1. **Principe**

Le test direct à l’antiglobuline sert à démontrer la présence ou l’absence d’immunoglobuline à la surface des globules rouges. On dit des globules rouges ayant de la globuline adsorbée en surface qu’ils sont sensibilisés.

La globuline sensibilisante peut être une gammaglobuline (anticorps) et/ou une bêtaglobuline (composants du complément). Le test direct à l’antiglobuline démontre si les globules rouges sont devenus sensibilisés ou non in vivo.

Dans cette épreuve, les globules rouges, placés dans une solution saline hypotonique tamponnée sont centrifugés dans un microtube de gel contenant un anti-IgG. On confirme la présence d’anticorps lorsque les globules rouges sensibilisés réagissent avec l’anti-IgG dans le gel du microtube pendant la centrifugation. Cette méthode ne détecte que la sensibilisation par IgG.

1. **Portée et politiques connexes**
   1. On utilise le test direct à l’antiglobuline (TDA) dans l’investigation de plusieurs états :

* maladie hémolytique du nouveau-né
* anémie hémolytique auto-immune
* réactions transfusionnelles
* sensibilisation d’origine médicamenteuse.
  1. Le TDA est nécessaire si le dépistage anticorps se fait sans auto-témoin dans les circonstances suivantes :
* l’identification de l’anticorps est nécessaire et un auto-témoin est impossible (p. ex. volume limité de plasma)
* il faut procéder au typage d’antigènes des cellules du patient
  1. L’antiglobuline utilisée pour cette épreuve directe ne contient que des anticorps à l’IgG et ne détectera pas le composant C3d du complément.
  2. Tous les réactifs doivent être utilisés et vérifiés conformément aux recommandations et aux procédures du fournisseur9.1.

1. **Échantillons**

Sang total anticoagulé (tube EDTA) – l’échantillon de sang doit être analysé dans les 24 heures suivant le prélèvement. Les échantillons coagulés ne sont pas recommandés. Voir la Remarque 8.5 au sujet de l’hémolyse et des échantillons.

Les globules rouges entreposés pendant de longues périodes peuvent se couvrir un vitro de protéines de globuline et de complément. Les échantillons couverts d’IgG auront alors un résultat TDA positif s’ils sont testés avec ce réactif.

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

dépliant du fournisseur

Réactifs : MTS Diluent 2, solution saline hypotonique tamponnée carte MTS anti-IgG, Anti-IgG (lapin), suspension en gel

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 détecter la détérioration des réactifs, il faut les soumettre à des témoins appropriés sur une base quotidienne.
   2. Il faut inspecter à l’œil nu le MTS Diluent 2MD pour s’assurer qu’il n’y a ni décoloration, ni turbidité, ni autre signe de contamination bactérienne au niveau 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.
   3. 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 d’anticorps positifs et négatifs connus et les globules rouges appropriés. Il doit y avoir réactivité uniquement avec les échantillons positifs.
   4. Ne pas congeler ou exposer les cartes à une chaleur excessive.

Entreposer en position verticale entre 2 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 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. Le fabricant recommande de faire la lecture des épreuves immédiatement après la centrifugation. La dessiccation du gel, l’hémolyse des globules rouges ou l’inclinaison des motifs de réactions due à un entreposage autre qu’à la verticale peut modifier les résultats.

1. **Procédures**
   1. Préparation des cellules de dépistage à 0,8 % à partir de globules rouges concentrés
      1. Mettre 1,0 mL de MTS Diluent 2 dans un tube étiqueté.
      2. Ajouter 10 µL de globules rouges concentrés au tube étiqueté.
      3. 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 doit se situer entre 0,6 % et 1,0 %.
   2. Procédure du test direct à l’antiglobuline
      1. Noter sur la carte anti-IgG MTS les renseignements appropriés concernant l’identification du patient et l’épreuve.
      2. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante (18-25 oC) avant de les utiliser
      3. Enlever l’opercule en aluminium du microtube 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
      4. À l’aide d’une pipette appropriée, ajouter 50 µL de suspension de globules rouges à 0,8 % au microtube étiqueté. La pipette ne doit pas toucher la carte de gel.
      5. Centrifuger la carte de gel à la valeur prédéfinie de 895±5 rpm pendant 10 minutes.
      6. 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.
    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. Noter les résultats.

1. **Documentation**
   1. L’agglutination de n’importe quelle quantité de globules rouges dans le microtube est une réaction positive.
   2. L’absence d’agglutination indique l’absence de composants d’IgG détectables sur les globules rouges.
   3. Si le TDA est positif quant à l’anti-IgG et que le témoin est négatif, obtenir la liste des médicaments que prend le patient et les antécédents récents de transfusion (trois derniers mois). Pour obtenir des antécédents précis, il sera peut-être nécessaire de consulter le patient ou sa famille, l’infirmière et/ou le médecin. Voir EC.005 - Investigation d’un test direct à l’antiglobuline (TDA) positif.
   4. Pour un échantillon de nouveau-né, si le TDA est négatif, que le nouveau-né a la jaunisse, que le dépistage anticorps maternel est négatif et que les cellules du nouveau-né sont ABO incompatibles avec le plasma maternel, inscrire : « Bien que le TDA soit négatif, la maladie hémolytique du nouveau-né en raison d’anti-A ou d’anti-B maternel ne peut être exclue. ».
2. **Remarques**
   1. Si un TDA effectué sur un échantillon coagulé détecte un complément, le résultat sera vérifié sur un échantillon EDTA9.1.
   2. 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. Vérifier les antécédents du patient.
   3. 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 inadéquate, 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. Dans la littérature, on mentionne que les anti-IgG pourraient ne pas détecter des anticorps dont on peut démontrer la présence à l’aide d’un réactif polyspécifique d’antiglobuline humaine. Les anticorps non détectés par anti IgG pourraient être d’importance clinique.
  7. Pour assurer le bon déroulement de l’épreuve, il est essentiel de respecter les directives du dépliant du fabricant.

1. **Références**
2. *Standards for Hospital Transfusion Services*, version 3 - février 2011. Société canadienne de médecine transfusionnelle, 5.3.6.2.
3. Roback JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical Manual*, 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2011:497-499
4. Implementation Guide and Procedures -Procedure 13 Direct Antiglobulin Test Version 5 2010-05-31, ID-Micro Typing System
5. ID-Micro Typing SystemTM Interpretation Guide-2010-06-04
6. *INSTRUCTIONS* FOR USE Anti-Human Globulin Anti-IgG (Rabbit) MTS™ Anti-IgG Card, Version 2.0
7. **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.007, maintenant TG.008 * Ajout à la section 3 d’un renvoi aux Remarques et d’explications * Précisions apportées à la section 5.2. * Étape ajoutée en 6.2.2. * Retrait des étapes 6.3 à 6.5 * Révision et renumérotation de la section 8.0; ajout des paragraphes 8.5 à 8.10 * Mise à jour des références |