	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2
<i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>		Applicable au : 17/02/2019
		Page 1 sur 8

Document intégré directement à la mise en œuvre du logiciel SAPANET

REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
DELORY ANAIS	MERLIN JULIEN	ONRAED BRIGITTE

SOMMAIRE


1. **OBJET**
2. **PRINCIPE**
3. **LES PRELEVEMENTS**
4. **LA RECHERCHE**
5. **L'ISOLEMENT DES CRYOPRECIPITES**
6. **LE TYPAGE ET LE DOSAGE DE LA CRYOGLOBULINE**
7. **L'IDENTIFICATION ET LE DOSAGE D'UN CRYOFIBRINOGENE**
8. **ARCHIVAGE**

ANNEXES :

Annexe 1 : Recommandations pratiques (Article CNBH)

Destinataires pour Application	Destinataires pour Informations
<ul style="list-style-type: none"> • Techniciens réalisant la recherche, le typage et le dosage des cryoglobulines et cryofibrinogène 	<ul style="list-style-type: none"> • Biologistes

Documents en amont	Documents en aval
	(uniquement les documents cités dans la procédure) <ul style="list-style-type: none"> - PR/BPH/001 - ANA-MO-BPH-003 - ANA-FI-BPH-004

	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2
<i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>		Applicable au : 17/02/2019
		Page 2 sur 8

1. OBJET :

Cette procédure est destinée à décrire le processus de Recherche, Typage et Dosage des cryoglobulinémies et des cryofibrinogénémies.

2. PRINCIPE :

Les cryoglobulines sont des immunoglobulines, qui lorsqu'elles sont présentes dans le sang (cryoglobulinémie) précipitent (ou se gélifient) à une température inférieure à 37°C et se redissolvent à la chaleur de façon réversible.

Les cryoglobulines font partie des protéines des liquides biologiques dont l'exploration est réalisée au Centre de Biologie Pathologie.

Les cryoglobulines peuvent apparaître dans de nombreuses pathologies :

- les pathologies lymphoprolifératives
- les maladies inflammatoires chroniques auto-immunes
- les maladies infectieuses ou virales

Il existe des liens forts entre le type de la cryoglobuline identifiée et la symptomatologie clinique ou la maladie causale.

Ces précipités sont isolés, identifiés par immunofixation et dosés.

Caractéristiques des cryoglobulines et du cryofibrinogène :


Protéine cryoprécipitante au froid et qui se redissout au chaud, sa mise en évidence dans le sérum implique une grande rigueur au niveau de la qualité du prélèvement ainsi que lors de son acheminement et sa prise en charge au laboratoire.

En effet, **si la T° baisse en dessous de 37°C**, la cryoglobuline précipite avant centrifugation du tube de sang, elle sera éliminée avec le culot de cellules au moment de la décantation du sérum. **La recherche sera alors faussement négative.**

3. LES PRELEVEMENTS :

A. Précautions générales pour la recherche d'une cryoprotéine (cryoglobuline / cryofibrinogène):

- La difficulté du dépistage d'une cryoglobulinémie repose essentiellement sur le **respect de la phase pré-analytique (T° à 37°C)** : le prélèvement sanguin doit être maintenu **à 37°C jusqu'au laboratoire** où il sera centrifugé **à 37°C** puis décanté et analysé.
- Si la recherche est positive, un typage et/ou un dosage sera ajouté.

	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE</i> <i>Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2
		Applicable au : 17/02/2019
		Page 3 sur 8

B. Procédure à suivre impérativement :

Analyse à programmer

Si vous ne disposez pas d'un thermobloc à demeure, il faut vous procurer, **avant** le prélèvement, une valisette à Température **37°C**



Deux solutions pour obtenir une valisette :

- 1) Valisette disponible au point d'accueil de votre bâtiment, ou
- 2) Téléphoner la veille au 35588 , chauffeurs et pédestres du Centre de biologie Pathologie, qui vous fourniront une valisette.






➤ **CONDITIONS DU PRELEVEMENT :**


Patient à Jeun impérativement

Du lundi au vendredi (jours ouvrés) pour enlèvement avant 11H

Pas d'envoi de tubes le week end ni les jours fériés car une conservation prolongée favorise une **hémolyse source de non-conformité.**

Préparation :

-  **Rebrancher la valisette dans l'unité de soins et vous assurer de la température affichée : T ° à 37° C**
-  Placer deux tubes secs  de 7 ml (ou 3 tubes de 5 ml) ainsi que l'aiguille à 37°C (dans son emballage) au moins 15 minutes avant le prélèvement.
-  Pour la recherche de cryofibrinogène, 2 tubes citratés de 5 ml  doivent être ajoutés.
- Le patient doit être **à jeun (un trouble du sérum est source de non-conformité)**
- Le patient ne doit pas être placé nécessairement dans une pièce chauffée à 37°C

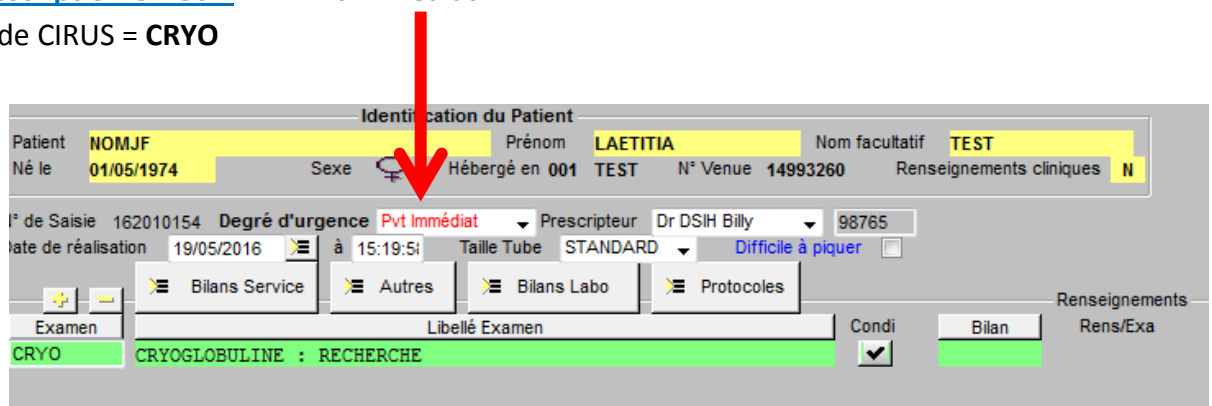
 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	ANA-MO-BPH-013 V : 2 Applicable au : 17/02/2019 Page 4 sur 8
--	---	---

➤ **Prélèvement :**

- Réaliser le prélèvement, homogénéiser les tubes et les placer immédiatement dans les plots de la valisette prendre soin de refermer le couvercle entre chaque tube prélevé.
- Quantité de sang : remplir les tubes au maximum

➤ **Prescription CIRUS : En « Pvt immédiat »**

Code CIRUS = **CRYO**




The screenshot shows a patient identification form with the following details:

- Patient: NOMJF
- Né le: 01/05/1974
- Sexe: ♀
- Prénom: LAETITIA
- Nom facultatif: TEST
- Hébergé en: 001
- TEST
- N° Venue: 14993260
- Renseignements cliniques: N
- Degré d'urgence: **Pvt Immédiat** (indicated by a red arrow)
- Prescripteur: Dr DSIH Billy
- 98765
- Date de réalisation: 19/05/2016 à 15:19:51
- Taille Tube: STANDARD
- Difficile à piquer:
- Examens: CRYO (CRYOGLOBULINE : RECHERCHE)

Compléter obligatoirement la [fiche de traçabilité](#) « Recherche de cryoglobuline/cryofibrinogène » éditée automatiquement lors de la prescription Cirus et la joindre à l'envoi.

➤ **Envoi :**

Vérifier que la Température de la valisette soit bien à 37°C et appeler *immédiatement* le 35588 pour le retrait de la valisette. **Un délai d'acheminement trop long entraîne une hémolyse, source de non-conformité.**

	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE</i> <i>Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2 Applicable au : 17/02/2019 Page 5 sur 8

Rappel ordre des tubes à prélever :

Ordre de prélèvement Recommandations CLSI (NCCLS), Déc. 2007, Doc. H3-A6 et GEHT 2007 (www.geht.org)

AVEC UNE AIGUILLE (ponction franche)



Autres tubes : ACD, VS, Aprotinine et tube Thrombine (toujours en dernier)

AVEC UNE UNITÉ A AILETTES

• Avec hémoculture



Flacon aérobic, Flacon anaérobic

Autres tubes : ACD, VS, Aprotinine et tube Thrombine (toujours en dernier)

• Sans hémoculture



Tube neutre (ou tube sec verre)


Autres tubes : ACD, VS, Aprotinine et tube Thrombine (toujours en dernier)

- Veiller au bon remplissage des tubes.
- Il est recommandé d'homogénéiser le tube dès le retrait du corps de prélèvement, par plusieurs retournements lents.
- Identifier les tubes.
- Veiller à respecter les conditions recommandées de prélèvement et de transport.



Règle d'étiquetage des échantillons :

Le collage de l'étiquette doit être particulièrement soigneux pour permettre aux automates de lire les codes à barre : Etiquette verticale et bien collée , **ne pas cacher l'intérieur du tube pour laisser apparaître l'état de l'échantillon.**

	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2
<i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>		Applicable au : 17/02/2019
		Page 6 sur 8

- Les prélèvements ne respectant pas ces préconisations ne sont pas traités. Traiter le dossier en non-conformité et saisir le code PNC (prélèvement non conforme) dans les analyses CRYO et CRYOFI.
- Mettre les prélèvements au bloc chauffant à 37°C dès leurs arrivées au laboratoire.
- Centrifuger les prélèvements après rétractation du caillot et les décanter dans des tubes à hémolyse Voir la procédure spécifique PR/BPH/001
- Mettre les tubes bouchés à + 4°C au réfrigérateur sur les portoirs correspondants (EL, TYPAGE, DOSAGE).

4. LA RECHERCHE

- Faire une lecture des tubes sur le portoir « TYPAGE», sans les agiter, tous les jours (est-ce le cas ? ou après 1 semaine) pour détecter rapidement les cryoprécipités importants en quantité.

La recherche est positive si:

- * un précipité blanc apparaît donnant un aspect de "volutes de fumée" lorsqu'il est remis en suspension dans le tube.
- * l'échantillon est pris en masse totalement ou partiellement
- Faire une lecture fine au bout de 8 jours;
 - * si aucun précipité n'est apparu, la cryoglobuline et/ou le cryofibrinogène sont rendus négatifs
 - * en cas de doute, il suffit de mettre le(s) tube(s) à 37°C et de regarder si le précipité disparaît ou non. Si le précipité disparaît, la cryoglobuline et/ou le cryofibrinogène sont rendus positifs.
- Contrôle externe de la qualité :
 - Echange interlaboratoire 1 fois par an d'échantillons avec cryoglobulinémie positive et/ou négative.
 - Cet échange a lieu entre le laboratoire Biocentre de Tourcoing (Dr Hammad) et le laboratoire des protéines du CBP (Dr Schraen).


5. L'ISOLEMENT DES CRYOPRECIPITES :

Pour effectuer le typage et le dosage d'une cryoglobuline et/ou l'identification et le dosage d'un cryofibrinogène, il faut avant tout isoler le(s) cryoprécipité(s) :

- Mettre la centrifugeuse à 4°C
- Centrifuger les tubes TYPAGE et DOSAGE à 4°C pendant 10 mn à 3000 trs/mn.
- Eliminer les surnageants
- Remplir les tubes d'eau distillée à 4°C et remettre en suspension les cryoprécipités
- Laisser reposer à 4°C pendant 24 heures
- Recommencer 2 fois ces opérations (ou plus si le cryoprécipité est très important)

6. LE TYPAGE ET DOSAGE DE LA CRYOGLOBULINE

- Effectuer une électrophorèse (avec dosage des protides totaux) sur le tube EL réchauffé à 37°C (il est important de s'assurer de la redissolution complète du cryoprécipité). Celle-ci est interprétée comme toute électrophorèse et un complément d'analyse est éventuellement apporté (IF complète ou avec un antisérum pentavalent) toujours sur le tube porté à 37°C.

	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2
<i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>		Applicable au : 17/02/2019
		Page 7 sur 8

- Après le dernier lavage du cryoprécipité sur le tube TYPAGE CRYOGL, jeter le surnageant, remettre le cryoprécipité en suspension avec 50 µl (ou plus en fonction de la quantité de cryoprécipité recueillie) de sérum physiologique et porter le tout à 37°C. Déposer ce cryoprécipité en immunofixation (Cf ANA-MO-BPH-003)
- Après le dernier lavage du cryoprécipité sur le tube DOSAGE CRYOGL, jeter le surnageant et procéder au dosage du cryoprécipité :
 - Soit par la technique de PETERSEN (cf ANA-FI-BPH-004) pour les cryoglobulinémies dont le taux est inférieur à 5 g/l environ.
 - Soit par différence entre le taux de protéines totales (biuret) du tube EL et celui du surnageant du tube DOSAGE CRYOGL pour les cryoglobulinémies dont le taux est supérieur à 5 g/l environ.

Attention Lorsque la cryoglobuline est positive, il faut d'abord vérifier que le patient n'est pas connu au niveau du laboratoire. Si c'est le cas, on ne procède pas à un nouveau typage mais directement au dosage de la cryoglobuline en rappelant sur le dossier du patient la date du diagnostic.

7. L'IDENTIFICATION ET LE DOSAGE D'UN CRYOFIBRINOGENE

Définition du cryofibrinogène :

Il s'agit d'un fibrinogène qui précipite en dessous de 37°C. Il peut être associé à une cryoglobuline. Il est souvent associé à des maladies dermatologiques.

- Après le dernier lavage du cryoprécipité sur le tube TYPAGE CRYOFI, jeter le surnageant, remettre le cryoprécipité en suspension avec 50 µl (ou plus en fonction de la quantité de cryoprécipité recueillie) de sérum physiologique et porter le tout à 37°C. Déposer ce cryoprécipité en immunofixation (Cf ANA-MO-BPH-003)
- Après le dernier lavage du cryoprécipité sur le tube DOSAGE CRYOFI, jeter le surnageant et procéder au dosage du cryoprécipité par la technique de PETERSEN (Cf ANA-FI-BPH-004)


Attention :

- *Si cryoglobuline négative et cryofibrinogène positif, le dosage du cryofibrinogène est égal au Dosage réalisé sur le tube DOSAGE CRYOFI.*
- *Si cryoglobuline positive et cryofibrinogène positif, le dosage du cryofibrinogène est égal à la différence entre le dosage sur le tube DOSAGE CRYOFI et le dosage sur le tube DOSAGE CRYOGL.*

8. ARCHIVAGE

Tous ces résultats sont saisis dans l'informatique centrale sous les codes :

- CRYO – Recherche de cryoglobuline
- IFCRY – Typage de cryoglobuline
- CRYOD – Dosage de cryoglobuline
- CRYOFI – Recherche de cryofibrinogène
- IFCRYF – Identification de cryofibrinogène
- CRYODF – Dosage de cryofibrinogène
- TECDOS – Technique de dosage (P pour Petersen et B pour Biuret)

	MODE OPERATOIRE TECHNIQUE	ANA-MO-BPH-013
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	CRYO-RECHERCHE, TYPAGE ET DOSAGES CRYO ET CRYOFI	V : 2
<i>INSTITUT DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE</i>		Applicable au : 17/02/2019
<i>Biochimie - Pathologie des protéines 8833</i>		Page 8 sur 8

On peut être amené à ne pas pouvoir typer la cryoglobuline lorsque celle-ci est en trop petite quantité. Le code "PEU" pour l'analyse IFCRY signale cet état de fait au médecin.

Une fiche signalétique est créée pour chaque nouveau patient dans le fichier des cryoglobulines.

Chaque dosage ultérieur y est inscrit.

Si la quantité initiale de prélèvement ne permet pas de décanter un tube DOSAGE, ajouter dans le dossier l'analyse DOSQI qui a un résultat standard : *La quantité de prélèvement est insuffisante pour effectuer le dosage de la cryoglobuline.*