1. **Principe**

La détermination du titre d’un anticorps dans l’échantillon de sang du patient se fait par une simple série de dilutions du plasma. Il en résulte une estimation semi-quantitative de la concentration de l’anticorps étudié, donnée suffisante dans la plupart des cas. Cette procédure ne mesure pas la force totale de l’anticorps plasmatique; la période relativement courte d’incubation et le rapport entre le sérum et les cellules ne permettent pas d’atteindre un équilibre entre l’antigène et l’anticorps. Malgré ces limites, un titrage effectué en parallèle à l’aide de la même technique et des mêmes cellules permet de déterminer s’il y a eu une augmentation ou une baisse de l’anticorps. Cette donnée peut aider le médecin à déterminer si des épreuves supplémentaires sont nécessaires pour faire le suivi de l’état du fœtus *in utero*.

Dans cette épreuve, des globules rouges réactifs mis en solution saline hypotonique sont combinés 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.

1. **Portée et politiques connexes**
	1. Le titrage d’anticorps IgG cliniquement significatifs se fera à l’aide d’une cellule homozygote (si possible) pour l’antigène correspondant à l’anticorps étudié.
	Certains pensent que les globules rouges choisis pour l’épreuve doivent être obtenus de donneurs hétérozygotes pour ressembler aux globules rouges du fœtus. D’autres privilégient l’emploi de globules rouges de donneurs homozygotes pour augmenter la sensibilité. Quelle que soit la méthode choisie par un établissement, elle doit être validée avec soin et utilisée uniformément9.1.
	2. Tout titrage se fera en parallèle avec le plasma congelé du titrage précédent (s’il est disponible)9.1. Toute divergence doit être signalée au technologiste principal ou à son délégué. On doit avertir le médecin par téléphone de toute augmentation importante et inscrire l’appel sur la demande. Si la différence de titrage est de +/- 1 tube, on inscrira qu’il n’y a pas de changement.
	3. L’épreuve de titrage n’est pas requise au moment de l’accouchement à moins que la patiente ne soit pas connue ou qu’il n’y ait eu aucun dépistage antérieur de l’anticorps.
	4. Avortement thérapeutique : les titres ne s’appliquent pas.
	5. Préparer les dilutions uniquement avec une solution saline isotonique. Voir la Remarque 8.5.
2. **Échantillons**

Sang total anticoagulé - tube EDTA prélevé dans les quatorze (14) jours précédant l’analyse.

Les échantillons hémolysés et nettement ictériques peuvent compliquer l’interprétation des résultats. Voir la Remarque 8.13.

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 SystemMC :

 centrifugeuse

 incubateur

 pipetteur

 distributeur

 poste de préparation, facultatif

 centrifugeuse sérologique

**Fournitures :** embouts de pipette

 tubes 12 x 75 mm

 pipettes sérologiques

 dépliant du fournisseur

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

 suspension à 3 % de cellules indicatrices de l’anticorps titré, préparée à l’interne pour les titrages MTS anti-IgG

 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 2MC pour s’assurer qu’il n’y a ni décoloration, turbidité, ni signe de contamination bactérienne.
	2. 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.
	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. Enlever l’opercule en aluminium des microtubes juste avant leur utilisation.
	8. 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.
	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.
2. **Procédure**
	1. Dilution maîtresse du plasma
		1. Centrifuger l’échantillon pendant cinq minutes à 3500 rpm ou l’équivalent.
		2. Après la centrifugation, transférer tout le plasma dans un tube propre étiqueté au nom complet du patient. Transcrire les données à partir de l’étiquette de l’échantillon du patient (et non du formulaire de demande). On peut se servir d’étiquettes d’échantillon du patient (s’assurer que les données correspondent exactement à l’étiquette de l’échantillon).
		3. Étiqueter 13 tubes de 12 x 75 mm de 1 à 13 en mettant aussi les trois premières lettres du nom de famille du patient.
		4. Mettre 0,2 mL de solution saline dans les tubes 2 à 13.
		5. Mettre 0,2 mL de sérum à l’étude dans les tubes 1 et 2.
		6. Mélanger dix fois le contenu du tube 2 en évitant d’y former des bulles d’air. À l’aide d’une pipette propre, transférer 0,2 mL du tube 2 au tube 3.
		7. Répéter l’étape précédente avec chaque tube et continuer ainsi jusqu’à ce que le dernier 0,2 mL du tube 12 soit transféré dans le tube 13.
		8. Réserver ce dernier tube au cas où le titrage final doive se poursuivre au-delà de la dilution du tube 12.
	2. Préparation des cellules (cette étape n’est pas requise si l’on se sert de cellules de panel ou de dépistage commerciales à 0,8 %.
		1. Étiqueter le tube en identifiant la cellule indicatrice.
		2. Préparer un volume suffisant de cellules indicatrices lavées avec une solution saline pour fournir 10μL de globules rouges concentrés.
		3. Dans un autre tube étiqueté, mettre 1,0 mL de MTS Diluent 2. Ajouter 10 μL de cellules indicatrices concentrées au tube étiqueté.
		4. 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 %.
	3. Amener les échantillons et les réactifs à la température ambiante (18 °C à 25 °C).
	4. Procédure du titrage de l’anticorps
		1. Noter sur la carte anti-IgG MTS les renseignements appropriés concernant l’identification du patient et l’épreuve. Numéroter les microtubes de 1 à 12, un pour chaque dilution du plasma.
		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 50μL de suspension à 0,8 % de cellules indicatrices à chaque microtube. La pipette ne doit pas toucher la carte de gel.
		2. À l’aide d’une pipette adéquate, ajouter 25 μL de chaque tube du plasma aux bons microtubes. Changer d’embout de pipette pour chaque dilution pour éviter tout entraînement.
		3. Incuber à 37±2 oC pendant 15 minutes. Consulter le dépliant pour les détails sur la prolongation du temps d’incubation. Voir la Remarque 8.16.
		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 ».  |

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 des globules rouges est un résultat négatif qui indique l’absence de réaction antigène- anticorps.
	2. L’hémolyse en l’absence d’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.

* 1. Le tube le plus dilué ayant une réaction de niveau 1 est considéré comme étant le point final de la procédure de titrage.
	2. L’inverse sera inscrit pour tout titre, p. ex. 256 et non 1/256.
	3. Une augmentation de deux tubes dans la procédure de titrage comparativement à l’échantillon précédent est considérée comme étant une augmentation importante du titre. En présence d’une différence de plus d’un tube, il ne faut pas signaler les résultats tant que les résultats de l’échantillon précédent n’ont pas été revus et confirmés. Voir la Remarque 8.3.
	4. Transmettre les résultats.
1. **Remarques**
	1. Les cellules indicatrices sont choisies pour être homozygotes pour l’antigène correspondant à l’anticorps maternel. Il importe que le phénotype de la cellule indicatrice reste le même, p. ex. lors d’une épreuve de titrage de l’anti-D, si l’on se sert d’une cellule R1 R1 pour le premier titrage, il ne faut pas se servir d’une cellule R1R2 pour les titrages subséquents. Voir Portée 2.1.
	2. L’entraînement qui résultera de l’utilisation de la même pipette pour faire les dilutions provoquera des titres faussement élevés.
	3. Au moment de la comparaison avec un titrage antérieur, s’assurer que la même procédure d’épreuve a été utilisée, p. ex. technique en gel et non SIDAT ou PEG. Si la procédure n’était pas la même, la comparaison pourrait ne pas être valide.
	4. En général, les titres d’anticorps peuvent être plus élevés avec une technique en gel, car la sensibilité de cette épreuve est plus grande.
	5. Ne pas prendre de sérum ou de plasma inerte comme diluant lors de la préparation des dilutions de l’épreuve en gel. Éviter aussi l’ABS à 6 % en raison du risque de faux résultats positifs. Seule une solution saline isotonique doit servir à faire les dilutions.
	6. Des anticorps spécifiques à des antigènes peu fréquents non représentés sur les cellules à l’épreuve ne seront pas détectés.
	7. Il est possible que cette épreuve ne permette pas la détection d’anticorps en deçà du niveau seuil.
	8. 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.
	9. La présence dans le sérum d’anticorps réagissant à des composants de la solution de conservation pourrait entraîner de faux résultats positifs
	10. 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.
	11. 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.
	12. 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.
	13. 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.
	14. 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.
	15. De faux résultats positifs peuvent survenir si les cartes de gel présentent des signes de dessiccation.
	16. 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.
	17. 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.
	18. Pour assurer le bon déroulement de l’épreuve, il est essentiel de respecter les directives du dépliant du fournisseur.
2. **Références**
	1. Roback JD, éd. *American Association of Blood Banks Technical Manual*, 17e éd. Bethesda, MD : American Association of Blood Banks, 2011 : 633, 935=937, 907-908
	2. INSTRUCTIONS FOR USE Anti-Human Globulin Anti-IgG (Rabbit) MTS™ Anti-IgG Card, version 2.0

Joindre le dépliant courant du fabricant.

1. **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.010, maintenant TG.011
* Révision du libellé de la section 1.0
* Révision et renumérotation des sections 2.0, 5.0, 6.0, 7.0 et 8.0.
* Ajout de la référence 9.1 en 2.2
* Précision sur l’échantillon sanguin en 3.0 et ajout de « Voir la remarque 8.12 ».
* Mise à jour des références
 |