

روش عملکردی استاندارد برای جستجوی آنتی بادی‌های غیرمنتظره مهم از نظر بالینی

S.O.P for Antibody Screening Test

Indirect Antiglobulin Test (IAT) for the Detection of Antibodies to Red Cell Antigens

هدف / اصول :

انجام آزمایش Antibody Screening Test با مجاورت سرم یا پلاسمای بیمار و معرف‌های استاندارد گلوبول قرمز خون گروه "O" حاوی حداقل آنتی‌ژن‌های $D, C, c, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, JK^a, JK^b, M, N, S, s, P_1, Le^a, Le^b$ به منظور جستجو و مشاهده آنتی بادی‌های غیرمنتظره unexpected antibodies می‌باشد. آلو آنتی‌بادی‌های غیرمنتظره در سرم بیمارانی که سابقه تزریق خون یا بارداری داشته‌اند، یافت می‌گردد. برخی از آلو آنتی‌بادی‌ها مانند I,H,P,M به صورت طبیعی در افراد ایجاد می‌گردند.

نمونه :

۱. حداقل ۵ میلی لیتر پلاسمای خون بیمار در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA قابل قبول است. (به نکات مهم رجوع شود)
۲. الزامی است نام و نام خانوادگی بیمار و شماره منحصر به فرد شناسایی کننده بر روی لوله حاوی خون بیمار ثبت شود.
۳. الزامی است نام خونگیر و تاریخ خونگیری بر روی لوله حاوی خون بیمار ثبت شود.
۴. در صورتی که فرد تزریق خون یا سابقه بارداری در سه ماهه گذشته دارد، نمونه تهیه شده فقط تا ۷۲ ساعت پس از خونگیری معتبر می باشد.
۵. از نمونه‌هایی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed –lipemic) دارند، استفاده نکنید. نمونه‌گیری مجدد انجام شود.
۶. شرایط نگهداری نمونه:
 - نمونه‌های خون به مدت حداقل ۷ روز جهت هرگونه آزمایش‌های بعدی ذخیره شود.
 - نمونه‌های خون در دمای یخچال ۲-۸ درجه سانتیگراد ذخیره شود.
 - جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی، جداسازی سرم یا پلاسما از گلوبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره سازی در لوله های تفکیک شده توصیه نمی‌شود.

سازمان انتقال خون ایران

روش عملکردی استاندارد برای جستجوی آنتی بادی‌های غیرمنتظره مهم از نظر بالینی

S.O.P for Antibody Screening Test

Indirect Antiglobulin Test (IAT) for the Detection of Antibodies to Red Cell Antigens

تجهیزات ، مواد و معرف ها :

- ۱- سالین نرمال ۰/۹ درصد
- ۲- آلبومین گاوی ۲۲ درصد یا معرف LISS
- ۳- معرف Polyspecific - antihuman globulin (AHG)
- ۴- معرف‌های گلبول قرمز خون استاندارد (I,II,III) جهت جستجوی آنتی بادی‌های غیرمنتظره مشابه جدول زیر:

(Standard Antibody Screening Cell Panel)

No	Cell	Rh							MNS				Lutheran		P	Lewis		Kell		Duffy		Kidd			
		D	C	E	c	e	f	V	C ^w	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	P1	Le ^a	Le ^b	K	k	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	
I	R1R1	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0
II	R2R2	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	+
III	rr	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+

توجه: جهت انجام آزمایش بیمار فقط از گلبول قرمز خون استاندارد که (unpooled) می باشد استفاده گردد.

- ۵- گلبول قرمز خون کنترل (حساس شده) IgG Control Cells
- ۶- لوله های آزمایش ۱۰×۷۵ یا ۱۲×۷۵ میلی متر
- ۷- سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده (کالیبراسیون دستگاه توسط بخش پشتیبان انجام شده و مستند گردد).
- ۸- پیپت یکبار مصرف یا پیپت ۱۰۰-۵۰
- ۹- جا لوله‌ای
- ۱۰- آینه مقعر و منبع روشنایی

سازمان انتقال خون ایران

روش عملکردی استاندارد برای جستجوی آنتی بادی‌های غیرمنتظره مهم از نظر بالینی

S.O.P for Antibody Screening Test

Indirect Antiglobulin Test (IAT) for the Detection of Antibodies to Red Cell Antigens

کنترل کیفی :

از یک کنترل سرم Anti-D که در آلبومین ۶ درصد رقیق شده و واکنش 2^+ ≤ در آزمایش IAT نشان می‌دهد، جهت کنترل روزانه استفاده نمایید و برای تهیه کنترل سرم مانند ذیل عمل شود:

۱. حجمی از معرف anti-D موجود در آزمایشگاه را با آلبومین ۶ درصد رقیق و مخلوط نمایید.
۲. در صورتی که گلبول قرمز O positive (R1R1) با محلول کنترل anti-D واکنش 2^+ ≤ بدهد، کنترل سرم قابل استفاده است.

توجه :

- ۱- هرگونه تغییر و جایگزینی معرفها باید مطابق دستورالعمل سازنده باشد.
- ۲- مراحل ۸-۱۲ باید بدون ایجاد هرگونه وقفه در مراحل آزمایش ، انجام پذیرد.

روش کار :

- ۱- ۳ لوله 12×75 میلی متر را به صورت جداگانه نشانه‌گذاری نمایید.
- ۲- به هر یک از لوله‌ها ۲ قطره سرم یا پلاسماي بیمار را اضافه کنید.
- ۳- به ترتیب به هر یک از لوله‌ها ۱ قطره گلبول قرمز استاندارد I, II, III اضافه کنید.
- ۴- لوله‌ها را در سانتریفوژ کالیبره مطابق زمان مشخص یا دور $1000 \times g$ از زمان ۳۰-۱۵ ثانیه سانتریفوژ نمایید. سپس لوله‌ها را جهت مشاهده آگلوتیناسیون و همولیز با استفاده از آینه مقعر ارزیابی نمایید. نتایج واکنش را درجه بندی و ثبت کنید.
- ۵- به هر یک از لوله‌های فوق ۲ قطره آلبومین ۲۲ درصد یا محلول LISS مطابق دستورالعمل سازنده اضافه نمایید.
- ۶- در صورت اضافه نمودن آلبومین لوله‌ها را به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید. در صورت اضافه نمودن LISS لوله‌ها را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه یا مطابق دستورالعمل سازنده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.
- ۷- پس از طی زمان مشخص لوله‌ها را سانتریفوژ کرده و جهت مشاهده آگلوتیناسیون و همولیز با استفاده از آینه مقعر ارزیابی نمایید. نتایج واکنش را درجه بندی و ثبت نمایید.
- ۸- در ادامه لوله‌ها را حداقل ۳ تا ۴ بار با سالین ۰/۹ درصد شسته و پس از آخرین مرحله شستشو محلول سالین را با ضربه آرام بر روی سطح یک گاز کاملاً تخلیه کنید.
- ۹- مطابق دستورالعمل سازنده به لوله‌های شسته شده معرف AHG اضافه کنید. سپس لوله‌ها را به آرامی مخلوط نمایید.

روش عملکردی استاندارد برای جستجوی آنتی بادی‌های غیرمنتظره مهم از نظر بالینی

S.O.P for Antibody Screening Test

Indirect Antiglobulin Test (IAT) for the Detection of Antibodies to Red Cell Antigens

۱۰- لوله‌ها را ۳۰-۱۵ ثانیه سانتریفوژ کرده و جهت مشاهده آگلوتیناسیون و همولیز با استفاده از آینه مقعر ارزیابی نمایید.

۱۱- نتایج واکنش‌ها را درجه بندی و ثبت کنید.

۱۲- جهت کنترل و معتبر سازی نتایج منفی آزمایش، ۱ قطره از گلبول قرمز حساس شده (IgG Control Cells) به لوله‌های منفی اضافه کنید.

۱۳- لوله‌ها را سانتریفوژ کرده و جهت مشاهده آگلوتیناسیون ارزیابی نمایید.

تفسیر:

۱- نتیجه آزمایش با وجود آگلوتیناسیون / همولیز در مرحله سریع (Immediate spin) و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد مثبت گزارش شود.

۲- نتیجه آزمایش با وجود آگلوتیناسیون / همولیز پس از اضافه نمودن AHG مثبت گزارش شود.

۳- نتیجه آزمایش در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون / همولیز در هر یک از مراحل و در مرحله AHG و پس از اضافه نمودن گلبول قرمز حساس شده و مشاهده آگلوتیناسیون ($2^w - 1^+$) منفی گزارش شود.

۴- در صورت عدم وجود آگلوتیناسیون پس از اضافه نمودن گلبول قرمز حساس شده نتیجه آزمایش معتبر نبوده و باید مراحل آزمایش تکرار شود.

نکته مهم:

۱. استفاده از خون لخته در موارد زیر بلامانع است:

- در صورت عدم وجود نمونه خون کامل حاوی EDTA
- جستجوی آنتی‌بادنی که می‌تواند کامپلمان را فعال نماید. (به دستورالعمل تولیدکننده معرف‌ها رجوع شود).
- ۲. معرف Polyspecific AHG حاوی anti-Ig & anti-C3 می‌باشد. با توجه به اینکه وظیفه اصلی معرف Polyspecific AHG شناسایی آلو آنتی‌بادی‌های IgG است، بنابراین استفاده از معرف Monospecific anti-IgG در آزمایش جستجوی آنتی‌بادی‌های غیر منتظره بلامانع می‌باشد. استفاده از Monospecific anti-IgG AHG می‌تواند از واکنش‌های ناخواسته جلوگیری نماید.

روش عملکردی استاندارد برای جستجوی آنتی بادی‌های غیرمنتظره مهم از نظر بالینی

S.O.P for Antibody Screening Test

Indirect Antiglobulin Test (IAT) for the Detection of Antibodies to Red Cell Antigens

خطاهای شایع :

گلوبول قرمز حساس شده جهت اطمینان از عدم وجود منفی کاذب در مرحله AHG کاربرد دارد. زمانی که واکنش منفی باشد معرف AHG به صورت آزاد درلوله وجود دارد که با گلوبول قرمز حساس شده آگلوتیناسیون می‌دهد. در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون یکی از موارد زیر اتفاق افتاده است :

- معرف AHG اضافه نشده است.
- معرف AHG اضافه شده ولی با توجه به وجود سالیین باقی مانده یا عدم شستشوی مناسب ، با آنتی بادی‌های آزاد خنثی شده است.
- معرف AHG ، دارای توان واکنش (potency) مناسب نیست.

مراجع :

References:

1. AABB Technical Manual 16th ed. Bethesda , MD 2008
2. Issitt PD, Anstee Dj , Applied blood group serology 4th edition , Durham , NC: Montgomery Scientific Press , 1998
3. Judd WJ, Methods in immunohematology 3rd ed . Durham , NC : Montgomery Scientific Publication , 2008
4. Denise MH , Modern Blood Banking & Transfusion Practices 5th ed . Philadelphia, PA: F.A. Davis company 2005
5. ARC Immunohematology Methods and procedures 1ST ed. Rockville, MD 1993
6. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the UK , 7th ed 2005
7. WHO ; Safe Blood and Blood products; WHO Distance learning material , WHO PRESS 2004
8. WHO ; The Clinical Use of Blood in Medicine, Obstetrics, Pediatrics , Surgery & Anesthesia, Traum & Burns , WHO Press 2002

سازمان انتقال خون ایران