence d’un anticorps contre l’antigène correspondant présent sur les cellules de dépistage. Voir TG.004 – Identification de l’anticorps – Carte de gel anti-IgG. On peut aussi recourir à un laboratoire de référence conformément à la procédure établie.
2. **Remarques**
   1. Cette épreuve ne permet pas la détection d’anticorps à des antigènes à faible incidence non représentés sur les cellules de l’épreuve.
   2. Il est possible que cette épreuve ne permette pas la détection d’anticorps en deçà du niveau seuil
   3. La présence dans le sérum d’anticorps réagissant à des composants de la solution de conservation peut entraîner de faux résultats positifs.
   4. Il se peut que l’anti-G n’arrive pas à détecter des anticorps qui se manifestent seulement à l’utilisation de réactifs à l’antiglobuline contenant de l’anti-C3.
   5. 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. If faut vérifier les antécédents du patient.
   6. 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. De faux résultats positifs ou négatifs peuvent survenir dans les situations suivantes : contamination bactérienne du matériel de l’épreuve, température ou durée d’incubation inadéquates, mauvaise centrifugation, mauvais entreposage du matériel.
  4. De faux résultats positifs peuvent survenir dans le cas de cartes de gel qui présentent des signes de dessiccation de cellules et de plasma.
  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. Ajout de cellules et de plasma ou sérum
     1. On doit ajouter la suspension de globules rouges avant le plasma, car le volume de la suspension de globules rouges est plus grand que le volume de plasma. Si on ajoute le plus petit volume de plasma avant la suspension de globules rouges, le mélange pourrait être inadéquat.
     2. On doit ajouter le plasma dans les 10 à 15 minutes suivant l’ajout de la suspension de globules rouges aux chambres de réaction. Tout globule rouge qui entre en contact avec la colonne de gel avant la centrifugation pourrait ne pas avoir l’occasion d’entrer en contact avec le plasma et ainsi commencer à migrer dans le gel et possiblement entraîner une réaction plus faible après la centrifugation.
  7. Dans la documentation, on recommande une incubation d’une durée de 5 à 40 minutes dans des solutions à faible concentration ionique. Il n’y a pas de durée d’incubation optimale unique pour tous les anticorps. Si on change la durée d’incubation recommandée par le fabricant, il faut mener des études de validation.
  8. Il se pourrait que les anticorps IgM réagissent dans cette épreuve. Certains anticorps de type IgM pourraient réagir aux antigènes correspondants dans la partie supérieure du microtube et rester pris dans le haut du gel au moment de la centrifugation, entraînant une réaction positive.
  9. 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, 5.2.3.3; 5.3.5.
   2. Implementation Guide and Procedures -Procedure 6 Antibody Detection Method Three Cell Screen Version 5 2010-05-31, ID-Micro Typing System
   3. ID-Micro Typing SystemMC Interpretation Guide-2010-0604
   4. Fung MK, éd. American Association of Blood Banks Technical Manual, 18e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2014:370
   5. Dépliant courant du fabricant : Anti-Human Globulin Anti-IgG (Rabbit) MTS Anti-IgG Card, version 2.0.
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.002, maintenant TG.003 * Ajout au libellé de la section 1.0 : « L’agglutination indique la présence d’une réaction antigène-anticorps. L’absence d’agglutination indique l’absence de réaction antigène-anticorps. » * Ajout au libellé de la 2.5 : « Un nouvel échantillon doit être prélevé après 96 heures en cas de grossesse ou de transfusion récente » * Précision dans la section 3 au sujet de l’échantillon préféré - tube EDTA, idéalement prélevé dans les quatorze (14) jours précédant l’analyse * Révision et renumérotation des sections 5.0, 6.0, 7.0, et 8.0 * Mise à jour des références |