1. **Principe**

Des globules rouges sont testés contre des antisérums spécifiques pour déterminer la présence ou l’absence d’antigènes au groupe sanguin.

Dans cette épreuve, les globules rouges en suspension dans une solution saline hypotonique sont combinés au réactif antisérique pour susciter une interaction antigène-anticorps dans la partie supérieure du microtube. Les cartes sont ensuite incubées pour stimuler l’interaction antigène/anticorps; si les globules rouges sont sensibilisés, ils réagiront avec l’anti-IgG intégré au gel du 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. L’absence d’agglutination indique que le phénotype pour l’antigène testé est négatif, alors que l’agglutination indique que le phénotype est positif.

1. **Portée et politiques connexes**
   1. Lors d’une procédure de typage d’antigène chez des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse (GMO), il faut toujours prendre en compte les antécédents du patient. Après une GMO, on peut constater un chimérisme dû à la présence d’antigènes aux globules rouges, en raison de la persistance des lymphocytes B du receveur.
   2. Si un patient a reçu une transfusion au cours des trois derniers mois, il ne faut pas faire de phénotypage de l’échantillon courant. Si un échantillon prétransfusionnel est disponible, c’est celui qui devrait servir au phénotypage9.1.

* 1. Il faut revoir les dossiers de transfusion antérieurs et comparer les résultats passés aux résultats actuels9.1.
  2. Un auto-témoin ou un test direct à l’antiglobuline sera exécuté en conjonction avec le phénotypage des globules rouges du patient soumis à un test indirect à l’antiglobuline9.1.

1. **Échantillons**

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

Des cellules de donneur traitées à l’AS3, au CPDA-1 ou au CPD peuvent être testées jusqu’à la date de péremption de l’unité. Des caillots de fibrine peuvent apparaître dans certains échantillons de sang, p. ex. du sang de cordon, lors d’une dilution. On peut laver de tels échantillons dans du MTS Diluent 2 avant la dilution.

1. **Matériel**

**Équipement** : centrifugeuse

incubateur

pipetteuse

distributeur

poste de préparation, facultatif

centrifugeuse sérologique

**Fournitures :** 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

solution saline

anti-sérum (pour le typage d’antigène)

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 d’anticorps positifs et négatifs connus et les globules rouges appropriés. 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 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 dans les microtubes.
   5. Ne pas utiliser les cartes de microtubes si l’opercule du microtube semble endommagé ou ouvert.
   6. Enlever l’opercule en aluminium des microtubes juste avant leur utilisation.
   7. Il faut inspecter à l’œil nu le MTS Diluent 2 PlusMC pour s’assurer qu’il n’y a ni décoloration, ni turbidité, ni autre 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.
   9. Lorsqu’on se sert de réactifs commerciaux de groupage sanguins qui ne sont pas spécifiquement conçus pour les épreuves sur carte de gel, le laboratoire doit valider les résultats de l’épreuve obtenus avec le réactif avant de recourir à cette procédure. Il faut inscrire au dossier le type de cellules et son numéro de lot.
   10. Des cellules que l’on sait être positives ou négatives pour l’antigène étudié doivent être préparées et testées au même moment que les cellules de donneur et du patient, p. ex. lors de l’étude de l’antigène anti- K1, il faut inclure à la fois des cellules K1+ et des cellules K1-. Les réactions attendues doivent être obtenues pour que le test soit valide.
2. **Procédures**
   1. Préparation à 0,8 % de cellules du patient, de donneur ou témoin, à partir de globules rouges concentrés de l’échantillon du patient ou de segments des unités de donneur.
      1. Étiqueter un tube
         * pour chaque donneur à tester
         * pour le patient à tester
         * pour chaque témoin positif ou négatif

(inutile si l’on se sert de cellules de dépistage commerciales à 0,8 %).

* + 1. Mettre 1,0 mL de Diluent 2 de MTS dans le ou les tubes étiquetés. Ajouter 10 µL de globules rouges concentrés du patient ou du donneur au tube étiqueté correspondant.
    2. 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 du test
     1. Noter sur la carte anti-IgG MTS les renseignements appropriés concernant l'identification du patient et l'épreuve.
        + le nom de famille du patient
        + les 4 derniers chiffres du numéro de donneur  
          le réactif utilisé et son numéro de lot (p. ex. anti-Fya Lot 123)
     2. 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. Au bon microtube, à l’aide d’une pipette appropriée, ajouter 50μL d’une suspension à 0,8 % de globules rouges :
* de cellules du patient
* de cellules témoins positives et négatives. Utiliser des globules rouges ayant une expression simple de l’antigène testé pour les témoins positifs9.1.
* de chaque unité de donneur

La pipette ne doit pas toucher la carte de gel. Un témoin positif et un témoin négatif doivent être utilisés pour chaque lot incubé.

* + 1. À l’aide d’une pipette appropriée, ajouter 25µL d’antisérum au bon microtube.
    2. Incuber à 37±2 c pendant 15 minutes. Consulter le dépliant pour des détails sur la prolongation du temps d'incubation. Voir la Remarque 8.11
    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 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. Inscrire les résultats
     1. Mettre ses initiales ou sa signature et noter la date et l’heure de la fin de l’épreuve sur le formulaire approprié ou à l’ordinateur.
     2. La vérification des résultats doit être notée.

1. **Documentation**
   1. Si les cellules témoins positives et négatives ont produit les réactions attendues :
      1. L’absence d’agglutination des globules rouges est un résultat négatif qui indique l’absence de réaction antigène- anticorps. Les unités de donneur et/ou les cellules du patient sont négatives pour l’antigène étudié.
      2. L’agglutination des globules rouges est un résultat positif. Les unités de donneur et/ou les cellules du patient sont positives pour l’antigène étudié.
   2. L’hémolyse en l’absence d’un échantillon hémolysé ou l’agglutination de tout globule rouge dans un microtube de la carte de gel signale la présence d’un anticorps contre l’antigène correspondant présent sur les cellules de donneur.
2. **Remarques**
   1. Présence de segments coagulés sur une unité de donneur :

|  |  |
| --- | --- |
| *Si…* | *vous devez…* |
| des segments coagulés sont trouvés sur une unité de donneur, | ouvrir les segments suivants attachés au sac, jusqu’à ce que vous trouviez un segment qui ne soit pas coagulé |
| tous les segments sont coagulés, | en aviser le fournisseur de sang. Voir GS.005 - Disposition finale du sang, des composants sanguins et des produits connexes qui ne sont pas en état d’être transfusés - procédure manuelle. |

* 1. Présence de segments hémolysés au moment du lavage du segment (c.-à-d. surnageant rougeâtre)

|  |  |
| --- | --- |
| *Si…* | *vous devez…* |
| Un segment hémolysé est trouvé, | ouvrir les segments suivants attachés au sac, jusqu’à ce que vous trouviez un segment qui ne soit pas hémolysé |
| tous les segments sont hémolysés, | en aviser le fournisseur de sang. Voir GS.005 - Disposition finale du sang, des composants sanguins et des produits connexes qui ne sont pas en état d’être transfusés - procédure manuelle. |

* 1. 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.
  2. 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.
  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 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 ou de sérum :
     1. On doit ajouter la suspension de globules rouges avant le plasma ou le sérum, 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 ou le sérum 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. La présence dans le sérum d’anticorps réagissant à des composants de la solution de conservation pourrait entraîner de faux résultats positifs.
  9. Pour assurer le bon déroulement de l’épreuve, il est essentiel de respecter les directives du dépliant du fournisseur.

1. **Références**
2. *Standards for Hospital Transfusion Services* Version 3 - février 2011. Société canadienne de médecine transfusionnelle, 5.2.3.3, 5.2.4.2, 5.3.4.3, 5.3.4.2
3. Roback JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical Manual*, 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2011:491-492
4. ID-Micro Typing SystemTM Interpretation Guide-2010-06-04
5. INSTRUCTIONS FOR USE Anti-Human Globulin Anti-IgG (Rabbit) MTS™ Anti-IgG Card, version 2.0
6. Dépliant d’utilisation des anti-sérums utilisés.
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.008, maintenant TG.009 * Révision de la section 1.0 pour y ajouter des explications * Ajout d’une référence en 2.2 * Ajout du paragraphe 2.4 * Révision de 5.1 à 5.10 * Ajout d’une remarque en 6.2.2 * Révision en 6.2.3 * Ajout du paragraphe 7.2 * Renumérotation de la section 8.0 * Mise à jour des références |