بسم الله الرحمن الرحیم

گروه های خونی

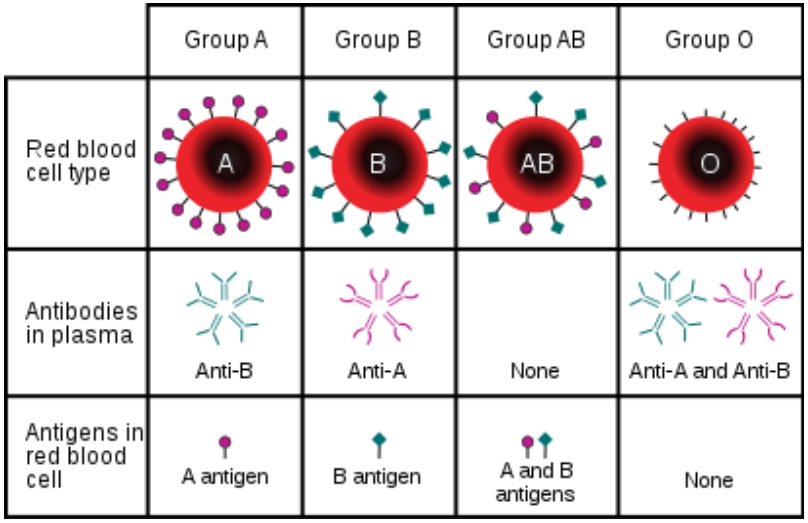
ABO & Rh

ارائه دهنده : دکتر اسفندیار عزیزی
(استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایلام)

کاربرد و اهمیت مطالعه گروه های خونی

- انتقال خون و فرآورده های خونی
- پزشکی فانونی
- حل اختلافات اصل و نسبی
- پیوند اعضاء
- ارتباط گروه های خونی با بیماری ها

- گروه خونی سیستم ABO از چهار فنوتیپ اصلی A، B، AB و O تشکیل شده است.
  - آنتی بادی طبیعی بر ضد آنتی ژن های A و B ....
  - پراکندگی وسیع آنتی ژنهای ABO .....
- گروه خونی A به دو زیر گروه اصلی A1 و A2 و چندین زیر گروه فرعی ....
- گروه های فرعی B و O بسیار نادر هستند.
- در گروه های فرعی افراد بخشی از ساختمان آنتی ژن آن گروه خونی را ندارند.



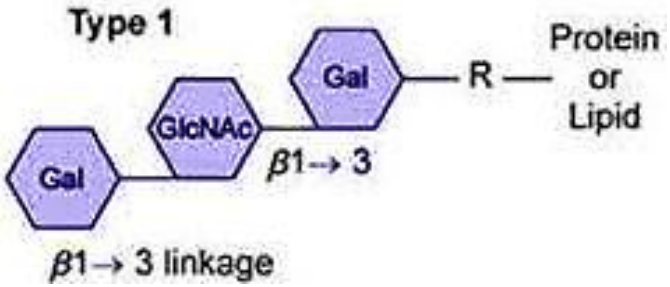
- سیستم گروه خونی سیستم ABO توسط سه دسته ژن کنترل می شود.

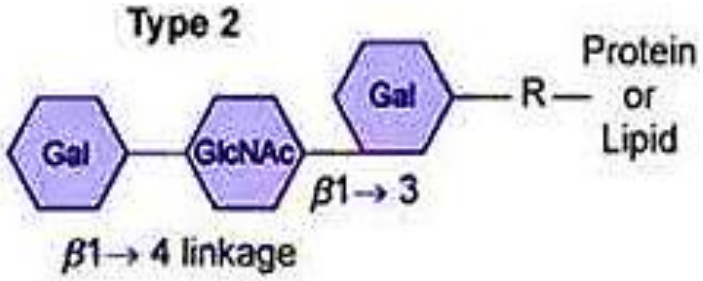
- $I^A/I^B/i$ ← کروموزوم 9
- H/h
- Se/se

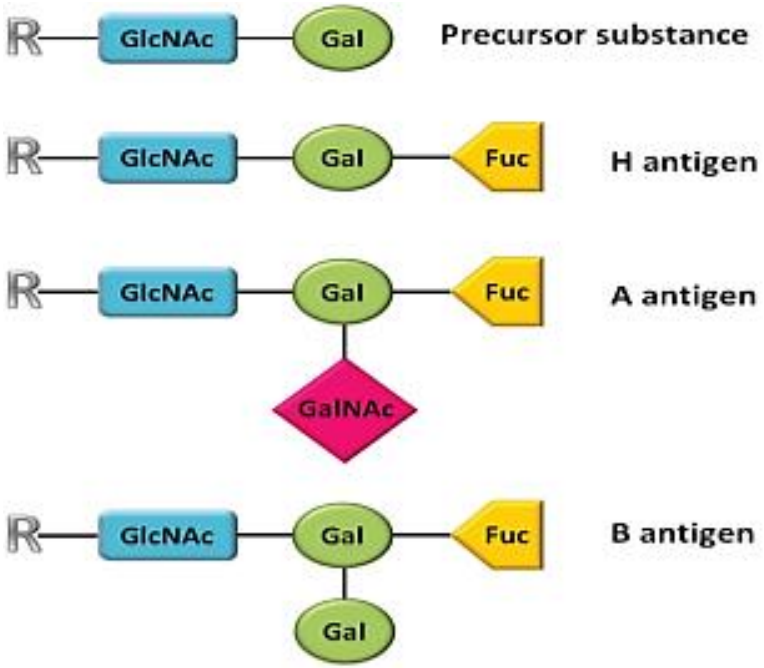
← کروموزوم 19

ژنوتیپ	فنوتیپ	آنتی بادی در سرم
AA AO	A	آنتی B
BB BO	B	آنتی A
AB	AB	هیچکدام
OO	O	آنتی A و آنتی B

- H ⟵ فوکوزیل ترانسفراز
- I^A ⟵ آلفا ـ ان ـ استیل ـ گالاکتوزآمین ترانسفراز
- I^B ⟵ آلفا ـ گالاکتوزیل ترانسفراز
- i ⟵ آنزیمی را کد نمی کند







(دانیلز، ۱۳۸۶)

آلوآنتی بادی ها یا ایزوآگلوتی نین های سیستم گروه خونی ABO

- تولید آنتی بادی ها ضد آنتی ژنهای سیستم گروه خونی ABO از 3 ماهگی ...
- افراد دارای گروه خونی O دارای anti-A، anti-B و anti-C(AB) می باشند.
- افراد دارای گروه خونی A2 دارای anti-A1 و anti-B می باشند.
- افراد دارای گروه خونی B دارای anti-A و anti-A1 هستند.
- افراد دارای گروه خونی AB فاقد anti-A و anti-B می باشند.
- برخی از افراد دارای گروه خونی A2B دارای anti-A1 هستند.
- افراد دارای گروه خونی بمبئی دارای anti-A، anti-B و anti-H می باشند.

آلوآنتی بادیها ی A و B به دو دسته تقسیم می شوند

آلوآنتی بادیها ی طبیعی

IgM

IgG(گروه خون O)

SIgA(درمایعات بدن)

آلوآنتی بادیها ی طبیعی

IgG

IgM

IgA

سیستم گروه خونی Rh

- ساختمان شیمیائی آنتی ژنهای سیستم Rh از جنس یک مجموعه پروتئینی است.
- سه روش نامگذاری برای این سیستم پیشنهاد شده است
  - روزنفیلد
  - وینر یا نامگذاری آمریکائی
  - فیشر – رایس یا نامگذاری اروپائی
- در تئوری فیشر – رایس، پنج فاکتور Dd ، Cc و Ee سیستم Rh را تحت کنترل دارند
- آنتی بادی بر ضد آنتی ژن های سیستم Rh به طور طبیعی وجود ندارد.
- در بین تمام آنتی ژن های سیستم گروه خونی Rh ، قوی ترین آنها Rho(D) می باشد.
- بطور بسیار نادر برخی افراد Rh_{null} و یا Rh_{mod} هستند.

سیستم گروه خونی Rh

- یکی از انواع آنتی ژن ضعیف D بنام RhD^u می باشد.
- علل بروز RhD^u
  - تداخل ژنی
  - آنتی ژن D ناقص
  - آنتی ژن D^u ژنتیکی

تعیین گروه های خونی سیستم ABO

❖ گروه های خونی سیستم ABO را به دو طریق می توان تعیین کرد.

❑ روش مستقیم (Front type، Direct type یا Cell type)

- با استفاده از anti-A و anti-B آنتی ژن های سطح گلبول های قرمز تعیین و مشخص می شود.

❑ روش غیر مستقیم یا معکوس (Indirect type ، Reverse type یا Back type)

- با استفاده از گلبول های معلوم A و B آمنی بادی های موجود در سرم یا پلاسما تعیین می شود و سپس گروه خونی فرد با توجه به نتایج به دست آمده تعیین می گردد.

تعیین گروه های خونی سیستم ABO

- روش مستقیم (Front type، Direct type یا Cell type)
  - روش تعیین گروه خون بر روی لام یا Direct Slide Test
  - روش تعیین گروه خون به روش لوله ای یا Direct Tube Test

تعیین گروه خون بر روی لام یا Direct Slide Test

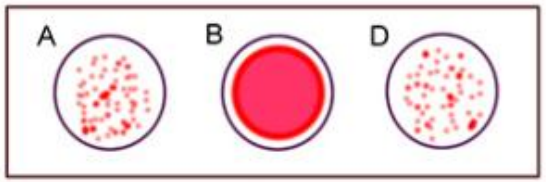
1. بر روی یک اسلاید تمیز سه قطره خون (خون نوک انگشت که با لانست گرفته شده یا دو قطره خون مجهول ٤٠ تا ٥٠ درصد شسته شده در سرم فیزیولوژی) با فاصله مناسب از هم قرار می دهیم.

2. به یکی از قطره های خون روی لام یک قطره ازanti-A و به یکی دیگر یک قطره از anti-B و به قطره سوم anti-D (جهت تعیین Rh) اضافه می کنیم.

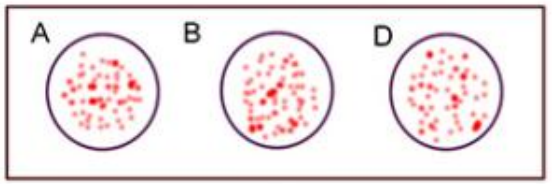
3. سپس با یک اپلیکاتور قطره خون و anti-A و با یک اپلیکاتور دیگر قطره خون و anti-B را باهم مخلوط می کنیم و دایره ای به قطر تقریبا ۲ سانتی متر پهن می کنیم.

4. در مرحله بعد لام را با دست یا بر روی دستگاه روتاتور به مدت ۳۰ ثانیه الی ۲ دقیقه به صورت افقی حرکت دورانی می دهیم، سپس در زیر نور نتیجه آگلوتیناسیون را بررسی می کنیم.

آگلوتیناسیون های احتمالی و نوع گروه خون

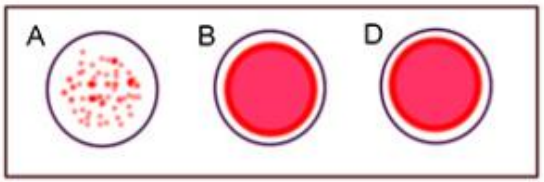


A +

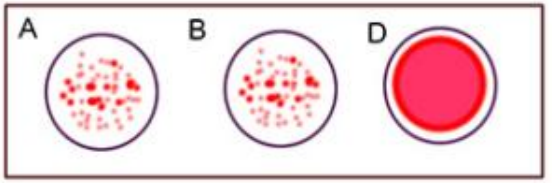


AB +

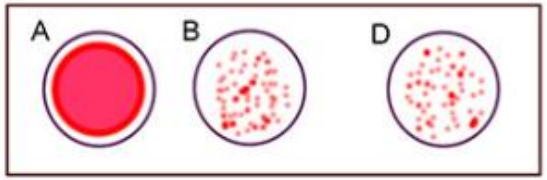
LabWorld.ir



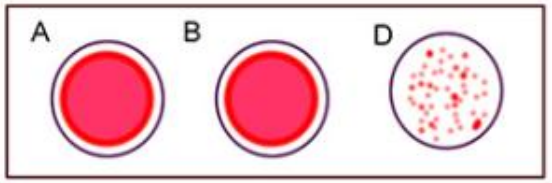
A -



AB -

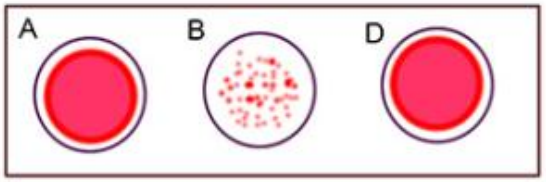


B +

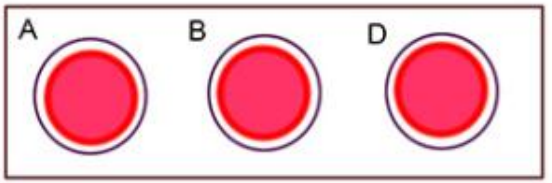


O +

LabWorld.ir



B -



O -

تهیه سوسپانسیون ۳ درصد گلبول قرمز خون

هدف/ اصول

۱) تهیه سوسپانسیون گلبول قرمز نزدیک به ۳درصد (۵-۲ درصد) به منظور حذف اثرات نامطلوب غلظت گلبولی و همچنین محتویات پلاسما(سرم) روی حساسیت آزمایش و قدرت آگلوتیناسیون در آزمایشات سرولوژیک مرتبط با ایمونوهماتولوژی.

موارد/ دامنه کاربرد

۱) بانک‌های خون بیمارستانی و مراکز مصرف‌کننده خون و فرآورده‌های خونی.

نمونه

۱) خون کامل (در صورت عدم وجود نمونه خون کامل دارای ضدانعقاد استفاده از خون لخته بلامانع است).

۲) قطعات کورد کیسه‌های حاوی فرآورده گلبول قرمز

تجهیزات، مواد و لوازم مورد نیاز

۱) لوله آزمایش ۱۰×۷۵ یا ۱۲×۷۵ میلی‌متر

۲) لوله ۱۰ میلی‌لیتری (۱۰۰×۱۶ میلی‌متر)

۳) پیپت‌های ۱۰-۱ میلی‌لیتری کالیبر شده

۴) پیپت متغیر µl ۱۰۰۰-۵۰

۵) سالین ۰/۹ درصد

۶) سانتریفوژ سرولوژیک

۷) جالوله‌ای

۸) آینه مقعر

۹) منبع روشنایی (چراغ مطالعه)

۱۰) نمونه سوسپانسیون خون ۳ درصد (شناخته شده)

نکات ایمنی

۱) استفاده از دستکش و عینک محافظ در هنگام کار

۲) وجود سیفتی باکس جهت دفع کلیه مواد بیولوژیک و زباله‌های تیز و برنده

کنترل کیفی

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

۲) به منظورمقایسه مقدارتجمع گلبول قرمز سوسپانسیون ۳درصد تهیه شده، یک قطره از این سوسپانسیون را به لوله ۱۲×۷۵ میلی‌متر انتقال دهید. به صورت مشابه یک قطره از سوسپانسیون ۳ درصد شناخته شده را به لوله ۱۲×۷۵ میلی‌متر دیگری انتقال دهید. با توجه به زمان تعیین شده (۳۰-۱۵ ثانیه)، لوله‌ها را سانتریفوژ (معمولاً دور g ۱۰۰۰) نمایید. اندازه دو رسوب گلبول قرمز خون با مشاهده در آینه مقعر باید مشابه باشد.

مراحل اجرا

۱) حداقل ۱ میلی‌لیتر از خون کامل را به یک لوله ۱۰ میلی‌لیتری انتقال دهید.

۲) به گلبول‌های قرمز خون سالین اضافه نموده و به مدت ۱ الی ۳ دقیقه سانتریفوژ (معمولاً دور g ۱۰۰۰) 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.

۴) مقدار ۰/۳ میلی‌لیتر (۳۰۰λ) از گلبول‌های قرمز متراکم شسته شده (توده انتهای لوله) را به لوله‌ای حاوی ۹/۷ میلی‌لیتر سالین ۰/۹ درصد انتقال دهید.

۴) با استفاده از پارافیلم لوله را پوشش دهید. چند بار با سروته کردن لوله، گلبول‌های قرمز خون را با سالین۰/۹ درصد کاملاً مخلوط نمایید.

نکات مهم

- جهت تهیه سوسپانسیون سلولی O Cell مورد استفاده در آزمایشات سرولوژیک ایمونوهماتولوژی، بهتر است حداقل سه سوسپانسیون از نمونه‌های مختلف را مخلوط نمایید.
- جهت تهیه حجم کمتر، مقدار سالین ۰/۹ درصد و گلبول قرمز خون را به تناسب انتخاب نمایید.

محدودیت

۱۱-۱) تهیه سوسپانسیون گلبولی غلیظ یا رقیق می‌تواند منجر به پاسخ مثبت یا منفی کاذب در آزمایش گردد.

تعیین گروه ABO گلبول قرمز و سرم با روش لوله‌ای

هدف/ اصول

۱) تعیین فنوتیپ ABO فرد 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

موارد/ دامنه کاربرد

۱) بانک‌های خون بیمارستانی و مراکز مصرف‌کننده خون و فرآورده‌های خونی.

نمونه

۱) مقدار ۵-۲ میلی‌لیتر خون کامل نمونه‌گیری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA برای آزمایش تعیین ABO قابل قبول است.

۲) در صورت عدم وجود نمونه خون کامل حاوی EDTA استفاده از خون لخته بلامانع است(به دستورالعمل تولیدکننده معرف‌ها رجوع شود).

۳) از نمونه‌هایی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed –lipemic) دارند، استفاده نکنید و نمونه‌گیری مجدد انجام شود.

۴) نمونه‌های خون در دمای یخچال ۸-۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت حداقل ۷ روز جهت هرگونه آزمایش بعدی ذخیره شود (به دستورالعمل تولیدکننده معرف‌ها جهت محدودیت و شرایط ذخیره‌سازی نمونه‌ها رجوع شود).

۵) جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی، جداسازی سرم یا پلاسما از گلبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره‌سازی در لوله‌های تفکیک شده توصیه نمی‌شود.

تجهیزات، مواد و لوازم مورد نیاز

۱) Anti-A از نوع polyclonal یا monoclonal

۲) Anti-B از نوع polyclonal یا monoclonal

۳) سوسپانسیون گلبول قرمز A_1 و B که به صورت تجاری یا توسط آزمایشگاه براساس روش عملکردی استاندارد تهیه سوسپانسیون ۳درصد گلبول قرمز خون AOBB95/SOP07/01

۴) لوله آزمایش ۱۲×۷۵ میلی‌متر

۵) سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده

۶) آینه مقعر و منبع روشنایی

۷) سالین ۰/۹ درصد

۸) پیپت یکبار مصرف (پیپت λ ۵۰و λ ۱۰۰)

۹) جا لوله‌ای

نکات ایمنی

۱) استفاده از دستکش و عینک محافظ در هنگام کار

۲) وجود سیفتی باکس جهت دفع کلیه مواد بیولوژیک و زباله‌های تیز و برنده

فرم و مستندات

۱) دفاتر ثبت نتایج گروه خون

۲) نتایج ثبت شده در نرم افزار بیمارستانی

کنترل کیفی

۱) مطابق با روش عملکردی استاندارد کنترل کیفی روزانه (AOBB95/SOP03/01)

۲) مطابق با روش عملکردی استاندارد نگهداری و پایش دمایی تجهیزات و محیط بانک خون (AOBB95/SOP02/01)

مراحل اجرا

۱) آزمایش گلبول قرمز (Forward Test)

۱-۱) یک قطره Anti-A را به یک لوله ۱۲×۷۵ میلی‌متر تمیز که از قبل نشانه‌گذاری کرده‌اید، اضافه نمایید.

۱-۲) یک قطره Anti-B را به یک لوله ۱۲×۷۵ میلی‌متر تمیز که از قبل نشانه‌گذاری کرده‌اید، اضافه نمایید.

۱-۳) به هر یک از لوله‌ها یک قطره از سوسپانسیون گلبول قرمز (۵-۲ درصد) بیمار را اضافه نمایید.

۱-۴) 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●۱۰۰۰- ۹۰۰ سانتریفوژ نمایید.

۱-۵) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون یا همولیز را با استفاده از آیینه مقعر مشاهده نمایید.

۱-۶) نتایج واکنش را درجه‌بندی و تفسیر نمایید.

۱-۷) نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت نمایید.

۲) آزمایش سرم یا پلاسما (Reverse Test)

۲-۱) ۲تا ۳ قطره از سرم یا پلاسما را به دو لوله ۱۲×۷۵ میلی‌متر تمیزکه قبلاً A_1 و B نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.

۲-۲) یک قطره از سوسپانسیون گلبول A_1 را به لوله‌ای که A_1 نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.

۲-۳) یک قطره از سوسپانسیون گلبول B را به لوله‌ای که B نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.

۲-۴) محتوای داخل لوله‌ها را به آرامی مخلوط نمایید و با سانتریفوژ کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه با دور g●۱۰۰۰- ۹۰۰ سانتریفوژ نمایید.

۲-۵) سرم یا پلاسمای داخل لوله‌ها را جهت وجود همولیز بررسی نمایید.

۲-۶) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هر گونه آگلوتیناسیون را با استفاده از آیینه مقعر مشاهده و بررسی نمایید.

۲-۷) نتایج واکنش را درجه‌بندی و تفسیر نمایید.

۲-۸) نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت نمایید.

تفسیر

۱) نتایج واکنش‌های 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.

RBCs react		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

۲) عدم مشاهده آگلوتیناسیون همراه با محیط همگن مخلوط گلبول قرمز، نشان‌دهنده نتیجه منفی می باشد.

۳) هرگونه ناهمخوانی در نتایج آزمایش گلبول قرمزخون و سرم / پلاسما باید قبل از ثبت و تفسیر گروه ABO پیگیری و حل شود.

۴) شدت واکنش در قسمت گلبولی (Forward) مشخصا بصورت 4^+ - 3^+ می باشد درحالی که شدت واکنش در قسمت سرمی (Reverse) ممکن است ضعیف‌تر باشد که در این صورت می توانید لوله‌ها را به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمایید.

محدودیت

۱) در بانک خون‌های مراکز بیمارستانی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انجام آزمایش ABO با استفاده از اسلاید ممنوع می‌باشد.

۲) در نوزادان و کودکان با سن کمتر از ۴ ماه و بزرگسالان با سن بالای ۶۵ سال و همچنین بیماران دارای نقایص ایمنی هومورال و برخی موارد بدخیمی آزمایش سرمی (Reverse) معتبر نبوده و قابل استناد نمی‌باشد.

آزمایش Rh(D) به روش لوله‌ای

هدف / اصول

۱) تعیین گروه Rh(D) گلبول قرمز خون به صورت فنوتیپ Rh-Positive و Rh-Negative با توجه به حضور و عدم حضور آنتی‌ژن D در سطح غشای گلبول قرمز خون

۲) شناسایی آنتی‌ژن‌های ضعیف D و تعیین فنوتیپ (D Weak) در صورت لزوم (نوزادان متولد شده از مادر Rh-Negative و افراد اهداکننده خون).

موارد / دامنه کاربرد

۱) بانک‌های خون بیمارستانی و مراکز مصرف‌کننده خون و فرآورده‌های خونی.

نمونه

۱) مقدار ۵-۲ میلی‌لیتر خون کامل نمونه‌گیری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA برای آزمایش تعیین Rh قابل قبول است.

۲) در صورت عدم وجود نمونه خون کامل حاوی EDTA استفاده از خون لخته بلا مانع است(به دستورالعمل تولیدکننده معرف‌ها رجوع شود).

۳) از نمونه‌هایی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed–lipemic) دارند، استفاده نکنید و نمونه‌گیری مجدد انجام شود.

۴) نمونه‌های خون در دمای یخچال ۸-۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت حداقل ۷ روز جهت هرگونه آزمایش بعدی ذخیره شود (به دستورالعمل تولیدکننده معرف‌ها جهت محدودیت و شرایط ذخیره‌سازی نمونه‌ها رجوع شود).

۵) جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی، جداسازی سرم یا پلاسما از گلبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره‌سازی در لوله‌های تفکیک شده توصیه نمی‌شود.

تجهیزات، مواد و لوازم مورد نیاز

۱) معرف مناسب Anti-D

۲) لوله آزمایش ۱۲×۷۵ میلی‌متر

۳) سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده

۴) آیینه مقعر و منبع روشنایی

۵) سالین ۰/۹ درصد

۶) محلول Albumin 6%

۷) پیپت یکبار مصرف یا پیپت ۵۰ λ و ۱۰۰ λ

۸) AHG(Anti IgG Monospecific)

۹) گلبول‌های قرمز حساس شده IgG sensitized check cells

۱۰) جا لوله‌ای

۱۱) بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد

نکات ایمنی

۱) استفاده از دستکش و عینک محافظ در هنگام کار

۲) وجود سیفتی باکس جهت دفع کلیه مواد بیولوژیک و زباله‌های تیز و برنده

فرم و مستندات

۱) دفاتر ثبت نتایج گروه خون

۲) نتایج ثبت شده در نرم افزار بیمارستانی

کنترل کیفی

۱) مطابق با روش عملکردی استاندارد کنترل کیفی روزانه (AOBB95/SOP03/01)

مراحل اجرا

۱) مقدار مناسب Anti-D بر اساس دستورالعمل سازنده به لوله‌ای که از قبل نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.

۲) حجم مشابه با بند ۱ از محلول Albumin 6% را به لوله دوم که از قبل نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.

۳) به هریک از لوله‌های فوق، یک قطره از سوسپانسیون گلبول قرمز (۵-۲ درصد) اضافه نمایید.

۴) محتوای داخل لوله‌ها را به آرامی مخلوط نمایید و مطابق زمان و سرعت مندرج در دستورالعمل تولیدکننده سانتریفوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور g ●۱۰۰۰ -۹۰۰ می‌باشد.

۵) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود و وجود هرگونه آگلوتیناسیون را مشاهده، درجه‌بندی و نتایج را ثبت کنید.

۶) در صورت مشاهده آگلوتیناسیون در لوله Anti-D و سوسپانسیون یک‌دست و بدون آگلوتیناسیون در لوله Albumin 6% نتیجه آزمایش را Rh(D)-Positive گزارش کنید.

۷) در مورد آزمایشات پیش از تزریق جهت دریافت‌کنندگان خون، در صورت مشاهده سوسپانسیون یک‌دست و بدون آگلوتیناسیون در هر دو لوله Anti-D و Albumin 6% نتیجه آزمایش را Rh(D)-Negative گزارش کنید و نیازی به انجام آزمایش D Weak و ادامه مراحل نمی باشد.

در خصوص تعیین گروه خونی Rh در نوزادان متولد شده از مادر Rh-Negative و همچنین اهداکنندگان خون مراحل را جهت تعیین فنوتایپ D Weak به صورت زیر ادامه دهید:

۸) هر دو لوله را مطابق دستورالعمل سازنده انکوبه نمایید. معمولاً به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

۹) پس از طی زمان انکوباسیون لوله‌ها را سانتریفوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ می‌باشد.

۱۰) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را مشاهده، درجه‌بندی و نتایج را ثبت کنید.

۱۱) در صورت مشاهده آگلوتیناسیون در لوله Anti-D و سوسپانسیون یک‌دست و بدون آگلوتیناسیون در لوله Albumin 6% نتیجه آزمایش را Rh(D)-Positive گزارش کنید و <u>مرحله AHG لازم نیست.</u>

۱۲) در صورت عدم مشاهده تغییری در واکنش یا وجود واکنش مشکوک، لوله‌ها را سه تا چهار بار با سالین به صورت کامل شست‌وشو دهید.

۱۳) پس از آخرین شست‌وشو لوله‌ها را خوب از سالین تخلیه کرده و مطابق دستورالعمل سازنده AHG به لوله‌ها اضافه نمایید.

۱۴) محتوای لوله‌ها را به آرامی مخلوط کرده و مطابق زمان و سرعت مندرج در دستورالعمل تولیدکننده سانتریفوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ می‌باشد.

۱۵) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را مشاهده، درجه‌بندی و نتایج را ثبت کنید.

۱۶) در صورت مشاهده آگلوتیناسیون در لوله Anti-D و سوسپانسیون یک‌دست و بدون آگلوتیناسیون در لوله Albumin 6% نتیجه آزمایش را Rh(D)-Positive گزارش کنید.

۱۷) اگر واکنش هر دو لوله منفی باشد، یک قطره گلبول قرمز حساس شده IgG sensitized check cells به هر یک از لوله‌ها اضافه کنید.

۱۸) لوله‌ها را سانتریفوژ نمایید. معمولاً زمان ۳۰-۱۵ ثانیه با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ می‌باشد.

۱۹) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود. وجود هرگونه آگلوتیناسیون را مشاهده، درجه‌بندی و نتایج را ثبت کنید.

نکات

- انجام آزمایش دوم Rh(D) با استفاده از معرف دوم و با کلون آنتی D متفاوت جهت شناسائی آنتی‌ژن‌های ضعیف Rh(D) توصیه می‌شود.
- جهت تهیه Albumin 6% می‌توان محلول‌های تجاری Albumin 22% را بصورت ۳ به ۸ با نرمال سالین رقیق کرد(۳ حجم Albumin 22% را به ۸ حجم نرمال سالین اضافه می‌کنیم که حجم نهایی ۱۱ می‌شود.)

تفسیر

۱) در صورت مشاهده آگلوتیناسیون در لوله Anti-D پس از مراحل ۳۷ درجه سانتیگراد و یا AHG و عدم مشاهده آگلوتیناسیون در لوله Albumin 6% باید نتیجه آزمایش بصورت " Rh(D)- Positive " گزارش شود.

گزارش نتیجه به شکل "منفی D " و "مثبت D" و "Weak Positive" اشتباه و غلط می‌باشد.

۲) عدم مشاهده آگلوتیناسیون در لوله حاوی Anti-D و Rh-Control نشان دهنده عدم وجود آنتی ژن D در سطح غشای گلبول قرمزخون می‌باشد و باید نتیجه آزمایش به صورت "Rh(D)-Negative" گزارش شود.

۳) در صورتی که در لوله Albumin 6% هرگونه آگلوتیناسیون مشاهده شود، نتیجه آزمایش Unresolved گزارش شده و غیرقابل تفسیر می‌باشد و در صورت نیاز بیمار به خون ازگروه " Rh(Negative) " تزریق شود.

۴) درصورتی‌که پس از اضافه نمودن گلبول قرمز خون حساس شده، نتیجه واکنش منفی شود، یکی از موارد زیر اتفاق افتاده است و آزمایش باید پس از رفع منبع خطا تکرار شود:

- معرف AHG اضافه نشده است.
- معرف AHG اضافه شده ولی با توجه به وجود سالین باقی مانده یا عدم شستوشوی مناسب آنتی‌بادی‌های آزاد خنثی شده است.

- معرف AHG دارای توان واکنش (potency) مناسب نیست.

محدودیت

۱) فقط واکنش‌هایی که به صورت ماکروسکوپی macroscopic مشاهده می‌شود قابل گزارش می‌باشد. از میکروسکوپ جهت مشاهده واکنش‌های ضعیف در آزمایش تعیین آنتی‌ژن Rh(D) استفاده نکنید.

۲) معرف‌های تجاری موجود در بازار به صورت IgM monocolonal و یا مخلوط IgG&IgM Blend می‌باشند. باید توجه داشت، معرف‌های anti-D که فقط شامل IgM می‌باشند جهت آزمایش Weak-D مناسب نیستند و باید از معرف‌های anti-D که حاوی IgG می‌باشند، استفاده نمود.

۳) در بانک خون‌های مراکز بیمارستانی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی انجام آزمایش & ABO Rh با استفاده از اسلاید ممنوع می‌باشد.

انجام آزمایش سازگاری

هدف / اصول

۱) آزمایش کراس مچ ماژور با مجاورت سرم/ پلاسمای بیمار و گلبول قرمز امداکننده خون به منظور تأیید سازگاری ABO کیسه خون با گروه ABO بیمار و تشخیص وجود هرگونه آلوآنتی بادی غیرمنتظره حائز اهمیت از نظر بالینی.

موارد / دامنه کاربرد

۱) بانک‌های خون بیمارستانی و مراکز مصرف‌کننده خون و فرآورده‌های خونی.

نمونه

۱) حداقل ۵ میلی‌لیتر پلاسما/ یا سرم (پلاسما ارجح است) خون بیمار در لوله حاوی ضدانعقاد EDTA (یا لوله لخته) قابل قبول است.

۲) از نمونه‌هایی که ظاهر همولیز یا لیپیمی (hemolyzed –lipemic) دارند، استفاده نکنید و نمونه‌گیری مجدد انجام شود.

۳) نمونه‌های خون در دمای یخچال ۸-۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت حداقل ۷ روز جهت هرگونه آزمایش بعدی ذخیره شود (به دستورالعمل تولیدکننده معرف‌ها جهت محدودیت و شرایط ذخیره‌سازی نمونه‌ها رجوع شود).

۴) جهت پیشگیری از وقوع هرگونه خطای انسانی، جداسازی سرم یا پلاسما از گلبول قرمز خون نمونه بیمار و ذخیره‌سازی در لوله‌های تفکیک شده توصیه نمی‌شود.

تجهیزات، مواد و لوازم مورد نیاز

۱) سالین نرمال ۰/۹ درصد

۲) آلبومین گاوی ۲۲ درصد یا معرف LISS

۳) لوله‌های آزمایش ۱۲×۷۵ میلی‌متر

۴) لوله‌های آزمایش ۱۰×۷۵ یا ۱۲×۷۵ میلی‌متر

۵) پیپت یکبار مصرف یا پیپت λ ۵۰ و λ ۱۰۰

۶) سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده

۷) گلبول‌های قرمز حساس شده IgG sensitized check cells

۸) بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد

۹) معرف antihuman globulin (AHG)

۱۰) پیپت یکبار مصرف یا پیپت λ ۱۰۰-۵۰

۱۱) جا لوله‌ای

۱۲) آیینه مقعر و منبع روشنایی

نکات ایمنی

۱) استفاده از دستکش و عینک محافظ در هنگام کار

۲) وجود سیفتی باکس جهت دفع کلیه مواد بیولوژیک و زباله‌های برنده

فرم و مستندات

۱) دفتر ثبت نتایج آزمایشات بانک خون

۲) فرم‌های درخواست خون

۳) نتایج ثبت شده در نرم افزار بیمارستانی

کنترل کیفی

۱) مطابق با روش عملکردی استاندارد کنترل کیفی روزانه (AOBB95/SOP03/01)

۲) مطابق با روش عملکردی استاندارد نگهداری و پایش دمایی تجهیزات و محیط بانک خون (AOBB95/SOP02/01)

مراحل اجرا

۱) لوله‌هایی را که با نمونه خون هریک از اهداکنندگان و سرم بیمار آزمایش می‌شوند، نشانه‌گذاری کنید.

۲) به هریک از لوله‌ها ۲ قطره سرم یا پلاسمای بیمار اضافه نمایید.

۳) به هریک از لوله‌های مربوطه ۱ قطره سوسپانسیون گلبول قرمز خون (۵-۲ درصد) اهداکننده اضافه کنید.

۴) محتوای لوله‌ها را مخلوط نمایید. سپس در سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ سانتریفوژ نمایید.

۵) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود، وجود هرگونه آگلوتیناسیون را بررسی و مشاهده 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 آلبومین۲۲ 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 در سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ سانتریفوژ نمایید.

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 درجه‌بندی کنید.

۱۲) نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.

۱۳) سپس محتویات لوله را سه تا چهار بار با سالین ۰/۹ درصد شست‌وشو دهید و در مرحله آخر کاملاً سالین را تخلیه نمایید.

۱۴) به این لوله مطابق دستورالعمل سازنده AHG اضافه کنید.

۱۵) محتوای لوله را مخلوط کرده و در سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ سانتریفوژ 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 بررسی میکروسکوپی توصیه می‌گردد).

۱۷) نتایج واکنش را بررسی و درجه‌بندی کنید.

۱۸) در صورت مشاهده واکنش منفی، یک قطره گلبول قرمز حساس شده IgG sensitized check cells به لوله حاوی AHG اضافه کنید.

۱۹) محتوای لوله را مخلوط کرده و در سانتریفوژ سرولوژیک کالیبره شده به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه و با دور g●۱۰۰۰ -۹۰۰ سانتریفوژ نمایید.

۲۰) لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا توده گلبولی به صورت سوسپانسیون آزاد شود، وجود هرگونه آگلوتیناسیون را بررسی و مشاهده نمایید.

۱۸) نتایج واکنش را بلافاصله در دفتر آزمایشگاه ثبت کنید.

تفسیر

۱) وجود آگلوتیناسیون یا همولیز در هر یک از مراحل نشان‌دهنده نتیجه آزمایش مثبت یا کراس مچ کامل ناسازگار (Incompatible) می‌باشد.

۲) نتیجه آزمایش در صورت عدم مشاهده آگلوتیناسیون/ همولیز در هریک از مراحل IS، 37°C و AHG و مشاهده آگلوتیناسیون (1^+ - 2^+) پس از اضافه نمودن گلبول قرمز حساس شده، منفی یا کراس مچ کامل سازگار (Compatible) گزارش شود

محدودیت

۱. درصورتی‌که فرد تزریق خون یا سابقه بارداری در سه ماهه گذشته دارد، نتیجه سازگاری فقط تا ۷۲ ساعت معتبر می‌باشد و در صورت دریافت هرگونه فرآورده خونی، اعتبار نتیجه سازگاری فقط ۲۴ ساعت می‌باشد.

۲. در صورت عدم وجود آگلوتیناسیون پس از اضافه نمودن گلبول قرمز حساس شده نتیجه آزمایش معتبر نبوده و باید مراحل آزمایش با رفع خطای احتمالی تکرار شود. در این حالت 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 شست‌وشوی مناسب، با آنتی‌بادی‌های آزاد خنثی شده است.
- معرف AHG دارای توان واکنش (potency) مناسب نیست.

۳. معرف Polyspecific AHG حاوی anti- IgG & anti-C3 می‌باشد. با توجه به اینکه هدف استفاده از معرف AHG شناسایی آلو آنتی‌بادی‌های IgG است، بنابراین استفاده از معرف Monospecific anti-IgG در آزمایش سازگاری در مقایسه با Polyspecific AHG می تواند از واکنش‌های ناخواسته جلوگیری نماید.

۴. در صورت انجام آزمایش غربالگری آلو آنتی‌بادی غیرمنتظره با استفاده از کیت antibody screen cells استاندارد و مشاهده نتیجه منفی فقط آزمایش کراس مچ مختصر Immediate spin cross match یعنی مراحل۶-۱ کافی می‌باشد و ادامه آزمایش لازم نیست.

۵. زمانی که سابقه انجام آزمایش ABO&Rh بیمار در بانک خون موجود نیست مطابق با روش عملکردی استاندارد تعیین گروه خونی و تزریق خون در بیمارانی که سابقه قبلی نتیجه گروه خون ندارند (AOBB95/SOP16/01) عمل نمایید.

زمانی نتایج گروه بندی گلبول های قرمز با گروه بندی سرمی اختلاف وجود دارد.

- این اختلاف ممکن است به دلیل خطاهای فنی یا شرایط بالینی بیماران ایجاد شود
  - منابع رایج خطاهای فنی در بانک خون
  - مشکلات در نمونه های خونی (گلبول های قرمز)

مشکلات در نمونه های خونی (گلبول های قرمز)*

شرایط	دلایل	گروه
کایمریسم (به دلیل انتقال خون، مغز استخوان پیوندی، انتقال خون تعویضی، خونریزی جنینی) – نوزادان تازه متولد شده. –بیماران مسن – هیپوگاماگلوبولینمی (لوسمی، بیماری های نقص ایمنی)	واکنش ضعیف یا از دست دادن آنتی بادی ها	I
زیر گروه هایAیا B لوسمی – مقدار بیش از حد B، پدیده Bاکتسابی (سپتی سمی گرم منفی، انسداد روده و سرطان کولون یا رکتوم).	واکنش ضعیف یا از دست دادن آنتی بادی ها	II
افزایش سطح گلوبولین (در مولتیپل میلوم، ماکروگلوبولینمی والدنستروم، دیسکرازی سلولی پلاسما، لنفوم هوچکین). – گسترش دهنده های پلاسما مانند دکستران، پلی وینیل پیرولیدون – ژله وارتون (در خون بند ناف)	ناهنجاری پروتئین / پلاسما که منجر به تشکیل رولو می شود	III
قرار گرفتن در معرض آنتی ژن Tپنهان گلبول قرمز (پلی آگلوتیناسیون) اتوآنتی بادی سرد و گرم ((AIHA آنتی ژن خارجی انتقال یافته ایزوآگلوتینین و آلوآنتی بادی ABOغیرمنتظره. آنتی بادی غیر از آنتی A و آنتی B (به عنوان مثال: آنتی بادی آکریفلاوین) افراد AB	مشکلات متفرقه	IV

* Arumugam P, Hamsavardhini S, Ravishankar J, Bharath RR. Resolving ABO discrepancies by serological workup-an analysis of few cases. Int J Res Med Sci 2017;5:893-900.

با تشکر از توجه
شما عزیزان