

UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

Mémoire de stage service CTS
5ème année pharmacie

Les équipements en
immuno-hématologie

Présenté par

AZZI Zeyneb

BELGAID Ahlam

BELBACHIR Ikram

BENASID Imane

SMAHI Chifaa Fatiha

Maitre de stage

Dr GHAFFOUR

2012

TLEMCEN



Remerciements :

En préambule à ce mémoire, on souhaite adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire. Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Dr Ghaffour, qui, en tant que Directeur de mémoire, s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

On exprime notre gratitude à tous le personnel du centre de transfusion sanguine qu'on a consulté lors des recherches effectuées et qui ont accepté de répondre à nos questions avec gentillesse et cœur ouvert.

Toutes les étudiantes qui ont travaillé pour la réalisation de ce mémoire tiennent à remercier sans doute leurs parents et leurs familles pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, on adresse nos chaleureux remerciements à tous les étudiants de pharmacie et tous les professeurs qui nous ont formé dès le premier jours jusqu'à la fin de notre cursus. .

Merci à tous et à toutes.



Plan d'étude

Introduction

Partie théorique :

Généralités sur l'immunohématologie

- Définition de l'immunohématologie.
- Applications de l'immunohématologie.
- Limites de détection.
- Rappel sur les groupes sanguins.
- Principe du groupage sanguin.
- Les examens pré-transfusionnels.
- Les techniques en immunohématologie.

Partie pratique :

- Les équipements en immunohématologie :
- Matériels.
- Réactifs.

- I. -Les exigences techniques.
- II. -Qualification et maintenance.
- III. -validation des techniques.
- IV. -Evaluation externe des qualités.

Conclusion :

Résumé

L'automatisation trouve une application particulièrement justifiée dans le domaine de l'immunohématologie dans laquelle toute défaillance humaine peut avoir des conséquences dramatiques pour les patients.

Les objectifs de l'automatisation, indissociables de l'informatisation, sont rappelés par la réglementation :

- *Diminuer* les risques d'erreur humaine relatifs à chaque étape de la réalisation des analyses ;
- *Garantir* une traçabilité fidèle de tous les éléments ayant contribué aux opérations analytiques;
- *Gérer* toutes les alarmes de dysfonctionnement du système.

Les principaux matériaux commercialisés permettent l'automatisation d'une partie de la phase pré-analytique et de tout ou partie des étapes de la phase analytique par la réalisation en routine des groupages ABO-RH1, des phénotypes RH-KEL, des recherches d'anticorps irréguliers et des épreuves de compatibilité.

Ils utilisent la réaction d'agglutination, que ce soit en microplaques ou en filtration.

On distingue deux types de matériaux :

- Les automates complets gérant toutes les étapes allant du positionnement du tube sur le portoir jusqu'au résultat final sans aucune manipulation des échantillons (ID gel station, Qwalys, Tango, Techno, Autovue, Galileo) et
- Les semi-automates qui nécessitent l'intervention de l'opérateur pour les phases de centrifugation, d'agitation et d'incubation (HémOs, Swing, Mitis2, Rosys), la phase de lecture étant automatisée pour tous.

De même, tous intègrent la possibilité d'une connexion au système informatique central. Si certains automates autorisent le choix des réactifs, d'autres ne peuvent fonctionner qu'avec les réactifs proposés par le fabricant.

Dans tous les cas, l'optimisation des systèmes automatisés implique une formation adaptée du personnel et le respect impératif des procédures par ce dernier.

Introduction

Durant cette année universitaire nous avons eu l'opportunité d'effectuer nos stages dans des services de biologie du CHU de Tlemcen, ce qui nous a permis de mieux nous imprégner du fonctionnement des laboratoires d'analyses médicales, d'acquérir plus d'informations et de connaissances et de lier la théorie à la pratique.

Notre premier stage s'était déroulé au centre de transfusion sanguine, pendant le mois sacré du ramadhan. Notre objectif principal était aussi sacré, apprendre à sauver des vies et notre slogan était et sera toujours « Un pouce vers le bas, c'est la fatalité, un pouce vers le haut, c'est la vie » et le sang est sans doute la vie.

Chaque travail doit donner ces fruits et ce mémoire est le fruit de notre expérience au centre de transfusion sanguine.

Dans ce mémoire nous tenons à vous présenter les principaux équipements et automates d'immunohématologie ayant grandement contribué au développement de la discipline du point de vue de la fiabilité, de la sécurité et de la qualité des résultats.

Mais avant d'entamer la partie pratique, nous proposons de donner un petit aperçu sur l'immunohématologie, les techniques pratiquées ainsi que les principaux groupes sanguins.

Partie Théorique

Généralités sur l'immuno-hématologie

☉ Définition de l'immuno-hématologie

L'immuno-hématologie est une partie de la médecine commune à l'hématologie et à l'immunologie.

Elle correspond à l'étude :

- Des antigènes portés par les éléments figurés du sang.
- De l'immunisation qu'ils peuvent induire.
- Des conflits qui en résultent.

L'immuno-hématologie est donc la science consacrée à l'étude des propriétés antigéniques du sang, des réactions immunologiques correspondantes, et des pathologies qui y sont associées.

Sont ainsi concernés les **groupes sanguins**, le **système HLA**, certaines pathologies auto-immunes, les **incompatibilités fœto-maternelles**, les réactions immuno-allergiques touchant les éléments figurés du sang, etc. Les personnes qui s'y consacrent sont des immuno-hématologistes.

Ces dernières années avec l'évolution de la science, l'immuno-hématologie nécessite aussi l'utilisation de la biochimie, de la génétique, du génie cellulaire et de l'histologie. Toutes ces disciplines ont permis de mieux comprendre les réactions antigènes-anticorps afin d'être plus précis dans les diagnostics.

📌 Antigène :

Substance de nature chimique diverse (protéique, lipidique, glucidique ou mixte) capable d'induire une réponse immunitaire et de réagir spécifiquement avec les effecteurs cellulaires et humoraux du système immunitaire.

Deux notions fondamentales sont associées à l'antigène :

- **Immunogénicité** : ou pouvoir antigénique.
- **Spécificité** : précision de la reconnaissance.

📌 Anticorps :

Médiateurs humoraux de la réponse immune par opposition aux médiateurs cellulaires.

- ➔ **Déterminant antigénique** : **épitope**.
 - ➔ **Site de liaison** de l'anticorps avec l'épitope : **paratope**.
- Ce sont des structures complémentaires.

La liaison Antigène/Anticorps obéit à la loi d'action de masse.



La force de liaison entre un Antigène et l'anticorps correspondant définit **l'affinité**. Cette réaction est **réversible**.

☉ Application de l'immuno-hématologie :

Les découvertes relatives à l'immuno-hématologie (IH) ont été essentiellement réalisées afin de parvenir à transfuser les malades et ainsi sauver des vies. Mais les différentes découvertes et la compréhension des antigènes des groupes sanguins ont permis d'utiliser l'immuno-hématologie dans diverses applications médicales :

- ➔ **La transfusion sanguine** : l'immuno-hématologie est à ce jour la discipline indispensable pour réaliser une transfusion sanguine. Elle est utilisée chez les donneurs de sang bénévoles afin de déterminer le groupe sanguin et le phénotype RH-KEL qui seront indiqués sur les produits sanguins

labiles et chez les receveurs (malades transfusés) afin d'assurer la compatibilité des produits sanguins transfusés. La recherche des anticorps est aussi réalisée.

- Le suivi des femmes enceintes : l'IH est utilisée lors de chaque grossesse afin de garantir la bonne santé du fœtus et de la mère. Outre la détermination du groupe sanguin afin de pallier à une hémorragie de la délivrance lors de l'accouchement par la réalisation d'une transfusion, des recherches d'anticorps irréguliers (RAI) sont réalisées tout au long de la grossesse afin de détecter une éventuelle immunisation de la mère à l'encontre de son enfant.
- Les incompatibilités fœto-maternelles (IFM) : l'immuno-hématologie est utilisée afin de chercher les raisons d'un problème de sang du nouveau-né (ictère) dans les premiers jours de sa vie. Elles permettront de déterminer le traitement à réaliser chez la mère comme chez l'enfant.
- La transplantation rénale : Le système ABO n'est pas exclusivement situé sur les globules rouges, il se trouve aussi sur différents tissus du corps humain. Ce système est un rempart important lors des transplantations rénales. Les systèmes HLA ont aussi une place importante lors de ces transplantations.
- Le diagnostic des anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI) : Certains malades développent des anticorps contre leurs propres globules rouges conduisant à leur destruction par phagocytose ou par lyse. Ce phénomène est appelé anémie hémolytique auto-immune. Le test direct à l'antiglobuline permet de mettre en évidence cette anémie.
- La recherche de paternité : Les différents systèmes érythrocytaires permettent de déterminer le lien de parenté entre l'enfant et ses parents. Cette méthode est de moins en moins utilisée au profit des recherches génotypiques de l'ADN.

⊙ Les limites de détection :

La limite de détection prend une part essentielle dans la lecture des résultats d'immuno-hématologie (IH) et dans la comparaison des résultats antérieurs. Les limites de détection varient d'une technique à l'autre. Il est donc indispensable lors de la réalisation des analyses et de leur interprétation que les techniciens et les biologistes en charges des analyses immuno-hématologiques les connaissent. Il existe plusieurs limites de détections :

- La quantité des anticorps : Chaque technique en immunohématologie a une limite à laquelle la quantité d'anticorps présents dans les échantillons du patient ne peut pas être détectée. Il peut donc conduire à l'obtention de résultats négatifs sur une technique et pas sur une autre. Les évolutions dans le domaine de l'immunohématologie ont permis de diminuer cette limite de détection.
- La température de l'analyse : La rencontre des anticorps et des antigènes utilisée lors des analyses d'IH ne se fait pas avec la même intensité. Elle dépend du type d'anticorps : IgG ou IgM. Cette température est appelée température optimale.
- La quantité des antigènes : Comme la quantité minimale des anticorps détectés, les techniques antisérum d'immunohématologie nécessitent un minimum d'antigène afin de pouvoir être détectés.
- La spécificité des analyses : Lors de la recherche d'anticorps irrégulier (RAI), les réactions peuvent être mises en évidence par des réactifs de type IgG, de type C3d, de type polyvalent. D'autres analyses peuvent être réalisées à la suite d'un traitement des globules rouges (papaïne, broméline). Ces traitements enzymatiques peuvent changer considérablement les résultats obtenus par une autre analyse car elles détruisent des systèmes antigéniques.
- L'effet prozone : Cet effet se produit lorsque la quantité des anticorps est trop importante par rapport aux nombre de sites antigéniques des globules rouges. Les anticorps se fixent sur les hématies mais ne permettant pas de créer un réseau et ainsi d'être observés à l'œil nu. Lorsque l'effet prozone se produit, le résultat est négatif, alors qu'il est réellement positif.

📌 Rappel sur les groupes sanguins :

Les groupes sanguins ou phénotypes érythrocytaires, correspondent à des antigènes membranaires de l'érythrocyte, dont l'expression est déterminée par une série de systèmes génétiques polymorphes.

Ces antigènes introduits dans un organisme qui les reconnaît comme étrangers, peuvent être la cible d'anticorps sériques naturels ou immuns, responsables d'une lyse cellulaire parfois grave, voire mortelle.

Cette notion s'exprime dans deux domaines de la pathologie : Les accidents immunologiques transfusionnels et l'incompatibilité fœto-maternelle.

29 systèmes de groupes sanguins ont été identifiés depuis la découverte du système ABO par Landsteiner en 1900.

Certains de nature glucidique comme les systèmes ABO, H ou LE, dont les extrémités terminales glycoprotéiques ou glycolipidiques membranaires portent les antigènes.

D'autres de nature peptidique, représentent l'expression directe des gènes et sont ancrés dans la membrane des hématies.

Au contraire des antigènes de nature peptidique, dont l'expression est souvent restreinte aux cellules sanguines et souvent limitée à l'homme, les antigènes glucidiques sont des antigènes tissulaires, présents dans de nombreux organes et exprimés dans d'autres espèces, y compris les bactéries.

Les anticorps anti-érythrocytaires dirigés contre ces systèmes de groupes sanguins, en se fixant sur la membrane érythrocytaire, entraînent fréquemment une diminution de la durée de vie des hématies et une hémolyse retardée par phagocytose. Ils peuvent parfois induire une hémolyse intravasculaire massive par activation du complément.

Les implications cliniques des conflits immunologiques mettent en jeu, de façon considérable, les antigènes de groupes sanguins. Il faut distinguer deux situations très différentes :

- La présence d'anticorps naturels dans le système ABO représente un obstacle infranchissable à toute transfusion « incompatible » dans ce système.
- L'immunisation et l'apparition d'anticorps irréguliers vis-à-vis du système RH ou d'un autre système « majeur » imposent de sélectionner des hématies (donneurs) compatibles pour les transfusions ultérieures.

Les informations à acquérir concernant les systèmes de groupes sanguins sont :

- Le groupe sanguin : correspond à un ensemble d'antigènes allotypique (allotypique signifie : différence d'un individu à l'autre de la même espèce. Les différences d'antigènes sont distribuées par groupe dans une population donnée).
- Il comporte des antigènes portés par la membrane du globule rouge.
- Ces antigènes sont génétiquement induits.
- Ces antigènes sont génétiquement indépendants au sens mendélien du terme.

Et pour la localisation des antigènes de groupe sanguin : Deux catégories d'antigènes existent :

- Les antigènes localisés à la fois sur les globules rouges et d'autres tissus : notion de **groupe tissulaire**.
- Les antigènes localisés **uniquement** sur le globule rouge.

Le système ABO

1) Historique :

En 1900, Landsteiner découvre que le sérum de certains individus agglutine les globules rouges d'autres individus. Cela prouve l'existence d'anticorps sériques définissant deux variétés d'antigènes érythrocytaires A et B. Ces caractéristiques s'avèrent être de transmission héréditaire et constituent le système de groupe ABO, premier système génétique connu, exprimant le polymorphisme humain.

En dehors de son intérêt théorique, puisqu'elle démontre l'existence d'antigènes différents et d'anticorps capables de les reconnaître à l'intérieur de notre espèce humaine, cette découverte a une application pratique immédiate d'une importance considérable puisqu'elle permet la réalisation sans danger apparent de transfusions sanguines efficaces. Et donc Karl Landsteiner est celui qui a découvert les antigènes A et B (agglutinogènes) et leurs anticorps antiA et antiB (agglutinines) respectifs.

2) Les antigènes A et B :

2-1. Répartition :

- a) Sur les hématies.
- b) Sur les autres cellules sanguines : leucocytes et plaquettes.
- c) Sur les autres tissus (sauf tissu conjonctif et système nerveux central).
- d) Dans les sécrétions : caractère sécréteur.

2-2. Nature biochimique :

Les antigènes A et B sont construits par des enzymes spécifiques: Les glycosyltransférases A et B. Ces antigènes sont des oligosaccharides portés par des glycolipides membranaires.

2-3. Le phénotype :

Il comporte l'ensemble des antigènes s'exprimant à la surface du globule rouge. Le groupage ABO comporte obligatoirement la recherche des anticorps sériques correspondants.

Par convention, le groupe sanguin ABO est défini par les antigènes présents à la surface des globules rouges. Le ou les anticorps présents dans le sérum correspondent à l'antigène ou aux antigènes absents à la surface des globules rouges.

2-4. Premier niveau de complexité :

Détermination de l'antigène A avec un anticorps anti-A de sujet B (le sujet B a obligatoirement des anticorps anti-A dans son plasma). Certaines hématies sont moins fortement agglutinées (hématies A2, 20 % des sujets) que d'autres (hématies A1, 80 % des sujets).

Six phénotypes courants sont observés : A1, A2, B, O, A1B et A2B.

2-5. Aspects génétiques :

Gènes : Ils sont localisés :

*Sur le chromosome 9 (bras long).

*Sur 2 loci homologues. Sur chaque locus se trouve un gène de la série allélique A, B, O.

Le gène A → Antigène A.
Le gène B → Antigène B.
Le gène O → aucun produit A ou B (il s'agit d'un gène amorphe).

| Génotypes | Phénotypes | Fréquence * |
|-----------------|------------|-------------|
| A/A, A/O et O/A | A | 45 % |
| B/B, B/O et O/B | B | 9 % |
| A/B et B/A | AB | 3 % |
| O/O | O | 43 % |

* population caucasóide

Du phénotype, le génotype n'est pas toujours déductible.

3) Les anticorps anti A et anti B :

3-1. Les anticorps anti A et anti B réguliers :

Ces anticorps comportent plusieurs caractéristiques.

2-1-1. Anticorps réguliers :

Ils sont régulièrement présents en l'absence de l'antigène correspondant.

Cas particulier du nouveau-né : il ne dispose pas de ces anticorps à la naissance (ex : un nouveau-né de groupe A n'a pas d'anticorps anti B dans son plasma).

3-1-2. Anticorps naturels :

Ils apparaissent de façon spontanée chez le nourrisson entre 3 et 6 mois.

3-1-3. Classe de ces anticorps :

Ce sont des anticorps complets :

- Immunoglobulines de classe M.
- Anticorps agglutinants en milieu salin.
- Anticorps plus actifs à plus de 4 C° qu'à 37 C°.

3-2 Anticorps anti A et anti B immuns :

Les caractéristiques de ces anticorps sont différentes de celles des anticorps réguliers. Ce sont :

- Des immunoglobulines de classe G observées le plus souvent chez le sujet O.
- Des anticorps non agglutinants en milieu salin.
- Des anticorps actifs à plus de 37 C°.

Ces anticorps sont « acquis » par stimulation immune (transfusion incompatible, grossesse ...).

Ils sont dangereux en transfusion et responsables d'accidents d'hémolyse indirecte (les anticorps du donneur contenus dans le plasma se fixent sur les globules rouges du receveur, entraînant leur destruction).

Cas particulier : phénotype Bombay :

Le terme Bombay correspond à un phénotype dans lequel les hématies n'expriment pas d'antigène H, et donc pas non plus d'antigène A ou B. Ce phénotype extrêmement rare et extrêmement dangereux en transfusion, a été décrit pour la première fois en Inde.

Il correspond à un gène H non fonctionnel à l'état homozygote dans des familles consanguines.

Le groupage sanguin donne apparemment un groupe O, mais ces individus possèdent, en plus des anti-A et anti-B, un anticorps naturel anti-H et agglutinent donc toutes les hématies à l'exception des hématies Bombay elles-mêmes. Ils ne peuvent donc être transfusés qu'avec des hématies Bombay.



Le système Lewis :

1. Historique :

En 1940 grâce à l'immunisation de lapins par le sang d'un singe : le Macacus rhésus, l'antigène Lewis est découvert. Ce système représente un cas particulier. Les antigènes sont en fait des substances synthétisées en dehors du globule rouge. Elles sont déversées du plasma puis vont s'adsorber sur les hématies.

2. Les antigènes :

Ce système comporte deux antigènes principaux :

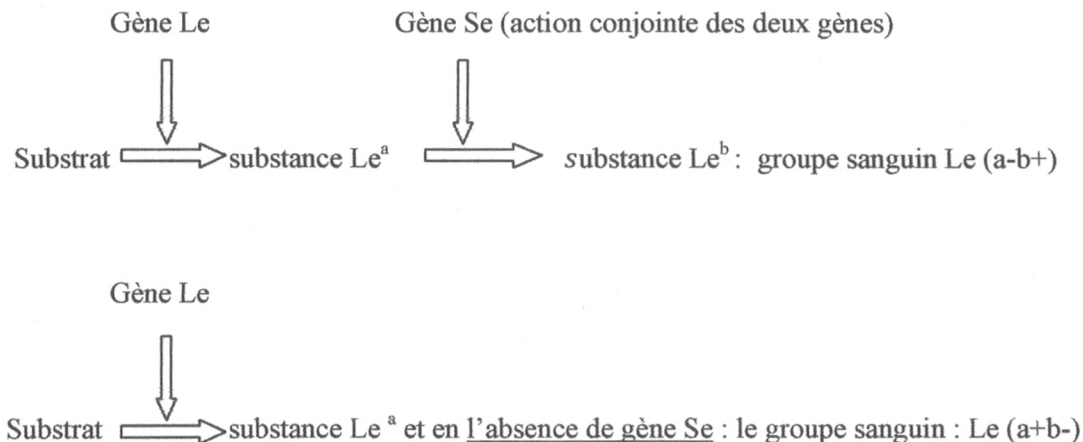
-Le^a [LE1].

-Le^b [LE2].

| Phénotype | * Fréquence |
|-------------------------------------|-------------|
| Le (a-b ⁺) | 0.70 |
| Le (a+b ⁻) | 0.20 |
| Le (a ⁻ b ⁻) | 0.10 |

-*Population caucasöide-

Les antigènes produits selon le schéma suivant :



Substrat , en l'absence des gènes Le et Se : groupe sanguin Le (a-b-)

3. Les anticorps :

L'anticorps le plus fréquent est l'anticorps anti-Le^a (anti LE1). Les anti-Lewis sont des anticorps naturels. Dans le domaine transfusionnel, ils sont peu importants mais dans quelques cas, ces anticorps sont lysant en présence de complément et à 37°C et doivent être respectés.

Le système RH :

Système complexe sur le plan de la nomenclature en raison de son polymorphisme.

1. Historique :

1-1. Découverte en 1939 par P.Levine et Stetson

Cadre de la maladie hémolytique de nouveau né.

1-2. Parallèlement en 1940, Landsteiner et Wiener :

L'hétéro-immunisation de lapins et de cobayes par des GR de Macacuscus rhesus induit l'apparition d'un anticorps qui reconnaît l'antigène découvert par P. Levine et Stetson. Cet anticorps agglutine environ 85% des hématies humaines.

2. Les antigènes :

Ils sont de 5 pour les plus importants : D, C, E, c, e.

2.1. Ag D [Rh1]:

Il définit le groupe RH standard avec un sérum anti-D. Chez les caucasoïdes, 85% des sujets et leurs GR agglutinés (Rh+) [RH1] et 15% non agglutinés (Rh-) [RH-1].

2.2. Les autres antigènes :

2.2.1. Ag C et c [RH2 et RH4] :

Ils sont antithétiques. Toute hématie C négative [RH2] est systématiquement c positif [RH4] et inversement ; il existe cependant d'exceptionnels sujets où cette donnée n'est pas vérifiée.

2.2.2. Ag E et e [RH3 et RH5] :

Ils sont antithétiques. Toute hématie E négative [RH3] est systématiquement e positif [RH5] et inversement. Il existe cependant d'exceptionnels sujets où cette donnée n'est pas vérifiée.

2.2.3. La complexité des Ag du système RH :

2.2.3.1- D faible (autrefois D^a) (++++)

Réactivité Rh faible.

Chez un sujet D faible, le nombre de molécules d'Ag D [RH1] présentes à la surface de l'hématie est plus faible que dans les cas habituels. En pratique, la définition du D faible reste dépendante des réactifs et des techniques employés par le laboratoire d'immuno-hématologie qui réalise les examens.

2.2.3.2-Biochimie et génétique :

Polypeptides de 30 Kd, homologues mais distincts Chromosome 1 (bras court).

Le système Rh comporte deux gènes liés :

- D
- CCEe

Existence sur la membrane du GR, d'un complexe avec les Ag des systèmes Ss [MNS] et Duffy [FY].

3-Les anticorps :

Les plus fréquents des anticorps irréguliers. Le système Rh représente le système le **plus important** en clinique.

Les anticorps sont par ordre de fréquence décroissante : Anti -D(le plus immunogène), anti-E , anti-c, anti-C, anti-e.

Ce sont des anticorps immuns acquis par : grossesse, transfusion. Ils appartiennent à la classe G des immunoglobulines et sont des anticorps incomplets.

L'immunisation est fonction :

- D'une aptitude individuelle à répondre à l'antigène,
- De la qualité de l'antigène,
- De la répétition des injections,
- De l'existence d'une incompatibilité ABO entre donneur/receveur et fœtus /mère.



Systeme Kell

1-Antigenes :

Le système le plus immunogène après le système RH. Il possède 2 antigènes principaux : K (KEL1) et k (KEL2, Cellano) portés par une glycoprotéine membranaire dont l'expression se trouve restreinte à la lignée érythrocytaire.

| Phénotype | génotype | *fréquence |
|-----------|----------|------------|
| K+ k- | KK | 0.002 |
| K+k+ | Kk | 0.088 |
| K-k+ | kk | 0.910 |

-*Population caucasöide-

En France 9% des sujets sont K positif.

2-Les anticorps :

L'anticorps le plus fréquent est l'anticorps anti-K (anti-KEL1), acquis par allo-immunisation par grossesse ou transfusion). C'est un anticorps incomplet qui appartient à la classe IgG.

D'autres anticorps existent : anti-k (antiKEL2), anti-kpb etc... Ces derniers peuvent se développer immédiatement après la première transfusion. Ils sont dangereux pour le receveur (accident hémolytique).



✚ Systeme Duffy :

1. les antigenes :

1.1. Les antigenes les plus frequents :

Ce sont les antigenes Fy^a [FY1] et Fy^b [FY2].
Chez les caucasoïdes :

| Phenotype | Genotype | Frequence |
|------------|-------------------|-----------|
| $Fy(a+b-)$ | $Fy^a Fy^a$ 0.195 | |
| $Fy(a-b+)$ | $Fy^b Fy^b$ | 0.330 |
| $Fy(a+b+)$ | $Fy^a Fy^b$ | 0.475 |

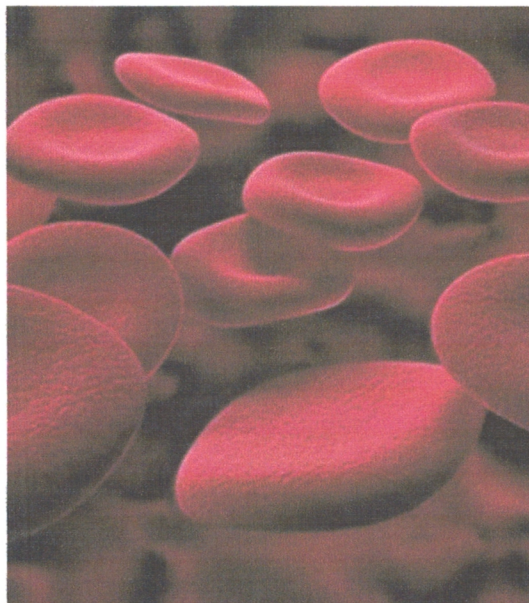
1-2-Le phenotype $Fy(a-b-)$ [FY-1-2].

Très frequente chez les noirs (jusqu'à 70%). Il existe chez ces sujets un allele silencieux FY.

2. les anticorps :

Ils apparaissent par :

- Allo-immunisation (grossesse, transfusion) et sont des IgG.
- Anti- Fy^a (antiFY1) (IgG) est le plus frequente mais très rare chez les noirs.
- Anti- Fy^b (antiFY2).



✚ Système Kidd :

1. Antigènes : 2 sont décrits :

- Ag JK^a [JK1] très immunogène.
- Ag JK^b[JK2]

| Phénotype | Génotype | Fréquence |
|-----------|---------------------------------|-----------|
| JK (a+b-) | JK ^a JK ^a | 0.28 |
| JK (a-b+) | JK ^b JK ^b | 0.22 |
| JK (a+b+) | JK ^a JK ^b | 0.50 |

Le phénotype JK(a-b-) [JK-1-2] est exceptionnel.

Le gène JK est localisé sur le bras long → chromosome 18.

Ces gènes sont localisés sur une protéine de transport de l'urée insérée dans la membrane du GR.

2. Les anticorps :

Ils sont acquis par allo-immunisation, ce sont des IgG. Le plus fréquent en clinique est l'anticorps anti-JK^a(anti-JK1).

L'identification de l'anticorps anti-JK^a est très difficile chez les malades polytransfusés, même par un laboratoire d'immuno-hématologie performant. C'est un anticorps qui fixe bien le complément. Il est dangereux en transfusion.

A cause de la difficulté de son identification, sa présence doit être évoquée ou soupçonnée devant tout accident hémolytique ou transfusion inefficace (le taux d'hémoglobine mesuré chez le patient après transfusion de GR est identique ou inférieur à celui déterminée avant la transfusion) inexpliquée.



Système MNSs :

1. Les antigènes :

Il doit prendre en compte quatre antigènes principaux :

- Ag S (MNS3).
- Ag s (MNS4).
- Ag M [MNS1].
- Ag N [MNS2].

Les antigènes M et N sont portés par la glycophorine A et les antigènes S et s par la glycophorine B. Ces glycophorines sont importantes dans la membrane du globule rouge.

Les antigènes M et N sont antithétiques. Les antigènes S et s, antithétiques également, sont génétiquement liés au Ag M et N. Il y a 09 phénotypes correspondant à 10 génotypes.

2. Les anticorps :

Les plus fréquents en pratique transfusionnelle sont les anticorps anti-S et anti-s. Ils apparaissent par allo-immunisation et sont des IgG. L'anti-S le plus fréquent, est à l'origine d'accidents hémolytiques et transfusionnels et de maladies hémolytiques de fœtus et de nouveau-né sévères avec dans certains cas de décès.

Cas particulier de l'anticorps anti-U :

Certains sujets n'ont pas l'Ag U et sont aussi dépourvus des Ag S et s. Ces sujets peuvent fabriquer un anticorps anti-U. Cet anticorps n'existe pas chez les sujets noirs. Les anticorps anti-M et anti-N sont des anticorps naturels.



Ⓢ Principe du groupage sanguin :

Le groupage sanguin consiste donc à trouver l'antigène des globules rouges d'un individu pour le faire appartenir à un groupe. Ce terme est surtout utilisé pour le système ABO qui donne donc les groupes A, B, AB et O.

Le phénotypage consiste aussi à rechercher les antigènes à la surface des globules rouges afin de définir le phénotype du patient pour ce système. Pour le système ABO, le patient n'est plus A, B, AB et O mais, ABO : 1,-2,-3,-4 pour un sujet A2 (dépend des règles internationales).

Pour déterminer le groupage ou le phénotypage, il faut rechercher l'antigène à la surface des globules par l'intermédiaire d'anticorps qui sont le plus souvent des anticorps monoclonaux.

Le principe consiste à mettre en contact un sérum contenant l'anticorps spécifique à l'antigène (anti-sérum) aux globules rouges du patient. Après un temps d'incubation plus ou moins long qui permet de laisser le temps aux anticorps de venir à la rencontre des antigènes et de s'y fixer. Si l'anticorps se fixe à l'antigène, alors le patient contient l'antigène correspondant à l'anticorps.

Par exemple, si l'on utilise un anti-sérum anti-A est qu'on le met en contact avec les hématies du patient, s'il y a formation du complexe immun antigène-anticorps, alors le patient a l'antigène A, mais cela ne signifie pas qu'il soit du groupe A, mais du phénotype ABO : 1.

La réaction antigène-anticorps est appelée agglutination. Celle-ci peut être soit visible à l'œil (essentiellement produit par les anticorps anti-IgM), soit elle doit être mise en évidence par un anticorps anti-anticorps (anti globuline). Cet anticorps a la capacité de se fixer aux fractions Fc des immunoglobulines afin de faire un réseau. Cette anti globuline est essentiellement utilisée afin de mettre en évidence des réactions de sensibilisation par des anticorps IgG.

Le système ABO possède une particularité réglementaire pour la réalisation de son groupage car il présente deux épreuves indissociables l'une de l'autre : l'épreuve globulaire (Beth-Vincent) et l'épreuve sérique (Simonin).

Pour réaliser les groupages et les phénotypes, plusieurs techniques peuvent être utilisées avec des limites de détection et des intérêts de mise en œuvre très différentes, conduisant à un choix très spécifique aux différents laboratoires d'analyses médicales.

⊙ Examens pré-transfusionnels :

| | |
|--|---|
| Groupages sanguin ABO-RH1(D) Phénotype RH-KEL1 RAI | Obligation avant tout transfusion |
| Epreuve Directe de Compatibilité au Laboratoire | Obligatoire selon la situation clinique |

● **Le groupage sanguin ABO-RH1**

La détermination des groupes sanguins ABO-RH1 est une étape primordiale de sécurité transfusionnelle. Elle doit respecter des règles bien définies dictées par la législation en vigueur et dont le non respect peut être à l'origine d'accident hémolytique d'incompatibilité ABO.

■ **Le groupage ABO :**

La détermination du groupe sanguin ABO, indissociable de groupe RH1, s'inscrit dans un contexte potentiel pré-transfusionnel pré ou périnatal.

Le groupage ABO comporte obligatoirement 2 épreuves complémentaires, épreuve globulaire de BETH-VINCENT) et l'épreuve sérique de SIMONIN:

➤ **BETH-VINCENT :**

Cette méthode s'effectue avec des sérums test contenant des anticorps connus, afin de rechercher des antigènes A et B c'est une réaction Ag-Ac et la présence ou l'absence d'agglutination permet de déterminer l'antigène.

● **La réalisation du contrôle :** il faut :

- Une plaque d'opaline,
- Une carte de contrôle pré-transfusionnelle,
- Des sérum-tests anti A, anti B, anti AB: Vérifier la date de péremption et la conservation à + 4°C,
- Un agitateur,
- Un marqueur,
- Des gants,
- Le nécessaire pour essuyer l'agitateur,
- Nécessaire de nettoyage.

● **Les techniques :**

Technique sur plaque d'opaline.

Technique en tube.

Résultats :

| Anti B | Anti A | Anti AB | Détermination |
|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Pas de réaction | Agglutination | Agglutination | Groupe A |
| Agglutination | Pas de réaction | Agglutination | Groupe B |
| Agglutination | Agglutination | Agglutination | Groupe AB |
| Pas de réaction | Pas de réaction | Pas de réaction | Groupe O |

NB : il est important d' :

- Inscrire sur le support: le nom, prénom, date de naissance du patient, la date du contrôle et le numéro de la poche.

- Inscrire sérum anti B, anti A, anti AB sur la plaque d'opaline.

➤ L'EPREUVE DE SIMONIN :

Elle se réalise à l'aide d'hématie-tests connues et permet d'identifier les ac naturels réguliers du plasma.

• Les techniques :

Technique sur plaque d'opaline.

Technique en tube.

• Résultats :

| Hématies A | Hématies B | Détermination |
|-----------------|-----------------|---------------|
| Pas de réaction | Agglutination | Groupe A |
| Agglutination | Pas de réaction | Groupe B |
| Pas de réaction | Pas de réaction | Groupe AB |
| Agglutination | Agglutination | Groupe O |

■ Le groupage RH1 :

• Techniques de détermination du Rhésus :

Détermination sur une plaque chauffée à une température de 40°C, nécessite la disponibilité de réactifs spéciaux particulièrement avides. C'est une technique de choix pour les urgences mais présente 2 inconvénients : risque de fausse réaction positive et consommation importante de sérum-test.

Détermination en tube dans des tubes Kahn ou des microtubes. Le mélange est laissé 1 à 2 heures à 37°C, à 37° à l'aide d'un rhésuscope (Plaque d'opaline chauffée à 37°) + sérum test Anti D ou à température ambiante avec sérum anti D spécifique monoclonal agissant à froid.

• Réalisation :

- Brancher et allumer le rhésuscope.

- Mettre en contact le sérum-test anti D avec une goutte de sang du patient, mélanger avec un agitateur, attendre 2 à 3 minutes et déterminer le rhésus.

• Détermination :

| Sérum Anti D | Détermination |
|-----------------|---------------|
| Agglutination | RH+ |
| Pas de réaction | RH- |

Remarque :

Pour qu'un groupage ABO-RH1 soit définitif il faut 2 déterminations effectuées sur 2 prélèvements différents réalisés par 2 techniciens de préférence à distance l'un de l'autre étiqueté selon la procédure réglementaire après vérification chaque fois de l'identité du patient.

● Phénotypage RH-KEL1 :

La détermination du phénotype RH-KEL1 consiste à rechercher la présence ou l'absence des antigènes érythrocytaires RH2,RH3,RH4,RH5 et KEL1 à l'aide de réactifs de préférence monoclonaux avec les contrôles de qualité interne obligatoire.

- **Techniques :**

Différentes techniques sont disponibles mais il est préconisé d'utiliser des supports à usage unique en particulier ceux permettant l'automatisation telles les microplaques ou colonnes de filtration.

- **Phénotypage étendu :**

Cette analyse consiste à rechercher un ou plusieurs antigènes érythrocytaires autres que ceux qui sont définis par le groupage ABO.RH1 et par le phénotypage Rh-KEL 1.

C'est un phénotypage associé à la détermination d'au moins un autre antigène érythrocytaire (CW, antigènes du système Duffy, Kidd, Lewis, Ss...)

NB : Un phénotypage étendu valide est réalisé sur deux prélèvements différents à raison d'une détermination par prélèvement.

- **Indications :**

Systématique dans le cas d'allo-immunisation érythrocytaire complexe, à titre préventif chez certains polytransfusés itératif(thalassémie, drépanocytose...) et pour valider l'identification d'anticorps anti érythrocytaire dirigés contre un ou plusieurs antigènes érythrocytaire autre que ceux définis par le groupage ABO-RH1 et le phénotypage RH-KEL1.

- **La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers (RAI) :**

- **Définition**

Un allo-anticorps anti-érythrocytaire ne peut exister que si l'antigène correspondant des globules rouges est absent. S'il est présent à chaque fois, il est dit « régulier » dans le cas contraire, il est dit « irrégulier »

- **Intérêt**

Prévention et diagnostic des incompatibilités anti-érythrocytaire en transfusion.
Surveillance des incompatibilités fœto-maternelles (IFM) érythrocytaires non ABO et obstétrique.

- **Principe**

La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires irréguliers est la mise en évidence, dans le sérum d'un patient, des anticorps irréguliers dirigés contre des antigènes érythrocytaires différents de ceux du système ABO.

Le sérum à tester est mis en présence des hématie-tests de groupe O et de phénotypes connus dans les principaux systèmes de groupe sanguins ayant une incidence transfusionnelle. (RH, KEL, FY, JK, MNS, etc...). La RAI est obligatoire avant toute transfusion du culot de globules rouge.

La RAI doit être réalisée dans un prélèvement frais et conservé dans de bonnes conditions +4°C, sa durée légale de validation est de 3jours mais ce qui serait recommandé une durée de validation de :

- 24H si transfusion < 3 semaines,
- 72H si le patient a eu une transfusion il y a plus de 3 semaines et moins de 6 mois,
- 3 semaines si pas de transfusion ou antécédents obstétricaux depuis moins de 6 mois.

En situation post-transfusionnelle, le médecin prescrit une RAI qui sera effectuée de préférence entre la 3^{ème} et 5^{ème} semaine, car il s'agit du moment idéal pour détecter l'apparition d'un anticorps. En effet le taux plasmatique peut chuter jusqu'à devenir indétectable dans les semaines qui suivent.

- **Indications**

Patient susceptible d'être transfusé,
Avant toute transfusion ou nouvelle série de transfusion,
Après transfusion (dans le cadre de suivi d'hémovigilance),
Femme enceinte et
Polytransfusés.

- **Réalisation de la RAI**

Elle comporte deux étapes dont l'enchaînement est sous la responsabilité du biologiste :

- ❖ **Une première étape « dépistage »**

Au terme de laquelle le laboratoire pourra répondre « dépistage positif » ou « dépistage négatif » d'anticorps anti-érythrocytaires. En cas de dépistage positif, l'identification de l'anticorps est obligatoire.

- ❖ **Une seconde étape « identification »**

L'étape d'identification consiste à déterminer la spécificité du ou des anticorps présents. Cette étape est réalisée sur un échantillon non décanté et non ouvert si possible, si elle est mise en œuvre par un laboratoire différent de celui qui a réalisé le dépistage.

- ◆ Pour les deux étapes, la méthodologie technique repose sur la mise en œuvre d'un test indirect à l'anti globuline polyspécifique ou anti-IgG permettant de détecter, sur colonne de filtration ou en immuno-adhérence, un anti-RH1 humain de concentration égale à 20 ng/ml ou d'autres techniques de sensibilité au moins égale.
- ◆ Lors de la phase d'identification, il peut être utile voire indispensable d'utiliser en complément les techniques dites enzymatiques notamment dans le cadre de difficulté d'identification (association d'alloanticorps) et lors des étapes de diagnostic biologique des accidents immunohémolytiques transfusionnels.

L'interprétation des réactions positives et négatives observées nécessite qualification, formation et expérience certaine.

- **Les différentes techniques de RAI**

1/Le test indirect à l'antiglobuline dont les variantes sont les suivants :

- Le TIA normal,
- Le TIA à basse force ionique,
- Le TIA par gel-filtration,
- Le TIA en phase solide.

2/ Test aux enzymes protéolytiques avec 2 techniques :

- Technique par filtration,
- Technique en phase solide.

- **Epreuves directes de compatibilité ou (EDC) :**

- **Définition**

Les épreuves de compatibilité sanguine consistent à tester directement le sérum du receveur et le sang que l'on va injecter au cours de la transfusion.

La compatibilité receveur/donneur doit être examinée par technique sensible, donc par un laboratoire compétent. Cependant un ultime contrôle de compatibilité doit obligatoirement et légalement être pratiqué au lit du malade avant toute transfusion par la personne pratiquant l'acte transfusionnel.

Epreuve Directe de Compatibilité au Laboratoire

Epreuve personnalisée permettant la vérification au laboratoire de la compatibilité de chaque unité de globules rouges à transfuser avec le sérum du receveur donc s'assurer de l'absence de réaction entre les anticorps du receveur et les antigènes portés par les globules rouges des poches à transfuser.

- **Intérêt et indications**

Epreuve de compatibilité directe au laboratoire est fondamentale pour la prévention des accidents immuno-hémolytiques transfusionnels. Cet examen est obligatoire en cas de transfusion prévue pour les patients ayant développé un alloanticorps (RAI positive), les nouveau-nés présentant un test direct à l'antiglobuline positif ou d'une mère alloimmunisée, les fœtus et les patients possédant un phénotype érythrocytaire rare. L'EDC est recommandée pour les femmes en cours de grossesse et pour les sujets polytransfusés.

- **Modalités techniques de(EDC)**

(EDC) est un examen qui ne dispense pas de la vérification ultime au lit du malade ni de RAI car ces derniers sont obligatoire alors de (EDC) est complémentaire de la RAI et ne prévient pas l'allo-immunisation RH/KEL.

En plus du fait qu'elle présente un délai maximal de validation de 3 jours, elle s'effectue dans les mêmes conditions techniques que la RAI après sélection des unités à comptabilisation et préparation des hématies de la tubulure de l'unité à transfuser.

Une des difficultés du test réside dans la sécurisation de l'identification positive de la tubulure et des tubes secondaires utilisés dans le test à partir du numéro codé en barres de l'unité PSL. Il est donc souhaitable de :

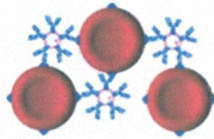
- Prendre des mesures indispensables au maintien de la chaîne du froid,
- D'identifier la tubulure du PSL à l'aide d'une étiquette codée en barres disponible sur la poche avant de la désolidariser de la poche,
- Dupliquer le numéro codé en barres sur des étiquettes qui seront apposées sur les tubes secondaires et les supports utilisés,
- De vérifier informatiquement l'étiquetage secondaire du tube et du support par rapport au concentré globulaire,
- Pour des raisons évidentes d'hygiène et de sécurité, il est fortement recommandé d'utiliser des dispositifs à usage unique pour perforer la tubulure.

- **Techniques en immuno-hématologie**

Pour réaliser le groupage ou le phénotypage d'un individu, les laboratoires possèdent plusieurs techniques qui ont été développées avec les progrès techniques scientifiques. Ces techniques consistent à mettre en évidence la réaction antigène-anticorps (agglutination). Les méthodes de détection de cette réaction n'ont cessé d'évoluer.

Au principe de l'agglutination spontanée base de la découverte des premiers systèmes de groupes sanguins se sont ajoutés des artifices multiples ayant permis l'agglutination des hématies sensibilisées par des anticorps non directement agglutinants (test à l'antiglobuline).

✦ Agglutination spontanée :

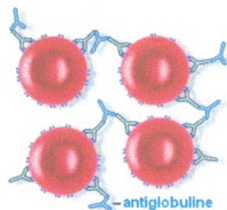


Il se forme alors un complexe immunitaire qui est visible à l'œil. Cela se caractérise par un amas de globules rouges avec un éclaircissement de la solution réactionnelle. La visibilité de cette agglutination est due aux caractéristiques de l'IgM (pentamère) qui permet pour un anticorps de fixer plusieurs globules rouges et ainsi faire un réseau visible.

Les IgG, par leur caractère monomérique, n'ont pas le pouvoir d'agglutination directe sauf pour l'IgG3 qui a un fragment Fc plus long, qui lui permet de créer un réseau par adhérence des fractions Fc entre elles.

✦ Test à l'antiglobuline (test de Coombs)

Ce test permet, grâce à un sérum antiglobuline humaine, de révéler la présence d'anticorps spécifiques fixés sur l'antigène correspondant à la surface de l'hématie, dans le cas où cette fixation ne s'est pas traduite par leur agglutination directe.



• Principe général

Les anticorps incomplets sont capables de se fixer sur les hématies porteuses de l'antigène homologues sans provoquer une agglutination en milieu salin.

Cette liaison antigène-anticorps est suffisamment solide pour que la globuline anticorps ne se détache pas de la surface de l'hématie, même après plusieurs lavages. Au contraire, les globulines ou d'autres protéines qui peuvent s'absorber de manière non spécifique des érythrocytes seront pour une grande part éliminées par ce lavage et se retrouveront dans le surnageant.

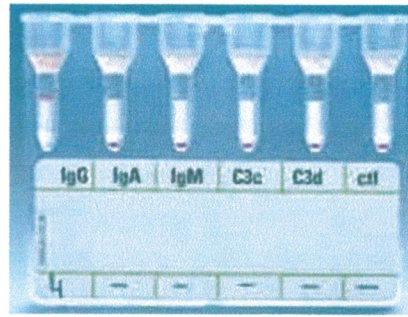
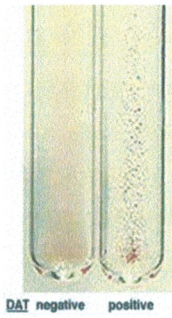
On provoque l'agglutination des hématies ainsi sensibilisées en les mettant en présence d'un réactif antiglobuline reconnaissant spécifiquement et donc se fixant sur l'anticorps lié aux antigènes globulaires. Il existe deux variantes de la réaction de Coombs ; le test de Coombs direct et le test de Coombs indirect.

■ Le test de Coombs direct :

Ce test s'applique aux cas où les hématies sont sensibilisées *in vivo*. C'est le cas des anémies hémolytiques à auto-anticorps ou dans la maladie hémolytique du nouveau-né. Dans ces conditions, la mise en contact des hématies lavées avec l'antiglobuline entraîne l'agglutination en une seule réaction.

Remarque :

En cas de réaction positive avec l'antiglobuline polyvalente, la nature de l'autoanticorps peut être déterminée en refaisant un test de Coombs avec des antiglobulines monospécifiques : anti-IgG, anti-IgM ou anti-complément, en utilisant des sérums Coombs spécifiques (tubes et gel-tests). On peut même quantifier en utilisant des dilutions croissantes d'antiglobuline.



Techniques en tube

Techniques par filtration en gel-test

Le TIA :

Se fait en deux temps : dans un premier temps, on sensibilise in vitro les hématies à l'aide de l'anticorps utilisé. Dans un deuxième temps, après lavage, l'adjonction d'antiglobuline provoque l'agglutination des hématies sensibilisées

On peut ainsi soit identifier l'anticorps si on utilise un antigène connu (recherche d'agglutinine irrégulier dans le sérum) soit identifier l'antigène si c'est l'anticorps qui est connu (phénotypage érythrocytaire).

Remarque :

Ce test peut se faire en tube ou sur plaque d'opaline. Dans l'une de ces techniques comme dans l'autre 3 étapes sont indispensables pour la réalisation du test de Coombs indirect :

- **Sensibilisation**

Déposer successivement dans un tube de Kahn, 1 goutte de sérum et 1 goutte de globule rouge préalablement lavés et remis en suspension en soluté salé physiologique à 5% ; Incuber 45 minutes à la température optimale d'activité de l'anticorps et à 37°C pour les anticorps anti-Rh(étuve) ; Rechercher une hémolyse éventuelle qui se traduit par une coloration plus ou moins rosée du surnageant ; Remettre le culot globulaire en suspension dans le petit volume de liquide restant et noter le cas échéant l'intensité de l'agglutination apparue. Si l'agglutination est totale (+++), il est évidemment inutile de poursuivre.

- **Lavage**

Pratiquer 4 lavages en soluté physiologique en utilisant 1 volume de globules rouges pour environ 50 volumes de soluté ; Noter une agglutination éventuelle après le premier lavage.

- **L'adjonction de l'antiglobuline**

Préparer à partir du dernier culot de lavage, une suspension saline à 2% si on doit effectuer le test en tube et à 5% si on doit effectuer le test sur plaque ; Déposer 1 goutte de cette suspension avec 1 goutte d'antiglobuline à la dilution convenable.

Test de Coombs indirect à basse force ionique :

- **Principe**

Il est possible d'augmenter la sensibilité de la réaction de Coombs, en particulier pour la détection de certains anticorps importants en transfusion (anti-D, C, E, c, e, anti-Kell, anti-Duffy, anti-Kidd), par l'utilisation d'un milieu de dilution à basse force ionique. Un tel milieu se substituant au NaCl à 9 p.1000 habituellement employé, a l'avantage de raccourcir également le temps d'incubation nécessaire à la sensibilisation des hématies.

- **Réactifs**

Le milieu de dilution à basse force ionique utilisé est la solution de Low et Messeter (solution BFO du centre national de transfusion sanguine, référence 3630C et 3635W).

- **Technique**

1) Préparation de la suspension globulaire

Les hématies doivent être lavées trois fois en soluté physiologique puis mises en suspension à 2% dans le tampon à basse force ionique.

2) Sensibilisation des hématies et lavage

3) Réaction avec l'antiglobuline et lecture.

- **Applications**

- RAI : le test de coombs à basse force ionique, associé au test à la papaïne, permet de mettre en évidence la majorité des allo-anticorps irréguliers d'intérêt transfusionnel.
- Test de compatibilité : en raison de la rapidité d'exécution du test.
- Phénotypages.

- ◆ **Techniques actuelles d'agglutination**

- ♣ **Technique en tube :**

Il faut utiliser des tubes en verre à usage unique. Le choix du type de tube est indifférent. Cependant le tube de **Kahn** (longueur 80mm diamètre inférieur 10mm) est préférable au tube à hémolyse moins résistant à la centrifugation. Cette méthode est très utilisée lors de difficultés de groupage sanguin.

- ◆ **Pour l'épreuve globulaire (Beth-Vincent) :**

Déposer et repérer au marqueur 3 tubes, déposer :

Dans le premier tube, 1 goutte de sérum-test antiA

Dans le deuxième tube, 1 goutte de sérum-test antiB

Dans le troisième tube, 1 goutte de sérum-test antiA+B

Dans chacun de ces 3 tubes, déposer une goutte de globule rouge échantillons en suspension à 5%, mélanger en agitant légèrement puis centrifuger une minute à 1000 trs/min.

La lecture d'effectue en secouant légèrement les tubes et en observant simultanément le comportement des globules rouges :

S'ils se remettent aisément en suspension, il y a absence d'agglutination.

S'ils se présentent sous forme d'un culot se décollant difficilement en un ou plusieurs blocs, il y a présence d'une agglutination.

- ◆ **Pour l'épreuve plasmatique (Simonin-Michon) :**

Déposer et repérer au marqueur 3 tubes,

Déposer dans chaque tube une goutte de sérum ou de plasma échantillon, ajouter :

Au premier tube 1 goutte de suspension de globules-test A,

Au second tube 1 goutte de suspension de globules-test B,

Mélanger en agitant légèrement puis centrifuger une minute à 1000 trs/min.

La lecture est comme celle indiquée précédemment.

- **Témoins**

Déposer et repérer au marqueur 3 tubes,

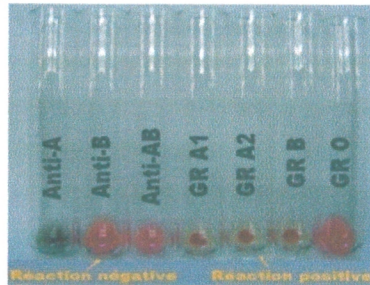
Déposer dans les 2 premiers tubes 1 goutte de sérum ou plasma échantillon, ajouter :

Au premier tube 1 goutte de suspension de globules-test O (témoin « allo »),

Au second tube 1 goutte de suspension de globules rouges échantillons (témoin « auto »),

Déposer dans le troisième tube 1 goutte de sérum AB et 1 goutte de suspension de globules rouges échantillons (témoin « AB »).

Lecture de la technique en tube :



- ♣ **Technique sur plaque :**

- ❖ **Sur plaque d'opaline**

- **Pour l'épreuve globulaire (Beth-Vincent) :**

Déposer sur la plaque d'opaline de haut en bas ou côté à côté :

1 goutte de sérum-test antiA,

1 goutte de sérum-test antiB,

1 goutte de sérum-test antiA+B.

Déposer à chacune de ces gouttes 1 goutte de globule échantillon à tester en suspension à 10% en soluté salé isotonique.

- **Pour l'épreuve sérique (Simonin-Michon) :**

Déposer sur la plaque d'opaline de haut en bas ou côté à côté, 3 gouttes de sérum ou plasma échantillon,

A côté de chacune de ces gouttes déposer sélectivement :

Une goutte de globule-test A en suspension de 5 à 10 %,

Une goutte de globule-test B en suspension de 5 à 10%.

- **Témoin**

On utilise d'une manière systématique 3 témoins :

Témoin « auto » : sérum ou plasma échantillon + globules rouges. Il permet le contrôle des agglutinations observées dans les 2 épreuves,

Témoin « allo » sérum ou plasma échantillon + globules rouges test de groupe O et de constitution antigénique connue. Il contrôle l'épreuve de Simonin,

Témoin AB sérum ou plasma-test provenant d'individus de groupe AB + globules rouges échantillon. Ce témoin contrôle l'épreuve de Beth-Vincent.

- **Lecture des résultats**

Mélanger soigneusement à l'aide d'une baguette de verre rodée ou sur fond d'un tube, les globules et les sérums ou plasma, pour obtenir un rond de 2cm environ de diamètre. L'agitateur doit être changé ou essuyé très soigneusement après chaque mélange.

Après une première remise en suspension obtenue en faisant légèrement osciller la plaque d'opaline, laisser reposer 30 secondes environ, puis lire toute en imprimant à la plaque un lent mouvement continu d'oscillation circulaire.

NB :

L'agglutinat de l'épreuve globulaire est en général très rapide à apparaître, ceux de la réaction sérique plus fins et plus lents.

L'intensité de la réaction doit être notée,

La présence de globules non agglutinés, d'hémolyse partielle ou totale doit également être soigneusement notée.

Dans le cas de la technique en plaque, la cinétique de la réaction est utile à noter : apparition plus ou moins rapide des agglutinats ou modification du temps, de leur taille ou de leur forme.

❖ **technique en microplaques :**

Cette technique est identique à celle en tube sauf que la réaction se fait dans des micro-cupules positionnées sur une plaque. Elle nécessite l'utilisation d'une enzyme protéolytique, la broméline qui permet de diminuer le potentiel zêta des globules rouges afin de faciliter le contact des anticorps avec les antigènes. Cette enzyme réduit la charge du globule rouge par la suppression de plusieurs antigènes à la surface du globule rouge. La méthode des microplaques est utilisée pour la réalisation du groupe ABO et du phénotype Rhésus, Kell.

Remarque :

La société Diagast a innové cette technique avec la magnétisation des hématies qui évite la centrifugation de la plaque pour mettre les globules rouges au fond de la cupule.

En fait, les hématies sont magnétisées puis un champ magnétique est utilisé afin de mettre les globules rouges au fond du tube. La société Diagast par cette méthode a gagné de la place sur ses automates Qwalys en supprimant la centrifugeuse.

Lecture de technique en microplaque



• **Avantages**

Les réactifs adaptés à ce support permettant un gain de spécificité-sensibilité par rapport aux techniques conventionnelles.

Diminution de consommation des réactifs et des échantillons,

Réduction de l'encombrement de paillasse,

Gain de temps,

Pré-préparation des réactifs possible qui contribue à améliorer la fiabilité des résultats en supprimant des risques d'erreur liés à l'oubli ou l'écart de distribution,
Hygiène et sécurité,
Automatisation possible.

- **Inconvénients**

L'agitation est la phase critique. En effet, les multiples réactions simultanément présentes sur le support n'ont pas la même cinétique de remise en suspension. Il convient donc, lors de cette phase qui doit être réalisée sous contrôle visuel, d'être particulièrement attentif surtout en cas de phénomène d'adhérence de certains réactifs.

- **Techniques en filtration :**

Cette méthode consiste à détecter une agglutination par filtration des hématies au travers d'une micro-colonne contenant un milieu défini (microbille ou gel..ect). Trois types de procédés sont couramment mis en œuvre.

- **le gel test**

Typage et détection d'anticorps par test indirect à l'antiglobuline :

Dans ces conditions le milieu contient des antiglobulines humaines et des particules de gel fonctionnant comme un filtre qui arrête, après centrifugation, des hématies sensibilisées « in vitro » par l'anticorps spécifique et laisse passer celles qui ne le sont pas.

Typage par agglutination en solution saline 0,15M

Dans ces conditions le milieu contient un sérum test et les hématies portant l'antigène correspondant sont arrêtées, alors que des hématies dépourvus de cet antigène traverseront le gel sans y arrêter.

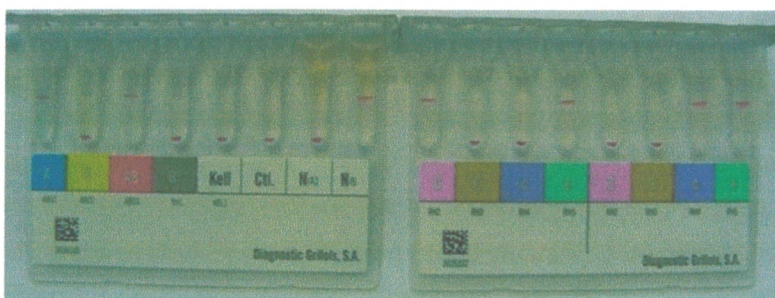
- **Les microbilles en verre**

Comme dans le gel-test en fonction des réactifs présents dans le milieu, les microbilles peuvent piéger de la même façon des hématies agglutinées et des hématies sensibilisés.

- **Les colonnes d'affinité**

Dans ce procédé un ligand tel que la protéine A ou G qui se fixe spécifiquement au fragment Fc des immunoglobulines G, est associé à un gel. Ce ligand peut ainsi capturer des hématies sensibilisées lors de leur passage à travers la colonne, de même un anticorps spécifique, préalablement fixé sur le ligand, peut arrêter des hématies porteuses d'antigène correspondant.

Lecture de technique en filtration



- **Avantages**

Sensibilité,
Absence de lavage,
Stabilité de la phase réactionnelle,
Standardisation des phases d'exécution technique et de lecture,
Pré-préparation des réactifs,
Faible quantité de réactants,
Automatisation possible.

- **Inconvénients**

Risque de non détection de certaines agglutinations très faibles. Ces faibles semblent liées à des forces de cisaillement qui détruisent des faibles agglutinats durant leur passage forcé dans la matrice de filtration au cours de la centrifugation.

Les doubles populations ne sont pas toujours visibles par piégeage de petites quantités d'hématies libres dans l'agglutinat bloqué dans la partie supérieure de la colonne.

L'excès de sensibilité en technique enzymatique, un des inconvénients majeur de la détection trop fréquente d'auto-anticorps et de pseudo spécificité anticorpale en relation avec la préparation d'hématies tests et en particulier celles traitées par les enzymes protéolytiques.

Non applicable à certains champs d'application analytique, la technique de filtration n'est pas adaptée à l'interprétation de certaines analyses comme le titrage des anticorps immuns chez la femme enceinte ou le contrôle d'anti-RHI passifs, en raison du risque des résultats par excès pouvant aboutir à des décisions thérapeutiques mal adaptées.

Partie pratique

I. Les équipements en immunohématologie :

⊙ Réactifs :

i. Rappel sur les réactifs et leur évolution :

Les débuts des examens d'immuno-hématologie ont été marqués par l'utilisation de réactifs d'origine humaine (plasma, sérum et hématies) dans des conditions techniques très simple (plaque, température du laboratoire) mettant en jeu des anticorps dits « agglutinants ».

L'évolution ultérieure a été marquée par l'accroissement des connaissances sur :

- Les antigènes des systèmes de groupes sanguins érythrocytaires,
- Le développement des techniques d'agglutinations artificielles (la plus importante étant le test indirect à l'anti globuline) permettant de mettre en évidence des anticorps « non agglutinants »,
- L'utilisation croissante d'anticorps monoclonaux murins ou humains produits in vitro,
- L'apparition de l'automatisation et l'informatisation ainsi que
- Les débuts de l'utilisation des outils de la biologie moléculaire.

Toutefois, les réactifs d'origine humaine restent indispensables, essentiellement les hématies porteuses des antigènes érythrocytaires. Cette évolution correspond donc, de plus en plus, à l'adaptation d'un réactif à un système analytique.

✦ Soluté salé isotonique :

Les hématies sont extrêmement sensibles aux variations du taux des électrolytes des liquides dans lesquels elles sont en suspension. Pour cela, elles doivent être manipulées dans des milieux isotoniques ayant la même pression osmotique que les globules rouges.

Le liquide isotonique employé le plus souvent est le soluté salé isotonique appelé également « sérum ou eau physiologique ». C'est de l'eau distillée ou déminéralisée contenant une concentration de 9 g/L de chlorure de sodium. Toutes les manipulations (lavage des pipettes entre deux réactions, mise en suspension et lavage des érythrocytes, certaines dilutions de sérum ou de plasma) doivent être effectués avec des solutés salés isotoniques.

✦ Globules-tests :

La détermination du groupe sanguin ABO ainsi que le dépistage et l'identification des anticorps anti-érythrocytaire nécessitent l'utilisation des globules rouges-tests dont on connaît la spécificité dans les principaux systèmes de groupes érythrocytaires.

Ces globules rouges seront prélevés sur une solution anticoagulante et conservatrice, en particulier la solution ACD (acide citrique, citrate de sodium et de dextrose). Elle permet la conservation du sang recueilli stérilement pendant théoriquement 15-21 jours. Les globules rouges employés doivent être lavés trois fois en sérum physiologique, puis remis en suspension dans ce même milieu.

✦ Sérums-tests :

Les sérum-tests sont soit d'origine humaine, soit d'origine animale, soit d'origine végétale. Dans tous les cas, il faut les manipuler dans des conditions d'asepsie stricte ; certaines contaminations bactériennes pouvant entraîner des agglutinations non spécifiques. La limpidité du sérum-test est un bon contrôle simple de l'absence de contamination.

Chaque sérum-test possède une technique optimale d'utilisation fonction d'une part du système antigène-anticorps correspondant, d'autre part des anticorps eux même. Cette technique est chaque fois précisée dans la notice accompagnant le sérum test.

Il est impératif de respecter, sous peine de résultats faussement négatifs (anticorps non actifs dans une autre technique) ou faussement positifs (sérum -test poly spécifique dans une autre technique). Globalement les sérum-test sont spécifiques, non hémolytiques, ne contenant aucun produit bactérien et ne produisant aucun phénomène de rouleaux.

a-Avidité :

Elle est représentée par le temps exprimé en seconde écoulé entre la mise en présence des globules rouges échantillons avec le sérum-test, et l'apparition des premiers agglutinats sur plaque d'opaline.

b- Titre :

C'est l'inverse de la dernière dilution donnant lieu à une réaction positive dans la technique utilisée ; il s'agit d'une dilution finale tenant compte de la dilution apportée par la suspension érythrocytaire.

c-Expression du titre en score :

Réduit considérablement la différence de lecture entre les individus en particulier pour les dilutions les plus élevées, le code utilisé est le suivant :

- 1 à 3 agglutinats non fragmentés : +++ ou 10
- Une dizaine d'agglutinats : ++ ou 8
- Plus de 10 agglutinats : + ou 5
- Micro agglutinats: ± ou 2
- Absence d'agglutinats : -

ii. Les réactifs utilisés dans les différentes techniques d'immunohématologie :

Tous les réactifs nécessaires aux examens d'immunohématologie érythrocytaire doivent être conformes à la législation et à la réglementation relative aux conditions particulières de mise sur le marché en vigueur à la date de lancement.

1. Le groupage ABO-RH1 :

➤ La réalisation du groupage sanguin ABO :

| | |
|--------------------|---|
| Epreuve globulaire | Les réactifs monoclonaux suivants : anti-A (anti-ABO1), anti-B (anti-ABO2) et anti-AB (anti-ABO3) |
| Epreuve sérique | Des hématies-tests A1 et B. Au moins une de ces hématies doit être de phénotype RH :-1. |

➤ La réalisation du groupage sanguin RH1 :

| | |
|-----|--|
| RH1 | Un réactif monoclonal anti-RH1 et un réactif témoin dépourvu de toute activité anticorps mais dont la capacité d'agglutination d'hématies sensibilisées est strictement identique au réactif anti-RH1. |
|-----|--|

➤ Les contrôles qualité internes :

En ce qui concerne la détermination du groupage sanguin ABO-RH1, le système analytique doit être ontrôlé en utilisant une série d'échantillons de contrôle de phénotypes garantis (typage obtenu par un processus technique différent de celui qui doit être contrôlé par ces échantillons) comprenant au minimum :

| | |
|----------------------|--|
| Groupage sanguin ABO | - un échantillon de groupe A - un échantillon de groupe B - un échantillon de groupe O |
| Groupage sanguin RH1 | -un échantillon de groupe RH : 1 - un échantillon de groupe RH : -1 |

2. Le phénotypage RH-KEL 1 :

Il est recommandé d'utiliser des réactifs d'origine monoclonale.

| | |
|---------------------|---|
| Le phénotypage RH | Réactifs anti-RH2, anti-RH3, anti-RH4, anti-RH5 |
| Le phénotypage KEL1 | Réactif anti-KEL1 |

➤ Les contrôles qualité internes

Utilisant une série d'échantillons de contrôle comprenant pour chaque spécificité les hématies suivantes :

| | |
|-----------|---|
| Anti-RH2 | un échantillon RH :2,4 et un échantillon RH :-2,4 |
| Anti-RH3 | un échantillon RH :3,5 et un échantillon RH :-3,5 |
| Anti-RH4 | un échantillon RH :2,4 et un échantillon RH :2,-4 |
| Anti-RH5 | un échantillon RH :3,5 et un échantillon RH :3,-5 |
| Anti-KEL1 | un échantillon KEL :1 et un échantillon KEL :-1. |

3. Le phénotypage étendu :

➤ La réalisation du phénotypage étendu :

Réactif : pour un système donné la recherche de chaque antigène est basée sur l'utilisation du réactif spécifique et du témoin adéquat. Il existe donc actuellement des antisérums pour des antigènes des systèmes MNS, P1, LU, KEL, LE, FY, JK, H.

➤ Les contrôles qualité internes

Le système analytique doit être contrôlé en utilisant, pour chaque spécificité, deux échantillons de contrôle de phénotypes garantis, l'un de ces échantillons doit être négatif et l'autre d'expression « hétérozygote ».

4. La recherche d'anticorps anti-érythrocytaires (RAI) :

Réactifs :

Etape de dépistage : repose sur l'utilisation d'une gamme d'au moins trois hématie-tests de groupe O qui doit permettre la détection des anticorps correspondants aux antigènes RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e), KEL 1 (K), KEL 2 (Cellano), KEL 4 (Kpb), FY1 (Fya), FY2 (Fyb), JK1 (Jka), JK2 (Jkb), MNS1 (M), MNS2 (N), MNS3 (S), MNS4 (s), LE1(Lea), LE2 (Leb), P1, LU2 (Lub).

Les phénotypes RH suivants doivent être obligatoirement représentés sur la gamme de dépistage :

- RH : 1,2,-3,-4,5 ;
- RH : 1,-2,3,4,-5 ;
- RH :-1,-2,-3,4,5.

De plus, une expression phénotypique « homozygote » doit être respectée pour les antigènes FY1, JK1, JK2, MNS3 et recommandée pour les antigènes FY2 et MNS4.

NB : En aucun cas ces hématies ne feront l'objet de mélange.

Etape d'identification :

Repose sur l'utilisation, outre la gamme de dépistage, d'au moins 10 hématies-tests. L'ensemble de ces hématies de groupe O doit comporter les antigènes suivants : RH1, RH2, RH3, RH4, RH5, RH6, RH8 (Cw), KEL 1, KEL 2, KEL 3 (Kpa), KEL 4, FY1, FY2, JK1, JK2, MNS1, MNS2, MNS3, MNS4, LE1, LE2, P1, LU1 (Lua), LU2.

Les phénotypes suivants doivent être représentés au moins sur deux hématies : KEL1, FY :1,-2, FY :-1,2, JK :1,-2, JK :-1,2, MNS :3,-4, MNS :-3,4, P :-1.

5. Test de Coombs :

◆ Réactifs antiglobuliniques

Les réactifs antiglobulines sont obtenus par immunisation d'animaux (lapin, chèvre, cheval, etc.) à l'aide de sérum humain total, d'immunoglobulines purifiées, de classe déterminées (IgG, IgM, IgA, etc) de complément total ou de certain de ses composants :C4 (β 1E) ou C3 (β 1C ou mieux α 2D).

On obtient ainsi des réactifs dont il faut se souvenir qu'ils sont spécifiques d'espèces (ne reconnaissent que les protéines humaines).

Il existe ainsi des antiglobulines de différentes sortes :

Les antiglobulines polyvalentes, reconnaissent des immunoglobulines IgG, IgM et les composants du complément.

Les antiglobulines spécifiques de classe, anti-IgG, ou anti-IgM, ou anti-IgA.

Les antiglobulines anti-complément, reconnaissent la fixation du complément sur un complexe antigène-anticorps : anti- β 2C (et/ou α 2D) et/ou anti- β 1E.

iii. Exemples des Réactifs : *Réactifs HumaType*

Les réactifs HumaType pour les typages ABO & RH1 sont des réactifs potentiels avec une affinité élevée pour les antigènes. Ils sont adaptés aux techniques classiques en tube, sur lame et sur microplaque.

Le HumaTypeAnti-D (IgM) est le réactif idéal pour le typage de patients, tandis que le HumaTypeAnti-D (IgM/IgG) peut être utilisé pour le typage du patient et du donneur.

| Type d'anticorps | Anti-A | Anti-B | Anti-AB | Anti-D (IgM) | Anti-D (IgM/IgG) | AGH | |
|------------------|--|--------|---------|--------------|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| | Réactif monoclonal pour groupage sanguin ABO | | | | Réactif monoclonal pour groupage RH | Blended Réactif monoclonal pour groupage RH | Polyspécifique (vert) pour TDA et TIA |
| Albumine 22% | Milieu potentialisant pour procédures sérologiques | | | | | | |

Ⓢ Matériel :

Pour le moment, le contrôle ABO-RH des poches se fait manuellement par les techniciens en analyses biomédicales dans un laboratoire d'immuno-hématologie. La question est de savoir si l'acquisition d'un automate serait plus bénéfique que le contrôle manuel. Avant de faire ce choix, il faut commencer par comparer les différents types d'automates.

Il existe plusieurs types d'automates.

— Automate complet :

- Capable de pipeter, centrifuger, lire et interpréter les résultats.
- Fait l'analyse du début jusqu'à la fin.
- Peut être relié à un système informatique afin de pouvoir transférer les demandes directement sur l'automate et que ce dernier puisse transmettre les résultats sur l'informatique du laboratoire. Il sera donc bidirectionnel.

— Semi-automate :

- Fera une partie de l'analyse à savoir soit pipeter, soit centrifuger, lire et interpréter les

résultats.

- Peut-être combiné afin de faire le même travail qu'un automate complet.
- Peut également être connecté au système informatique du laboratoire.

1. SwingTwinSampler :

- Semi-automate pipetteur pour cartes-ID et microplaques,
- Dimensions : 47x72.3x65.1cm.
- 19 tubes peuvent être chargés simultanément,
- 24 cartes-ID et une microplaque.
- 1 rack de 12 places est prévu pour les différents réactifs.
- Cadence ABO/Rh est d'environ 47 échantillons par heure.



Les avantages :

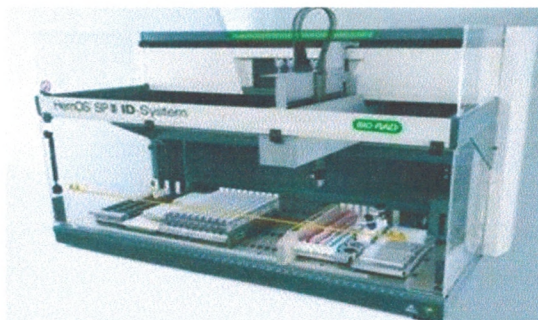
- La traçabilité complète des tests, des résultats et de l'utilisateur ;
- La combinaison avec un lecteur de cartes-ID ou un lecteur pour microplaques ;
- La connexion au système informatique du laboratoire (bidirectionnel) ;
- L'indication du niveau des réactifs ;
- Le choix des volumes des 2 solutions de lavage (100ml ou 10 litres) ;
- Eviter les erreurs de pipetages ;
- Sa petite taille ;
- Sa simplicité d'utilisation.

Les inconvénients sont :

- La quantité d'hématies dans le tube doit être d'au moins 1,5 ml.
- Le bidon de 10 litres des déchets (et les deux bidons de 10 litres des solutions de lavage si l'on choisit de travailler avec ces volumes) à l'extérieur de l'automate.
- Tous les tubes doivent être débouchés.
- L'aiguille n'est pas capable de transpercer l'aluminium des cartes-ID.
- La présence d'un TAB une fois le pipetage terminé soit pour centrifuger les cartes manuellement et interpréter, soit pour transférer les cartes (ou la microplaque) dans un automate capable de les centrifuger et de les lire.

2. HemOS SP IITwinSampler :

- Semi-automate pipetteur pour cartes-ID et microplaques mais de plus grande capacité que l'appareil précédent,
- Plus encombrant : 145x87x78cm,
- Peut contenir 96 échantillons, 96 cartes-ID et 8 microplaques,
- Capable de pipeter 80 échantillons (480 essais) par heure pour faire les groupes ABO/Rh en carte ID ou 100 échantillons par heure pour la méthode en microplaques.



Ses avantages:

- Traçabilité complète des tests, des résultats et de l'utilisateur,
- Combinaison avec un lecteur de cartes-ID ou un lecteur pour microplaques,
- Connexion au système informatique du laboratoire (bidirectionnel),

- Indication du niveau des réactifs.

Ses inconvénients :

- Taille imposante.
- Tous les tubes doivent être débouchés.
- L'aiguille n'est pas capable de transpercer l'aluminium des cartes-ID.
- La présence d'un TAB une fois le pipetage terminé soit pour centrifuger les cartes manuellement et interpréter, soit pour transférer les cartes (ou les microplaques) dans un automate capable de les centrifuger et de les lire.

3. LyraMP-Reader :

- Semi-automate,
- Centrifuge et lit les microplaques,
- Dimensions : 59x43x62cm,
- Capacité de 2 microplaques, résultats en moins de 7 minutes,
- Poids 38 Kg,
- Alimentation électrique : 100-250V/50-60Hz.



Les avantages sont :

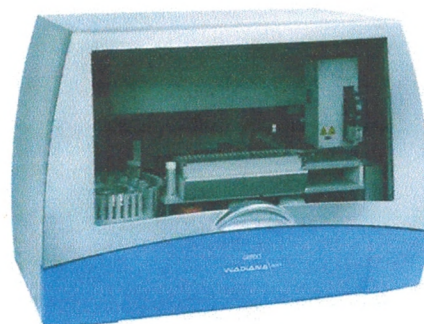
- Traçabilité complète des tests, des résultats et de l'utilisateur,
- Combinaison avec un pipetteur pour microplaques,
- Connexion au système informatique du laboratoire (bidirectionnel),
- Possibilité de voir les images des puits de la microplaque,
- Interprétation des résultats peut être modifiée par l'utilisateur,
- Petite taille,
- Simplicité d'utilisation.

Les inconvénients :

- Présence d'un TAB pour placer les microplaques dans l'automate.

4. WADiana8XT :

- Automate complet pour cartes-Gel,
- Dimensions : 60x100x65 cm,
- Capacité de 48 échantillons, 24 cartes DG Gel, 16 réactifs et 2 bouteilles de diluent,
- Résultat d'environ 36 cartes par heure.



Ses points forts sont:

- L'absence de manipulation,
- La distribution des échantillons et des réactifs en perçant l'aluminium des cartes,
- L'élimination de contamination croisée,
- La possibilité de voir l'image de la carte,
- La transmission des données au système informatique du laboratoire (bidirectionnel),
- Le contrôle continu des niveaux des réactifs, des diluants, des solutions de lavage et des déchets,
- Le contrôle des lots et de la date d'expiration des réactifs et des diluants,
- L'accès contrôlé par mot de passe,
- L'adaptation aux différents diamètres de tubes (de 10 à 16 mm),
- Sa taille compacte,
- La faible quantité de maintenance journalière,
- Son système opérationnel 24h/24h,
- La possibilité de rajouter des analyses.

Ses points faibles:

- L'aluminium des cartes ne peut pas être recyclé.

5. Groupamatic :

Les appareils Groupamatics sont des analyseurs qui mettent en œuvre des réactions d'agglutination selon une méthode se rapprochant de la technique sérologique en tube, incubation du mélange échantillon/réactif et centrifugation de celui-ci.

Deux types d'équipements sont actuellement commercialisés : le Groupamatic 360C et le Minigroupamatic qui traitent respectivement 340 et 50 échantillons à l'heure.

Sur chacune de ces deux machines, chaque échantillon est testé sur 12 canaux selon un principe de base identique. La mise en présence de l'échantillon et du réactif est effectuée automatiquement, sans intervention préalable s'il s'agit de plasma et après une dilution automatique dans le cas des globules rouges. La lecture au stade final des réactions est réalisée sans intervention humaine.

A la centrifugation succède une agitation dont le but est de remettre en suspension les cellules libres et de centrer les agglutinats éventuels.

A l'agitation succède une lecture automatique effectuée par des séries de photomètres mesurant des transmissions de flux lumineux.

Un système d'identification utilisant soit une étiquette pré perforée lue par un dispositif électromécanique, soit une étiquette à code de barres lue par un dispositif Laser, permet la lecture automatique du numéro correspondant à l'échantillon examiné. Quelque soit le principe d'identification utilisé, le principal avantage est constitué par la lecture simultanée, pour chaque échantillon traité, du numéro d'identification et des résultats sérologiques obtenus sur les 12 canaux.

I. Groupamatic 360C :

Description :

La configuration de base des équipements Groupamatic comporte principalement une unité électromécanique contrôlée par une unité de traitement électronique.

- L'unité électromécanique est utilisée pour la mise en service et la lecture des réactions d'agglutination, et pour l'acquisition du numéro d'identification de l'échantillon. Deux chaînes de travail permettent de remplir deux fonctions distinctes :
 - 1) Le transfert des tubes échantillons et la mise en œuvre des réactifs sont assurés par la chaîne de transfert des tubes échantillons, le poste de dilution, le poste de chargement échantillons/réactifs et le poste de lecture des numéros d'identification.
 - 2) Le transfert des disques supports de réactions est réalisé par le poste de stockage des disques neufs, le poste de chargement des disques, le poste d'attente, le poste de centrifugation, le poste d'agitation, le poste des réactions et le poste de récupération des disques utilisés.
- L'unité électronique, à programme software, est utilisée pour la commande et le contrôle de l'unité électromécanique, pour le traitement des informations immuno-hématologiques et sérologiques, leur édition et leur transmission.

II. Minigroupamatic :

Le Minigroupamatic est un analyseur qui reprend les principes fondamentaux des systèmes automatiques de groupage sanguin Groupamatic 360C. Les échantillons prélevés sur anticoagulant, sont placés sur le plateau d'un passeur d'échantillon à 36 positions. Les globules rouges sont dilués en milieu physiologique broméliné dans un tube de dilution associé mécaniquement au tube support. Les échantillons sont traités par lot de 12 ou moins si nécessaire.

Après une première incubation de 15 mn dans le tube de dilution, une pompe péristaltique de chargement vient délivrer les échantillons (globules rouges dilués-plasma) et les réactifs (sérums-tests) dans un disque comportant 144 godets. Chacun de ces godets est affecté à une réaction particulière et fait partie d'un secteur de 12 godets lui-même affecté à un échantillon.

Le traitement des échantillons suit alors le cycle classique d'une technique en tube. Le tube est incubé à la température ambiante pendant 8 mn puis centrifugé pendant 2 mn à environ 100g puis agité à quatre vitesses différentes afin de recollecter les agglutinats au centre des godets.

L'identification de l'échantillon et la lecture des réactions s'effectuent selon un principe identique à celui du Groupamatic 360C.

L'extension informatique confère à l'automate toutes les fonctions du système GC360. Il permet à l'utilisateur de définir son programme de travail, de comparer les résultats entre plusieurs passages, d'inclure des résultats extérieurs et de contrôler l'étiquetage des unités de sang. Il existe enfin la possibilité de relier deux Minigroupamatic au même ordinateur, formule permettant d'obtenir une cadence de groupage plus élevée.

6. QWALYS®3 : L'automate tout en performance :

Avec une très haute cadence et la capacité de chargement la plus forte du marché, QWALYS®3 est l'automate de référence pour les laboratoires qui ont une activité d'immuno-hématologie comprise entre 10 000 et 100 000 tests/an.

QWALYS®3 est un automate complet d'immuno-hématologie utilisant une technique de magnétisation des hématies «Erythrocytes Magnetized Technologie», une nanotechnologie innovante, développée par DIAGAST.

Autonomie et rapidité

- Capacité de chargement allant jusqu'à 544 échantillons,
- Cadence de réalisation des groupes ABO-RH1 et phénotype RH-K est d'environ 45 par heure sur de grandes séries et 40 par heure sur de petites séries.
- Quelle que soit la taille de la série, les premiers résultats sont disponibles en 30 mn (soit une plaque de 8 échantillons).
- 32 dépistages RAI par petites séries et 60 par grandes séries sont traités par heure. Lorsque les 3 analyses sont associées, les cadences varient de 16 à 32 par heure selon la taille de la série. Les premiers résultats sont disponibles au bout de 50 minutes.

Simplicité d'utilisation

- Simplifié à deux écrans principaux, le logiciel du QWALYS®3 facilite la prise en mains des opérateurs et optimise leur polyvalence.
- 10 minutes de formation suffisent pour lancer une série en toute autonomie.
- Visualisation en temps réel de l'activité (consommation de réactifs, état de l'échantillon...).

Economies

- L'utilisation de l'E.M.® Technology garantit un budget de fonctionnement hautement économique par rapport aux techniques du marché.
- Gagnez jusqu'à 35 % d'économies sur votre budget annuel.

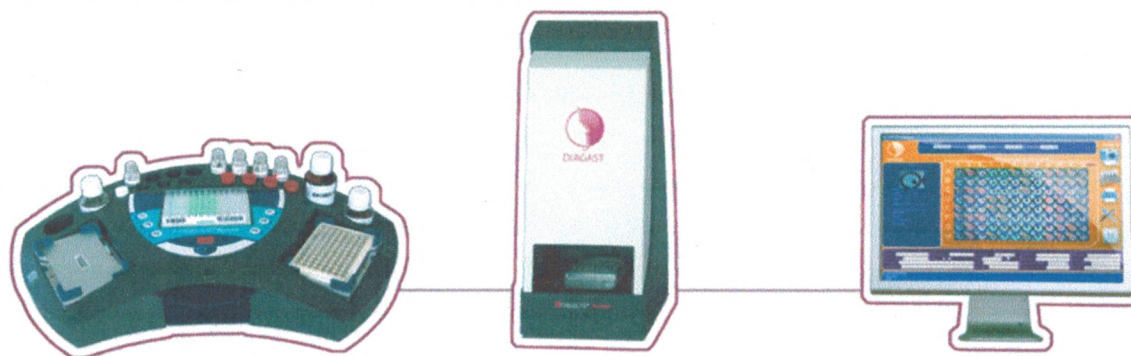
QWALYS®3

| Désignation | Référence | Composition |
|-------------|-----------|--|
| QWALYS® 3 | 90804 | Autonomie : 32 microplaques, 6 diluants, 10 réactifs L : 145 cm ; l : 78 cm ; H : 98 cm / 4 aiguilles |
| QWALYS® 3 | 90854 | Autonomie : 32 microplaques, 6 diluants, 10 réactifs L : 145 cm ; l : 78 cm ; H : 98 cm / 8 aiguilles |



7. FREELYS® Mini lab : Votre IH miniaturisée

Avec FREELYS® Mini Lab, DIAGAST donne une nouvelle dimension à l'immuno-hématologie manuelle, celle de la miniaturisation et de l'ergonomie. Composé d'une station de travail (FREELYS® Nano) et d'un lecteur (FREELYS® Reader & Software), FREELYS® MiniLab garantit une standardisation, sécurité, traçabilité et économies.



FREELYS® Nano :

Intègre tout le matériel associé : agitateur, incubateur et plaques magnétiques. La station de travail miniaturisée, apporte aux techniciens une standardisation des protocoles sans précédent. FREELYS® Reader & Software, lecteur et son logiciel associé, permettent la lecture l'interprétation, la validation et l'archivage des tests d'immuno-hématologie. Sa caméra couleur haute définition assure une interprétation

sécurisée des résultats. Il permet maintenant de modifier, valider, enregistrer, consulter les résultats avec une traçabilité complète des patients et des réactifs utilisés et les transférer au système informatique du laboratoire. Son moteur de recherche permet une consultation rapide et intuitive des archives (résultats, données patients, image des réactions, traçabilité des réactifs).

FREELYS® Nano et FREELYS® Reader

| Désignation | Référence | Composition |
|------------------------------|-----------|---|
| FREELYS® Nano (2 agitateurs) | 90750 | La station de travail, un ou deux agitateurs préprogrammés, 1 ou 2 plaques magnétiques et le support associé, un cordon d'alimentation de 2 mètres, une clé Allen, un manuel d'utilisation. |
| FREELYS® Nano (1 agitateur) | 90751 | |
| FREELYS® Reader | 90651 | Le lecteur, son alimentation, un câble USB, une douchette de lecture de code à barres, une interface utilisateur (ordinateur non fourni). |

8. Classic Plus-ID Gel Station:



- Instrumentation → Automate pour ID système
- Analyseur compact et entièrement automatisé :
- Informatique combiné et écran tactile.
- Capacité de chargement: jusqu'à 48 échantillons, 24 cartes d'identité et 16 réactifs.
- Fonctions exécutées automatiquement: identification positive, suspensions cellulaires, perçage de cartes d'identité, de pipetage, incubation, centrifugation, la lecture et l'interprétation.
- Performance: jusqu'à 35 cartes d'identité (210 essais) par heure.
- Connexion bidirectionnelle à LIS / hôte.
- Idéal pied à emporter pour les moyennes d'automatiser les laboratoires de taille moyenne.
- Poids: 99.5kg.
- Alimentation électrique: 110-240 V / 50-60 Hz.

| Pkg. la taille | Les profils ou de test unique | REF |
|------------------------------|-------------------------------|----------|
| Classic Plus-ID GelStation | | 009983KT |
| Solution de lavage A | (10 L) | 009821 |
| Solution de lavage B Classic | (10 L) | 009833 |
| Solution de lavage | (10 x 100 ml) | 009818 |
| Solution de lavage B Classic | (10 x 100 ml) | 009829 |

9. TechnoTwin Station :

- Instrumentation → Automate pour ID système.
- Analyseur compact et entièrement automatisé.
- Nouveau concept, un débit élevé, flexible et convivial,



pour des combinaisons de cartes d'identité et microplaques.

- Capacité de chargement jusqu'à 36 échantillons,
- 48 cartes d'identité, 3 microplaques et 24 réactifs.
- Avec 2 centrifugeuses / lecteurs combinés (24 cartes d'identité capacité de chacun).
- Fonctions exécutées automatiquement: le plein d'identification positive, les suspensions cellulaires, perçant de cartes d'identité, de pipetage, incubation, centrifugation, la lecture et l'interprétation.
- Performance: jusqu'à 60 cartes d'identité (360 tests) par heure.
- Traçabilité complète des essais, les résultats et l'opérateur.
- Automatique dispense de vérification.
- Connexion bi-directionnelle à LIS / hôte.
- Une utilisation conviviale avec écran tactile plat.
- Toutes les opérations sont contrôlées par le Maestro Master Software.
- Idéal pied à emporter pour les banques de sang, laboratoires moyennes et grandes entreprises.
- Dimensions: 129cm/120cm/75cm.
- Poids: 320kg
- Alimentation: 85 à 255 V / 50-60 Hz.

| PKg. la taille | Les profils ou test unique | Référence |
|---|---|--------------|
| Techno TwinStation | | 009895K T |
| Solution de lavage A | (10L) | 009821 |
| Laver la solution B | (10L) ou | 009822 |
| Solution de lavage Un concentré | (10x100ml) | 009818 |
| Laver immédiatement le concentré la solution B | (10x100ml) | 009819 |
| Conteneur à déchet | 10L | 009887 |
| Distributeur de Magnet | Pour la cellule d'essai de mélange/100pcs | 009893 |

10. Saxo ID-Reader :

- Automate lecteur de carte ID.
- Capacité pour 24 cartes d'identité par série.
- Centrifuge, lit et interprète les cartes d'identité en une seule étape de travail
- La pleine identification positive de cartes d'identité.
- L'interprétation facile avec des images claires des résultats des tests.
- Les résultats peuvent être validés, stocké, imprimé et envoyé à l'ordinateur hôte.
- Traçabilité complète des essais, les résultats et l'opérateur.
- Toutes les opérations sont contrôlées par le Maestro Master Software.
- Idéal si connecté à un automate de pipetage, toutes deux contrôlées par un seul PC et le Master Software Maestro.
- Dimensions(L/H/P) : 53,2cm/38,8cm/52,4cm.
- Poids: 25kg(tête de la centrifugeuse inclus).
- Alimentation électrique: 110-230 V / 50-60 Hz.



11. Banjo-ID Reader :

- Automate lecteur de carte d'identité.
- Lit et interprète les cartes d'identité en quelques secondes.
- L'identification positive de cartes d'identité.
- Interprétation simple avec des images claires des



résultats des tests.

- Les résultats peuvent être validés, stockés, imprimés et envoyés à l'ordinateur hôte.
- Traçabilité des résultats de tests et de l'utilisateur.
- Toutes les fonctions sont contrôlées par le logiciel de MasterCard.
- Idéal pour les emplois manuels ou en combinaison avec une pipette automatique, pour la sécurité et la traçabilité des résultats.
- Dimensions(L/H/P):25cm/15pouces/39cm.
- Poids:5,3kg

.12. Lecteur de microplaques Modèle BP 800 :

✦ **Caractéristiques :**

- Une capacité multiple.
- Capacité de stockage jusqu'à 75 définitions de dosages personnalisés.
- Possibilité d'enregistrer jusqu'à 8ensembles de résultats de microplaques.



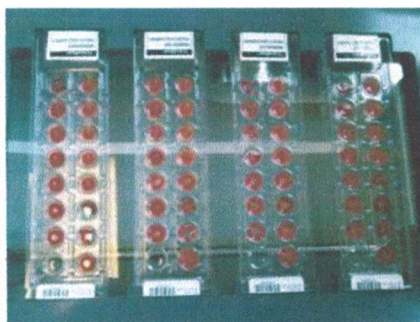
✦ **Aperçu :**

- Le BP 800 lecteur de microplaques possède toutes les caractéristiques d'un lecteur de microplaques moderne, offrant des protocoles d'essai programmés pour le diagnostic Biohit. Lit24/48/96-microplaques.
- 384-bien ou 72/96-well plaques Terasaki sont pris en charge par le NB-modèle. L'unité standard comprend quatre filtres dans la plage de 400 nm à 750 nm. 340 nm optique filtre est supporté par le rayonnement UV- modèle.
- Auto disposition de la plaque d'emploi pour les blancs, les contrôles, les normes, et des échantillons. Résultats imprimés dans une matrice, colonne, ou les deux formats.

✦ **Vaste à bord d'analyse de données comprend :**

- Sept ajustements de courbe des options.
- Les formules de validation de transformation, de contrôle et de dosage.
- Enregistre jusqu'à 40 courbes standard.
- Les définitions Magasins de dosage 55 (jusqu'à 75 tests personnalisés).
- Enregistre jusqu'à 8 résultats des tests de microplaques.

.13.Lecteur de plaque VidimPlate® agréé IVD :



Caractéristiques:

VidimPlate® peut lire, scanner, numériser, archiver et donner des images couleurs.

VidimPlate® est universel, le labo a le libre choix des réactifs.

VidimPlate® offre des fonctions de sécurité uniques=les infos de codes-barres du patient sont reliées au code-barres de la plaque.

Vidimplate en plastique.

Les plaquettes VidimPlate®sont agréées IVD et chaque plaquette est munie d'un code-barres.



VidimPlate® peut être utilisé pour traiter les plaques pour les tests sérologiques de groupe sanguin, avec libre choix des réactifs.

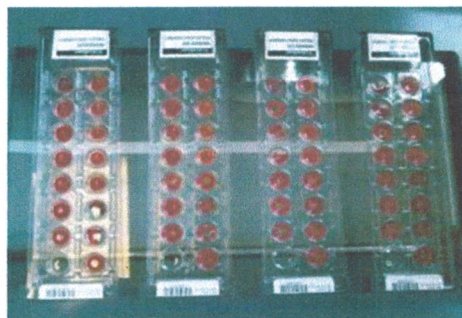
Le logiciel agréé IVD de VidimPlate® reprend les paramètres pour les tests suivants:

ABO/confirmation Rh ABD, ABO/Rh pour les nouveau-nés, ABO/Rh pour les patients, DVI+ABO/Rh pour les nouveau-nés DVI- ABO Rh pour les donneurs, confirmation ABD pour les donneurs ABO/ RhD ABO/DABO/D+DAT, ABO/D+groupe inverse, sous-groupes Rh+K, sous-groupes Rh-+ Cw +K, RhD+ Phénotype, Anti-A absorbé, Anti-H, ID-Partiel RhD typage, Coombs Anti-IgG, ID- Antigène Profile I, ID-Antigène Profile II, ID-Antigène Profile III, Anti-D, Anti-DVI nég, Anti-Cw, Anti-K, Anti-K / k, Anti-M, Anti-N, Anti-M/N Anti-P1, Anti-Lea, Anti -Leb, Anti-P1, Anti-Lea/ Le b, Anti-Jk a, Anti-Jkb, Anti-Jka/Jkb Anti-Kpa, Anti-Kpb, Anti-Kpa/Kpb Anti-Lua, Anti- Lu b, Anti- Lu a/Lu b, Test de l'antigène S, Test de l'antigènes Test de l'antigène S et Test de l'antigène Fy a, Test de l'antigène Fyb, Test de l'antigène Fya et Fyb, ID-Anti-I, ID-Anti-i, groupage inverse avec dépistage des anticorps, test NaCl. Enzyme et des agglutines froides, LISS /Coombs, Coombs Anti-IgG, dépistage DCI, dépistage DC II.

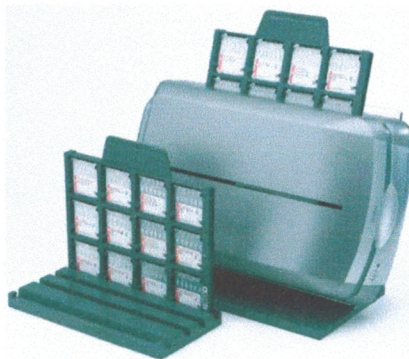
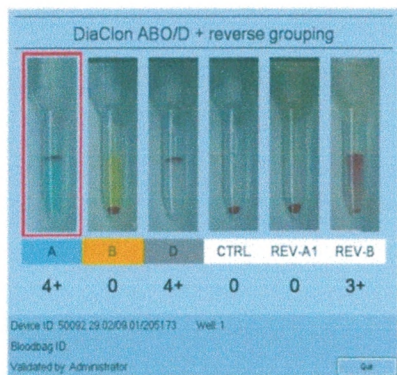
VidimPlate® peut être utilisé:

- Pour les contrôles sanguins des patients après transfusion (résultats mixtes).
- Pour traiter les tubes de sang de bébé qui ne peuvent être analysés par certains automates.
- Comme contrôle de qualité interne, avec traçabilité.
- Comme système de secours pour les labos entièrement automatisés.
- Comme alternative rapide quand l'appareil automatisé est occupé conformément aux directives européennes (2005/61 EG) de traçabilité.

On peut placer jusqu'à 4 plaques dans les canner Vidim Plate®.



.14.Lecteur de carte ID Gel universel VidimScan® agréé IVD:



Caractéristiques:

VidimScan® est universel : il traite toutes les cartes ID Gel du marché.

VidimScan® donne une interprétation des résultats des groupes sanguins.

VidimScan® peut lire, scanner, numériser, archiver et donner des images couleurs.

VidimScan® offre des fonctions de sécurité uniques= les infos de codes-barres du patient sont reliées au code-barres de la carte ID Gel.



VidimScan® est un lecteur de cartes ID Gel universel qui peut être utilisé pour traiter toutes les cartes gel pour les tests de sérologie de groupe sanguin sur le marché actuellement.

En fonction du type de carte choisie, on peut placer 9 ou 12 cartes dans un cadre.

Le logiciel agréé IVD de VidimScan® reprend les paramètres pour les tests suivants: ABO/confirmation Rh ABD, ABO/Rh pour les nouveau-nés, ABO/Rh pour les patients.

DVI+ABO/Rh pour les nouveau-nés DVI- ABO Rh pour les donneurs, confirmation ABD pour les donneurs ABO/RhD ABO/DABO/D+DAT, ABO/D+groupe inverse, sous-groupes Rh+K, sous-groupes Rh+Cw+K, RhD+Phénotype, Anti-A1 absorbé, Anti-H, ID-Partiel RhD typage, Coombs Anti-IgG, ID- Antigène Profile I, ID-Antigène Profile II, ID-Antigène Profile III, Anti-D, Anti-DVI nég, Anti-Cw, Anti-K, Anti-K/k, Anti-M, Anti-N, Anti-M/N Anti-P1, Anti-Lea, Anti -Leb, Anti-P1, Anti-Lea/Leb, Anti-Jka, Anti-Jkb, Anti-Jka/Jkb Anti-Kpa, Anti-Kpb, Anti-Kpa/Kpb Anti-Lua, Anti- Lu b, Anti- Lua/Lub, Test de l'antigène S, Test de l'antigènes Test de l'antigène S et Test de l'antigène Fy a, Test de l'antigène Fyb, Test de l'antigène Fya et Fyb, ID-Anti-I, ID-Anti-i, groupage inverse avec dépistage des anticorps, test NaCl. Enzyme et des agglutines froides, LISS /Coombs, Coombs Anti-IgG, dépistage DC I, dépistage DC II, DAT IgG-Dilution, DT IgG1/IgG3, Coombs +Enzyme test, LISS/Coombs, Coombs Anti-IgG, test NaCl. Enzyme et des agglutines froides, Type+dépistage, cross-match (compatibilité croisée) complet, LISS/Coombs, Coombs Anti-IgG, NaCL...

VidimScan® peut être utilisé:

-pour les contrôles sanguins des patients après transfusion (résultats mixtes).

-Pour traiter les tubes de sang de bébé.

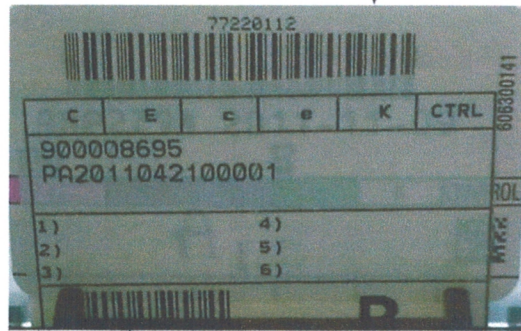
-Comme contrôle de qualité interne, avec traçabilité.

-Comme système de secours pour les labos entièrement automatisés, comme alternative rapide quand l'appareil automatisé est occupé conformément aux directives européennes (2005/61 EG) de traçabilité.

-Combinaison unique de sécurité.

-Lien entre le code-barres des informations du patient et les informations de la carte ID Gel

Code-barres de la carte ID Gel



Code-barres des informations du patient

II- Exigences Techniques

➔ Qualification à l'installation.

Qualification opérationnelle: vérification de toutes les spécifications annoncées telles que vérifications métrologiques des volumes, temps, température, vérification des affichages écran, traçabilité des interventions manuelles...

➔ Formation du personnel ----- fiche d'habilitation

Incombe au fournisseur

♣ Logiciel automate :

Qualification à chaque changement de version selon paramètres modifiés.

(Remarque : qualification du matériel sera abordée ultérieurement).

Constitution du dossier matériel :

- CCTP
- Bon de commande
- Contrats de maintenance
- Fiche de réception.(voir Annexe 1)
- Fiche signalétique = fiche de vie.(voir Annexe2)
- Protocoles de qualification
- Fiche de qualifications.(voir Annexe 3)
- Fiches de formation du personnel
- Validation des méthodes réalisées sur automate :
 - protocole de validation
 - compte-rendu de validation
- Compte-rendu de qualification
- Documents des opérations de maintenances

❖ Réactifs: (voir Annexes 4 .5. 6)

- CCTP
- Contrôle à réception:
 - Adéquation avec commande
 - Vérification notice fournisseurs
 - Contrôle des performances dans la technique d'utilisation par passage des CQI

4/ Les méthodes (procédures analytiques):

- Validation de chaque analyse dans son environnement avec réactifs et automate dédiés par comparaison de méthodes avec la technique antérieure utilisée au laboratoire manuelle ou automatique ou par comparaison inter-laboratoire.
- Paramètres à valider:
 - Spécificité.
 - Sensibilité.
 - Contamination inter- réactants.
 - Seuil de détection des AC.
 - Stabilité.
 - Robustesse.

Parmi les exigences techniques dans la partie matériel on a parlé de la

qualification et maintenances :

III- Qualification et maintenances :

La qualité des résultats d'analyse, outre la formation et l'expérience des analystes, repose essentiellement sur la validité des méthodes d'analyse et la fiabilité de l'appareillage.

La qualification de l'appareillage qui démontre que l'appareil est adapté à son usage et est maintenu et étalonné de façon appropriée est un pré requis avant l'étape de validation d'une méthode qui consiste à étudier ses performances au travers de certains critères (spécificité/sélectivité, exactitude, fidélité, linéarité, limites de détection et quantification, intervalle d'application, robustesse). Par la suite, il faudra s'assurer que les performances du système sont maintenues lors de l'application de la méthode en routine en utilisant des tests de conformité du système et/ou des échantillons de contrôle de qualité. Dans l'industrie pharmaceutique, les tests de conformité sont en général réservés aux analyses chimiques et relèvent des « Bonnes Pratiques de Fabrication », tandis que les échantillons de contrôle de qualité sont la règle en bioanalyse qui relève des « Bonnes Pratiques de Laboratoire ».

Ces différentes étapes constituent un « triangle de qualité » (figure 1) dont la qualification de l'appareillage et la validation du système informatique associé constituent la base. À toutes les étapes, il faut « démontrer », c'est-à-dire apporter les preuves documentées, tangibles, en fournissant les enregistrements et les données et en consignand les résultats dans des fiches.

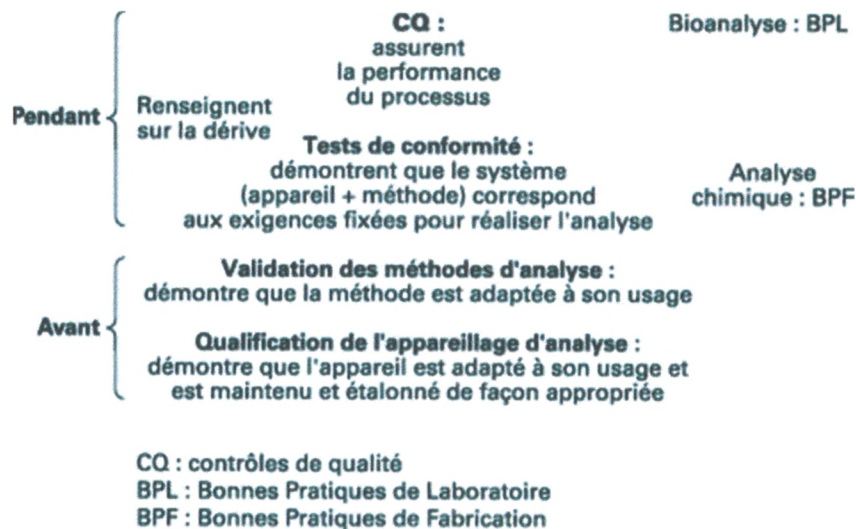


Figure 1 - Triangle de qualité des résultats d'analyse

1/Qualification d'un automate

Avant leur utilisation pour les analyses, et après chaque déménagement, ces automates doivent être "qualifiés" c'est-à-dire que chaque paramètre biologique analysé doit subir une validation de méthode analytique (sensibilité, spécificité, limite de détection, linéarité, seuil de quantification, répétabilité, reproductibilité, biais, incertitude...) et une corrélation avec les résultats de l'automate précédent.

● Appareils

1/Qualifiés.

Qualification : " processus démontrant de façon tangible et documentée qu'un équipement est capable de répondre aux exigences spécifiées" un appareil doit faire ce pourquoi il a été conçu.

2/Entretenus.

3/Étalonnés.

4/Vérifiés.

● Documents associés

♣ Étapes de la qualification : 4 étapes

✿ Avant l'achat : qualification de la conception (QC)

✿ Après l'achat : qualification à l'installation (QI)

qualification opérationnelle (QO)

qualification des performances (QP)

1/ QC – Qualification de la Conception :

❖ Vérification documentée que les installations, systèmes et équipements conviennent aux usages auxquels ils seront destinés

❖ Avant l'achat

Fournisseur : conception

Utilisateur : vérification

❖ Identifier les besoins, les spécifications, justifier l'acquisition, établir le budget,...

2/QI – Qualification à l'Installation

❖ Vérification documentée: s'assurer que les systèmes et équipements reçus, tels qu'ils ont été installés ou modifiés sont conformes à la conception et aux recommandations du fabricant

" adéquation entre ce qui doit être installé et les systèmes et équipements réellement livrés "

❖ Sur équipements neufs, ou ayant subi des modifications

❖ Appareil conforme (commande, bon de livraison, installé au bon endroit,...)

3/ QO – Qualification Opérationnelle

- ❖ Vérification documentée : installations, systèmes et équipements fonctionnent comme prévu sur toute la gamme d'exploitation dans l'environnement *appareil fonctionne comme prévu selon les spécifications définies*

**soit test modulaire*

**soit test holistique*

4/QP – Qualification des Performances

- ❖ Vérification documentée que les installations, systèmes et équipements tels qu'ils sont installés sont en mesure de fonctionner de manière efficace et reproductible dans des conditions réelles d'analyse, de production,...
- ❖ Vérification des performances du système complet
- ❖ "Confirmation que l'appareillage continue régulièrement à fonctionner comme prévu"
- ❖ Tests basés sur des applications types de l'appareil
- ❖ Souvent semblables à la QO; spécifications différentes
- ❖ À intervalles réguliers
- ❖ Après réparation, déplacement, ou longue période de temps sans utilisation
- ❖ Réalisés de façon classique ou automatique : logiciel intégré
- ❖ *QP : partiellement couverte par tests de conformité*

Démarche pour établir des tests OO/OP

- ❖ Etudier l'appareillage : modules , fonctionnement, spécifications
- ❖ Consulter la documentation
- ❖ Définir l'usage de l'appareil
- ❖ Définir les caractéristiques à évaluer
- ❖ Définir les paramètres à enregistrer
- ❖ Étudier les facteurs d'influence
- ❖ Rédiger une procédure détaillée du test
- ❖ Établir des spécifications
- ❖ Exécuter les tests personnels qualifiés
- ❖ Analyser les résultats
- ❖ Rédiger un rapport
- ❖ Qualification pendant toute la vie d'un instrument
- ❖ Fréquence des vérifications :
 - ✓ Suivant appareillage,
 - ✓ Suivant application,
 - ✓ Suivant utilisation.

Exemples Pipettes automatiques :

✿ Caractéristiques

Volume délivré par la pipette

Volume vérifié par méthode gravimétrique

✿ Définitions

Volume nominal

Volumes contrôlés

Volume nominal pour pipettes à volume fixe

Volumes mini, intermédiaire, maxi pour pipettes à volume variable.

✿ Équipement

Balance, thermomètre, récipient de pesée, eau, cône

✿ Mesures

Dix mesures par volume

✿ Perte par évaporation

✿ Exploitation des résultats

📊 Volume moyen = (masse moyenne + évaporation moyenne)* Z

❖ $Z = [1/(\rho_{\text{eau}} - \rho_{\text{air}})] * [1 - (\rho_{\text{air}}/\rho_{\text{eau}})]$

▣ Justesse

❖ volume moyen - volume nominal, µl

▣ Répétabilité

❖ CV % = (écart-type/volume moyen)*100

Pourquoi faut-il vérifier régulièrement le matériel de laboratoire ?

Garantir la fiabilité des résultats
(répondre aux exigences métrologiques)

2/Maintenances et contrôls :

Ensuite, tout au long de son utilisation, il devra subir des maintenances régulières (quotidienne, hebdomadaire ou mensuelle) par le personnel qualifié du laboratoire, communément par les technologues médicaux, technologues ou techniciens de laboratoire ainsi que des maintenances plus poussées (changement de pièces importantes) par le SAV (service après vente) du constructeur. Les résultats de ces automates doivent être contrôlés avec des contrôles de qualité (externes ou internes) et, à chaque nouveau lot de réactif, ils doivent être calibrés.

On ne peut pas parler de la **qualification des automates** sans aborder la **validation des méthodes** qui est déjà considérée parmi les exigences techniques ; voici deux exemples sur la validation l'un sur le groupage ABO/RH1 et l'autre sur la méthode de RAI :

IV-Validation des Techniques Analytiques :

Dans un environnement réglementaire (BPF, BPL, cGMP et ICH), la validation des méthodes est, avec la qualification des équipements, à la base de la qualité des données analytiques.

Processus décrit et strictement encadré par des textes réglementaires (ICH International Conference on Harmonisation et pharmacopées), la mise en place d'une démarche de type : Plan de Validation, rédaction de protocoles et de fiches de tests, du Rapport de Validation, est incontournable. Les analyses réalisées dans le cadre du dossier d'AMM, des contrôles de routine, des études de stabilité, des analyses d'impuretés, doivent être validées selon des critères prédéfinis : spécificité, détectabilité, sensibilité, exactitude, reproductibilité, répétabilité, et à l'aide d'outils statistiques

Ex1: Validation du groupage sanguin ABO/RH1 phénotype RH-KEL1 en filtration sur automate complet

• Echantillons à tester : 40 représentant la répartition phénotypique dans la population (+ les 4 CQI).

Exemple:

A: 15 B: 6 O: 15 AB: 4

Rh neg: 6

Rh pos: 34

CCee: 8

ccEE: 4

Cc et Ee: 22

K neg: 35 K pos: 5

analysés dans les 2 techniques: → Résultats concordants à 100%

- Etude des limites de la méthode
- Etudes des variants quantitatifs: détection des D faibles de type 1
- Etude des double-population d'hématies: mélange 80/20, 50/50, 20/80 avec hématies A+/O-, B-/O+ et O+CCee K+/O+ccEE K-
- Vérification de la non-contamination inter-réactants:
 - Inter-échantillons: alterner les différents groupes
 - Inter-réactifs: non applicable
- Analyse de risques = estimation des incertitudes de mesure
- Validation du transfert informatique des résultats vers le logiciel du Laboratoire.

Ex2: Validation de la RAI dépistage en filtration sur automate complet

- Echantillons à tester : 40
- 20 échantillons R.A.I. négative,

- 20 échantillons R.A.I. positive avec présence au moins des spécificités suivantes : anti RH1, anti RH3, anti RH4, anti KEL1, anti FY1, anti JK1, anti MNS3 de sensibilité de l'ordre de ++ en TIA filtration (titre 4)+ CQI

- analysés dans les 2 techniques → Résultats concordants à 100% (on accepte une différence de 1 + ou (+) pour 10% des échantillons)

Performances des résultats identiques ou supérieures

• Etude des limites de la méthode

- Etude du seuil de détection des dilutions extemporanées d'un étalon de référence anti RH1 standard. (Exigences GBEA: 20ng/mL en général: 5ng/mL)

• Vérification de la non-contamination inter-réactants:

- Distribuer un échantillon contenant un anticorps de titre élevé suivi d'échantillons RAI négative.

• Analyse de risques = estimation des incertitudes de mesure.

• Validation du transfert informatique des résultats vers le logiciel du laboratoire.

V-Evaluation externe de qualité :

A coté de la validation qualification et maintenances il ya également l'évaluation externe de la qualité qui doit couvrir toutes les analyses

• CQE réglementaire afssaps:

• *Groupage sanguin, RAI*

• Institut scientifique de sant

publique (Bruxelles)
(3 envois par an)

**Groupage sanguin*

**RAI dépistage et identification*

**Test direct à l'antiglobuline*

**Epreuve directe de compatibilité*

**Titrage d'anticorps*

CQE intersites entre les 6

labo IHE de l'EFS Bretagne
(4 envois par an)

**Groupage sanguin manuel et*

sur automate

* *RAI dépistage/identification manuel
et sur automate*

* *Phénotypes étendus*

**Test direct à l'antiglobuline + élution*

**Epreuve directe de compatibilité*

* *Titrage d'anticorps*

Conclusion:

De tous les secteurs de la biologie médicale, l'immuno-hématologie constitue certainement celui où l'ensemble automatisation/informatisation se justifie le plus par la sécurisation des analyses qu'il est susceptible d'apporter. Ce contexte particulier impacte nécessairement la conduite d'un projet visant à équiper un laboratoire d'un nouvel automate.

Les équipements proposés en immuno-hématologie continuent de se renouveler. Sous l'impulsion des textes réglementaires, la bascule vers les automates complets et l'adjonction de logiciels spécifiques se poursuivent. La diversité des solutions, notamment en termes de débit, reste cependant préservée, permettant d'adapter le choix d'un équipement aux besoins du laboratoire.

MATERIEL

(Automates)



ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG - BRETAGNE

FICHE DE RECEPTION DU MATERIEL

Site :

- BREST RENNES
 LORIENT ST BRIEUC
 QUIMPER VANNES

Service :

Reception le :

par :

Appareil :

Marque :

Modèle :

N° de série :

Adéquation bon de commande/bon de livraison oui non

Aspect Général

| | Satisfaisant | Non satisfaisant |
|-------------------------------------|--------------|------------------|
| - Etat | | |
| - Matériel associé | | |
| - Nécessaire branchement électrique | | |

Mise sous tension :

satisfaisant non satisfaisant

Le matériel fait l'objet d'un protocole de qualification :

- Par le fournisseur oui non
- En interne oui non

Remarques - commentaires

.....
.....
.....

Matériel : accepté

Refusé

Motif :

.....
.....
.....

Visa du chef de service
ou de son représentant

Annexe 1

MATERIEL

(Automates)

E.F.S. Bretagne
Site de RENNES

Fiche signalétique matériel

Secteur:

Centre de Coût:

Marque:

N° Inventaire:

N° Identification interne:
N° Immo SAP:
N° Série:

Modèle:

Achat

Mise à disposition

Location / Crédit Bail

Local (ventuel):

Garantie:

Date de fin:

Date de réception:

Date de qualification:

Date de mise en service:

Fournisseur:

Tél.:

Fax:

Adresse:

Correspondant - SAV (Précisez la société si différente du fournisseur):

Nom:

Tél.

Fax

Documentation technique:

Contrat de maintenance: Préventif

Curatif

Curatif

Type de maintenance assurée par le service technique interne: Préventif

Consumables:

Recommandations d'utilisation:

Conduite à tenir en cas de dysfonctionnement:

Annexe 2

MATERIEL

(Automates)



ETABLISSEMENT FRANÇAIS DU SANG - BRETAGNE
RUE PIERRE-JEAN GINESTE - BP 91614 - 35016 RENNES CEDEX
TEL. 02 99 54 42 22 - FAX 02 99 54 83 20

Laboratoire d'immuno-hématologie érythrocytaire
EFS site de Rennes
Chef de service : Dr. M. Delamaire
Biologiste adjoint : Dr. L. Delugin

FICHE DE QUALIFICATION OPERATIONNELLE

(Réalisée selon le protocole de qualification B.072.2.MC.007)

Dénomination du matériel : automate complet

Série n° : 4423 Identification : J 271130 Fournisseur : ORTHO

Installation dans le laboratoire IHE Urgences et qualifications effectuées par les techniciens de la société Ortho.

Autres tests effectués par les techniciens du laboratoire.

Qualifications effectuées du 06.07.2010 au 11.08.2010

| Conformité des contrôles métrologiques des modules : | Réalisés par le fournisseur |
|---|-----------------------------|
| → de pipetage et distribution | Oui |
| → d'incubation | Oui |
| → de centrifugation | Oui |
| → de lecture | Oui |
| Conformité du fonctionnement : passage des COI | Oui |
| Vérifications des connexions informatiques avec le LMT | Oui |
| Vérifications de la traçabilité des modifications manuelles | Oui |
| Vérifications de l'affichage à l'écran | Oui |

Date : 12.08.2010

Chef de service : Dr. M. Delamaire Biologiste adjoint : Dr. L. Delugin Cadre technique du laboratoire : Sylvie Flageul

Annexe 3.

MATERIEL

(Réactifs)

Etablissement Français du Sang - Bretagne
Rue Pierre Jean Guénel - B.P. 91614 - 35019 RENNES Cedex - Tél. : 02 99 54 42 22 Fax : 02 99 54 03 20
Laboratoire d'Immunohématologie Erythrocytaire
Chef de service : Dr Marysme DELAMARE

CONTROLE IMMUNO-HEMATOLOGIQUE A RECEPTION DES SERUMS TESTS POUR GROUPAGES SANGUINS ABO-RHESUS-KELL

Réactif :

Date de réception :

Date de péremption :

Fournisseur :

Date de contrôle :

Lot :

POUR TECHNIQUE SUR PLAQUE

| Hématies COI | | Résultats |
|---------------------|---------------------------|-----------|
| Groupes ABO-RH-Kell | Références (n° codebarre) | |
| | | |

Conforme

Non-conforme

Signature du technicien :

Annee 24

MATERIEL

(Réactifs)

Etablissement Français du Sang - Bretagne
 Rue Pierre Jean Guenée - B.P. 91614 - 35016 RENNES Cedex - Tél. : 02.99.54.42.22 - Fax : 02.99.54.83.20

Laboratoire d'Immuno-Hématologie Erythrocytaire
 Chef de service : Dr Maryvonne DELAMAIRE
 Biologiste adjoint : Dr Laurence DELUCIN

CONTROLE IMMUNO-HEMATOLOGIQUE A RECEPTION DU PANEL DE DEPISTAGE

en méthode manuelle en méthode automatique (Cf. résultats bruts de l'automate)

Date de réception :
 N° de lot :
 Date de péremption :

Fournisseur :
 Support utilisé :
 Date du contrôle :

RAI EN METHODE MANUELLE

| | Hématies-test n° 1 du Panel | | Hématies-test n° 2 du Panel | | Hématies-test n° 3 du Panel | |
|----------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|-------------|
| | Enzyme | C. Indirect | Enzyme | C. Indirect | Enzyme | C. Indirect |
| Anti-D | | | | | | |
| Lot : | | | | | | |
| Anti-Fya | | | | | | |
| Lot : | | | | | | |
| Témoin négatif | | | | | | |
| Lot : | | | | | | |
| Anti-D étalon | | | | | | |
| Lot : | | | | | | |

Conforme Non Conforme

Signature du Technicien :

1.072.0.EN.022-V68-19/08/10

Annes S

MATERIEL

(Réactifs)

Laboratoire d'Immuno-Hématologie
Chef de Service :

Etablissement Français du Sang - Bretagne
Rue Pierre-Jean Girese - 35016 Rennes Cedex - Tél: 02 99 54 42 22 - Fax : 02 99 54 83 20

CONTROLES A RECEPTION DES REACTIFS CONTROLE DE CONFORMITE DOCUMENTAIRE

| |
|---|
| Réactif : |
| Caractère : <input type="checkbox"/> monoclonal - <input type="checkbox"/> polyclonal |
| Dénomination : |
| Distributeur : |
| Date de livraison sur site : |

Date de péremption

| |
|------------|
| N° lot : |
| N° doses : |

| |
|-------------|
| Marquage CE |
|-------------|

| |
|--|
| |
|--|

Modalités techniques
préconisées par le fabricant

| |
|--|
| |
|--|

Modalités techniques
d'utilisation

| |
|--|
| |
|--|

Adéquation commande / livraison/conditionnement :
Aspect de l'emballage :
Contrôle de la notice N° notice :
Conformité antigénique des hématies-tests selon réglementation :

Conforme Non conforme
Conforme Non conforme
Conforme Non conforme
Conforme Non conforme

Commentaires aux éventuelles anomalies :

| |
|--|
| |
|--|

CONTROLES IMMUNO-HEMATOLOGIQUES :

Conforme

Non conforme

| |
|---------------------|
| Dates d'utilisation |
| Début : |
| Fin : |

Date du contrôle à réception :

Signature du technicien :

Date et signature du Chef de service :

NA : non applicable
B.072.3 EN.001-1/46-23/08/10

Annexe B.

Bibliographie:

1-Les examens de laboratoire ; Technique en immunohématologie ; A.MARCELLI, J-M. FINE, J-C. HOMBERG, L.RIVAT ; Edition Flammarion, Médecine sciences ; ISBN : 2-257-10111-1 (1981) France ; pages 13 → 16, 45, 46,64, 67 → 73.

2-Aphérèse thérapeutique et Hémovigilance ; Référent : Dr.P.Latry ; petit livret infirmier des bonnes pratiques transfusionnelles ; 3^{ème} édition CHRU Montpellier ; pages 20, 21,22.

3-Cahier de formation Biologie Médicale : Immunohématologie et Groupes sanguins. N26. Bioforma 2002 ; pages 139,140.

4-Biologie clinique ; Antoine Pierson ; 1998-2001 ; page 160.

5-Transfusion sanguine une approche sécuritaire ; Jean jaque Lefrère et PhillipeRouger Bonnes pratiques de laboratoire et contrôle des réactifs en immunohématologie ; Pierre Yves Le Pennec France Noisat - Pirenne, PhillipeRouger.

6- Les équipements automatisés en immuno-hématologiespectra biologie ; PY , Jean-Yves et ROUBINET F 2002 ,125(21),51-57 ;2005 146(24) 28 -23.

7- Automatisation au laboratoire d'immunohématologie érythrocytaire. Transfusion clinique et biologique ; Delamaire M. 12 (2005) 163-168.

8- Automation de la détermination des groupes sanguins ABO-RH.Mannessier L.

9-Maîtrise des tolérances métrologiques.... L.Mannessier, M.Delamaire. Transfusion Clinique et biologique 2006 vol 13 271-277) Définition des Ecarts Maximum Tolérables: EMT.

10-Qualification des instruments de laboratoire Marie-Dominique Blanchin, Journées Qualité et Chimie 2010. 14 octobre 2010 ;Autrans.

11-Document « Analyse des limites de méthodes en immuno-hématologie érythrocytaire ».

12-Widman FK technical manual .13 ed .Arlington VA: AABB, 1993.

13-Oxymag Revue Vol 23 - N° 112 - mai 2010 P. 1-29 © Elsevier Masson.

14-FR- Catalogue ; DIAGAST.

15-Arrêté 26 avril 2002 modifiant l'arrêté du 26 novembre 1999 relatif a la bonne exécution des analyses de biologie médicale

16-Arrêté du 10 avril 2008 relatif aux modalités d'application à certains fonctionnaires relevant des ministres chargés de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche du décret n° 2007-1365 du 17 septembre 2007 portant application de l'article 55 bis de la loi n° 84-16 du 11 janvier 1984 modifiée portant dispositions statutaires relatives à la fonction publique de l'Etat.

17-Arrêté du 9 mai 1977, fixant la spécification et les conditions de préparation, de conservation et de distribution des sérums tests pour les groupages sanguins et des globules rouges tests pour les groupages sanguins et la détection ou l'identification d'anticorps.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Résumé..... | 1 |
| Introduction..... | 2 |
| Partie théorique : | |
| *Généralités sur l'immuno-hématologie..... | 3 |
| I. Définition de l'immuno-hématologie..... | 3 |
| II. Application de l'immuno-hématologie..... | 3 |
| III. Limite de l'immuno-hématologie..... | 4 |
| IV. Rappel sur les groupes sanguins..... | 5 |
| 1. Système ABO..... | 6 |
| 2. système Lewis..... | 9 |
| 3. système Rhésus..... | 10 |
| 4. système Kell..... | 12 |
| 5. système Duffy..... | 13 |
| 6. système Kidd..... | 14 |
| 7. système MNS..... | 15 |
| V. Principe du groupage sanguin..... | 16 |

| | | |
|------|---|----|
| VI. | Examens pré transfusionnels..... | 16 |
| 1. | Groupage ABO/Rh1D..... | 17 |
| 2. | Phénotypage Rh-Kell..... | 18 |
| 3. | Phénotypage étendu..... | 18 |
| 4. | La recherche d'anticorps érythrocytaire irrégulier..... | 19 |
| 5. | Epreuve directe de compatibilité ou EDC..... | 20 |
| VII. | Technique en immuno-hématologie..... | 21 |
| 1. | Agglutination spontanée..... | 21 |
| 2. | Test à l'antiglobuline (test de coombs)..... | 21 |
| a. | Test de coombs direct..... | 22 |
| b. | Test de coombs indirect..... | 22 |
| c. | Test de coombs indirect à force ionique..... | 23 |
| 3. | Techniques actuelles d'agglutination..... | 24 |
| a- | Technique en tube..... | 24 |
| b- | Technique en plaque..... | 25 |
| | *Sur plaque d'opaline..... | 25 |
| | *Sur microplaque..... | 26 |
| c- | Technique en filtration..... | 27 |
| | *Le gel test..... | 27 |
| | *Les microbilles en verre..... | 28 |
| | *Les colonnes d'affinité..... | 28 |

Partie pratique

| | | |
|-----|---|----|
| I. | Les équipements en immuno-hématologie..... | 29 |
| 1. | Réactifs..... | 29 |
| a. | Rappel sur les réactifs et leur évolution..... | 29 |
| b. | Les réactifs utilisés dans les différents techniques en immuno-hématologie..... | 30 |
| c. | Exemple de réactif..... | 32 |
| 2. | Matériel..... | 32 |
| 1) | Swing Twin Sampler..... | 33 |
| 2) | HemOS SP IITwing Sampler..... | 33 |
| 3) | LyraMP-Reader..... | 34 |
| 4) | WADiana8XT..... | 34 |
| 5) | Groupamatic..... | 35 |
| a. | Groupamatic 360C..... | 35 |
| b. | Minigroupamatic..... | 36 |
| 6) | QWALYS®3 : L'automate tout en performance..... | 36 |
| 7) | FREELYS® Mini lab : Votre IH miniaturisée..... | 37 |
| 8) | Classic Plus-ID Gel Station..... | 38 |
| 9) | Techno Twin Station..... | 38 |
| 10) | Saxo ID-Reader..... | 39 |
| 11) | Banjo-ID Reader..... | 39 |

| | | |
|---|---|----|
| 12) | Lecteur de microplaques Modèle BP 800..... | 40 |
| 13) | Lecteur de plaque VidimPlate® agréé IVD..... | 40 |
| 14) | Lecteur de carte ID Gel universel VidimScan® agréé IVD..... | 42 |
| II-Les exigences techniques..... | | 43 |
| 1) | Le matériel..... | 43 |
| 2) | Méthodes..... | 43 |
| III-Qualification et maintenance..... | | 44 |
| a-Qualification des automates..... | | 44 |
| b-Maintenance et contrôle | | 46 |
| VI-Validation des techniques analytiques..... | | 48 |
| V-Evaluation externe de qualité..... | | 50 |
| Conclusion..... | | 51 |
| Bibliographie..... | | 53 |
| Annexes..... | | 54 |