

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

IP06IBTO90/1

هدف / اصول :

از آزمایش DAT به منظور تشخیص گلبول‌های 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 گلبول 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 :

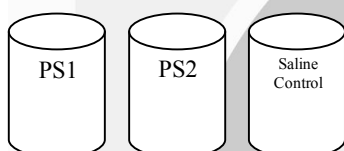
- ۱- حداقل ۵-۲ میلی لیتر نمونه خون کامل که در لوله حاوی ماده ضد انعقادی EDTA باشد، جمع‌آوری شود. (تنها نمونه مورد قبول، نمونه حاوی EDTA می‌باشد.)
- ۲- سوسپانسیون تازه (۵-۲ درصد) باید بلافاصله قبل از انجام آزمایش، تهیه و مورد استفاده قرار گیرد.
- ۳- از نمونه خونی که بیش از ۴۸ ساعت از خونگیری آن گذشته 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- گلبول 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 سالین ۰/۹ درصد به خوبی شستشو دهید و در مرحله آخر شستشو ، سالین 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 سالین 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 ۷-۸ 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 ایمونوهماٹولوژی سازمان انتقال خون ایران
روش عملکردی استاندارد برای آزمایش آنتی گلوبولین مستقیم
S.O.P For Direct Antiglobulin Test

IP06IBTO90/1

تفسیر :

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

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 گلبول قرمز واکنش دهند . در صورتی که تعداد IgG های چسبیده به گلبول 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.

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