

آزمایشگاه رفرانس ایمونوهماتولوژی 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 شناسائی 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 لوله ای 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 لوله های فوق ، یک قطره از سوسپانسیون گلبول قرمز (۲-۵ درصد) اضافه نمایید.
۴. محتوای داخل لوله ها 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. لوله ها 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 $900-1000 \times g$ 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 $900-1000 \times g$ 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