1. **Principe**

L'épreuve d'identification des anticorps sert à repérer des anticorps immuns A ou B. Dans cette épreuve, des globules rouges A et B commerciaux mis en solution saline hypotonique tamponnée sont combinés au sérum ou au plasma du patient pour entraîner une réaction antigène-anticorps dans la chambre 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. L’inclusion d’un autotémoin facilite la reconnaissance de la présence d’autoanticorps dans l’échantillon de plasma à l’épreuve.

1. **Portée et politiques connexes**
   1. Un pourcentage élevé de mères O positif ont une forme d’IgG immun anti-A et/ou anti-B. Si leur bébé est du groupe A ou du groupe B, il y a un risque d’hémolyse en raison de ces anticorps qui sont capables de traverser le placenta. Lorsqu’une incompatibilité ABO est constatée entre une mère de groupe O et son bébé, une épreuve de routine doit être faite pour dépister l’anti-A ou l’anti-B maternel.
   2. Des cellules d’adultes connues de groupe A1, B et O sont testées pour exclure la présence d’A/B immuns.
   3. Les cellules suivantes serviront à déterminer la présence d’A/B immuns, selon la catégorie de patientes :

|  |  |
| --- | --- |
| Patiente | Cellules |
| Groupe O | A, B, O |
| Groupe A | B, O |
| Groupe B | A, O |

1. **Échantillons**

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

Du sérum de sang de cordon peut aussi être utilisé.

Les échantillons hémolysés et nettement ictériques peuvent compliquer l'interprétation des résultats. Voir la Remarque 8.4

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 :** embouts de pipette

tubes 10 x 75 mm

pipettes sérologiques

dépliant du fournisseur

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

cellules A1, B et O d’adultes, en suspension à 3 %, préparées à l’interne pour servir lors des épreuves sur cartes de gel MTS anti-IgG (on peut se servir de cellules commerciales de groupage sérique et de cellules de dépistage de groupe O)

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 détecter la détérioration des réactifs, il faut les soumettre à des témoins appropriés le jour même où l’on veut s’en servir.

5.2 La contamination bactérienne du matériel utilisé pour les épreuves peut entraîner des faux positifs ou des faux négatifs. Il faut inspecter à l'œil nu le MTS Diluent 2MC pour s'assurer qu'il n'y a pas décoloration, turbidité ni signe de contamination bactérienne.

5.3 Pour confirmer la spécificité et la réactivité des cartes anti-IgG de MTSMC, 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.

* 1. 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.
  2. 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.
  3. Ne pas utiliser les cartes en cas de décoloration ou de présence de bulles ou de cristaux dans les microtubes.
  4. Ne pas utiliser les cartes de microtubes si l'opercule du microtube semble endommagé ou ouvert.

5.8 Ne pas enlever l'opercule en aluminium des microtubes avant l'utilisation.

5.9 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
      1. Étiqueter les tubes pour les cellules A, B et O.
      2. Avec une pipette adéquate, mettre un (1) volume (minimum suggéré, 100 µL) de chaque échantillon de cellules dans le tube correspondant. Ajouter un petit volume de MTS Diluent 2MC à chaque tube pour avoir un volume suffisant.

6.1.3 Centrifuger pendant une (1) minute pour concentrer les globules rouges.

6.1.4 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.

* + 1. 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 %.

**Remarque** : On a modifié la méthode de préparation d'un petit volume d'une suspension de globules rouges à 0,8 % pour cibler avec le plus d'exactitude possible une concentration de 0,8 %, dans un intervalle de 0,6 % à 1,0 %.

* 1. Procédure d'identification d'anticorps
     1. Noter sur les cartes anti-IgG MTS les renseignements appropriés concernant l'identification du patient et l'épreuve.
     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. À l’aide d’une pipette adéquate, ajouter 50 μL de chacune des suspensions cellulaires à 0,8% du panel d’anticorps (A, B, O) et de l’autotémoin aux microtubes correspondants. La pipette ne doit pas toucher la carte de gel.
    2. À l’aide d’une pipette adéquate, ajouter 25 μL de sérum ou de plasma aux microtubes correspondants.
    3. Incuber à 37±2 oC pendant 15 minutes. Consulter le dépliant pour les détails sur la prolongation du temps d'incubation.
    4. Centrifuger les cartes de gel à la valeur prédéfinie de 895±25 rpm pendant 10 minutes.
    5. 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 ». | |

**7.0 Documentation**

* 1. L'agglutination de cellules dans la carte de gel indique la présence d’un anticorps à l’antigène correspondant qui est présent sur l’échantillon de cellules réactives.
  2. L'absence d'agglutination des cellules à l’étude dans la carte de gel signale un résultat négatif et l'absence de réaction antigène-anticorps.
  3. L’hémolyse en l'absence d'un échantillon hémolysé de tout globule rouge dans la carte de gel signale la présence d'un anticorps.
  4. On peut identifier l'anticorps présent dans le plasma par l'appariement des réactions obtenues avec les cellules A, B et O.
  5. Pour transmettre le résultat du dépistage d’anticorps A/B immuns, inscrire « Présence d’anticorps anti-A ou anti-B immuns maternels ».

1. **Remarques**
   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 inadéquates, mauvaise centrifugation, mauvais entreposage du matériel ou omission d'échantillons d'épreuves.
  4. De faux résultats positifs peuvent survenir si les cartes de gel présentent des signes de dessiccation.
  5. Ajout de cellules et de plasma
     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.
  6. 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.
  7. Il se pourrait que des 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.
  8. Pour assurer le bon déroulement de l'épreuve, il est essentiel de respecter les directives du dépliant du fournisseur.
  9. Il est possible que cette épreuve ne permette pas la détection d'anticorps en deçà du niveau seuil.
  10. La présence dans le sérum d'anticorps réagissant à des composants de la solution de conservation pourrait entraîner de faux résultats positifs.
  11. À l'occasion, les anti-IgG ne permettent pas la détection d'anticorps dont on peut démontrer la présence à l'aide d'un réactif d'antiglobuline contenant des anti-C3.
  12. 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. Le recours à du plasma avec EDTA minimisera le problème.

1. **Références**
   1. *Standards for Hospital Transfusion Services* Version 3 – février 2011. Société canadienne de médecine transfusionnelle, 5.9.2.4.
   2. Roback JD, ed. *American Association of Blood Banks Technical Manual,* 17e éd. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks, 2011:639
   3. ID-Micro Typing SystemTM Interpretation Guide-2010-06-04.
   4. INSTRUCTIONS FOR USE 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.009, maintenant TG.010 * Changement du libellé de la section 1.0 * À la section 3.0m précision sur l’échantillon en et ajout de « Voir la Remarque 8.4 ». * Renumérotation de la section 5.0 * Révision et renumérotation des sections 6.0, 7.0 et  8.0 * Mise à jour des références |