1. **Principe**

Cette épreuve permet de prévenir la réactivité des anticorps froids cliniquement non significatifs tout en dépistant les anticorps chauds cliniquement significatifs.

Dans cette technique en gel, on mélange les globules rouges commerciaux mis en solution saline hypotonique tamponnée avec l’échantillon de plasma ou de sérum à tester pour susciter une réaction antigène-anticorps dans la partie supérieure du microtube. L’incubation de ces réactifs à 37 °C stimule l’interaction antigène-anticorps; si les globules rouges sont sensibilisés, ils réagissent avec l’anti-IgG dans le microtube pendant la centrifugation. L’agglutination indique la présence d’une réaction antigène-anticorps. L’absence d’agglutination indique l’absence de réaction antigène-anticorps..

En modifiant cette technique par préréchauffement, il est possible de diminuer ou d’éliminer la réactivité d’anticorps réactifs froids non désirés tout en maintenant la sensibilité des anticorps réactifs chauds cliniquement significatifs. L’inclusion d’un autotémoin facilite la reconnaissance d’autoanticorps dans l’échantillon de plasma soumis à l’épreuve.

1. **Portée et politiques connexes**
   1. On teste un panel de cellules quand le dépistage d’anticorps initial est positif.
   2. Lorsqu’un patient a un anticorps cliniquement significatif ou des antécédents d’anticorps cliniquement significatifs, les globules rouges dénués de l’antigène correspondant devraient être mis à l’épreuve à l’aide d’une antiglobuline ou d’une technique comparable9.1.
   3. Des « cellules choisies » provenant d’un panel sont testées pour exclure la présence d’autres anticorps cliniquement significatifs dans les circonstances suivantes :
      1. Un anticorps déjà identifié réagit avec les cellules de dépistage.
      2. Des cellules supplémentaires sont nécessaires pour exclure un anticorps (c’est à dire, après une procédure d’exclusion sur un panel d’anticorps initial).
   4. Une technique de préréchauffement est habituellement utilisée en présence d’un anticorps réactif froid non significatif dans l’échantillon d’un patient ou lors d’un soupçon à cet effet.
   5. Outre le réchauffement, la technique de préréchauffement doit être identique à la méthode qui a donné un résultat positif (c.-à-d. même type de carte, même temps d’incubation, etc.).
2. **Échantillons**

Sang total anticoagulé - tube EDTA prélevé dans quatorze (14) jours précédant l’épreuve, de préférence, mais du sérum peut aussi être utilisé.

En cas de transfusion récente ou de grossesse, il faut tester l’échantillon dans les trois (3) jours suivant son prélèvement.

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**: centrifugeuse

incubateur

pipetteur

distributeur

poste de préparation, facultatif

centrifugeuse sérologique

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

tubes 10 x 75 mm

pipettes sérologiques

dépliants du fournisseur

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

panel d’identification d’anticorps, soit :

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)

solution saline

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 cartes anti-IgG MTS, on recommande de tester chaque lot à chaque jour d’utilisation avec des échantillons positifs et négatifs connus et les globules rouges appropriés. Il doit y avoir réactivité uniquement avec les échantillons positifs.

5.2 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.

* 1. Ne pas utiliser les cartes qui présentent des signes de dessiccation. Il doit y avoir une couche liquide claire par-dessus le gel dans chaque microtube.
  2. Ne pas utiliser les cartes en cas de décoloration ou de présence de bulles ou de cristaux dans les microtubes.
  3. Ne pas utiliser les cartes de microtubes si l’opercule du microtube semble endommagé ou ouvert.
  4. Ne pas enlever l’opercule en aluminium des microtubes avant l’utilisation.
  5. Il faut inspecter à l’œil nu le MTS Diluent 2 PlusMC pour s’assurer qu’il n’y a ni décoloration, 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.
  6. 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.

1. **Procédures**

6.1 Préparer un panel d’anticorps, si nécessaire.

6.1.1 Méthode 1 (pour deux (2) à quatre (4) épreuves, avec une suspension cellulaire à 3 %).

* + - Étiqueter les tubes en fonction des cellules du panel à tester; inclure le numéro de lot, la date et l’heure de la préparation.
    - Avec une pipette adéquate, mettre un (1) volume (minimum suggéré, 100 μL) de chaque échantillon de cellules du panel d’anticorps dans le tube étiqueté correspondant. Ajouter un petit volume de MTS Diluent 2MC à chaque tube pour avoir un volume suffisant.
    - Centrifuger pendant une (1) minute pour concentrer les globules rouges.
    - Décanter le surnageant (on recommande un culot de cellules sec) et ajouter deux (2) volumes de MTS Diluent 2MC (200 μL si le volume initial était de 100 μL) à chaque tube.   
      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 (pour 20 épreuves, avec des cellules concentrées)
     1. Étiqueter les tubes en fonction des cellules du panel à tester; inclure le numéro de lot, la date et l’heure de la préparation. Préparer un volume de cellules suffisant pour obtenir 10 μL de globules rouges concentrés de chaque échantillon de cellules du panel.
     2. Dans des tubes étiquetés séparément, mettre 1,0 ml de MTS Diluent 2MD. Ajouter 10 μL de chacun des globules rouges concentrés du panel au tube étiqueté correspondant.
     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 doit se situer entre 0,6 % et 1,0 %.
  2. Préparation de l’autotémoin en suspension à 0,8 %

6.3.1 Mettre 1,0 ml de MTS Diluent 2 dans un tube portant l’identification de l’échantillon à tester.

6.3.2 Ajouter 10 μL de globules rouges concentrés provenant de l’échantillon à tester.

6.3.3 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 doit se situer entre 0,6 % et 1,0 %.

* 1. Procédure d’identification d’anticorps
  2. Étiqueter les cartes anti-IgG MTSMC avec les renseignements appropriés concernant l’identification du patient et l’épreuve.
  3. 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. Mettre une petite aliquote de cellules de dépistage/panel dans un tube dans l’incubateur MTS pendant 5 à 10 minutes.
    2. Mettre la carte et une aliquote du plasma à tester dans l’incubateur MTS pendant 5 à 10 minutes.
    3. Avec une pipette adéquate, ajouter 50 μL de la suspension cellules de dépistage d’anticorps/panel à 0,8 % au microtube correspondant. La pipette ne doit pas toucher la carte de gel.
    4. En laissant la carte dans l’incubateur, ajouter 25 μL de plasma préréchauffé aux microtubes étiquetés.
    5. Incuber à 37±2 oC pendant 15 minutes. Consulter le dépliant pour des détails sur la prolongation du temps d’incubation et la remarque 8.15.
    6. Centrifuger les cartes de gel à la valeur prédéfinie de 895±25 rpm pendant 10 minutes.
    7. Après la centrifugation, retirer la ou les cartes de la centrifugeuse et faire une lecture 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.

|  |  |
| --- | --- |
| **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 globules rouges, après l’utilisation de la technique de préréchauffement indique habituellement qu’il n’y avait pas d’anticorps irréguliers cliniquement significatifs ou qu’ils étaient indécelables.
   2. La présence d’agglutination ou d’hémolyse des globules rouges, après l’utilisation de la technique de préréchauffement indique la présence d’anticorps irréguliers cliniquement significatifs.
   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 cet échantillon de cellules commerciales
   4. La réactivité du plasma avec les globules rouges autologues témoins peut signaler la présence d’un autoanticorps. Il pourrait être utile de consulter les antécédents cliniques de transfusion récente de globules rouges.
   5. On peut identifier l’anticorps présent dans le plasma par l’appariement des réactions obtenues avec les profils d’antigènes des globules rouges sur le formulaire du panel. Des cellules supplémentaires pourraient être nécessaires pour l’identification d’anticorps multiples. Voir EC.008 - Exclusion d’anticorps.
   6. Signaler la présence de tout anticorps.
2. **Remarques**
   1. Même si on effectue la centrifugation à température ambiante, le préréchauffement des réactifs précédant le mélange peut éliminer la réactivité causée par les anticorps froids.
   2. Comme c’est le cas pour la mise en œuvre de toute nouvelle procédure, on doit vérifier le rendement de cette technique de préréchauffement avant sa mise en œuvre dans le cadre des procédures normales de fonctionnement de l’établissement
   3. La technique de préréchauffement peut éliminer certains anticorps cliniquement significatifs.
   4. Il est possible que cette épreuve ne permette pas la détection d’anticorps en deçà du niveau seuil.
   5. Cette épreuve ne permet pas la détection d’anticorps contre des antigènes à faible incidence non représentés sur les cellules de l’épreuve.
   6. La présence dans le sérum d’anticorps réagissant à des composants de la solution de conservation pourrait entraîner de faux résultats positifs.
   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 microtube

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 ou omission d’échantillons d’épreuves.
  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 peuvent entraîner des résultats anormaux. Le recours à du plasma avec EDTA minimisera le problème.
  6. Ajout de cellules et de plasma

8.15.1 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.

8.15.2 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.

* 1. 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.
  2. 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.
  3. Pour assurer le bon déroulement de l’épreuve, il est essentiel de respecter les directives du dépliant du fabricant.
  4. Il se peut que l’anti-G n’arrive pas à détecter des anticorps qui se manifestent à l’utilisation de réactifs à l’antiglobuline contenant de l’anti-C3.

1. **Références**
   1. *Standards for transfusion medicine*, version 3 (Février 2011). Société canadienne de médecine transfusionnelle : 5.3.5.3.
   2. Implementation Guide and Procedures -Procedure 8 Antibody Identification Method with( Auto Control) Version 5 2010-05-31, ID-Micro Typing System.
   3. Roback JD, éd. American Association of Blood Banks Technical Manual, 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2011; 463-470,489.
   4. Dépliant courant : Reagent Red Blood Cells SELECTOGEN® . Raritan, N.J. Ortho-Clinical Diagnostics Inc.
   5. ID-Micro Typing SystemMC Interpretation Guide, 2010-0604.
   6. Dépliant courant : Anti-Human Globulin Anti-IgG (lapin). MTSMC Anti-IgG Gel 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.004, maintenant TG.005 * Changement au libellé de la section 1.0 * Révision et renumérotation de la section 2.0 * Précision dans la section 3 au sujet de l’échantillon préféré - tube EDTA, idéalement prélevé dans les quatorze (14) jours précédant l’analyse. * Ajout à la section 3.0 : « Voir la Remarque 8.10 ». * Révision du libellé de la section 5.3 pour préciser une « couche de liquide claire » * Révision et renumérotation des sections 5.0, 6.0, 7.0 et 8.0 * Mise à jour des références |