

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 A_1 و B نشانه‌گذاری شده اضافه نمایید.
۲. یک قطره از سوسپانسیون گلبول A_1 را به لوله‌ای که A_1 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 پلاسما را 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