جزوه آموزشی – تخصصی شماره ۷۳

آشنایی با اصول اولیه سرولوژی اختصاصی

Basic Principles of Specialized Serology

تدوین و گردآوری :

جمشید اسماعیلی

منور سلسله

رویا احمدمنفرد

مینا سلسله

زیر نظر :

دکتر شهین شریفی

دکتر فرزاد یزدانی

(کارشناسان پایگاه‌منطقه ای آموزشی انتقال خون تهران)

تهیه شده در مرکز تحقیقات انتقال خون ایران

اسفند ماه ۱۳۸۵

مقدمه :

بانک خون بیمارستانها ، پلی بین پزشک ، بیمارستان و سازمان انتقال خون هستند این پل باید به قدری محکم و استوار ساخته شود که بتواند فشارهای ناشی از هر دو طرف را متحمل گردد . از یک سو تکنیسین بانک خون باید دستورات پزشک معالج را جهت تهیه خون سازگار برای بیماران اجرا نماید و از سویی دیگر ملزم به رعایت استانداردهای سازمان انتقال خون می باشد .

مجموعه حاضر محتوی رایج ترین آزمایشات استاندارد در بخش سرولوژی اختصاصی سازمان انتقال خون می باشد و امید است کمکی جهت بهبود وضعیت بانک خونها باشد ، مطمئناً بانک خونهای امروزی ما بالقوه قادر به ارائه خدمات با کیفیت عالی به بیماران همگام با دانش در حال توسعه ایمونوهماتولوژی می باشند .

پرسنل عزیز بانک خون ، لازم است پس از انجام آزمایش های استاندارد در صورت وجود مشکل جهت مشاوره با شماره تلفن سازمان ۵ ـ ۸۹۵۹۰۹۳ داخلی ۲۵۰ (سرولوژی اختصاصی) تماس حاصل نمائید . درصورت نیاز به انجام آزمایش در سازمان مقدار ۱۰ سی سی خون لخته بیمار را به همراه نمونه CBC (محتوی EDTA) و اطلاعات زیر ارسال نمائید :

سن بیمار ، نوع بیماری ، سابقه تزریق خون و فرآورده های خونی ، مصرف دارو ، سابقه حاملگی یا سقط جنین و یا مرده زائی و هرگونه اقدام تشخیصی یا درمانی در طول حاملگی ، گروه خون بیمار ، نتایج کراس مچ و تجسس آنتی بادی نامنظم (که در بانک خون بیمارستان انجام شده) ، سابقه واکنش های قبلی نسبت به تزریق خون و فرآورده های خونی ، سابقه پیوند مخصوصاً مغز استخوان .

تهیه و نگهداری نمونه خون بیمار :

برای انجام آزمون سازگاری ، نمونه سرم یا پلاسما مورد استفاده قرار می گیرد . مراکز انتقال خون معمولاً سرم را ترجیح می دهند ، زیرا لخته های کوچک فیبرین که اغلب در نمونه های پلاسمایی وجود دارند ممکن است تشخیص آگلوتیناسیون واقعی را با مشکل مواجه کند . اگرچه نمونه سرم نیز درصورتی که بیمار ، زمان انعقاد طولانی داشته باشد و یا هپارین مصرف کرده باشد ، مشکلاتی را به همراه خواهد داشت .

با افزودن یک قطره محلول ترومبین در هر میلی لیتر نمونه خون ، یا افزودن مقداری ترومبین خشک که به نوک اپلیکاتور چسبیده است ، ممکن است لخته شدن نمونه تسریع یابد .

برای خنثی کردن اثر هپارین میتوان یک یا چند قطره محلول سولفات پروتامین یک درصد در سالین به ۴ میلی لیتر خون کامل اضافه کرد .

انتخاب سرم یا پلاسما جهت تعیین آنتی بادی های وابسته به کمپلمان ، دارای معایب و فوایدی می باشد . هنگامی که پلاسما مورد استفاده قرار می گیرد ، ضد انعقادهایی نظیر EDTA **یا سیترات ، کلسیم را از محیط خارج کرده و مانع فعالیت کمپلمان می شود . بنابراین برای تعیین آنتی بادی های که فقط از طریق فعال کردن کمپلمان مشخص می شوند ، باید سرم تازه را مورداستفاده قرار داد .**

برای حفظ میزان مناسب کمپلمان ، باید فوراً سرم را از لخته جدا کرده و آن را در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری نمود .

از به کار بردن نمونه های دارای همولیز باید پرهیز کرد . چنانچه همولیز ناشی از دریافت خون باشد ، ممکن است با همولیز ناشی از آنتی بادی لیزکننده که با گلبولهای قرمز آنتی ژن مثبت واکنش می دهند اشتباه شود .

آنتی بادی هایی که توانایی ایجاد همولیز را دارند بیشتر در سیستم های خونی ABO و lewis و kidd مشاهده می شوند . چنانچه به کاربردن یک نمونه همولیز شده اجتناب ناپذیر باشد مقایسه بین اندازه سلولهای باقی مانده بعداز انجام آزمایش در مقایسه با اتوکنترل ضروری می باشد .

برای اجتناب از آلودگی نمونه با مایعات تزریقی ، نمونه های وریدی را نباید بالاتر از محل تزریق مایعات درون رگی تهیه نمود ولی می توان پایین تر از محل تزریق یا ترجیحاً از بازوی دیگر بیمار نمونه گیری کرد .

نمونه ای از گیرنده خون و نمونه ای از خون تزریق شده (دهنده) باید حداقل یک هفته پس از تزریق خون در دمای ۶ـ۱ درجه سانتی گراد نگهداری شود .

به دلیل اینکه بسیاری از واکنش های همولیتیک تأخیری تا ده روز پس از انتقال خون ، از نظر بالینی قابل تشخیص نیستند ، مراکز انتقال خون معمولاً نمونه ها را حداقل تا ۱۴ روز پس از انتقال خون نگهداری می کنند ، تا درصورت نیاز به انجام مجدد آزمایش ها ، دسترسی به نمونه ها میسر باشد .

ابزار ، معرفها و کنترل کیفی :

در آزمایشات ایمونوهماتولوژی از لوله های باریک (۷۵×۱۲ میلی لیتر یا ۱۰۰×۱۷میلی لیتری) استفاده می شود که مزیت آن بر سایر لوله ها ارتفاع بیشتر نمونه ، کاهش تبخیر سطحی ، تسهیل در ایجاد آگلوتیناسیون می باشد .

درصورت استفاده از پی پت پاستور ، جهت تداوم در اندازه قطرات باید در تمام مراحل آزمایش ، از یک پی پت خاص استفاده شود که جهت زدودن معرفهای قبلی آنرا حداقل دو بار توسط آب و یکبار با سرم فیزیولوژی شستشو می دهند .

آنتی سرمهایی که در بانک خون مورد استفاده قرار می گیرند به طور معمول در یخچال نگهداری می شوند و در دمای اتاق قدرت خود را از دست می دهند . لکتین و آنتی سرمهای حاوی آلبومین بعلت کریستالیزاسیون قابل انجماد نمی باشند . آنتی سرمها در اثر آلودگی و حرارت ، قدرت (Potency) و اثر اختصاصی (specificity) خود را از دست می دهند .

این آنتی سرمها باید روزانه از نظر تغییر رنگ ، کدورت ، واکنش آگلوتیناسیون قوی با سلولهای A و B مشخص و واکنش منفی با سلولهای O مشخص کنترل شوند .

تیتراسیون و کسب اطمینان از تیتر مطلوب آنتی سرمها بصورت هفتگی و یا به هنگام باز کردن ویالهای جدید صورت گیرد .

کنترل ولع یا avidity آنتی سرمها با استفاده از سوسپانسیون ۲۵ ـ ۲۰ درصد گلبولهای قرمز شسته شده صورت می گیرد و زمان لازم جهت ایجاد آگلوتیناسیون توسط کرنومتر ثبت می شود که زمان به دست آمده برحسب نوع آنتی سرم بین ۶۰ ـ ۱۰ ثانیه خواهد بود .

کنترل آنتی هیومن با استفاده از گلبولهای قرمز حساس و سلولهای کنترل مثبت و منفی صورت می گیرد .

تعیین گروه خونی ABO به روش اسلاید

روش انجام آزمایش :

1. **یک قطره از آنتی سرمهای Anti A ، Anti B ، Anti AB را جداگانه روی یک اسلاید شیشه ای تمیز قرار دهید .**
2. **بر روی هر یک از معرف ها ، یک قطره سوسپانسیون ۴۰ تا ۵۰ درصد گلبول قرمز قرار دهید .**
3. **سپس با اپلیکاتور آنها را به شعاع ۲۰ mm × ۲۰ mm کاملاً مخلوط کنید .**

۴. اسلاید را به مدت ۲ دقیقه به آرامی تکان دهید ، بعداز ۲ دقیقه نتـایج را گزارش کنید .

تفسیر : آگلوتیناسیون گلبول های قرمز با آنتی سرمهای فوق را بـه صـورت مثبت و عدم آگلوتیناسیون (سوسپانسیون صاف گلبول های قرمز) را منفـی گزارش کنید .

تعیین **Rh** به روش اسلاید :

۱. یک قطره از معرف Anti D را روی اسلاید قرار دهید .
۲. یک قطره سوسپانسیون ۴۰ تا ۵۰ درصد گلبـول قرمـز را روی معـرف بریزید .
۳. با اپلیکاتور قطره را به هم بزنید و بعداز ۲ دقیقه نتیجه آگلوتیناسـیون را بررسی نمائید .

نکته : تعیین Rh به روش اسلاید الزاماً به همراه نمونه کنترل انجام گیرد .

لازم بذکر است تعیین گروه بندی خون به روش لوله ای که به تفصیل توضیح داده خواهد شد ، از روش اسلایدی دقیق تر می باشد (به خصوص در تعیـین گروههای خونی فرعی و D ضعیف)

تعیین گروه خونی **ABO** به روش لوله ای:

گروه بندی دقیق از اصول اولیه برای انتخاب خون سـازگار مـی باشـد ، لـذا تعیین گروه خون باید بدو روش سلولی و سرمی همزمان انجام گیرد.

در گروهبندی سلولی (Cell type=forward typing) نوع آنتی ژن موجود در سطح گلبول های قرمز تعیین می گردد و در گروهبندی سرمی (Back type = reverse typing) آنتی بادی های طبیعی (Anti A , Anti B) در سرم مشخص می شوند ، در نهایت نتیجه هر دو روش باید مطابقت داشته باشد در غیر اینصورت بررسی های بیشتر ضروری است .

تعیین گروه سلولی (**Cell type**):

۱. چهار عدد لوله را بصورت D,AB,B,A مشخص کنید .
۲. در هر لوله یک قطره از آنتی سرمهای مربوطه را بریزید .
۳. در هر یک از لوله ها یک قطره از سوسپانسیون ۵ـ۳٪ گلبول قرمز بیمار را اضافه نمائید .

(نمونه خون می تواند به صورت لخته یا در ماده ضد انعقاد جمع آوری شده باشد ، برای تهیه رقت ۵ـ۳٪ ، نمونه را سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و در نهایت مقداری سرم فیزیولوژی اضافه گردد تا گلبول های قرمز به رقت ۵ـ۳٪ برسند ، برای تأیید رقت سوسپانسیون می توان از دستگاه میکرو هماتوکریت استفاده کرد .)

۴. لوله ها را به آرامی تکان دهید ، سپس بمدت ۳۰ ثانیه با دور ۳۴۰۰ دور در دقیقه (۱۰۰۰g) سانتریفوژ نمائید (ترجیحاً با استفاده از سروفیوژ)
۵. لوله ها را در مقابل نور از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید .

هرگونه آگلوتیناسیون یا همولیز مؤید واکنش مثبت می باشد ، در غیر اینصورت واکنش منفی بوده که باید حتماً از نظر میکروسکوپی نیز کنترل شود .

نکته ۱: در روش سل تایپ ، همیشه ابتدا آنتی سرمها داخل لوله ها ریخته شود و سپس کلیه لوله ها از نظر ریختن آنتی سرمها کنترل گردد .

نکته ۲ : روش خواندن آگلوتیناسیون : بعد از بیرون آوردن لوله ها از سروفیوژ ، لوله را کج کرده و به آرامی حرکت می دهیم تا گلبول های چسبیده شده به ته لوله جدا شوند و سپس شدت واکنش را قرائت می کنیم .

تعیین گروه سرمی (Back type)

1. **سه عدد لوله را بصورت A و B و O مشخص کنید .**
2. **یک قطره از سرم بیمار را در هر لوله بریزید (لوله ها باید از نظر ریختن سرم کنترل شوند)**
3. **یک قطره از سوسپانسیون ۳ تا ۵ درصد گلبول قرمز A Cell و B Cell و O Cell را جداگانه در لوله های مربوطه اضافه نمائید .**

- **سوسپانسیون A Cell : مخلوطی از گلبول های قرمز حداقل ۲ فرد با گروه خون A می باشد .**
- **سوسپانسیون B Cell : مخلوطی از گلبول های قرمز حداقل ۲ فرد با گروه خون B می باشد .**
- **سوسپانسیون O Cell : برای تهیه O cell گلبول های قرمز حداقل ۱ فرد با گروه خون O استفاده می شود . درتعیین گروهبندی سرمی استفاده از Ocell الزامی نمی باشد ولی آنتی بادی های نامنظم که در دمای اتاق فعال هستند با این روش شناسایی می شوند .**

4. **سوسپانسیونهای گلبولهای O,B,A توسط پرسنل بانک خون تهیه می شوند .**
5. **به آرامی محتویات لوله ها را مخلوط کنید و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در دورrpm ۳۴۰۰ با سروفیوژ سانتریفوژ کنید .**
6. **لوله ها را در مقابل نور به ملایمت تکان داده و از نظر آگلوتیناسیون بررسی نمایئد .**

۷. درصورت هماهنگی و همخوانی بین Back type , Cell type نتیجه گروه خون را می توان گزارش نمود .

آزمایش DU

در مواردیکه نتایج حاصل از آزمایش ، Rh منفی است و نیز در واکنشهای ضعیف میکروسکوپی به آزمایش DU مبادرت می شود .

روش آزمایش :

۱. یک قطره از آنتی سرم D و یک قطره از سوسپانسیون ۵ـ۳ درصد از گلبولهای قرمز بیمار را در یک لوله آزمایش ریخته و مخلوط نمائید .
۲. لوله را به مدت ۶۰ـ۴۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
۳. پس از خاتمه زمان مذکور ، لوله را سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده و بار آخر محلول رویی را خالی کرده و یک قطره آنتی هیومن به آن اضافه کنید و ۳۰ ثانیه در دورrpm ۳۴۰۰ سانتریفوژ کنید .
۴. لوله را در مقابل نور به ملایمت تکان داده و از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید، موارد منفی را با میکروسکوپ کنترل نمائید ، نتایج منفی را می توان با استفاده از گلبول های قرمز حساس شده تأیید نمود .

درجه بندی واکنشهای آگلوتیناسیون :

در ایمنوهماتولوژی واکنش آنتی ژن ـ آنتی بادی از طریق آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز مشخص می شود ، به منظور استاندارد کردن قرائت نتایج ، در میان پرسنل انجام دهنده آزمون ، یک سیستم درجه بندی برای واکنشهای آگلوتیناسیون پایه گذاری شده است ، در این سیستم قرار دادی از مقیاس Weakly **تا** +4 **استفاده می شود .**

+4 ← یک توده بزرگ آگلوتینه از گلبولهای قرمز در ته لوله ایجاد می شود و مایع رویی کاملاً شفاف و بدون سلول است .

+3 ← یک توده بزرگ آگلوتینه از گلبولهای قرمز در ته لوله تشکیل می شود و گلبولهای آزاد نیز مشاهده می شود .

+2 ← تعداد متعددی از توده های با اندازه متوسط حاصل از آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز در ته لوله ایجاد می شود و گلبولهای آزاد وجود ندارد (مایع رویی شفاف است).

+1 ← تعداد زیادی توده های با اندازه متوسط و کوچک در ته لوله ایجاد می شود و مایع رویی کدر و به همراه تعداد فراوانی گلبولهای آزاد است .

+W ← تعداد فراوانی توده های کوچک سلولی که به صورت میکروسکوپی مشاهده می شود .

— ← گلبولهای قرمز آگلوتینه نشده به صورت آزاد قابل مشاهده هستند .

MF ← آگلوتیناسیون مخلوط Mixed Field ، بخشی از گلبولهای قرمز آگلوتینه و بخشی به صورت آزاد

تفسیر نتایج گروه بندی سلولی و سرمی

Cell type				Back type		Result
Anti A	Anti B	Anti AB	Anti D	A.Cell	B.Cell	
4+	-	4+	4+	-	4+	**A+**
4+	-	4+	-	-	4+	**A-**
-	4+	4+	4+	4+	-	**B+**
-	4+	4+	-	4+	-	**B-**
4+	4+	4+	4+	-	-	**AB+**
4+	4+	4+	-	-	-	**AB-**
-	-	-	4+	4+	4+	**O+**
-	-	-	-	4+	4+	**O-**

در صورتیکه نتایج Cell type **و** Back type **همخوانی نداشته باشند ابتدا باید آزمایش تکرار و در مرحله بعد تکرار نمونه گیری و انجام مجدد آزمایش است .**

اشکالات و علل بروز خطا در گروه بندی ABO:

عوامل بروز خطا در گروهبندی سیستم ABO **به دو بخش عمده تقسیم می شوند :**

الف ـ عوامل مرتبط با آنتی ژن یا آنتی بادی

ب ـ عوامل تکنیکی

الف ـ عوامل مرتبط با آنتی ژن یا آنتی بادی

این عوامل شامل ۴ گروه اصلی زیر می باشد :

۱. کاهش و یا فقدان ایزو آگلوتینین

کاهش یا فقدان آنتی کرهای گروه خونی در گروهبندی سرمی منعکس شده که علل عمده آن عبارتند از :

- **ضعف یا نقصان طبیعی آنتی کرهای گروه خونی ، در نوزادان(قبل از شش ماه) و افراد مسن و نیز افراد مبتلا به دیس پروتئینمی و هیپوگاماگلبولینمی (لوسمی ها و لنفوم)**
- **بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی ، انجام شیمی درمانی و استفاده از داروهای مهارکننده ایمنی**
- **کیمریسم (Chimerism) : مخلوط دو نوع مختلف از گلبول های قرمز در یک فرد که بدنبال تزریق خون قبلی ، تعویض خون نوزادان ، انتقال خون جنین به مادر هنگام زایمان و پیوند مغز استخوان و انواع نادر ارثی پدید می آید .۰**

۲. تضعیف یا فقدان آنتی ژنهای گروه خونی

تضعیف یا فقدان آنتی ژنهای A یا B و یا هردو از عوامل دیگر ناهماهنگی در گروهبندی سلولی و سرمی به شمار می رود که در گروهبندی سلولی منعکس می شود و علل عمده آن :

- **تغییرات کمی و کیفی آنتی ژن در لوسمی ها و تومورهای بدخیم**
- **غلظت بالای آنتی ژنهای محلول در سرم (B,A) در بیماریهایی مثل کارسینوم معده و پانکراس**
- **گروه های فرعی A یا B**

۳. واکنش های غیرمنتظره در گروهبندی مستقیم

- تغییر ماهیت گلبولهای قرمز توسط آنزیم های باکتریایی (acquired B Antigen)
- پلی آگلوتیناسیون (ظاهر شدن آنتی ژن مخفی T در عفونت های باکتریایی و آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز با سرم تمامی افراد)
- آنتی کر ضد Acriflavin (ماده رنگین در آنتی سرم B) که موجب آگلوتیناسیون کاذب با گلبولهای قرمز B می شود .

۴. واکنش های غیرمنتظره در گروهبندی معکوس

- وجود اتوآنتی بادی های سرد یا گرم که موجب واکنش در دمای اتاق می شوند.
- آلوآنتی بادی های مختلف
- تشکیل رو لو
- آنتی بادی ضد دارو

ب ـ عوامل تکنیکی ایجاد خطا در گروهبندی سیستم ABO :

شایع ترین علت بروز خطا و ایجاد ناهماهنگی در گروهبندی سلولی و سرمی را عوامل تکنیکی تشکیل می دهند که رایج ترین آنها عبارتند از :

۱. آلودگی ابزار (لوله ، پی پت و غیره) معرف ها (آنتی سرم و سوسپانسیون سلولی) که واکنش های مثبت و منفی کاذب را به همراه دارند .
۲. عدم تناسب سرم یا آنتی سرم با سوسپانسیون سلولی (واکنش منفی کاذب)
۳. عدم توجه به وجود همولیز (منفی کاذب)
۴. تضعیف یا کاهش تیتر آنتی سرم و کهنه بودن سوسپانسیون سلولی که واکنش منفی کاذب به همراه دارند .

۵. اشتباهات پرسنل در تعیین هویت بیمار یا معرفها ، عدم استفاده از میکروسکوپ در تأیید نتایج منفی

تست کومبس مستقیم : (Direct coombs)

آزمایش کومبس مستقیم ، بر روی گلبولهای قرمز بیمار انجام گرفته و هدف از انجام آن بررسی وجود آنتی بادی یا کمپلمان در سطح گویچه های قرمز است که بدنبال واکنش آنتی ژن به آن پیوسته اند .

کاربرد این آزمایش در بانک خون عبارت است از :

۱. **بررسی اتو آنتی بادی و یا کمپلمان در کم خونی های همولیتیک اتوایمیون سرد و گرم**
۲. **آنتی کرهای وابسته به دارو در آنمی های همولیتیک (پنی سیلین ، سفالوتین و . . . .)**
۳. **آنمی های همولتیک نوزادان** (Hemolytic disease of newborn)
۴. **بررسی عوارض ترانسفوزیون ناشی از تزریق خون ناسازگار**

روش آزمایش

۱. **در آزمایش کومبس مستقیم از نمونه خونی حاوی** EDTA **استفاده می شود. گلبولهای قرمز را حداقل سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو دهید تا بقایای پروتئین های موجود در سرم زدوده شود و سوسپانسیون ۳ تا ۵٪ از آن تهیه کنید.**
۲. **یک قطره از سوسپانسیون مزبور را داخل لوله آزمایش ریخته ، سپس یک قطره آنتی هیومن بر آن اضافه کنید .**

۳. محتویات لوله را به آرامی مخلوط کرده ، ۳۰ ثانیــه در دور ۳۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نمائید.
۴. لوله را به آرامی تکان داده و نتیجــه را از نظــر آگلوتیناســیون قرائــت نمائید ، کلیه نتایج منفی با استفاده از میکروسکوپ تأیید می گردند .

آزمایش کومبس غیرمستقیم (Indirect Coombs) :

در آزمایش کومبس غیرمستقیم آنتی کرهای ناقص (آنتــی بادیهــای از نــوع IgG) موجود در سرم بیمار مورد بررسی قرار می گیرند .

موارد استفاده از این آزمایش :

۱. Antibody Screening test
۲. تشخیص نوع یا ماهیت آنتی بادی (Panel test)
۳. Cross match
۴. آزمایش Du
۵. تیتراسیون آنتی D در زنان باردار

روش آزمایش

۱. لوله ای را به نام IDC علامت گذاری کنید .
۲. ســه قطــره از ســرم بیمــار را در ایــن لولــه بریزیــد و یــک قطــره از سوسپانسیون ۵ـ۳٪ ازگروه خونی O را به آن افزوده و به خوبی مخلــوط کنید .
۳. لوله مزبور را یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گــراد قــرارداده پس از طی زمان مذکور لوله را ۳ بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و بار آخر یک قطره آنتی هیومن به آن اضافه نمــوده ، ۳۰ ثانیــه بــا دور ۳۴۰۰ سانتریفوژ نمائید .

۴. لوله را به آرامی تکان داده و از نظر آگلوتیناسیون بررسی نمائید و واکنشهای منفی را با استفاده از میکروسکوپ کنترل کنید .

نکته ۱ : استفاده از کنترلهای مثبت و منفی به همراه نمونه مورد نظر جهت تأیید نتیجه ضروری است .

نکته ۲ : جهت جلوگیری از ایجاد نتایج مثبت کاذب ، سوسپانسیون گلبولی O را از نظر کومبس مستقیم کنترل نمائید فقط درصورت منفی بودن از آن جهت انجام تست استفاده کنید .

علل عمده واکنشهای مثبت کاذب عبارتند از :

آلودگی میکروبی گلبولهای قرمز ، آگلوتینین های سرد ، سرعت زیاد و طولانی بودن زمان سانتریفوژ

علل مهم نتایج منفی کاذب عبارتند از :

شستشوی ناکافی گلبولهای قرمز که موجب خنثی شدن آنتی هیومن می شوند ، کوتاه بودن زمان انکوباسیون ، آنتی هیومن تضعیف شده ، توقف یا تأخیر در انجام مراحل مختلف آزمایش ، سرعت کم و کوتاهی زمان سانتریفوژ

آزمون سازگاری (Compatibility testing)

آزمون سازگاری واژه ای است که غالباً معادل کراس مچ به کار می رود اما مفهوم گسترده تر آن شامل شناسایی گیرنده خون ، خونگیری ، پردازش خون گرفته شده و انجام آزمایشهای لازم برای رسیدن به بالاترین حد سازگاری (عدم واکنشهای ناسازگار و نامطلوب) بین خون اهدایی و گیرنده مورد نظر می باشد .

آزمون سازگاری شامل مراحل ذیل است :

- شناسایی صحیح بیمار ، بررسی پیشینه گیرنده خون
- تهیه نمونه خون
- تعیین دقیق ABO و Rh و انجام آزمایشها بر روی کیسه خون اهدایی
- تعیین دقیق ABO و Rh و انجام غربالگری آنتی بادی (Ab screening) بر روی نمونه گیرنده خون و انجام کراس مچ با سرم گیرنده و گلبولهای قرمز اهداکننده
- درصورت وجود آنتی بادی مهم بالینی در سرم گیرنده ، انتخاب کیسه های خون فاقد آنتی ژن مربوطه و انجام کراس مچ روی آنها
- تزریق خون به گیرنده و کنترل دقیق علایم حیاتی وی و اندازه گیری هموگلوبین و هماتوکریت بیمار بعداز تزریق خون به عنوان آخرین و مهمترین مرحله آزمون سازگاری

درصورتی که تمام مراحل آزمون سازگاری بطور صحیح انجام شود ، خون تزریق شده به بیمار به احتمال ۹۹/۹ درصد سازگار خواهد بود .

آزمایش کراس مچ ماژور Major cross match

آزمایش کراس مچ ماژور که کراس مچ مستقیم یا Forward نیز نامیده می شود قسمت اصلی آزمون سازگاری را تشکیل می دهد و به دو منظور اصلی نیز انجام می شود :

۱ـ پیشگیری از واکنش های ایمونولوژیک نامطلوب

۲ـ حداکثر بهره گیری بیمار از خون تجویز شده

عوارض ترانسفوزیون نامتجانس ، با علائم بالینی بارز و مشخص در حین یا متعاقب تجویز خون ناسازگار پدیدار شده و علائم آشکار همولیز(انهدام سریع گلبولهای قرمز) را بهمراه دارد و در موارد خفیف تر تخریب گلبولهای قرمز بتدریج و یا بصورت دیررس صورت می گیرد و با کاهش اعمال حیاتی آنها همراه می باشد ، در این آزمایش سرم فرد گیرنده خون را با

گلبولهای قرمز فرد دهنده مجاور کرده و واکنشهای آنرا بررسی می کنند ، در این روش آلوآنتی بادی های موجود در سرم بیمار (نسبت به گلبولهای قرمز دهنده) مشخص می شوند .

روش :

۱. سه عدد لوله را به صورت IDC , Alb , RT علامت گذاری کنید :

- RT (Room Temperature) برای تجسس آلوآنتی بادی های سرد
- Alb (Albumin) و IDC (Indirect Coombs) برای تجسس آلوآنتی بادی های گرم

۲. داخل لوله RT ، یک قطره سرم بیمار بریزید
داخل لوله Alb ، ۲ قطره سرم بیمار بریزید
داخل لوله IDC ، ۳ قطره سرم بیمار بریزید

(کلیه لوله ها را از نظر ریختن سرم بیمار کنترل کنید)

۳. در هر یک از لوله ها یک قطره از سوسپانسیون ۳ تا ۵ درصد گلبول قرمز دهنده بریزید .

(کلیه لوله ها را از نظر ریختن گلبولهای قرمز کنترل کنید)

۴. لوله RT را یک ساعت در حرارت اتاق قرار دهید .

۵. لوله IDC را یک ساعت در بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید.

۶. لوله Alb را به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید ، پس از گذشت نیم ساعت از کنار لوله به آرامی یک قطره آلبـومین گاوی ۲۲درصد اضافه کنید (بدون مخلوط کردن)

۷. پس از اتمام یک ساعت لوله های RT و Alb را به آرامی تکان داده و از نظر همولیز یا آگلوتیناسیون بررسی کنید .

۸. پس از طی زمان مذکور لوله IDC را از بن ماری بیرون آورده و ۳ بار بـا سرم فیزیولوژی شستشو داده ، پس از آخرین شستـشو و خـالی کـردن سرم فیزیولوژی لوله IDC را روی یک دستمال برگردانید تا تمـام سـرم خارج شود و گلبولهای قرمز کاملاً خشک شوند .

۹. در مرحله آخر یک قطره آنتی هیومن گلبولین داخل لوله IDC ریختـه و کاملاً مخلوط کنید ، سپس لوله IDC را بمـدت ۳۰ ثانیـه در سـروفیوژ سانتریفوژ کنید .

۱۰. لوله IDC را از سانتریفوژ خارج کنید و به آرامی تکان دهید لوله را در مقابل روشنایی از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید . در همه موارد ، نتـایج منفی باید از نظر میکروسکوپی چک شوند .

نکته : برای تأیید نتیجه منفی لوله IDC می توان از گلبول قرمز حساس شده استفاده نمود به این ترتیب که یک قطره گلبول قرمز حساس شده را به لولـه IDC اضافه کرده ، پس از ۳۰ ثانیه سانتریفوژ آگلوتیناسیون را قرائـت کنیـد واکنش مثبت با گلبولهای قرمز حساس شده نتیجه منفی لوله IDC را تأییـد می کند در غیر اینصورت نتیجه منفی لولـه IDC اعتبـار نداشـته و تکـرار آزمایش الزامی است .

آزمایش کراس مچ ماژور			تفسیر
RT	Alb	IDC	
-	-	-	این خون برای بیمار سازگار می باشد .

+	–	–	بیمار دارای آنتی بادی سرد می باشد .
–	+	+	بیمار دارای آنتی بادی گرم می باشد .

آنتی بادی های سرد در دمای ۴ درجه سانتی گـراد دارای بیـشترین شـدت آگلوتیناسیون (+4) می باشند و در دمای اتاق یا حتی ۳۰ درجه سانتی گـراد گلبول های قرمز را با شدت کمتری آگلوتینه می کنند .
آنتی بادی های گرم در در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد واکنش (+4) را نشان می دهند .
همزمـان بـا آزمـایش کـراس مـچ ، آزمایـشات Auto control و Ab) Screening) نیز انجام می شود که در ادامه شرح داده شده اند .

آزمایش Auto Control

در آزمون سازگاری به عنوان کنترل از گلبولهای قرمز و سرم بیمار اسـتفاده می شود که همزمان با آزمایش اصلی و نیز همراه با آزمونهای غربالگری آنتی بادی انجام می شود ، استفاده از اتو کنترل نشان خواهد داد که آیا آنتـی بادی موجود در سرم بیمار بر علیه سلولهای خود اوست و یا بر ضد سـلولهای تزریق شده می باشد .
اتو آنتی بادی ها دو نوع هستند : سرد و گرم که نوع گرم آن اهمیـت بـالینی بیشتری داشته و اکثراً برعلیه آنتی ژنهای سیستم Rh ایجاد می شوند .
اگر بیماری به تازگی تزریق خون داشته باشد مثبت بودن اتوکنترل را باید بـا احتیاط بررسی نمود چون ممکن است آلوآنتی بادی موجود در سرم بیمار بـر روی گلبولهای تزریقی جذب شده باشد و اتوکنترل مثبت شود درصورتی که اتوآنتی بادی در کار نیست .

روش انجام آزمایش اتوکنترل نیز مشابه Cross Match است با ایـن تفـاوت که به جای گلبولهای قرمز دهنده از گلبول خود بیمار استفاده می شود . سرم بیمار را با گلبولهای خودی در شرایط مختلف IDC , Alb , RT مجاور کـرده و نتایج را قرائت می کنیم .

درصورت مثبت بودن اتوکنترل باید از خونی جهت تزریق استفاده کـرد کـه نسبت به اتوکنترل ضعیف تر بوده و یا معادل آن باشند .

بـا اینکـه از انتقـال خـون بـه بیمـاران مبـتلا بـه WAIHA (Warm Auto immune Hemolytic Anemia) تا حد امکـان اجتناب می شود ، اما می توان از خونی که دارای کمترین ناسازگاری (نسبت به اتوکنترل) باشد جهت انتقال به بیماران دارای اتوآنتی بـادی بـا ویژگـی نامشخص ، استفاده نمود .

غربالگری یا آشکارسازی آنتی بادی (Ab Screening) یا (O Cell)

در این آزمایش از معرف O cell برای تجسس آنتی بادی نامنظم استفاده می شود . معرف O Cell از گلبول قرمز O^+ تهیه می شـود و دارای اکثـر آنتـی ژنهای مهم و شناخته شده است .

سلولهای معرف O Cell را می توان به صورت جداگانـه (حـداقل گلبولهـای قرمز یک فرد) با گروه خونی O^+ تهیه کرد سلولهای معرف اسکرین را نباید به صورت Pooled (مخلوط چند گلبول O^+) تهیه نمود زیـرا باعـث رقیـق شدن آنتی ژنها و واکنش mixed Field می شود .

روش آزمایش مشابه آزمایش کراس مچ می باشد ولی به جای گلبـول قرمـز فرد دهنده از سوسپانسیون O cell استفاده می شود .

روش :

۱. سه عدد لوله را به صورت IDC , Alb , RT علامتگذاری کنید .
۲. داخل لوله های IDC , Alb , RT به ترتیب یک ، دو و سه قطره از سرم بیمار اضافه کنید و لوله ها را از نظر ریختن سرم کنترل کنید.
۳. در هریک از لوله ها یک قطره از سوسپانسیون ۳ تا ۵ درصد گلبول O بریزید .
۴. مطابق با آنچه در آزمایش کراس مچ شرح داده شد لوله RT را یکساعت در حرارت اتاق ، لوله IDC را یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد و لوله Alb را یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید بعداز گذشت نیم ساعت به لوله Alb یک قطره آلبومین گاوی ۲۲ درصد اضافه کنید و مجدداً نیم ساعت در بن ماری بگذارید .
۵. پس از طی زمان های ذکر شده لوله RT و Alb را بدون سانتریفوژ از نظر وجود آگلوتیناسیون بررسی کنید .
۶. لوله IDC را سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده و بار آخر یک قطره آنتی هیومن اضافه کرده و ۳۰ ثانیه در دور ۳۴۰۰ سانتریفوژ کنید و از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید .

اگر در مرحله RT واکنش مثبت مشاهده شود آلوآنتی بادی از نوع Cold Antibody بوده و اگر در مرحله Alb یا IDC واکنش آگلوتیناسیون مشاهده شود مؤید وجود Warm Antibody می باشد ، جهت تعیین هویت این آنتی بادی انجام Panel test ضروری است .

تفسیر کراس مچ ناسازگار

اشکالات متعددی در جریان آزمایشات سازگاری پدید می آیند که لازم است به سرعت و دقت مورد بررسی قرار گرفته و راه حل مناسبی ارائــه شــود . در ذیل به شرح مهمترین موارد ناسازگاری می پردازیم :

۱ـ مثبت بودن آنتی بادی در آزمایش غربالگری ، منفــی بــودن اتــوکنترل و مثبت بودن کراس مچ ماژور :

تفسیر معمولی در این حالت تولید آلوآنتی بادی یا مخلوطی از آلوآنتی بــادی ها در گیرنده می باشد که توسط سلولهای غربالگر مشخص شــده اســت و در گلبولهای قرمز اهداکننده آنتی ژن معــادل آلــوآنتی بــادی هــا وجــود دارد . مطالعات تشخیص آنتی بادی ترجیحاً در سرم و یا پلاسمای بیمار و واحدهای انتخابی صورت می گیرد . اگر واحدهای انتخابی نیز سازگاری نشان ندهنــد ، پاسخ مربوطه را در حالت های بعدی ملاحظه کنید .

۲ـ منفی بودن آنتی بادی در آزمایش غربالگری ، منفـی بـودن اتـوکنترل و مثبت بودن کراس مچ :

کراس مچ ناسازگار در این حالت ، مکرراً در سیستم ABO ملاحظه می شود. گروهبندی ABO بیمار و اهداکننده باید مورد مطالعه قرار گیرد . گروهبندی غلط ABO چه در مورد بیمار و چه در مـورد اهداکننـده باعـث ناسـازگاری ABO می شود. همچنین ممکن است ، سرم بیمار حـاوی آنتـی بـادی هـای سیستم ABO نظیر آنتی A1 باشد که در غربالگری با گلبولهـای قرمـز (O) مشخص نشوند ولی در آزمایش با سلولهای شناخته شده A1 تـشخیص داده می شوند .

حالت سوم حضور آنتی بادی های غیرفعال برعلیه A و B است کـه ناشـی از انتقال خونهای قبلی یا درمان با گاماگلبولین تزریقی می باشد . مـروری بـر سابقه انتقال خون بیمار ، اطلاعات لازم در تفسیر نتایج را فراهم می کند .

چنانچه سرم بیمار فقط با یکی از واحدهای اهدایی در مرحله کـومبس غیـر مستقیم (IDC) مثبت شود ، ممکن اسـت واحـدهای اهداکننـده از نظـر آزمون کومبس مستقیم (DAT) مثبت باشند . باید روی سلولهای اهداکننده آزمایش (DAT) انجام شود . اگر آزمایش مثبت بود ، نباید در انتقال خون از آن استفاده شود . گلبولهای قرمز اهداکننده ای که قـبلاً بـا ایمونوگلبـولین حساس شده اند در آزمایش DAT مثبت می شوند و در مرحله کومبس غیـر مستقیم (IDC) آزمایش کراس مچ نیز با همه گیرنده ها مثبت خواهند شد .

تفسیر بعدی در مورد واحدهای اهداکننده زمانی است که آزمـایش کـومبس مستقیم (DAT) منفی می باشد ، وجود آلوآنتی بادی در سرم بیمار برعلیـه یک آنتی ژن با شیوع کم که بر روی گلبولهای قرمز اهدایی وجود دارد ولی بر روی سلولهای غربال کننده وجود ندارد مطرح مـی گـردد . در ایـن صـورت آزمایش تعیین هویت آنتی بادی باید با تعداد زیادی از آنتی ژن های با شیوع کم صورت گیرد .

به علاوه این موضوع ممکن است به علت وجود آنتی بادی باشد که فقط با گلبولهای قرمز اهداکننده ای که از نظر آنتی ژن هموزیگوس است ، واکنش می دهد . به دلیل اینکه سلولهای غربال کننده برای آنتی بادی که واکنش آن به میزان آنتی ژن وابسته است ، هتروزیگوت است ، در چنین شرایط خاصی واکنش ایجاد نخواهد شد .

۳ـ مثبت شدن آزمایش غربال آنتی بادی ، اتوکنترل مثبت و کراس مچ ماژور مثبت :

هنگامی که هر سه آزمایش مثبت شود باید سه احتمال را مورد مطالعه قرار داد . اولین مورد وجود اتوآنتی بادی است. به دلیل اینکه بیشتر اتوآنتی بادی ها بر علیه آنتی ژن اختصاصی با شیوع بالا می باشند، از این رو با همه سلولهای آزمایش شده واکنش می دهند . این موضوع ، هم در مورد اتوآنتی بادی های سرد ، نظیر آنتی I و هم در مورد اتو آنتی بادی گرم برعلیه آنتی ژن های سیستم Rh صادق می باشد . در این موارد برای برداشتن و حذف اتوآنتی بادی باید روش هایی را به کار برد که آلوآنتی بادی های احتمالی به واسطه واکنش های اتوآنتی بادی موجود در سرم بیمار پنهان نمانده باشد .

چنانچه بیمار به تازگی خون دریافت کرده باشد ، تفسیر دوم اینست که یک آلوآنتی بادی با گلبولهای قرمز اهداکننده واکنش داده ، در نتیجه اتوکنترل مثبت می شود ، مثبت شدن آزمایش کومبس مستقیم این نظریه را تأیید می کند که حساس شدن گلبولهای قرمز اهداکننده به واسطه وجود آنتی بادی IgG می باشد و با مطالعه تعیین هویت آنتی بادی و تعیین فنوتیپ نمونه خون تزریقی مشکل حل خواهد شد . تفسیر سوم موارد غیرطبیعی در سرم بیمار و یا مشکلات مربوط به معرف ها درخصوص واکنش های سرولوژیکی می باشد . تغییر نسبت طبیعی آلبومین و گاماگلبولین در سرم بیمار ممکن است باعث اتصال گلبولهای قرمز به یکدیگر شود که در بررسی میکروسکوپی به صورت رولو مشاهده می شود .

در این حالت ، تمام آزمایش ها از جمله اتوکنترل در دمای اتاق و مرحلــه ۳۷ درجه سانتی گراد (در لوله Alb) منظره آگلوتیناسیون را نشان می دهند . از آنجا که گلبولهای قرمز را قبل از افزودن معرف آنتی گلبولین شستــشو مــی دهند ، تشکیل رولو روی آزمایش کومبس غیر مستقیم (IDC) تأثیری نمی گذارد . این پدیده در بیماری هایی نظیر میلوم مولتیپل و نفریت ها دیده می شود . درصورت اضافه کردن محلول نمکی سرم فیزیولــوژی آگلوتیناســیون مربوط به رولو برطرف مــی شــود و بــه ایــن صــورت مــی تــوان رولــو را از آگلوتیناسیون مربوط به آنتی بادی تفکیک کرد .

مشکلات مربوط به معرف های به کار رفته هنگامی رخ می دهند که در ســرم بیمار بر علیه اجزای موجود در معرف از جمله مواد نگهدارنده گلبولهای قرمز و مواد افزودنی به معرف ها ، آنتی بادی وجود داشته باشد .

آنتی بادی برعلیه مواد نگهدارنده گلبولهای قرمــز بــا اتــوکنترل و آزمــایش کراس مچ واکنش ایجاد نمی کنند . شستشوی گلبولهای قرمز به کار رفتــه و یا به کار بردن گلبولهای قرمز سایر شرکت های سازنده معــرف هــا ، معمــولاً موضوع را مشخص خواهد کرد .

در مقابل ، وجود آنتی بادی در سرم بیمار برعلیه مواد افزودنی به معرف های سرولوژیک ، باعث می شود واکنش لوله اتوکنترل ، کــراس مــچ و همچنــین آزمایش غربال آنتی بادی مثبت شوند .

مثبت شدن لوله اتوکنترل در آزمایش کراس مچ را بایــد بــا انجــام آزمــایش کومبس مستقیم (DAT) بر روی گلبولهــای قرمــز ، تأییــد کــرد . چنانچــه آزمایش کومبس مستقیم منفی باشد ، اختلاف در نتــایج ، مربــوط بــه مــواد افزودنی در آزمایش اتوکنترل می باشد ، اگر به وجود آنتی بادی نــسبت بــه مواد موجود در معرف مشکوک شدیم باید از سایر معرف ها استفاده شود و یا آزمایش تعیین آنتی بادی با استفاده از محیط نمکی انجام گیرد .

دو نمونه از پدیده آنتی بادی برعلیه مواد افزودنی یکی وجود آنتی بادی برعلیه Thimersoal است که به عنوان ماده حفاظتی در بعضی معرف ها و از جمله محلولهای با قدرت یونی کم (Liss) مورد استفاده قرار می گیرد و دیگری کاپریلات سدیم است که به عنوان ماده پایدار کننده در معرف های آلبومین مورد استفاده قرار می گیرد .

تعیین نوع آنتی بادی یا Identification (Panel test)

این آزمایش درصورت مثبت بودن آزمون غربالگری (Ab screening) جهت تعیین هویت آنتی بادی انجام می شود و هدف از آن اجتناب از تجویز آنتی ژن هنگام تزریق خون به بیمار است .

برای انجام این تست از پانل های سلولی (Panel cell) استفاده می شود که بطور معمول از یکسری گلبولهای قرمز O (معمولاً ۸ تا ۱۰ نمونه) با آنتی ژنهای مشخص تشکیل شده اند و مشخصات آنتی ژنی هر سری از سلولهای پانل در جدول آن (Antigram) فهرست شده است . این جداول فقط برای یکسری گلبولهای همراه آنها معتبر و قابل استفاده است .

روش انجام این آزمایش مشابه آزمون سازگاری است ، هریک از این گلبولها جداگانه با سرم بیمار آزمایش می شوند . این آزمایش را می توان در شرایط RT (جهت شناسایی آنتی بادی های سرد) ، IDC , Alb (جهت شناسایی آنتی بادی های گرم) انجام داد که این مورد بستگی به اطلاعات بدست آمده از آزمایش تجسس آنتی بادی دارد ، مثلاً اگر در مرحله تجسس فقط مرحله IDC مثبت بود در مرحله تعیین هویت نیز این روش (IDC) را باید به کار برد هرگونه واکنش مثبت در آزمایش مزبور نشانگر وجود آنتی بادی نامنظم است که با استفاده از جدول می توان نوع آن را تعیین نمود .

پس از شناسایی آنتی بادی های نامنظم ، تمامی واحدهای خونی که برای تزریق انتخاب می شوند ، الزاماً با آنتی سرمهای معلوم آزمایش شده و از نظر

فقدان آنتی ژنها که برعلیه آنها در بدن بیمار آنتی بادی پدید آمده بررسی می شوند ، واحدهای خونی مزبور علاوه بر آن ، از نظر سازگاری با سرم بیمار آزمایش می شوند .

تعیین فنوتیپ RBC (RBC phenotyping)

یکی از آزمایشاتی است که قبل از اولین تزریق خون برای بیماران تالاسمی ماژور پیشنهاد می گردد و شامل تعیین آنتی ژنهای مختلف بیمار از نظر سیستم Kell ، Kidd ، Duffy ، MNSs ، Lutheran و CcEe است .
انجام این آزمایش از این لحاظ اهمیت دارد که هنگامیکه یک آلوآنتی بادی شناسایی می شود باید از عدم وجود آنتی ژن مربوطه در گلبولهای قرمز بیمار اطمینان حاصل کرد ، چنانچه بیمار به تازگی خون دریافت کرده باشد سلولهای تزریق شده خون ممکن است به صورت آگلوتیناسیون Mixed Field ظاهر شوند که فاقد ارزش است ، در اینصورت تنها آنتی ژنهایی که منفی گزارش می شوند ارزش خواهند داشت ، برای تعیین دقیق فنوتیپ RBC در اینگونه بیماران باید حداقل ۳ ماه از آخرین تزریق خون گذسته باشد.
روش انجام آزمایش مطابق با بروشور کارخانه سازنده آنتی سرمهای مربوط است و ضروری است که به همراه نمونه بیمار یک نمونه کنترل با آنتی ژنهای مشخص نیز استفاده گردد .

تیتراسیون آنتی بادی (Antibody Titration)

در مواردی که سنجش آنتی بادی از نظر کمیت و تغییرات آن در یک فرد ، از نظر افزایش و یا کاهش مورد نظر باشد ، از روش تیتراسیون استفاده می گردد .

از موارد مهم کاربرد بالینی ، که تیتراسیون مورد استفاده قرار می گیرد ، مـــی توان به کم خونی های ایمونوهمولیتیک و بررسی مادران در دوران بـــارداری (از نظر پیشگیری اریتروبلاستوز جنینی) اشاره نمود .
در تیتراسیون آنتی سرم ها و در بررسی سرم مادران از محلولهـــای نمکـــی (سرم فیزیولوژی) جهت رقت آنتی بادی استفاده می شود .

روش آزمایش :
۱ـ دوازده عدد لوله آزمایش را به ترتیب شماره گذاری کرده و یـــک حجـــم (معادل ۱۰۰ لاندا) از محلول رقیق کننده را به تمامی لوله ها اضافه کنید .
۲ـ یک حجم از سرم مورد نظـــر (۱۰۰ لانـــدا) را در لولـــه شـــماره ۱ ریختـــه و مخلوط نمایید .
۳ـ یک حجم از محتوی لوله شماره ۱ را به لوله شماره ۲ انتقال داده و پـــس از مخلوط کردن ، همان مقدار از آنرا به لوله شماره ۳ بریزید . ایـــن عمـــل را بـــه ترتیب در مورد سایر لوله ها ادامه داده و یک حجـــم اضـــافی از لولـــه شـــماره دوازده را دور بریزید .
بدین ترتیب رقتهای مختلفی از سرم از ۱/۲ در لوله شـــماره ۱ تـــا ۱/۴۰۹۶ در لوله شماره ۱۲ به دست می آید .
۴ـ یک قطره از سوسپانسیون گلبولی متناسب با روش اتخاذ شـــده (بعنـــوان مثال گلبول قرمز مثبت O^+ در مورد تیتراسیون آنتی D) را در تمامی لوله ها اضافه کرده و پس از مخلوط کردن برحسب فعالیت آنتی بادی در دمای اتاق و یا بن ماری ۳۷ درجه قرار دهید . بطور مثال اگر تیتر آنتی D مدنظر باشـــد در ۳۷ درجه سانتی گراد و اگر تیتر آنتی A یا آنتی B مدنظر باشد در دمـــای اتاق انکوبه می نمائیم .
۵ـ پس از انقضای زمان انکوباسیون که برحسب نوع واکنش متفاوت است در مورد تیتراسیون آنتی D لوله ها را سه بار شستشو داده و بار آخر یک قطـــره

آنتی هیومن به آنها اضافه کنید و سپس لوله ها را با دور ۳۴۰۰ بمدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ کنید و شدت آگلوتیناسیون را از +۱ تا +۴ ثبت کنید (در مورد آنتی A یا آنتی B پس از ریختن نمونه ها سانتریفوژ انجام می شود)
بالاترین رقتی از سرم که در آن اگلوتیناسیون + ۱ مشاهده گردد ، بعنوان تیتر آنتی بادی در نظر گرفته و گزارش نمایید.

جدول نگهداری خون و مشتقات خون

اجزاء یا مشتقات خون	حجم تقریبی	عمر ذخیره سازی
خون تام (Whole Blood)	۵۲۰ mL	CPD,ACD : ۲۱ روز در دمای ۶ـ۱ درجه سانتی گراد CPDA-l : ۳۵ روز در دمای ۶ـ۱ درجه سانتی گراد
گلبولهای قرمز متراکم(Packed RB)	۲۶۰ mL	مانند خون تام
گلبولهای قرمز شسته شده (Washed RBC)	۲۵۰ mL	بعداز شستن ، ۲۴ ساعت در دمای ۶ـ۱ درجه سانتی گراد
کنسانتره پلاکتی از اهداکننده تصادفی (Random-donor platelet concentrate)	۵۰ mL	۵ روز در دمای اتاق (۲۵ـ۲۰ درجه سانتی گراد) ، حرکت آرام و مداوم
پلاسمای منجمد تازه (FFP) (Fresh Frozen Plasma)	۲۶۰ـ۲۰۰ mL	در دمای ۱۸ـ درجه سانتی گراد یا سردتر به مدت ۱ سال
کرایو پرسی پیتیت (Cryoprecipitate)	۱۵ـ۱۰ mL	در دمای ۱۸ـ درجه سانتی گراد یا سردتر به مدت ۱ سال

Reference:

1- Henry , J.B, Beadling. W, Immunohematology , Clinical diagnosis and management by laboratory method , 20th edition , W.B.Saunders Company , 2001, page 748-826.

2- Rudmam sally V., The ABO and H Blood Group system , pretransfusion testing text book of blood banking and transfusion medicine , W.B. Saunders company 1996 page 66-97 & 348-373.

3- Mark.E.Brecher M.D, ABO,H,and lewis blood Group and Stracturally related Antigen , technical manual AABB , 14 th edition , 2003 page 271-293 & 669-686.

1. L. Simon lippincott william and wilkins, RBC immunology and compatibility testing , Rossi's principles of transfusion medicine 3th edition 2002-page 68-89.

حق هر گونه بهره‌برداری با ذکر منبع بلامانع می‌باشد.

نشانی: تقاطع بزرگراه همت و شیخ فضل‌اله نوری- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

تلفن: ۸۸۶۰۱۵۶۴- فاکس: ۸۸۰۶۰۷۱۷