

روش عملکردی استاندارد تهیه سوسپانسیون ۳ درصد گلبول قرمز خون

S.O.P for Preparation of a 3% Red Cell Suspension

هدف / اصول :

نسبت سرم به گلبول قرمز خون می‌تواند به شدت روی حساسیت آزمایش و قدرت آگلوتیناسیون اثر بگذارد. سوسپانسیون ۳ درصد معرفی است که در روش‌های سرولوژیک بکار برده می‌شود. تهیه سوسپانسیون نهایی ۳ درصد به صورت دقیق الزامی نیست، بلکه سوسپانسیون نزدیک به ۳ درصد (۵-۲ درصد) می‌تواند نسبت لازم سرم به گلبول را در بیشتر روش‌ها فراهم آورده و تعداد کافی و مناسب از گلبول قرمز خون را برای خواندن و درجه بندی واکنش در دسترس قرار دهد.

تجهیزات، مواد و معرف‌ها :

- ۱- نمونه خون کامل حاوی EDTA (به نکات مهم رجوع شود)
- ۲- لوله آزمایش ۱۰×۷۵ یا ۱۲×۷۵ میلی متر
- ۳- پیپت یکبار مصرف ۱-۱۰ میلی لیتر
- ۴- پیپت متغیر ۱۰۰۰-۵۰
- ۵- سالین ۰/۹ درصد
- ۶- سانتریفوژ سرولوژیک ۱۰۰۰× g
- ۷- جالوله‌ای
- ۸- آینه مقعر
- ۹- منبع روشنایی (چراغ مطالعه)
- ۱۰- نمونه سوسپانسیون خون ۳ درصد (شناخته شده)

روش کار :

جهت تهیه ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون ۳ درصد گلبول قرمز خون مراحل ذیل را انجام دهید:

- ۱- حداقل ۱ میلی لیتر از خون کامل را به یک لوله ۱۰ میلی لیتری انتقال دهید.
- ۲- به گلبول‌های قرمز خون سالین اضافه نموده و به مدت ۱ الی ۳ دقیقه سانتریفوژ نمایید. این مرحله را ۲ تا ۳ بار تکرار نمایید. محلول نهایی باید کاملاً شفاف و گلبول قرمز در انتهای لوله جمع شده باشند. محلول سالین فوقانی supernatant را کاملاً بدور بریزید.
- ۳- مقدار ۰/۳ میلی لیتر از گلبول‌های قرمز متراکم شسته شده را به لوله‌ای حاوی ۹/۷ میلی لیتر سالین ۰/۹ درصد انتقال دهید.
- ۴- با استفاده از پارافیلیم لوله را پوشش دهید. چند بار با سروته کردن لوله، گلبول‌های قرمز خون را با سالین ۰/۹ درصد کاملاً مخلوط نمایید.

روش عملکردی استاندارد تهیه سوسپانسیون ۳ درصد گلبول قرمز خون

S.O.P for Preparation of a 3% Red Cell Suspension

کنترل کیفی :

• جهت کنترل چشمی رنگ و تراکم سوسپانسیون مقداری از سوسپانسیون تهیه شده را به لوله ۱۲×۷۵ میلی متر انتقال دهید. سپس حجم مشابهی از سوسپانسیون ۳ درصد شناخته شده را به لوله ۱۲×۷۵ میلی متر دیگری انتقال دهید. جهت مقایسه لوله‌ها را مقابل منبع نور قرار دهید.

یا

• به منظور مقایسه مقدار تجمع گلبول قرمز سوسپانسیون ۳ درصد تهیه شده، یک قطره از این سوسپانسیون را به لوله ۱۲×۷۵ میلی متر انتقال دهید. به صورت مشابه یک قطره از سوسپانسیون ۳ درصد شناخته شده را به لوله ۱۲×۷۵ میلی متر دیگری انتقال دهید. با توجه به زمان تعیین شده (۳۰-۱۵ ثانیه)، لوله‌ها را سانتریفوژ نمایید. اندازه دو رسوب گلبول قرمز خون با مشاهده در آینه مقعر باید مشابه باشد.

نکات مهم:

۱. در صورت عدم وجود نمونه خون کامل EDTA استفاده از خون لخته بلا مانع است. به دستور العمل تولید کننده معرف‌ها رجوع شود.
۲. سوسپانسیون تهیه شده را فقط در روز آماده سازی استفاده نمایید و در یخچال آزمایشگاه در دمای ۲-۸ درجه سانتیگراد نگهداری شود.
۳. جهت تهیه حجم کمتر، مقدار سالین ۰/۹ درصد و گلبول قرمز خون را به تناسب انتخاب نمایید.
۴. تهیه سوسپانسیون گلبولی غلیظ یا رقیق می‌تواند منجر به پاسخ مثبت یا منفی کاذب در آزمایش گردد.

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

روش عملکردی استاندارد خواندن و درجه بندی آگلوتیناسیون به روش لوله‌ای

S.O.P for Reading and Grading Tube Agglutination

هدف / اصول :

- همولیز و آگلوتیناسیون هر دو نشاندهنده پایان واکنش آنتی ژن و آنتی بادی می باشد.
- درجه بندی واکنش‌ها در آزمایش‌های سرولوژی گروه خون به منظور مقایسه توان واکنش‌ها انجام می‌پذیرد. این مقایسه می‌تواند در مواردی که هم زمان، چند آنتی بادی در سرم فرد واکنش نشان می‌دهند مانند antibody specificities و یا وقوع antibody dosage مفید واقع شود. به منظور یکنواخت سازی و تکرار پذیری نتایج آزمایش‌ها، باید بین تمام کسانی که در آزمایشگاه، آزمایش انجام می‌دهند خواندن و درجه بندی واکنش‌های آگلوتیناسیون استاندارد سازی شود.
- استاندارد کردن نحوه قرائت، درجه بندی و ثبت واکنش آگلوتیناسیون در هماهنگی و تکرارپذیری نتایج آزمایش‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است.
- استفاده از میکروسکوپ بصورت روتین لازم نیست.
- می‌توان از یک وسیله اپتیک مانند آئینه مقعر یا وسیله نشان دهنده آگلوتیناسیون استفاده نمود. از میکروسکوپ برای تائید واکنش‌هایی که دارای زمینه مخلوطی از گلبول‌های آگلوتینه شده و آزاد (mf) می‌باشند، استفاده می‌گردد.

مواد لازم :

- ۱- لوله‌های آگلوتینه شده آزمایش پس از سانتریفوژ کردن
- ۲- وسیله مشاهده آگلوتیناسیون (آینه مقعر) و منبع روشنایی

روش کار:

- ۱- با دقت و آرام لوله حاوی توده گلبولی (cell botton) را تکان داده و هر بار کج نمایید. این تکان دادن باید به دقت و آرامی چند بار تکرار شود به طوری که توده گلبولی از انتها و جداره لوله، جدا شود.
- ۲- چگونگی جدا شدن گلبول‌ها را از لوله و انتشار آنها را از توده گلبولی مشاهده نمایید.
- ۳- با استفاده از جدول پیوست (A) بلافاصله واکنش‌ها را درجه بندی و ثبت نمایید. واکنش‌ها باید زمانی که گلبول‌های قرمز کاملاً از توده گلبولی و انتهای لوله آزمایش جدا شدند ارزیابی و ثبت گردند.

روش عملکردی استاندارد خواندن و درجه بندی آگلوتیناسیون به روش لوله‌ای

S.O.P for Reading and Grading Tube Agglutination

توجه :

- ۱- جهت خواندن واکنش‌ها می‌توان از وسیله‌ای که نشان دهنده آگلوتیناسیون باشد مانند آئینه معقر استفاده نمود، به دستورالعمل سازنده معرف‌های آزمایش رجوع کنید.
- ۲- سرم لوله آزمایش را که حاوی توده گلبولی است، جهت مشاهده هرگونه همولیز بررسی و گزارش کنید. وجود همولیز نشان دهنده واکنش مثبت آنتی ژن / آنتی بادی می‌باشد.
- ۳- پس از اینکه به لوله آزمایش منفی حاوی AHG سوسپانسیون گلبول قرمز حساس شده (IgG-Control cells) اضافه کردید، انتظار مشاهده واکنش mixed field را داشته باشید.
- ۴- باید به مشخصات آگلوتیناسیون هنگام خواندن لوله، دقت شده و موارد غیر معمول ثبت گردند. این اطلاعات می‌تواند در ارزیابی نهایی واکنش مانند پدیده Rouleaux یا anti-sd^a refractile agglutination کمک نماید.

جدول A

تفسیر واکنش و درجه بندی آگلوتیناسیون Interpretation of Agglutination Reactions	
Macroscopically Observed Findings	Designation
One solid agglutinate	4+
Several large agglutinates	3+
Medium-size agglutinates, clear back ground	2+
Small agglutinates, turbid background	1+
Very small agglutinates, turbid background	1 ^w
Barely visible agglutination, turbid back ground	W ⁺
No agglutination	0
Mixtures of agglutinated and unagglutinated red cells (mixed field)	mf
Complete hemolysis	H
Partial hemolysis, some red cells remain	PH

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

روش عملکردی استاندارد تعیین گروه ABO گلبول قرمز و سرم با روش لوله ای
S.O.P for Tube Test to Determine ABO type of Red Cells and Serum

هدف / اصول :

نوع ABO خون باتوجه به وجود یا عدم وجود آنتی ژن A و / یا B در سطح گلبول قرمز خون و Anti-A و / یا Anti-B در سرم فرد تعیین می شود. در افراد بزرگسال رابطه متقابل بین آنتی ژن A و / یا B سطح گلبول قرمز خون و آنتی بادی های A و B در سرم / پلاسما وجود دارد ، برای مثال در صورت عدم وجود آنتی ژن A در سطح گلبول قرمز فرد، انتظار می رود که در سرم یا پلاسما Anti-A مشاهده شود.

نمونه :

- ۱- حداقل ۵-۲ میلی لیتر خون بیمار در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA برای آزمایش تعیین ABO قابل قبول است. (به نکات مهم رجوع شود)
- ۲- الزامی است که نام و نام خانوادگی بیمار و شماره منحصر به فرد شناسایی کننده بر روی لوله حاوی خون بیمار ثبت شود.
- ۳- الزامی است که نام خونگیر و تاریخ خونگیری بر روی لوله حاوی خون بیمار ثبت شود.
- ۴- نمونه نوزادان کمتر از ۴ ماه معمولاً حاوی Anti-A یا Anti-B نمی باشد ، بنابراین فقط آزمایش گلبول قرمز جهت این بیماران انجام شود.
- ۵- زمانی که سابقه انجام آزمایش ABO بیمار در بانک خون موجود نیست در صورت نیاز به تزریق خون انجام یکی از بندهای ذیل با رعایت الویت الزامی است:
 - از بیمار نمونه گیری مجدد شده و به بانک خون جهت تکرار و تأیید نتیجه آزمایش ABO اولیه ارسال شود.
 - آزمایش ABO مجدداً بر روی نمونه توسط کارشناس دیگری تکرار و تأیید گردد.
 - کارشناس انجام دهنده آزمایش اولیه ABO مجدداً آزمایش ABO را تکرار، تأیید و مستند سازی نماید.
- ۶- از نمونه هایی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed –lipemic) دارند، استفاده نکنید. نمونه گیری مجدد انجام شود.

روش عملکردی استاندارد تعیین گروه ABO گلبول قرمز و سرم با روش لوله ای
S.O.P for Tube Test to Determine ABO type of Red Cells and Serum

۷- شرایط نگهداری نمونه:

- به دستورالعمل تولید کننده معرفها جهت محدودیت و شرایط ذخیره سازی نمونهها رجوع شود.
- نمونههای خون در دمای یخچال ۸-۲ درجه سانتیگراد و به مدت حداقل ۷ روز جهت هرگونه آزمایش بعدی ذخیره شود.
- جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی، جداسازی سرم یا پلاسما از گلبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره سازی در لوله های تفکیک شده توصیه نمی شود.

تجهیزات، مواد و معرفها:

۱. Anti-A از نوع polyclonal یا monoclonal
۲. Anti-B از نوع polyclonal یا monoclonal
۳. * سوسپانسیون گلبول قرمز A₁ و B که به صورت تجاری تهیه شده یا توسط آزمایشگاه با استفاده از محلول سالین ۰/۹ درصد با رقت (۵-۲ درصد) روزانه آماده سازی شده است. به روش عملکردی استاندارد شماره IP01IBTO90/1 رجوع شود.
- توجه: تمام معرفها باید مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده شوند.
۴. لوله آزمایش ۱۲×۷۵ میلی متر
۵. سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده (کالیبراسیون دستگاه توسط بخش پشتیبان انجام شده و مستند گردد).
۶. آینه مقعر و منبع روشنایی
۷. سالین ۰/۹ درصد
۸. پیپت یکبار مصرف (پیپت ۵۰ μ و ۱۰۰ μ)
۹. جالوله ای

کنترل کیفی Quality Control

- انجام آزمایش و مشاهده واکنشهای ذیل، روزانه (۲۴ ساعت) برای هر یک از معرفهای استفاده شده با شماره Lot مشخص الزامی است:
- ۱- معرف Anti-A با گلبول قرمز گروه A₁ واکنش (4⁺) و با گلبول قرمز گروه B واکنش منفی می دهد.
 - ۲- معرف Anti-B با گلبول قرمز گروه B واکنش (4⁺) و با گلبول قرمز A₁ واکنش منفی می دهد.

* مهم: در صورت عدم دسترسی به گلبول قرمز A₁ یا B شناخته شده مقداری از گلبول قرمز دو گروه A یا B را مخلوط نموده و در صورت مشاهده واکنش (4⁺) قابل استفاده می باشد.

روش عملکردی استاندارد تعیین گروه ABO گلبول قرمز و سرم با روش لوله ای
S.O.P for Tube Test to Determine ABO type of Red Cells and Serum

روش کار :

آزمایش گلبول قرمز (Forward Test)

- ۱- یک قطره Anti-A را به یک لوله ۱۲×۷۵ میلی متر تمیز که از قبل نشانه گذاری کرده‌اید، اضافه نمایید.
- ۲- یک قطره Anti-B را به یک لوله ۱۲×۷۵ میلی متر تمیز که از قبل نشانه گذاری کرده‌اید، اضافه نمایید.
- ۳- به هر یک از لوله‌ها یک قطره از سوسپانسیون گلبول قرمز (۲-۵ درصد) بیمار را اضافه نمایید.
- ۴- محتوای داخل لوله‌ها را به آرامی مخلوط کنید و مطابق دستورالعمل سازنده معرف با سانتریفوژ کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه با دور $g \times 1000 - 900$ سانتریفوژ نمایید.
- ۵- لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون یا همولیز را با استفاده از آینه مقعر مشاهده نمایید.
- ۶- نتایج واکنش را درجه‌بندی و تفسیر نمایید.
- ۷- نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت نمایید.

آزمایش سرم یا پلاسما (Reverse Test)

۱. ۲ تا ۳ قطره از سرم یا پلاسما را به دو لوله ۱۲×۷۵ میلی متر تمیز که قبلاً A₁ و B نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.
۲. یک قطره از سوسپانسیون گلبول A₁ را به لوله‌ای که A₁ نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.
۳. یک قطره از سوسپانسیون گلبول B را به لوله‌ای که B نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.
۴. محتوای داخل لوله‌ها را به آرامی مخلوط نمایید و مطابق دستورالعمل سازنده معرف با سانتریفوژ کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه با دور $g \times 1000 - 900$ سانتریفوژ نمایید.
۵. سرم یا پلاسمای داخل لوله‌ها را جهت وجود همولیز بررسی نمایید.
۶. لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را با استفاده از آینه مقعر مشاهده و بررسی نمایید.
۷. نتایج واکنش را درجه‌بندی و تفسیر نمایید.
۸. نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت نمایید.

روش عملکردی استاندارد تعیین گروه ABO گلبول قرمز و سرم با روش لوله ای

S.O.P for Tube Test to Determine ABO type of Red Cells and Serum

تفسیر :

- نتایج واکنش های به دست آمده با آزمایش سرم یا پلاسما (Reverse Test) را با نتایج واکنش گلبول قرمز (Forward Test) مقایسه نمایید و گروه ABO را مطابق جدول ذیل تفسیر کنید.

If RBCs react		And Serum/ Plasma react		Then ABO type is
Anti-A	Anti-B	A ₁ RBCs	B RBCs	
0	0	≥3+	≥3+	O
≥3+	0	0	≥3+	A
0	≥3+	≥3+	0	B
≥3+	≥3+	0	0	AB

- عدم مشاهده آگلوتیناسیون همراه با محیط همگن مخلوط گلبول قرمز، نشان دهنده نتیجه منفی می باشد.
- هرگونه ناهمخوانی در نتایج آزمایش گلبول قرمز خون و سرم / پلاسما باید قبل از ثبت و تفسیر گروه ABO پیگیری و حل شود.
- در صورت وجود واکنش ضعیف تر از 3⁺ در آزمایش سرم / پلاسما لوله ها را به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید و سپس مراحل ۸-۴ را تکرار نمایید.

نکات مهم :

۱. در صورت عدم وجود نمونه خون کامل EDTA استفاده از خون لخته بلامانع است. به دستورالعمل تولیدکننده معرف ها رجوع شود.
۲. گلبول های قرمز گروه A که با آنتی سرم های anti-A₁ و یا anti-A واکنش نشان می دهند، A₁ Cell نامیده می شوند. (تقریباً ۸۰ درصد افراد گروه A از گروه A₁ می باشند) بنابراین معمولاً جهت تعیین A₁ Cell استفاده از معرف آنتی سرم anti-A₁ الزامی نیست.
۳. در بانک خون های مراکز بیمارستانی و آزمایشگاه های تشخیص طبی انجام آزمایش ABO با استفاده از اسلاید ممنوع می باشد.

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, Trauma & Burns, WHO Press 2002

آزمایشگاه رفرانس ایمنوهماتولوژی سازمان انتقال خون ایران
روش عملکردی استاندارد آزمایش Rh(D) به روش لوله ای
S. O.P for Rh(D) Testing by Tube method

هدف / اصول :

- تعیین گروه Rh(D) گلبول قرمز خون انسانی از آزمایش‌های قبل از تزریق خون و دوران بارداری می‌باشد. نوع فنوتیپ Rh-Positive و Rh-Negative با توجه به حضور و عدم حضور آنتی‌ژن D در سطح غشای گلبول قرمز خون تعیین می‌شود.
- آنتی ژن D در سطح برخی از گلبول‌های قرمز خون به صورت ضعیف بیان شده و ممکن است با اکثر معرف‌های Anti-D واکنش مستقیم، مشاهده نشود.
- انجام آزمایش AHG در بیماران بسته به خط مشی هر مرکز پزشکی تعیین می‌شود.
- روش تعیین Rh باید توانائی شناسائی آنتی‌ژن‌های ضعیف D را داشته باشد. (جهت بانوانی که در دوران بارداری هستند یا سابقه سقط و روش‌های تهاجمی زایمان (Invasive obstetric procedure) دارند، و نیز نوزادان متولد شده از این گونه مادران برای تصمیم‌گیری تزریق (RhIG) روگام).
- مشاهده درجه واکنش 2^+ \geq برای تفسیر نتیجه Rh-Positive الزامی است.
- باید هرگونه واکنش ضعیف تر از 2^+ با ادامه آزمایش در مراحل بعدی، یعنی انکوباسیون در دمای 37°C درجه سانتیگراد و مرحله AHG تأیید شود. توجه به دستورالعمل سازنده معرف Anti-D جهت ادامه آزمایش الزامی است.
- در صورتی که نمونه خون بیمارانی که دارای اتو آنتی‌بادی هستند، و یا در خون آنها پروتئین‌های غیر نرمال وجود دارد، استفاده هم‌زمان از کنترل برای شناسائی نتایج مثبت الزامی است، بنابراین تعیین Rh نمونه زمانی اعتبار دارد که همراه با لوله حاوی Anti-D یک لوله دوم حاوی معرف Rh-Control مانند آلبومین ۶ درصد آزمایش شده و واکنش منفی مشاهده شود. مطابق دستورالعمل سازنده عمل نمایید.

نمونه :

- ۱- ۵-۲ میلی لیتر خون کامل نمونه‌گیری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA برای آزمایش تعیین Rh قابل قبول است. (به نکات مهم رجوع شود)
- ۲- الزامی است نام و نام خانوادگی بیمار و شماره منحصر به فرد شناسایی‌کننده بر روی لوله حاوی خون بیمار ثبت شود.
- ۳- الزامی است نام خونگیر و تاریخ خونگیری بر روی لوله حاوی خون بیمار ثبت شود.

سازمان انتقال خون ایران

۴- زمانی که سابقه انجام آزمایش Rh بیمار در بانک خون بیمارستان موجود نیست در صورت نیاز به تزریق خون یا تعیین گروه Rh مادر انجام یکی از بندهای ذیل با رعایت الویت الزامی است:

- از بیمار نمونه‌گیری مجدد شده و به بانک خون جهت تکرار و تأیید نتیجه آزمایش Rh اولیه ارسال شود.

- آزمایش Rh مجدداً بر روی نمونه توسط کارشناس دیگری تکرار و تأیید گردد.
- کارشناس انجام دهنده آزمایش اولیه Rh مجدداً آزمایش Rh را تکرار، تأیید و مستند سازی نماید.
- ۵- از نمونه‌هایی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed –lipemic) دارند، استفاده نکنید. نمونه‌گیری مجدد انجام شود.

۶- شرایط نگهداری نمونه :

- به دستورالعمل تولید کننده معرفها جهت محدودیت و شرایط ذخیره سازی نمونه‌ها رجوع شود.
- نمونه‌های خون در دمای یخچال ۲-۸ درجه سانتیگراد و به مدت حداقل ۷ روز جهت هرگونه آزمایش بعدی ذخیره شود.
- جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی ، جداسازی سرم یا پلاسما از گلبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره سازی در لوله های تفکیک شده توصیه نمی‌شود.

تجهیزات ، مواد و معرفها :

۱. معرفهای مناسب Anti-D شامل:
- Blend low protein IgM & IgG monoclonal / IgM monoclonal می باشد .
۲. لوله آزمایش ۱۲×۷۵ میلی متر
۳. سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده (کالیبراسیون توسط بخش پشتیبان تعیین شده و مستند گردد).
۴. آینه مقعر و منبع روشنایی
۵. سالین ۰/۹ درصد
۶. پیپت یکبار مصرف یا پیپت ۵۰ و ۱۰۰
۷. Anti-IgG یا AHG polyspecific
۸. گلبول قرمز حساس شده IgG Control Cells
۹. جا لوله‌ای
۱۰. انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد

آزمایشگاه رفرانس ایمونوهماولوژی سازمان انتقال خون ایران
روش عملکردی استاندارد آزمایش Rh(D) به روش لوله ای
S. O.P for Rh(D) Testing by Tube method

IP04IBTO90/1

کنترل کیفی :

- باید واکنش معرف استفاده شده برای شناسایی نوع Rh روزانه کنترل و ثبت شود.
- باید آگلوتیناسیون معرف Anti-D با سوسپانسیون گلبول قرمز خون (۲-۵ درصد)

Rh-Positive

واکنش بین 4^+ و 2^+ را نشان داده و با سوسپانسیون گلبول قرمز (۲-۵ درصد) Rh-Negative واکنش منفی مشاهده گردد.

روش کار :

۱. یک قطره Anti-D به لوله‌ای که از قبل نشانه گذاری شده اضافه نمایید.
۲. یک قطره Rh-Control را به لوله دوم که از قبل نشانه گذاری شده اضافه نمایید.
۳. به هر یک از لوله‌های فوق، یک قطره از سوسپانسیون گلبول قرمز (۲-۵ درصد) اضافه نمایید.
۴. محتوای داخل لوله‌ها را به آرامی مخلوط نمایید و مطابق زمان و سرعت مندرج در دستورالعمل تولید کننده سانتریفیوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور $1000 \times g$ - ۹۰۰ می باشد.
۵. لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را با استفاده از آینه مقعر مشاهده نمایید.
۶. نتایج واکنش را بررسی و درجه بندی کنید.
۷. نتایج درجه بندی لوله حاوی Anti-D و Rh-Control را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید و مطابق جدول A عمل نمایید.

جدول A

Anti-D	Rh-Control	تفسیر Interpretation
$\geq 2^+$	0	نوع Rh بیمار Positive گزارش شود.
$< 2^+$	0	از مرحله ۸ ادامه دهید.
Positive	Positive	Unresolved

روش عملکردی استاندارد آزمایش Rh(D) به روش لوله ای

S. O.P for Rh(D) Testing by Tube method

۸. هر دو لوله را مطابق دستورالعمل سازنده انکوبه نمایید. معمولاً به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد می باشد.
۹. پس از طی زمان انکوباسیون لوله‌ها را سانتریفوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور $1000 \times g - 900 \times g$ می باشد.
۱۰. لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را مشاهده کنید.
۱۱. اگر لوله Anti-D واکنش قوی $2^+ \geq$ با زمینه شفاف را نشان می دهد و لوله Rh-Control منفی می باشد، واکنش را ثبت کنید.
۱۲. نتیجه آزمایش را Rh-Positive گزارش کنید، پایان آزمایش و مرحله AHG لازم نیست.
۱۳. در صورت عدم مشاهده تغییری در واکنش یا وجود واکنش مشکوک، لوله‌ها را سه تا چهار بار با سالیین به صورت کامل شستشو دهید.
۱۴. پس از آخرین شستشو لوله‌ها را خوب از سالیین تخلیه کرده و مطابق دستورالعمل سازنده ۲ قطره AHG به لوله‌ها اضافه نمایید.
۱۵. محتوای لوله‌ها را به آرامی مخلوط کرده و مطابق زمان و سرعت مندرج در دستورالعمل تولید کننده سانتریفوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور $1000 \times g - 900 \times g$ می باشد.
۱۶. لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را مشاهده کنید.
۱۷. نتایج واکنش را بررسی و درجه بندی کنید و آن را در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.
۱۸. مطابق جدول B تفسیر و گزارش کنید.
۱۹. اگر واکنش هر دو لوله منفی باشد، یک قطره گلبول قرمز خون حساس شده IgG- Control Cells به هر یک از لوله‌ها اضافه کنید. لوله‌ها را سانتریفوژ نمایید. در صورت واکنش مثبت مطابق جدول B تفسیر نمایید.
۲۰. در صورتی که پس از اضافه نمودن گلبول قرمز خون حساس شده، نتیجه واکنش منفی شود، آزمایش باید مجدداً تکرار شود.

جدول B

Anti-D	Rh-Control	تفسیر Interpretation
$\geq 2^+$	0	Rh-Positive
0	0	Rh-Negative
Positive	Positive	Unresolved

نکات مهم :

۱. مشاهده آگلوتیناسیون قابل قبول در لوله Anti-D پس از مراحل ۳۷ درجه سانتیگراد ، AHG و عدم مشاهده آگلوتیناسیون در لوله Rh-Control باید نتیجه آزمایش " Rh Positive (Weak- D) " گزارش شود.

گزارش نتیجه به شکل " منفی D " و " مثبت D^U " اشتباه و غلط می باشد.

۲. عدم مشاهده آگلوتیناسیون در لوله حاوی Anti-D و Rh-Control نشان دهنده عدم وجود آنتی ژن D در سطح غشای گلبول قرمز خون می باشد و باید نتیجه آزمایش " منفی D " گزارش شود .

۳. در صورتی که در لوله Rh-Control هرگونه آگلوتیناسیون مشاهده شود ، نتیجه آزمایش Unresolved گزارش شده و غیرقابل تفسیر می باشد و در صورت نیاز بیمار به خون از گروه " Rh(negative) " تزریق شود.

۴. در صورت عدم وجود نمونه خون کامل حاوی EDTA استفاده از خون لخته بلا مانع است. به دستور العمل تولید کننده معرف ها رجوع شود.

۵. فقط واکنش هایی که به صورت ماکروسکوپی macroscopic مشاهده می شود قابل گزارش می باشد. از میکروسکوپ جهت مشاهده واکنش های ضعیف در آزمایش تعیین آنتی ژن Rh(D) استفاده نکنید.

۶. معرف های تجاری موجود در بازار به صورت IgM monoclonal و یا مخلوط IgG&IgM Blend می باشند. باید توجه داشت ، معرف های anti-D که فقط شامل IgM می باشند جهت آزمایش Weak-D مناسب نیستند و باید از معرف های anti-D که حاوی IgG می باشند، استفاده نمود.

۷. انجام آزمایش دوم Rh(D) بر روی نمونه خون بیمار با استفاده از معرف دوم و با کلون آنتی D متفاوت جهت شناسایی آنتی ژن های ضعیف Rh(D) توصیه می شود.

۸. در بانک خون های مراکز بیمارستانی و آزمایشگاه های تشخیص طبی انجام آزمایش ABO با استفاده از اسلاید ممنوع می باشد.

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

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 ۵۰-۱۰۰ λ
- ۹- جا لوله ای
- 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 با دور $1000 \times g$ از زمان ۱۵-۳۰ 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 ۱۵-۳۰ 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

هدف / اصول :

از آزمایش DAT به منظور تشخیص گلوبول‌های قرمز خون حساس شده و علت همولیز آنها با IgG و/یا کامپلمان (complement C₃) در داخل بدن استفاده می‌شود. همچنین برای شناسایی آنتی‌بادی‌هایی که به سطح گلوبول قرمز خون متصل شده و آنها را حساس نموده است و مستقیماً آگلوتیناسیون قابل مشاهده‌ای ایجاد نمی‌کنند، از این آزمایش استفاده می‌شود. موارد با لینی که منجر به مثبت شدن آزمایش DAT می‌شوند عبارتند از:

- Hemolytic Disease of the Fetus & New Born (HDFN)
- Auto Immune Hemolytic Anemia (AIHA)
- Drug Induced Hemolytic Anemia
- Hemolytic Transfusion Reactions (HTR)

نمونه :

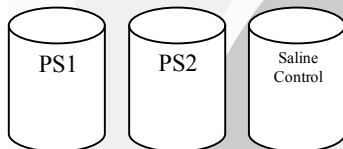
- ۱- حداقل ۵-۲ میلی لیتر نمونه خون کامل که در لوله حاوی ماده ضد انعقادی EDTA باشد، جمع‌آوری شود. (تنها نمونه مورد قبول، نمونه حاوی EDTA می‌باشد).
- ۲- سوسپانسیون تازه (۵-۲ درصد) باید بلافاصله قبل از انجام آزمایش، تهیه و مورد استفاده قرار گیرد.
- ۳- از نمونه خونی که بیش از ۴۸ ساعت از خونگیری آن گذشته باشد، استفاده نگردد.

تجهیزات، مواد و معرف‌ها :

- ۱- لوله آزمایش ۱۲×۷۵ میلی متر
- ۲- سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده (کالیبراسیون توسط بخش پشتیبان تعیین شده و مستند گردد).
- ۳- آینه مقعر و روشنایی
- ۴- معرف Polyspecific Antihuman Globulin (AHG)
- ۵- سالین ۰/۹ درصد
- ۶- پیپت یکبار مصرف (پیپت ۵۰ μl و ۱۰۰ μl)
- ۷- گلوبول قرمز خون کنترل (حساس شده) IgG Control Cells
- ۸- جا لوله‌ای

کنترل کیفی :

- ۱- روزانه معرف AHG را با گلوبول قرمز حساس شده با IgG آزمایش کنید .
- ۲- هر بار که آزمایش DAT منفی شد یک قطره گلوبول قرمز حساس شده را به لوله اضافه کنید . پس از سانتریفوژ کردن باید واکنش مثبت مشاهده شود. در صورت عدم مشاهده واکنش مثبت ، آزمایش مجدداً تکرار شود.



روش کار :

- ۱- ابتدا سه لوله ۱۲×۷۵ میلی متر را نشانه گذاری کنید.
- ۲- به هر یک از لوله ها یک قطره سوسپانسیون (۵-۲ درصد) از نمونه بیمار اضافه کنید.
- ۳- گلوبول های قرمز خون هر یک از لوله ها را ۳ الی ۴ بار با سالیین ۰/۹ درصد به خوبی شستشو دهید و در مرحله آخر شستشو ، سالیین را کاملاً تخلیه کنید.
- ۴- به لوله ۱ و ۲ مطابق دستورالعمل سازنده مقدار مناسب AHG از دو منبع با clone متفاوت اضافه کنید .(به توضیحات رجوع شود)
- ۵- به لوله سوم ، دو قطره سالیین ۰/۹ درصد اضافه کنید .
- ۶- محتوای لوله ها را به آرامی مخلوط کرده و مطابق دستورالعمل سازنده یا با دور ۱۰۰۰×g به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه سانتریفوژ کنید.
- ۷- لوله ها را به آرامی بیرون آورده سریعاً جهت مشاهده هرگونه آگلوتیناسیون با استفاده از آینه مقعر بررسی کنید.
- ۸- هرگونه واکنش مشاهده شده را درجه بندی نموده و ثبت کنید.
- ۹- مطابق دستورالعمل سازنده معرف AHG ، لوله های واکنش منفی را به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق ۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید، سپس سانتریفوژ کنید.
- ۱۰- مراحل ۸-۷ را تکرار کنید .
- ۱۱- در صورت مشاهده واکنش منفی ، یک قطره گلوبول قرمز حساس شده به لوله شماره ۱ و ۲ که حاوی AHG می باشند ، اضافه کنید .
- ۱۲- لوله شماره ۱ و ۲ را سانتریفوژ کنید و در صورت مشاهده واکنش مثبت ، نتیجه را ثبت کنید .
- ۱۳- در صورت مشاهده واکنش منفی آزمایش را از ابتدا تکرار کنید .

آزمایشگاه رفرانس ایمنونوهماٹولوژی سازمان انتقال خون ایران
روش عملکردی استاندارد برای آزمایش آنتی گلوبولین مستقیم
S.O.P For Direct Antiglobulin Test

IP06IBTO90/1

تفسیر :

لوله شماره ۱	لوله شماره ۲	لوله شماره ۳	پروتئین متصل به گلوبول قرمز	نتیجه DAT	ردیف
AHG PS1	AHG PS2	سالین 0.9%			
+	+	0	IgG+ C ₃ d	Positive	۱
+	+	+	غیر قابل گزارش	Unresolved	۲
0	0	0	----	Negative	۳
+	0	0	IgG+ C ₃ d	Positive	۴
0	+	0	IgG+ C ₃ d	Positive	۵

توضیح :

- نتیجه آزمایش ۱ و ۴ و ۵ قابل قبول بوده و مثبت گزارش شود.
- نتیجه آزمایش ۲ غیر قابل قبول بوده و بررسی بیشتر لازم می باشد.
- نتیجه آزمایش ۳ قابل قبول بوده و منفی گزارش شود.
- توصیه می گردد در مراکز بیمارستانی از دو منبع معرف AHG با Clone متفاوت به صورت موازی در هر آزمایش استفاده نمایید.
- منابع مختلف معرف AHG (Poly specific and anti-IgG) می توانند با حداقل ۵۰۰-۲۰۰ ملکول IgG روی غشای هر گلوبول قرمز واکنش دهند. در صورتی که تعداد IgG های چسبیده به گلوبول قرمز کمتر باشند، نتایج ممکن است منفی شود.
- کاربرد منبع AHG با clone مختلف جهت کاهش خطا می باشد.
- در صورت مشاهده واکنش های ضعیف و مشکوک از میکروسکوپ استفاده کنید.
- در صورتی که دقت لازم در تکنیک انجام آزمایش رعایت نشود، نتایج منفی کاذب ممکن است مشاهده گردد.

آزمایشگاه رفرانس ایمونوهما تولوژی سازمان انتقال خون ایران
روش عملکردی استاندارد برای آزمایش آنتی گلوبولین مستقیم
S.O.P For Direct Antiglobulin Test

IP06IBTO90/1

خطاهای شایع :

گلوبول قرمز حساس شده جهت اطمینان از عدم وجود منفی کاذب در مرحله AHG کاربرد دارد. زمانی که واکنش منفی می باشد معرف AHG به صورت آزاد درلوله وجود دارد که با گلوبول قرمز حساس شده آگلوتیناسیون می دهد. 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 آنتی بادی های 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

روش عملکردی استاندارد آزمایش سازگاری (کراس مچ) کامل
S.O.P for Complete Compatibility Testing

هدف / اصول :

آزمایش کراس مچ کامل با مجاورت سرم / پلاسما ی بیمار و گلبول قرمز اهداکننده خون به منظور تأیید سازگاری ABO کیسه خون با گروه ABO بیمار و تشخیص وجود هرگونه آلوآنتی بادی غیرمنتظره مهم از نظر بالینی انجام می گردد.

نمونه :

۱. از نمونه پلاسما ی (EDTA) بیمار استفاده شود.
۲. الزامی است ثبت 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 انجام آخرین آزمایش غربالگری خون معتبر می باشد.
۵. از نمونه هائی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed –lipemic) دارند، استفاده نکنید. نمونه گیری مجدد انجام شود.
۶. شرایط نگهداری نمونه:
 - نمونه های خون به مدت حداقل ۷ روز پس از هر کراس مچ جهت هرگونه آزمایشهای بعدی ذخیره شود.
 - نمونه های خون در دمای یخچال ۸-۲ درجه سانتیگراد ذخیره شود.
 - جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی ، جداسازی سرم یا پلاسما از گلبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره سازی در لوله های تفکیک شده توصیه نمی شود.

تجهیزات ، مواد و معرف ها :

- ۱- سالین نرمال ۰/۹ درصد
- ۲- سوسپانسیون (۵-۲ درصد) گلبول قرمز خون اهداکننده
- ۳- لوله های آزمایش ۱۲×۷۵ میلی متر
- ۴- پیپت یکبار مصرف یا پیپت ۵۰ و ۱۰۰
- ۵- سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده (کالیبراسیون توسط بخش پشتیبان تعیین شده و مستند گردد).
- ۶- گلبول قرمز خون حساس شده IgG Control Cells
- ۷- انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد

روش عملکردی استاندارد آزمایش سازگاری (کراس مچ) کامل
S.O.P for Complete Compatibility Testing

روش کار:

- ۱- لوله‌هایی را که با نمونه خون هر یک از اهداکنندگان و سرم بیمار آزمایش می‌شوند، نشانه‌گذاری کنید.
- ۲- به هر یک از لوله‌ها ۲ قطره سرم یا پلاسما بیمار اضافه نمایید.
- ۳- به هر یک از لوله‌های مربوطه ۱ قطره سوسپانسیون گلبول قرمز خون (۵-۲ درصد) اهداکننده اضافه کنید.
- ۴- محتوای لوله‌ها را مخلوط نمایید. سپس در سانتی‌فیوژ سرولوژیک کالیبره شده مطابق زمان مشخص، سانتی‌فیوژ نمایید.
- ۵- توده گلبولی لوله‌ها را جهت مشاهده همولیز و درجه بندی آگلوتیناسیون با استفاده از آینه مقعر مشاهده و ارزیابی نمایید.
- ۶- نتایج آزمایش را خوانده، تفسیر و بلافاصله ثبت نمایید.
- ۷- دو قطره آلبومین ۲۲ درصد یا محلول LISS به لوله فوق اضافه نمایید.
- ۸- لوله حاوی آلبومین ۲۲ درصد را به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه و لوله حاوی LISS را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه نمایید. مطابق دستورالعمل سازنده عمل نمایید.
- ۹- لوله را پس از مدت معین سانتی‌فیوژ کنید. (معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور $1000 \times g$ - ۹۰۰ می باشد).
- ۱۰- لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را بررسی و مشاهده نمایید.
- ۱۱- نتایج واکنش را بررسی و درجه بندی کنید.
- ۱۲- نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.
- ۱۳- سپس لوله را سه تا چهار بار با سالیین ۰/۹ درصد شستشو دهید و در مرحله آخر کاملاً سالیین را تخلیه نمایید.
- ۱۴- به این لوله دو قطره AHG یا مطابق دستورالعمل سازنده اضافه کنید.
- ۱۵- محتوای لوله را مخلوط کرده و سانتی‌فیوژ نمایید.
- ۱۶- لوله را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را بررسی و مشاهده کنید. ابتدا ماکروسکوپی بررسی کرده، در موارد مشکوک میکروسکوپی توصیه می‌گردد.
- ۱۷- نتایج واکنش را بررسی و درجه بندی کنید.
- ۱۸- نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.

۱۹- در صورت عدم وجود هرگونه واکنش ، کراس مچ منفی و نمونه خون اهداکننده با خون بیمار سازگار (Compatible) گزارش می‌شود.

۲۰- در صورت مشاهده هرگونه آگلوتیناسیون ،نمونه با خون بیمار سازگار نبوده (Incompatible) گزارش می‌شود .

۲۱- به لوله منفی یک قطره گلبول قرمز خون حساس شده IgG Control Cells اضافه کنید. پس از سانتریفوژ کردن ، مشاهده آگلوتیناسیون، آزمایش را تأیید می‌کند در صورت عدم مشاهده واکنش ، باید آزمایش مجدداً تکرار شود.

تفسیر:

۱- وجود آگلوتیناسیون یا همولیز نشان دهنده نتیجه آزمایش مثبت یا عدم سازگاری (Incompatible) می باشد .

۲- وجود سوسپانسیون گلبولی یکنواخت با گلبول های قرمز خون آزاد پس از سانتریفوژ و سوسپانسیون مجدد توده گلبولی نشان دهنده آزمایش منفی یا کراس مچ کامل سازگار (Compatible) می‌باشد.

نکات مهم :

۱. در صورت انجام آزمایش غربالگری آلو آنتی‌بادی غیر منتظره با استفاده از کیت antibody screen cells استاندارد و مشاهده نتیجه منفی فقط آزمایش کراس مچ مختصر Immediate spin cross match یعنی مراحل ۶-۱ کافی می‌باشد و ادامه آزمایش لازم نیست.

۲. در صورت وجود آلوآنتی بادی در سرم بیمار ، کراس مچ کامل انجام شود.

۳. در صورت عدم وجود نمونه خون کامل EDTA استفاده از خون لخته بلا مانع است. به دستور العمل تولید کننده معرف‌ها رجوع شود.

۴. زمانی که سابقه انجام آزمایش ABO&Rh بیمار در بانک خون موجود نیست انجام یکی از بندهای ذیل با رعایت الویت الزامی است.

- از بیمار نمونه‌گیری مجدد شده و به بانک خون جهت تکرار و تأیید نتیجه آزمایش ABO&Rh اولیه ارسال شود.

- آزمایش ABO&Rh مجدداً بر روی نمونه توسط کارشناس دیگری تکرار و تأیید گردد.

- کارشناس انجام دهنده آزمایش اولیه ABO&Rh مجدداً آزمایش ABO&Rh را تکرار، تأیید و مستند سازی نماید.

Emergency Blood Order	درخواست خون در شرایط اضطراری
<p>زمانی که پزشک پس از ارزیابی بالینی بیمار (تروما / خونریزی شدید بیمار) درخواست خون کراس مچ نشده می‌دهد ، باید مراحل ذیل جهت تحویل خون رعایت گردد. تأکید می‌گردد باید پس از تحویل خون کلیه مراحل آزمایش کراس مچ به طور کامل انجام پذیرد.</p>	
<p>۱. درخواست تحویل خون در شرایط اضطراری (بدون کراس مچ) با امضای پزشک درخواست کننده و توضیح اندیکاسیون شرایط بالینی بیمار دریافت شود.</p>	
<p>۲. باید خون با گروه ABO سازگار توسط کارشناس بانک خون تحویل شود.</p>	
<p><u>توجه: درخواست خون در شرایط اضطراری با امضای پزشک ، ساقط کننده مسئولیت کارشناس بانک خون جهت تحویل خون با گروه ABO سازگار نمی‌باشد.</u></p>	
<p>۳. خون سازگار کراس مچ نشده با شرایط و الویت بندی زیر تحویل شود :</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • خون با گروه (O) و Rh-(Negative) به ویژه به بیمار زن در سن باروری • خون با گروه (O) و Rh-(Positive) 	
<ul style="list-style-type: none"> • در صورت دریافت نمونه و تعیین گروه ABO&Rh بیمار، خون سازگار با گروه بیمار تحویل شود. <u>تأکید می‌شود از سابقه قبلی گروه ABO&Rh بیمار استفاده نشود.</u> 	
<p>۴. کیسه‌های ارسالی خون را با علامت کراس مچ انجام نشده مشخص کنید.</p>	
<p>۵. پس از ارسال کیسه‌های خون ، آزمایش کراس مچ را فوراً شروع کنید و در صورت مشاهده هرگونه آگلوتیناسیون پزشک را مطلع نمایید.</p>	

خطاهای شایع :

گلبول 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 گلبول 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 سالین باقی مانده یا عدم شستشوی مناسب ، با آنتی‌بادی های آزاد، خنثی شده است.
- معرف AHG ، دارای 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