جزوه آموزشی شماره ۶

روشهای تعیین گروه‌بندی خون (Rh,ABO) آزمایش کراس مچ، حمل ونگهداری انواع فرآورده‌های سلولی و پلاسمایی

ABO,Rh(D) Grouping, Crossmatch, Handling, and Storage of Different Cellular and Plasma Components

گردآوری :

دکتر حسین تیموری

دکتر مرسده خدیر

دکتر سهیلا ناسی زاده

تهیه و تنظیم:

حوزه معاونت آموزشی و پژوهشی

سازمان انتقال خون ایران

صفحه آرایی و امور رایانه :

ربابه قبادی

آذر ۱۳۸۱

روش‌های تعیین گروه‌بندی ABO و Rh

مقدمه

تعداد زیادی آنتی‌ژن بر سطح گلبول قرمز شناسائی شده است، اما بیشترین immunogenicity را آنتی‌ژن‌های ABH دارا می‌باشند. بنابراین تغیین گروه ABO از تمام آزمایش‌های سازگاری دارای اهمیت بیشتری می‌باشد. روش‌های تعیین گروه‌بندی ABO و Rh بشرح زیر می‌باشد:

۱-تعیین گروه‌های خونی (ABO و Rh) به روش اسلایدی

۱-۱- تعیین گروه‌های خونی ABO بر روی اسلاید

قبل از انجام آزمایش لازم است که بروشور کارخانه سازنده مورد مطالعه قرار گیرد به طوری که بعضی از آنها، تعیین گروه خون بر روی اسلاید را با خون کامل و بعضی دیگر سوسپانسیون رقیق شده گلبول قرمز (در سرم فیزیولوژی، سرم یا پلاسما) را توصیه می‌کنند.

۱-۱-۱- روش انجام آزمایش بر روی اسلاید

۱) یک قطره از معرف Anti-A را بر روی شیشهٔ تمیز دارای برچسب قرار می‌دهیم.

۲) یک قطره از معرف Anti-B، بر روی شیشهٔ دوم که تمیز و دارای برچسب است قرار می‌دهیم.

۳) یک قطره از معرف Anti -AB بر روی شیشهٔ سوم که تمیز و دارای برچسب است می‌ریزیم.

٤) بر روی هر یک از معرف‌ها در روی اسلایدها، یک قطره از سوسپانسیون گلبول قرمز کاملاً مخلوط شده، قرار می‌دهیم (غلظت سوسپانسیون گلبول قرمز و طرزتهیه آن در بروشور کارخانه سازنده معرف‌ها، نوشته شده است).

۵) سپس با اپلیکاتور، آنها را به شعاع ۲۰mm×۲۰mm، کاملاً مخلوط می‌کنیم.

٦) اسلایدها را به مدت ۲ دقیقه و به آهستگی تکان می‌دهیم. ضمناً بر روی سطوح گرم (مثل جعبه Rh) نباید قرار داده شوند.

۷) بعد از ۲ دقیقه قطرات روی اسلایدها را رؤیت نموده و نتایج را گزارش می‌کنیم.

۲-۱-۱- تفسیر

- آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز با هر یک از معرف‌های ABO، مثبت و عدم آگلوتیناسیون که بصورت سوسپانسیون صاف گلبول‌های قرمز مشاهده می‌شود منفی گزارش می‌شود.

***توجه** برای پیش‌گیری از خطر آلودگی سعی شود قطرات با دست تماس پیدا نکند.*

- *آزمایش بر روی اسلاید برای تعیین آنتی‌بادی‌های ABO در سرم بیمار و یا اهداکننده دقیق نمی‌باشد.*

۲-۱- تعیین گروه خون سیستم Rh به روش اسلایدی

۱) یک قطره از معرف Anti-D را بر روی شیشه‌ای قرار می‌دهیم.
۲) یک قطره از معرف شاهد نیز جهت کنترل، بر روی اسلاید شیشه‌ای قرار می‌دهیم.
۳) بر روی هر قطره در روی اسلایدها، دو قطره از سوسپانسیون ۵۰-۴۰ درصد گلبول قرمز (که با سرم خود بیمار و یا سرم و پلاسمای سازگار تهیه شده است) قرار می‌دهیم.
٤) با اپلیکاتورهای جداگانه و تمیز، قطرات روی اسلاید را در یک شعاع وسیع‌تر بهم می‌زنیم.
٥) اسلایدها را همزمان بر روی جعبه Rh قرار می‌دهیم و آنها را به آرامی تکان می‌دهیم. اغلب سازندگان معرف‌ها توصیه می‌کنند برای پیش‌گیری از خشک شدن قطرات در روی اسلایدها و تشکیل رولوفورمیشن، در مدت ۲ دقیقه باید آگلوتیناسیون بررسی گردد.

۱-۲-۱- تفسیر

- اگر آگلوتیناسیون با معرف‌های Anti-D ایجاد ولی با نمونه کنترل بروز نکند نتیجه آزمایش مثبت قلمداد می‌گردد (خشک شدن حاشیه قطره بر روی اسلاید نباید با آگلوتیناسیون اشتباه شود)
- اگر آگلوتیناسیون با نمونه کنترل و Anti-D یعنی هر دو بروز کند نتیجه معرف Anti-D نباید مثبت قلمداد گردد مگر بررسی بیشتری انجام شود. لازم بذکراست که تعیین گروه‌بندی خون به روش لوله‌ای که در زیر به تفسیر توضیح داده خواهد شد. از روش اسلایدی دقیق‌تر می‌باشد.

۲- تعیین گروه خونی ABO به روش لوله‌ای

با توجه به اهمیت این موضوع، تعیین گروه باید بطور روتین بدو روش سلولی و سرمی همزمان انجام شود. در تعیین گروه سلولی (forward typing) هدف شناسائی نوع آنتی‌ژن‌های ABO موجود بر سطح گلبول‌های

قرمز یک فرد می‌باشد. در تعیین گروه سرمی (reverse typing) هدف شناسائی آنتی‌بادی‌های طبیعی موجود (Anti-A, Anti-B) در سرم همان فرد می‌باشد. قبل از اعلام گروه خون نهایی، باید نتیجهٔ تعیین گروه به روش سلولی با نتیجهٔ تعیین گروه به روش سرمی همخونی داشته باشد. برای انجام هر دو روش می‌توان از اسلاید یا لولهٔ آزمایش استفاده شود. بعضی مواقع هنگام تعیین گروه واکنش ضعیف است و بخوبی مشخص نمی‌باشد. در چنین مواردی تکرار آزمایش به روش لوله‌ای الزامی می‌باشد.

۱-۲- تعیین گروه سلولی (روش لوله‌ای)

- لوله‌ها را A، B، AB علامت‌گذاری کنید
- ابتدا در هر لوله یک قطره از آنتی‌سرم‌های مربوطه بریزید.
-

توجه: *همیشه ابتدا سرم داخل لوله‌ها ریخته شود و سپس کلیهٔ لوله‌ها را از نظر ریختن آنتی‌سرم بی‌رنگ مجدداً کنترل کنید. مرحلهٔ بعد اضافه کردن گلبول قرمز می‌باشد و رنگ مایع داخل لوله‌ها تبدیل به قرمز می‌شود. با توجه به این روش لوله‌ها در هر دو مرحله از نظر ریختن مواد لازم کنترل می‌شوند.*

- نمونهٔ خون فرد می‌توان بصورت لخته یا در مادهٔ ضد انعقاد جمع‌آوری شده باشد. در هر یک از لوله‌ها یک قطره از سوسپانسیون ۵-۳٪ گلبول قرمز مورد آزمایش بریزید. کلیهٔ لوله‌ها را از نظر ریختن گلبول‌های قرمز مجدداً کنترل کنید.

توجه: *جهت تهیه رقت ۵-۳٪ گلبول‌های مورد استفاده می‌توان از سرم، پلاسما یا سرم فیزیولوژیک با pH=7 استفاده کرد. در صورت استفاده از سرم یا پلاسما جهت رقیق کردن، زمینه برای نتایج کاذب ایجاد خواهد شد. برای جلوگیری از این خطا باید نمونه را سه بار با سرم فیزیولوژیک شستشو و در آخرین بار مقداری سرم فیزیولوژیک اضافه گردد تا گلبول‌های قرمز به رقت ۵-۳٪ برسد. رقت سوسپانسیون را می‌توان با دستگاه میکروهماتوکریت کنترل کرد.*

- به آرامی محتویات لوله را مخلوط کنید
- لوله‌ها را بمدت ۱۵ الی ۳۰ ثانیه با دور g×۱۰۰۰(۳۴۰۰ دور در دقیقه)با سروفیوژ سانتریفوژ کنید. چنانچه سروفیوژ موجود نبود، لوله‌ها را یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید.
- سرم داخل لوله‌ها را از نظر همولیز بررسی کنید. سپس لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا میزان آگلوتیناسیون سلول‌ها قابل بررسی باشند. لوله‌ها را در مقابل روشنائی از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید.
- آگلوتیناسیون با هر گونه شدت یا همولیز نشان دهندهٔ واکنش مثبت می‌باشد.

- در غیر این صورت واکنش منفی می‌باشد و جهت تأیید آن زیر میکروسکوپ بررسی کنید.
-

توجه: *در تعیین گروه سلولی استفاده از anti-AB الزامی نمی‌باشد ولی در شناسایی زیر گروههای A و B کمک می‌کند.*

۲-۲- تعیین گروه سرمی (روش لوله‌ای)

- لوله‌ها را O,B,A علامت‌گذاری کنید
- ابتدایک قطره ازسرم موردآزمایش درهرلوله بریزید. کلیهٔ لوله‌هارا از نظرریختن سرم مجدداً کنترل کنید.

توجه: *در تعیین گروه سرمی استفاده از O cell الزامی نمی‌باشد ولی آنتی‌بادی‌های نامنظم که در دمای اتاق فعال هستند با این روش شناسایی می‌شوند.*

- یک قطره از سوسپانسیون ۳ الی ۵ درصد گلبول قرمز A Cell در لولهٔ مربوطه بریزید (سوسپانسیون A Cell مخلوطی از گلبول‌های قرمز حداقل ۲ فرد با گروه خون A می‌باشد که توسط خود مراکز درمانی تهیه می‌شود).
- یک قطره از سوسپانسیون ۳ الی ۵ درصد گلبول قرمز B Cell در لولهٔ مربوطه بریزید (سوسپانسیون B Cell مخلوطی از گلبول‌های قرمز حداقل ۲ فرد با گروه خون B می‌باشد که توسط خود مراکز درمانی تهیه می‌شود).
- یک قطره از سوسپانسیون ۳ الی ۵ درصد گلبول قرمز O Cell در لولهٔ مربوطه بریزید (سوسپانسیون O Cell مخلوطی از گلبول‌های قرمز حداقل ۳ فرد با گروه خون O می‌باشد که توسط خود مراکز درمانی تهیه می‌شود).
- به آرامی محتویات لوله را مخلوط کنید.
- لوله‌ها را بمدت ۱۵ الی ۳۰ ثانیه با دور g×۱۰۰۰(۳٤۰۰ دور در دقیقه) با سروفیوژ سانتریفوژ کنید. چنانچه سروفیوژ موجود نبود، لوله‌ها را یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید.
- سرم داخل لوله‌ها را از نظر همولیز بررسی کنید. سپس لوله‌ها را به آرامی تکان دهید تا میزان آگلوتیناسیون سلول‌ها قابل بررسی باشند. لوله‌ها را در مقابل روشنایی از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید.
- آگلوتیناسیون با هر شدت یا همولیز نشان دهندهٔ واکنش مثبت می‌باشد
- در غیر اینصورت واکنش منفی می‌باشد و جهت تأیید آن زیر میکروسکوپ بررسی کنید.

۳- کنترل کیفی آزمایش‌های تعیین گروه خون

- آنتی‌سرم‌ها باید بطور روزانه از نظر تغییر رنگ، کدر شدن محلول، دارا بودن واکنش $^{+}$۳ یا $^{+}$٤ در مقابل سلول‌های A و B شناخته شده، دارا بودن واکنش منفی در مقابل سلول‌های O شناخته شده بررسی شوند.

توجه: *بررسی تیتر آنتی‌سرم‌ها جز برنامه کنترل کیفی مراکز درمانی نمی‌باشد*

- سوسپانسیون‌های گلبول قرمز باید بطور روزانه از نظر تغییر رنگ و همولیز بررسی شوند.

۱-۳- تفسیر

گروه خون نهائی	تعیین گروه سرمی			تعیین گروه سلولی		
	O Cell	B Cell	A Cell	Anti AB	Anti B	Anti A
O	-	+	+	-	-	-
A	-	+	-	+	-	+
B	-	-	+	+	+	-
A B	-	-	-	+	+	+

توجه: *در صورتیکه نتایج تعیین گروه سلولی و تعیین گروه سرمی یکدیگر را تأیید نکردند، اولین قدم تکرار آزمایش‌ها با دقت بیشتر می‌باشد تا اشکالات روش آزمایشگاهی برطرف شوند.*

اختلاف در گروه‌بندی ABO

اختلاف در تعیین گروه خونی ABO زمانی اتفاق می‌افتد که دو واکنش مثبت و یا دو واکنش منفی مورد انتظار رخ ندهد که معمولاً مربوط به اشکالات تکنیکی می‌باشد. تعدادی از شایع‌ترین اختلافات در آزمایش سلولی و سرمی در تابلوی ۱ مشخص شده است.

جدول ۱: شایع‌ترین علل اختلاف گروه‌بندی ABO ناشی از خطاهای آزمایشگاهی

۱- برچسب ناقص نمونه خون، لوله‌ها و اسلایدها
۲- تهیه سوسپانسیون گلبولی غلیظ یا رقیق
۳- اشتباهات یادداشتی
٤- ریختن اشتباهی نمونه‌ها
٥- تفسیر نادرست همولیز
٦- اضافه نکردن معرف‌ها
۷- رعایت نکردن دستورات کارخانه سازنده
۸- کالیبره نبودن سانتریفوژ
۹- معرف‌های آلوده
۱۰-گرم شدن لوله آزمایش در زمان سانتریفوژ شدن

اختلاف در تعیین گروه ABO را می‌توان با تکرار آزمایش با گلبول‌های قرمز تهیه شده در نرمال سالین (در صورتی که قبلاً در سرم و پلاسما تهیه شده بود)، حل نمود.

بعد از اینکه همه اشکالات تکنیکی بررسی و تصحیح گردید در آن صورت اطلاعات لازم در زمینه سن، نوع بیماری، سابقه تزریق خون، مصرف دارو، میزان ایمونوگلوبولین (اگر اندازه‌گیری شده است) و سابقه حاملگی لازم می‌گردد در این صورت باید نمونه تازه از بیمار تهیه و آزمایش را با آن تکرار نمود. اختلاف در گروه‌بندی ABO را بطور اختیاری می‌توان به چهار دسته تقسیم کرد.

۱- اختلافات در گروه‌بندی ABO دسته اول

در این گروه، اختلافات بین آزمایش سلولی و سرمی ناشی از آنتی‌بادی با واکنش ضعیف یا فقدان آنتی‌بادی می‌باشد. اختلاف این دسته نسبت به گروه‌های دیگر شایع‌تر می‌باشد. زمانی که واکنش در آزمایش سرمی (Reverse grouping) ضعیف است و یا واکنشی بروز نمی‌کند. در آن صورت اختلاف دسته اول مطرح می‌گردد. زیرا بطور طبیعی واکنش‌های حاصل در آزمایش‌های سلولی و سرمی خیلی قوی (٤^{+}) می‌باشد. علت

واکنش ضعیف و یا عدم واکنش در این گروه ناشی از کاهش تولید آنتی‌بادی بوده و یا اینکه بیمار نمی‌تواند آنتی‌بادی‌های ABO تولید کند. تعدادی از جمعیت‌های مشهور که از این نوع اختلافات دارند عبارتند از:

۱- نوزادان

۲- افراد کهنسال

۳- بیماران لوکمیک مبتلا به هیپوگاماگلوبولینمی (مثل CLL)

٤- بیماران لنفومی مبتلا به هیپوگاماگلوبولینمی (مثل لنفوم بدخیم)

٥- بیمارانی که داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی مصرف می‌کنند به جهت هیپوگاماگلوبولینمی

٦- آگاماگلوبولینمی مادرزادی

۷- بیماران دارای نقص ایمنی

۸- بیمارانی که پیوند مغزاستخوان شده‌اند (این بیماران علاوه بر هیپوگاماگلوبولینمی ناشی از درمان، چندین جمعیت گلبول قرمز تولید می‌کنند).

۱-۱- رفع اختلافات شایع دسته اول

بهترین راه برای برطرف کردن اختلاف آزمایش سلولی و سرمی، تقویت واکنش سرمی، با انکوبه کردن سرم بیمار با گلبول‌های A_1 و B در دمای اتاق به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه می‌باشد. در صورت عدم بروز واکنش مخلوط فوق را در ٤ درجه سانتی‌گرادبه مدت ۳۰-۱۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم.

در کنار آزمایش سرمی، همیشه باید اتو کنترل و سلول‌های O کنترل انجام گردد. زیرا که در دمای کم، آگلوتنین‌های سرد شایع مثل Anti-I هم تقویت می‌شوند و ممکن است در واکنش تداخل ایجاد کنند بطوری که می‌تواند با همه گلبول‌های قرمز بالغین واکنش نشان دهند در جدول ۲ یک نمونه از اختلاف را بصورت واکنش ضعیف و یا فقدان آنتی‌بادی را نشان می‌دهد.

Example of ABO Discrepancy Seen with waek or Missing Antibodies

	Forward Grouping ***Reaction of patient's cells with***			***Reverse Grouping Reaction*** ***of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	Neg	+++	+++	Neg	Neg
Patient's probable group: B (elderly patient)					

جدول ۲

۲-۱- اختلافات نادر در دسته اول

کیمیریسم[1] همانطوری که در تصویر ۱ دیده می‌شود. یکی از علل نادراختلاف در تعیین گروه خونی ABO می‌باشد. کیمیریسم به داشتن دو نوع جمعیت گلبول قرمز در یک شخص اطلاق می‌گردد. تعیین هرکدام از جمعیت سلولی بسته به تعداد گلبول‌ها ممکن است آسان یا سخت باشد.

واکنش خونی کیمیریسم بطور تی‌پیک زمینه مخلوط (Mixed Field) می‌باشد. کیمیریسم نادر می‌باشد و در دوقلوها یافت می‌شود که در سراسر زندگیشان دو نوع جمعیت سلولی در خون دارند. در تعویض خون داخل رحمی بعلت آناستومرز عروقی اتفاق می‌افتد. چون هر دو جمعیت سلولی در فرد بروز می‌کند و به همان فرد تعلق دارند. آن فرد Anti-A و Anti-B تولید می‌کند بنابراین هیچ‌گونه آنتی‌بادی قابل تشخیصی در آزمایش سرمی وجود ندارد.

اگر فرد دوقلو نباشد این حالت یعنی کیمیرا ناشی از Dis Permy (لقاح دواسپرم با یک تخمک) می‌باشدکه‌آنراموزائیسم‌هم‌می‌گویند. بطور شایع کیمیرای ساختگی که سبب دو جمعیت سلولی در خون فرد می‌شود. شامل:

	Anti-A	Anti-B	Anti-A,B	A_1	B		
Pt.1	**o**	**2+MF**	**2+MF**	**4+**	**o**	**Twin 1**	**70%B 30%**
Pt.2	**o**	**+WK**	**+ WK**	**4+**	**o**	**Twin 2**	**30%B 70%**

Patients 1 and 2 are examples of chimera twins

تصویر ۱

۱- ناشی از تزریق خون O به افراد A و یا B می‌باشد.

۲- تعویض خون

۳- خونریزی – جنینی مادری

٤- پیوند مغزاستخوان

۲- اختلاف در گروه‌بندی ABO دسته دوم

در این دسته اختلاف بین آزمایش سرمی و سلولی ناشی از واکنش آنتی‌ژن ضعیف و یا فقدان آنتی‌ژن می‌باشد. احتمالاً این دسته اختلافات شیوع کمتری دارد. تعدادی از علل ایجادکننده این دسته اختلافات شامل:

۱- وجود زیرگروه‌های A و یا B

۲- ممکن است لوسمی سبب تضعیف آنتی‌ژن A و B گردد

۳- در بیماری هوچکین هم تضعیف آنتی‌ژن مثل لوسمی گزارش شده است

٤- افزایش مقدار مواد مخصوص گروه‌های خونی محلول* (BGSS) در سرم بیماران مبتلا به بعضی بیماری‌ها مثل ابتلا به کارسینوم معده و پانکراس

Chimerism

*- Blood Group Specific Soluble Substances

۵- پدیده B اکتسابی که اغلب موارد در انسداد روده و یا در مبتلایان به بدخیمی‌های روده و معده دیده می‌شود (جدول ۳)

٦- آنتی‌بادی‌های ضدآنتی‌ژن‌های با شیوع کم در معرف‌های Anti-A Anti-B (جدول ٤)

Example of ABO Discrepancy Caused by an Acquired B Antigen

	Forward Grouping Reaction of patient's cells with			***Reverse Grouping Reaction of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	++++	++	++++	Neg	++++
	Patient's probable group: A				

جدول ۳

Example of ABO Discrepancy Caused by Low-Incidence Antibodies in the Reagent Antisera

	Forward Grouping Reaction of patient's cells with			***Reverse Grouping Reaction of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	++++	+	++++	Neg	++++
	Patient's probable group: A				

جدول ٤

زمانی که لازم است پدیده آنتی‌ژن B اکتسابی را مشخص کنیم آزمایش‌های Secretory لازم می‌باشد.

اگر بیمار در واقع یک Secrotor باشد، فقط ماده A در این پدیده ترشح می‌کند. باندیرآسیمپلیسی‌فولیا۲ (Bandeiraea simplicifolia II) بطور قوی سلول‌های B اکتسابی را که قبلاً تحت آنزیم قرار گرفته‌اند آگلوتینه می‌کند تشخیص ژن مولکول گلیکوزیل ترانسفراز یک روش دیگری است که به شناسایی B اکتسابی کمک می‌کند. از آنجائیکه چنین افرادی از نظرژنتیکی گروه خونی A دارند فعالیت B ترانسفرازی ندارند.

درمان گلبول‌های قرمز با استیک ایندرید دی استیلاز (Acetic An-Hy-dride-deacetylase) که یک مولکول سطحی است سبب کاهش شدید واکنش سلولی با Anti-B می‌شود فعالیت سلول‌های B طبیعی با چنین درمانی تحت تأثیر قرار نخواهد گرفت. ندرتاً آنتی‌بادی‌های اضافی که در آنتی‌سرم‌ها وجود دارد با آنتی‌ژن‌های با شیوع کم در سطح گلبول قرمز واکنش نشان داده‌اند و این موجب می‌گردد که گلبول‌های قرمز بیمار با Anti-A, Anti-B واکنش‌های ضعیفی ایجاد کنند. بهترین راه برای حل این مشکل، تکرار آزمایش سلولی با آنتی‌سرم‌های با شماره سریال‌های مختلف می‌باشد. اگر علت اختلاف ناشی از وجود آنتی‌بادی‌های با شیوع کم

داخل آنتی‌سرم‌ها باشد، ممکن است آنتی‌بادی موردنظر در داخل آنتی‌سرم‌های دیگر موجود نباشد در این صورت اختلاف حل می‌شود.

۳- اختلاف دسته سوم

در این سری اختلاف بین آزمایش سلولی و سرمی، ناشی از وجود پروتئینی و یا اختلالات پلاسما می‌باشد که سبب رولوفورمیشن و یا آگلوتیناسیون کاذب می‌گردد. تعدادی از علل ایجادکننده رولوفورمیشن عبارتنداز:

۱- افزایش سطح گلوبولین‌ها در بعضی از بیماری‌ها مثل مولیتپل میلوم، ماکروگلوبولینمی والدن‌اشتروم، دیسکرازی‌های دیگر پلاسما سل‌ها، بعضاً لنفوم هوچکینی با پیشرفت متوسط.

۲- افزایش میزان فیبرینوژن

۳- افزایش میزان بالابرنده‌های حجم پلاسما (دکسترن، پلی‌وینیل پیرولیدین (Polyunil Vinil Pyrolidin)

جدول ۵ نشان دهنده عدم سازگاری آزمایش سلولی و سرمی در دسته سوم را نشان می‌دهد.

Example of ABO Discrepancy Caused by Rouleaux Formation

	Forward Grouping *Reaction of patient's cells with*			*Reverse Grouping Reaction* *of patient's serum with*	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	++++	++	++++	++	++++
Patient's probable group: A					

جدول ۵

۱-۳- اصلاح اختلاف‌های دسته سوم

رولوفورمیشین، وضعیت بهم چسبیده شبیه به قرار سکه‌ای گلبول‌های قرمز اطلاق می‌گردد. که بصورت آگلوتیناسیون تظاهر می‌کند که آنرا می‌توان در میکروسکوپ مشاهده نمود. برای حل این مشکل، در آزمایش سلولی، گلبول‌های بیمار را چندین بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و در آزمایش سرمی، سرم بیمار ا با سرم فیزیولوژی رقیق کرده و یا از تکنیک جایگزین سرم فیزیولوژی استفاده می‌کنیم. در آگلوتیناسیون واقعی، حتی با افزودن سرم فیزیولوژی، توده گلبول‌های آگلوتینه از بین نخواهد رفت.

شستشوی خون بندناف ٦ تا ٨ دفعه سبب خروج ژل وارتون (که یک موکوپلی ساکارید می‌باشد) از محیط واکنش خواهد شد. حتی با وجود اینکه انجام آزمایش‌های سرمی روی خون بندناف غیرمنطقی می‌باشد، بنابراین دانشجویان باید بدانند که شستشوی گلبول‌های قرمز با سرم فیزیولوژی در این موارد سبب دقت آزمایش سلولی

خواهد شد. ولی این را باید دانست که ممکن است آزمایش سلولی با آزمایش سرمی در نوزادان همخوانی نداشته باشد زیرا که آنتی‌بادی‌های موجود در سرم نوزاد آنتی‌بادی‌های مادر است.

٤- اختلاف در گروه‌بندی ABO دسته چهارم

این دسته اختلاف ناشی از تداخل یکسری عوامل متفرقه است که شامل موارد زیر می‌باشند:

١- پلی آگلوتیناسیون

٢- آنتی‌بادی‌های سرد (خودی یا غیرخودی)

٣- اتوآنتی‌بادی‌های گرم

٤- ایزوآگلوتینین‌های غیر منتظره ABO

٥- آنتی‌بادی‌های غیر از Anti-A, Anti-B که ممکن است تشکیل ایمون کمپلکس داده و بر روی گلبول‌های قرمز بیمار جذب شده (برای مثال بعضی افراد آنتی‌بادی‌های ضد اکریفلاوین که ماده زرد رنگ معرف Anti-B می‌باشد می‌سازند. سپس اکریفلاوین و آنتی‌اکریفلاوین با هم کمپلکس تشکیل داده بر روی گلبول‌های بیمار نشسته و در آزمایش سلولی، سبب آگلوتیناسیون گلبول‌های بیمار خواهد شد)

٦- گلبول‌های قرمز با فنوتایپ Cis AB (اتفاق نادر): در این فنوتایپ آنتی‌ژن ضعیف A (مشابه گلبول‌های Az) و B تظاهر می‌کند Anti-B ضعیفی که در سرم اغلب افراد Cis AB وجود دارد، سبب اختلال در ABO در آزمایش سرمی می‌گردد.

١-٤- رفع اختلاف دسته چهارم

پلی‌آگلوتیناسیون (آگلوتیناسیون گلبول‌ها با همه سرم‌های انسان) می‌تواند ناشی از توارث و یا عفونت باکتریال باشد. برای مثال می‌توان T پلی‌آگلوتیناسیون که در آن آنتی‌ژن مخفی گلبول‌های قرمز (T آنتی‌ژن) تحت تأثیر عفونت‌های باکتریال و یا ویرال تظاهر می‌کند. بدین صورت که آلودگی باکتریال در in vitro یاin vivo سبب تولید آنزیمی گردد که سبب تغییر و تظاهر آنتی‌ژن مخفی گلبول قرمز شده و منتهی به T-activation گردد. در تمامی سرم‌های انسانی Anti-T وجود دارد و با آنتی‌ژن T تازه ظهور واکنش می‌کند قدرت واکنش بستگی به مقدار Anti-T دارد.

این واکنش و اختلال در جدول ٦ دیده می‌شود.

	*Forward Grouping** <u>*Reaction of patient's cells with*</u>			*Reverse Grouping Reaction* <u>*of patient's serum with*</u>	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	++	+	++++	++++	++++
	Patient's probable group: O				

* Note: Rolyclonal antisera used.

جدول ٦

در صورت استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، Anti-T، مشکلی را ایجاد نخواهد کرد در صورت مشکوک شدن به پلی‌آگلوتیناسیون، آزمایش با لکتین لازم می‌گردد. که شامل آزمایش سلول‌های بیمار با یکسری از لکتین‌ها می‌باشد، کیت‌های تجارتی لکتین‌ها فراهم می‌باشد. بر اساس واکنش حاصل، نوع واکنش پلی‌آگلوتیناسیون را می‌توان تشخیص داد.

Tn-activation با وجود اینکه بندرت اتفاق می‌افتد یکنوع دیگر پلی‌آگلوتیناسیون می‌باشد. این حالت پایدار است نه موقتی و به عفونت‌های باکتریال و ویرال مرتبط نیست. پدیده آنتی‌ژن اکتسابی A با TnActivation گزارش شده است. اتوآنتی‌بادی‌های سرد بالقوه، می‌توانند با سلول‌های خودی آگلوتیناسیون ایجاد کنند این گلبول‌ها معمولاً آزمایش کومس مستقیم یا آنتی‌گلوبولین مثبت دارند. اگر آنتی‌بادی موجود در سرم با همهٔ گلبول‌های بالغین واکنش نشان دهد. (مثل Anti-I) در آنصورت گلبول‌های معرف A و B که در آزمایش سرمی بکار می‌رود آگلوتینه خواهند شد.

	Forward Grouping ***Reaction of patient's cells with***			***Reverse Grouping Reaction*** ***of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	++	++++	++++	++++	+++
	Patient's probable group: B				

جدول ۷

نوع اختلال ایجاد شده توسط اتوآنتی‌بادی‌های سرد در آزمایش‌های سلولی و سرمی در شکل ۷ نشان داده شده است. برای رفع این مشکل گلبول‌های بیمار می‌بایست برای مدت کوتاهی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده سپس آنرا با سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتی‌گراد سه بار شستشو داده و بعد آزمایش مجدداً تکرار می‌شود در صورتی که باز هم مشکل حل نشد در آن صورت گلبول‌های قرمز بیمار با حضور دی‌تیوتریتول (Dithiothreitol-DTT) آزمایش می‌شود. این کار سبب حذف IgM مسئول آگلوتیناسیون خواهد شد. در مورد سرم بیمار، اینکه آنرا با گلبول‌های معرف در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده سپس با هم مخلوط کرده و آزمایش را انجام می‌دهیم و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد آنرا ارزیابی می‌کنیم در صورت نیاز آنتی‌هیومن نیز بکار می‌بریم. آنتی A و B با واکنش ضعیف، در شرایط خارج از دمای مناسب واکنش نخواهند نمود. اگر آزمایش سرمی منفی باشد (در حالیکه انتظار واکنش مثبت باشد) در آنصورت باید اتوابسوربشن انجام داده‌شود. تا اتو آنتی‌بادی از سرم جدا شود. سپس سرم موردنظر را برای آزمایش سرمی مجدداً بکار می‌بریم.

بیماران مبتلا به آنمی همولیتیک اتوایمون گرم، یا آنهائیکه داروی متیل دوپا مصرف می‌کنند ممکن است گلبول‌های قرمز آنها به میزان کافی با آنتی‌بادی پوشانده شود به طوری که زمینه برای آگلوتیناسیون خودبخودی فراهم گردد. هم‌چنین ممکن است آنتی‌بادی‌های مسبب واکنش‌های تزریق خون، گلبول‌های قرمز بیمار را پوشانده و سبب مثبت شدن آزمایش کومس مستقیم شوند. این مسئله سبب می‌شود که ما در آزمایش سلولی، واکنش زمینه مخلوط (Mixed-Field) یا واکنش ضعیف مشاهده کنیم. این آنتی‌بادی‌های واکنش‌دهنده گرم که گلبول‌های قرمز بیمار را می‌پوشانند سبب واکنش ضعیف در دمای اتاق می‌شوند.

نوع اختلال در آزمایش‌های سلولی و سرمی که بوسیله اتوآنتی‌بادی‌های گرم و یا آنتی‌بادی‌های مسبب واکنش‌های تزریق خون که گلبول‌های قرمز را می‌پوشانند در جدول ۸ نشان داده شده است زمانی که تکنولوژیست مشکوک به اتوآنتی‌بادی می‌شود که سبب واکنش مثبت کاذب در آزمایش سلولی می‌گردد باید گلبول‌های قرمز را به روشی که اشاره شد تحت درمان قرار داده تا ایمونوگلوبولین‌های پوشاننده گلبول‌های قرمز جدا گردد. Elution آرام گلبول‌ها در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد ممکن است به میزان کافی آنتی‌بادی‌ها را جدا کرده سپس گلبول‌ها را با Anti-A,B آزمایش کنیم.

	Forward Grouping ***Reaction of patient's cells with***			***Reverse Grouping Reaction*** ***of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	+	+	+	++++	++++
	Patient's probable group: O				

جدول ۸

ممکن است اتوآگلوتنین‌های غیرمنتظره ABO در سرم بیمار، در دمای اتاق باآنتی‌ژن‌های گلبول‌های معرف واکنش کنند.

واکنش‌های از این نوع در ناسازگاری ABO شامل افراد Az و AzB که بطور طبیعی Anti-A_1 یا Anti-A_1 و Anti-A_1B تولید می‌کنند آنها ممکن است بطور طبیعی Anti-H تولید کنند. آزمایش سرمی حداقل باید با سه نوع سلول یعنی گلبول‌های A_1/A_2/B، گلبول‌های O و گلبول‌های خودی (گلبول‌های بیمار مخلوط با سرم بیمار) انجام شود. مشخصات آنتی‌بادی را با مطالعه طرح واکنش (بعنوان مثال اگر آنتی‌بادی فقط سلول‌های A_1 را آگلوتینه کند به احتمال قوی آن Anti-A خواهد بود) می‌توان تعیین نمود. آلوآنتی‌بادی‌های غیرمنتظره در سرم بیمار به‌غیر از ایزوآنتی‌بادی ABO (برای مثال Anti-M) ممکن است سبب اختلال در آزمایش سرمی

گردد. اگر گلبول‌های آزمایش سرمی، حاوی آنتی‌ژن‌های غیر از A و B داشته باشند، در این صورت آنتی‌بادی‌های غیرمنتظره موجود در سرم بیمار، با گلبول‌های فوق واکنش خواهند کرد.

Example of ABO Discrepancy Caused by Unexpected Alloantibodies in Patient's Serum

	Forward Grouping ***Reaction of patient's cells with***			***Reverse Grouping Reaction*** ***of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	++++	+++	++++	+	+
	Patient's probable group: AB				

جدول ۹

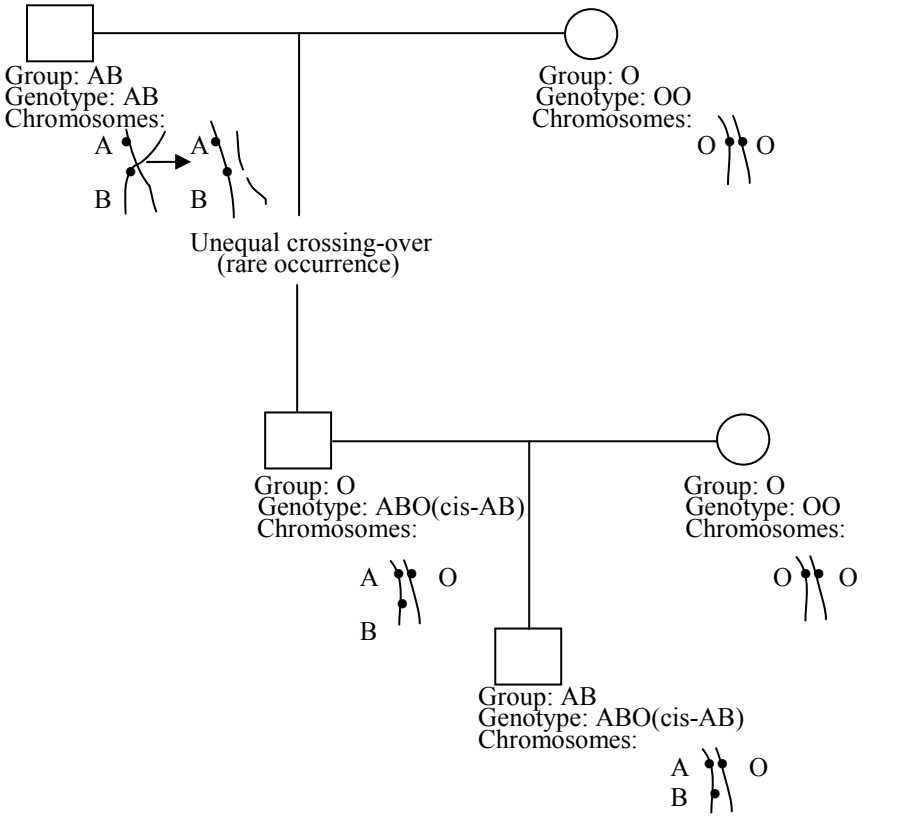
در این حالت باید پانل با سرم بیمار انجام داد. و برای شناسائی آلوآنتی‌بادی‌های موردنظر (درآزمایش سرمی) از گلبول‌های A_1 و B که آنتی‌ژن مربوطه را ندارند استفاده می‌کنیم.
بعضی افراد آنتی‌بادی ضد اکریفلاوین در سرم خود دارند آنتی‌بادی‌های بیمار با رنگ معرف ترکیب شده و متعاقباً به گلبول‌های بیمار چسبیده، در نتیجه در آزمایش سلولی سبب آگلوتیناسیون می‌گردد. این اختلال در جدول ۹ نشان داده شده است.

Example of ABO Discrepancy Caused by a Red Cell -adsorbed, Soluble, Antigen-Antibody Complex

	Forward Grouping ***Reaction of patient's cells with***			***Reverse Grouping Reaction*** ***of patient's serum with***	
	Anti-A	**Anti-B**	**Anti-A,B**	**A_1 Cells**	**B Cells**
Patient	Neg	+++	Neg	++++	++++
	Patient's probable group: O				

جدول ۱۰

شستشوی گلبول‌های بیمار سه بار با نرمال سالین، این اختلاف را حل خواهد نمود.
Cis-AB به توارث دو ژن AB از یکی از والدین (که در روی یک کروموزوم حمل می‌شوند) و ژن O از والد دیگر، اطلاق می‌شود. در این توارث فرزندان بجای دو ژن، سه تا ژن دارند (شکل۲).



Example of cis-AB inheritance to unequal crossing-Over. □=male; O= female.(From Harmening-Pittiglio. [33]P7 with Pemission.)

شکل ۲

این نوع توارث AB را باید با بروز گروه خون معمول AB که در آن ژن‌های آلل روی دو کروموزوم قرار دارند افتراق داد. معمولاً آنتی‌ژن B با سرم‌های اهداکنندگان راندوم حاوی Anti-B واکنش ضعیف با زمینه مخلوط (Mixed Field) نشان می‌دهد که مشخص زیر گروه B_3 می‌باشد و در تعدادی از نمونه‌ها گزارش شده است.

سرم اغلب افراد Cis-AB دارای Anti-B ضعیف دارند که با همهٔ سلول‌های B واکنش نشان می‌دهد، ولی با گلبول‌های Cis-AB واکنش نمی‌کنند. میزان ترانسفرازهای A و B در افراد Cis-AB کمتر از افراد با گروه‌های خونی A و B می‌باشد. بعضی‌ها عقیده دارند که قسمتی از آنتی‌ژن B در افراد Cis-AB وجود دارد.

خون‌های Cis-AB را می‌توان به چهار دسته تقسیم نمود: $A_2B_1 - A_1B_3 - AzB_3$ و A_zB_x

تئوری‌های متعددی برای توجیه فنوتایپ Cis-AB ارائه شده است اغلب Cross over را در بخشی از ژن B را مسبب تظاهر نابرابر و ترکیب جدید می‌دانند با وجود این طرح باندینگ قسمت انتهای دیستال بازوی طویل کروموزوم۹ نشانگر طرح طبیعی ABO می‌باشد.

از طرف دیگر تئوری‌های دیگری وجود دارد که از نظر تئوری فوق مطابقت نمی‌کند. بعنوان مثال: موتاسیون در جایگاه ABO سبب تولید آنزیمی می‌گردد که می‌تواند هر دو قندهای اختصاصی A و B را به مولکول پیشتاز منتقل کند.

مثال‌های متعددی از واکنش‌های سرولوژیک مربوط به اختلالات ABO همراه با رفع اشکال در جدول ۱۰ نشان داده شده است.

آزمایش کراس‌مچ ماژور (Major Crossmatch)

مقدمه

در آزمایش کراس‌مچ ماژور سرم بیمار در مجاور گلبول‌های قرمز دهنده قرار می‌گیرد و از نظر آلوآنتی‌بادی داخل سرم بیمار نسبت به آنتی‌ژن‌های سطح گلبول‌های قرمز دهنده بررسی می‌شود. این آزمایش تنها یکی از آزمایش‌های سازگاری می‌باشد. کراس‌مچ ماژور اگر همراه با تعیین گروه ABO و Rh و غربالگری آنتی‌بادی بطور صحیح انجام شود، خون تزریق شده با بیمار به احتمال ۹۹٫۹۵ درصد سازگار می‌باشد. به عبارت دیگر با انجام تمام آزمایش‌های سازگاری هنوز احتمال بروز واکنش نسبت به خون‌دهنده هر چند بسیار کم وجود دارد.

روش

- سه عدد لوله را RT* برای تجسس آلوآنتی‌بادی‌های سرد، Alb** و IAT*** برای تجسس آلوآنتی‌بادی‌های گرم علامت‌گذاری کنید.
- داخل لولهٔ RT، یک قطره از سرم بیمار بریزید
- داخل لولهٔ Alb، دو قطره از سرم بریزید
- داخل لولهٔ IAT، دو یا سه قطره از سرم بیمار بریزید
- کلیهٔ لوله‌ها را از نظر ریختن سرم بیمار مجدداً کنترل کنید
- در هر یک از لوله‌ها یک قطره از سوسپانسیون ۳ الی ۵ درصد گلبول قرمز دهنده بریزید.
- کلیهٔ لوله‌ها را از نظر ریختن گلبول‌های قرمز مجدداً کنترل کنید
- به آرامی محتویات لوله را مخلوط کنید
- لولهٔ RT را بمدت یک ساعت در حرارت اتاق قرار دهید.
- لولهٔ IAT را بمدت یک ساعت در حمام آب گرم (بن‌ماری) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.
- لولهٔ Alb را به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. پس از نیم ساعت، لوله را بیرون بیآورید. از کنار لوله یک قطره آلبومین گاوی ۲۲ درصد به آرامی اضافه کنید

*RT: Room Temperature
** Alb: Albumin
*** IAT: Indirect Antiglobulin Test (Indirect Coombs)

- (بدون مخلوط کردن). مجدداً لولهٔ Alb را بمدت نیم ساعت داخل حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دهید.
- پس از ساعت تعیین شده، لولهٔ RT را به آرامی تکان داده و از نظر همولیز یا آگلوتیناسیون بررسی کنید.
- پس از ساعت تعیین شده، لولهٔ Alb را از حمام آب گرم بیرون آورید. به آرامی تکان دهید و از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید.
- پس از ساعت تعیین شده، لولهٔ IAT را از حمام آب گرم بیرون بیآورید. لوله را تقریباً با سرم فیزیولوژیک پر کنید و کمی تکان دهید تا محتویات داخل آن مخلوط شوند. لوله را بمدت ۳۰ ثانیه در سروفیوژ سانتریفوژ کنید. پس از سانتریفوژ سرم روی گلبول‌های قرمز را دور بریزید. این عمل را شستشوی گلبول‌های قرمز می‌نامند.
- شستشوی گلبول قرمز را دو بار دیگر تکرار کنید.
- پس از آخرین شستشو و خالی کردن سرم فیزیولوژیک، لولهٔ IAT را روی یک دستمال برگردانید تا تمام سرم خارج شود و گلبول‌های قرمز کاملاً خشک شوند.
- با توجه به دستورات تولیدکننده، تعداد مورد نیاز قطره (یا قطرات) آنتی- هیومن گلوبولین داخل لولهٔ IAT بریزید و کاملاً مخلوط کنید.
- لولهٔ IAT را بمدت ۳۰ ثانیه در سروفیوژ سانتیفوژ کنید.
- لولهٔ IAT را از سانتریفوژ خارج کنید و به آرامی تکان دهید. لوله را در مقابل روشنائی از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید.

توجه: *چنانچه گلبول حساس شده در دسترس باشد، مواردی که لولهٔ IAT منفی شد به آن یک قطره گلبول حساس شده اضافه شود. پس از ۳۰ ثانیه سانتریفوژ از نظر آگلوتیناسیون بررسی کنید. واکنش مثبت با گلبول‌های حساس شده دلالت بر معتبر بودن نتیجهٔ منفی در لولهٔ L AT می‌باشد. اما اگر گلبول‌های قرمز حساس شده آگلوتینه نشوند نشان‌دهندهٔ عدم اعتبار نتیجهٔ منفی در لولهٔ IAT می‌باشد و تکرار مجدد آزمایش با دقت بیشتر الزامی می‌باشد.*

تفسیر	آزمایش کراس‌مچ ماژور		
	IAT	Alb	RT
خون دهنده برای بیمار گیرنده سازگار بوده و قابل تزریق می‌باشد.	–	–	–
بیمار دارای آنتی‌بادی سرد بر علیه آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز دهنده می‌باشد.	–	–	+
بیمار دارای آنتی‌بادی گرم بر علیه آنتی‌ژن‌های گلبول‌های قرمز دهنده می‌باشد.	+	+	–

در صورت مثبت شدن یا مشاهدهٔ آگلوتیناسیون در هر یک از لوله‌ها باید ۱۰ میلی‌لیتر خون بیمار جهت بررسی بیشتر به آزمایشگاه سرولوژی اختصاصی سازمان انتقال خون ارسال می‌شود.

توجه: *آتی‌بادی‌های سرد ترجیحاً در دمای سرد عمل می‌کنند. بطوری که در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد شدت آگلوتیناسیون $^{+}$٤ می‌باشد. در دمای اتاق یا حتی ۳۰ درجه سانتی‌گراد آنتی‌بادی‌های سرد عمل می‌کنند اما با شدت کمتر ($^{+}$۲ یا $^{+}$۱) گلبول‌های قرمز را آگلوتینه می‌کنند. آنتی‌بادی‌های گرم نیز در یک طیف عمل می‌کنند ولی قوی‌ترین واکنش ($^{+}$٤) را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهند.*

نگهداری خون و فرآورده‌های آن

برای حفظ حیات و پایداری خون و فرآورده‌های خونی، محلول‌های ضدانعقاد و نگهدارنده به تنهایی کافی نمی‌باشند و شرایط فیزیکی و نگهداری مناسب فرآورده‌ها نیز حائز اهمیت است.

شرایط عمومی نگهداری فرآورده‌های خونی

محل‌های نگهداری فرآورده‌های خونی باید دمای ویژه، فضای کافی و نور مناسب داشته باشد و به‌گونه‌ای منظم و تجهیز شده باشد که امکان نگهداری فرآورده‌ها در محلی خشک، تمیز و مرتب وجود داشته باشد.

کلیهٔ وسایل نگهداری اعم از یخچال، فریزر، یا شیکر ویژه نگهداری پلاکت، باید دارای وسیلهٔ کنترل دمای پایه، خط‌مشی‌ها و روش‌های کار باشند که شامل این مواردند:

۱- کنترل دائمی دمای داخلی

۲- روش‌های مصوب جهت کنترل و ثبت دما در فواصل زمانی حداقل ٤ ساعت (ممکن است یک وسیلهٔ کنترل دائمی مورد استفاده قرار گیرد).

۳- علائم هشداردهندهٔ شنیداری که طی شبانه‌روز قابل شنیدن باشد.

٤- بازرسی هشدار دهنده‌ها طبق یک برنامهٔ تنظیمی

٥- به‌کار بردن دستورالعمل‌های ضروری هنگام قطع برق و فعال شدن علائم هشداردهنده

٦- به‌کار بردن روش‌های جایگزینی برق در مواقع اورژانس

۷- کالیبره کردن دماسنج‌ها با دماسنج مرجع حداقل ۲ بار در سال

کلیهٔ سیستم‌های نگهداری باید مجهز به علائم هشداردهندهٔ شنیداری باشند. به منظور جلوگیری از هرنوع آسیب به فرآورده‌ها این علائم هشداردهنده باید قبل از ایجاد دمای نامناسب فعال شوند. این وسایل باید به طور دائم و ترجیحاً با ابزار ثبتی که دمای محیط نگهداری را ثبت می‌کند کنترل شوند. اگر چنین وسیله‌ای موجود نباشد، دما باید حداقل هر ٤ ساعت ثبت شده و هر تغییری از میزان مورد انتظار گزارش و تصحیح گردد.

علائم هشداردهنده باید در محلی باشند که طی ۲٤ ساعت شبانه روز شنیده شود. سیستم‌های هشداردهنده باید در موارد قطع برق دارای جایگزین باشند. کارت‌های ثبت دما باید به طور مرتب تعویض و کنترل شده و هر نوع انحراف از دمای مورد نظر ثبت شود.

* لازمهٔ کار تولیدی خوب آن است که فرآورده‌های مختلف بطور مناسب مشخص گردیده و از هم جدا شده باشند.
* در یخچال‌ها یا فریزرهای بانک خون نباید مواد غذایی نگهداری کرد.

موارد قابل توجه عبارتند از:

* **قرنطینه**

باید اطمینان یابیم که فرآورده‌های آزمایش نشده در کنار فرآورده‌هایی قرار نگیرند که بطور مکرر در آزمایش‌های غربالگری میکروب‌شناسی نتایج واکنشی نشان داده‌اند.

* **فرآورده‌های تأیید نشده**

فرآورده‌هایی هستند که با مشخصات آزمایش‌های معمول تطبیق نداشته یا بطریقی برای انتقال خون نامناسب می‌باشند.

* **فرآورده های برگشتی**

فرآورده‌هایی که از آزمایشگاههای خارج از نظارت مستقیم سازمان انتقال خون برگردانده می‌شوند نباید به موجودی بازگردانده شوند.

* **ذخیره**

فقط فرآورده‌هایی که برای ارسال رضایتبخش فرض شده‌اند باید توسط فرد مسئول بصورت ذخیره نگهداری شوند.

* **خطرات**

فرآورده‌هایی تحت عنوان خطرناک طبقه‌بندی می‌شوند که از خون‌هایی که مکرراً در آزمایش‌های غربالگری میکروب شناسی واکنش نشان داده‌اند تهیه شده باشند یا اینکه از خون اهداکنندگانی تهیه شده باشد که بعلت قرار داشتن در گروه پر خطر (high risk) بودن یا نتایج آزمایش قبلی باید معدوم شوند.

دماهای مناسب نگهداری انواع فرآورده‌های سلولی و پلاسمایی:

۱- خون کامل و گلبول‌های قرمز (شامل گلبول‌های قرمز کم‌لکوسیت و سایر فرآورده‌های خاص گلبول قرمز نیز می‌باشد): ۱ تا ٦ درجه سانتی‌گراد

۲- پلاسمای تازهٔ منجمد (FFP): کمتر یا مساوی ۱۸- درجه سانتی‌گراد

۳- فاکتور ضد هموفیلی کرایوپرسی‌پیتیت: کمتر یا مساوی ۱۸- درجه سانتی‌گراد

٤- گلبول‌های قرمز منجمد شده در گلسیرول ٤۰ درصد: کمتر یا مساوی ٦٥- درجه سانتی‌گراد

٥- گلبول‌های قرمز منجمد شده در گلسیرول ۲۰ درصد: کمتر یا مساوی ۱۲۰- درجه سانتی‌گراد

٦- پلاکت: ۲۰ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد

۷- گرانولوسیت: ۲۰ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد

حمل و نقل خون‌های اهدایی به مراکز انتقال خون

هنگام حمل و نقل خون و فرآورده‌های خونی باید دمای آن دقیقاً کنترل شود. در تمام مراحل حمل و نقل باید سلامت و فیزیولوژی مناسب فرآورده تضمین شود.

مراقبت در حمل و نقل خون باید از زمان دریافت خون تازه آغاز شود. واحدهایی که پلاکت تغلیظ شده از آنها تهیه می‌شود نباید در دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد چون روی عملکرد پلاکت تأثیر می‌گذارد. همچنین دمای آنها نباید از ۲٤ درجه سانتی‌گراد تجاوز کند. ظروف حمل خون که برای تهیهٔ پلاکت مورد استفاده قرار می‌گیرد باید عایق‌دار باشند و نباید در آنها از یخ استفاده شود. چنانچه از واحدهای خونی دریافت شده پلاکتی تهیه نشود، دمای حمل و نقل باید در محدودهٔ ۱۰-۱ درجه سانتی‌گراد حفظ شود.

حمل و نقل گلبول‌های قرمز به مراکز درمانی

هنگام حمل و نقل گلبول‌های قرمز یا خون کامل دما باید بین ۱ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شود، به همین منظور از صندوق‌های عایق‌دار قطور و برخی یخچال‌های مخصوص استفاده می‌شود. بهترین خنک‌کننده برای ارسال گلبول قرمز یخ مرطوب است که آن را باید در بالای صندوق حمل کننده قرارداد تا هوای سرد در مخزن به سمت پایین جریان یابد. در آب و هوای خیلی گرم یا وقتی که مدت حمل و نقل طولانی است یخ ممکن است همچنین در ته مخزن گذاشته شود. هرگز یخ را نباید در تماس مستقیم با خون قرار داد چون باعث همولیز گلبول‌های قرمز می‌شود.

برای حفظ دمای حمل و نقل چندین راه وجود دارد. می‌توان از دماسنج‌های جیوه‌ای در ظروف حمل و نقل استفاده کرد که حداکثر و حداقل دما را در طول حمل و نقل بخوبی نشان می‌دهند. ولی چون دارای جیوه هستند در صورت شکسته شدن برای فرآورده‌ها خطرناک است همچنین این دماسنج‌ها مدت زمانی را که دما بالا یا پایین بوده نشان نمی‌دهند و فقط حداقل و حداکثر دما را در طول حمل و نقل نشان می‌دهند.

روش‌های دیگری وجود دارد که حداکثر دما را هنگام حمل و نقل نشان می‌دهد. در این سیستم‌ها از سنسوری استفاده می‌شود که وقتی دما به حد غیرقابل قبول می‌رسد رنگ یا شکل آن تغییر می‌کند. دماهای حمل و نقل باید ثبت شده و گزارشات در کنار سایر گزارشات کنترل کیفی نگهداری شوند.

یک روش ساده و ارزان قیمت، تعیین دمای خون هنگام ورود به مرکز دریافت‌کنندهٔ خون می‌باشد. در این روش انتهای حساس دماسنج را بین دو کیسهٔ خون به شکل «ساندویچ» قرار داده و آنها را با باندهای لاستیکی محصور می‌کنند، سپس کیسه‌های ساندویچی را به مخزن حمل کننده منتقل و دمای بین دو کیسه را پس از حداقل ۵ دقیقه یادداشت می‌کنند اگر دما در محدودهٔ قابل قبول (۱ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد) نبود خون دیگر قابل استفاده نیست.

هنگامی که بیش از چند دقیقه خارج از دمای نگهداری کار می‌کنیم مثلاً هنگام برچسب زدن یا ترخیص خون، بهتر است دمای فرآورده کنترل شود به این ترتیب که یک مخزن پر از مایع را در اطراف محلی که با فرآورده کار می‌کنیم قرار می‌دهیم و دمای آن ظرف را اندازه می‌گیریم. هنگامی که دما به نزدیک ٦ درجه سانتی‌گراد رسید، فرآورده باید به داخل یخچال انتقال یابد.

شرایط نگهداری گلبول قرمز

یخچالی که گلبول‌های قرمز یا خون کامل در آن نگهداری می‌شود، باید دارای Fan چرخشی باشد تا دما در تمام قسمت‌های آن یکسان باشد. سنسور ثبت دما باید در حجمی از مایع برابر یا کمتر از حداقل حجم گلبول‌های قرمزی که در یخچال نگهداری می‌شوند قرار داده شود. آب مایع مناسبی برای این منظور است زیرا مانند خون غلیظ نیست و نسبت به تغییرات دما از خون حساس‌تر است و قبل از آنکه فرآورده تحت تأثیر تغییرات نامطلوب دما قرار گیرد، پرسنل آگاه می‌شوند. تمامی دماسنج‌های بکار رفته باید با یک سیستم استاندارد کالیبره شوند.

کنترل دمای داخلی معمولاً در یک نقطهٔ ثابت صورت می‌گیرد، بنابراین منعکس کنندهٔ تمام قسمت‌های مخزن نگهداری نمی‌باشد. به‌همین دلیل به منظور کنترل دمای مناسب در تمام قسمت‌ها باید از دماسنج‌های بیشتری استفاده شود که این دماسنج‌ها نیز باید مشابه دماسنج اصلی بوده و در ظرف حاوی مایع مشابه قرار گیرد. بهتر است دماسنج‌ها در طبقهٔ بالا و طبقهٔ پایین یخچال قرا گیرند. برای یخچال‌ها و فریزرهای بزرگ ممکن است دماسنج‌های اضافی ضروری باشد.

دماهای ثبت شده برای تمامی وسایل نگهداری خون و فرآورده‌های خونی باید حداقل به مدت ۵ سال نگهداری شود.

بازرسی خون

خون قبل از انتقال از یک واحد به واحد دیگر و یا ارسال جهت تزریق به بیمار باید مورد بازرسی قرار گیرد، بازرسی ابتدا به منظور بررسی امکان وجود آلودگی باکتریایی صورت می‌گیرد که ممکن است باعث تغییر رنگ غیرطبیعی گلبول‌های قرمز و یا پلاسما شود. واحدهای خونی از نظر وجود همولیز، لخته‌های قابل رویت، تغییر رنگ پلاسما به ارغوانی، قهوه‌ای و یا قرمز، مورد بررسی قرار می‌گیرند. واحدهای خونی غیرطبیعی نباید ارسال شود و باید عامل ایجادکنندهٔ آن را شناسایی کرد. پلاسمای دارای رنگ سبز کم رنگ قابل استفاده است چون این تغییر رنگ به علت قرار گرفتن پیگمان‌های بیلی‌روبین در معرض نور می‌باشد.

همچنین قبل از ارسال پلاسما، کیسهٔ اصلی و کورد آن باید از نظر تغییر رنگ یا همولیز مورد بررسی چشمی و مقایسه قرار گیرد. برخی آلودگی‌های باکتریال ممکن است باعث همولیز گلبول‌های قرمز در کورد شود در حالی که کیسهٔ حاوی پلاسما ظاهری طبیعی داشته باشد. در عفونت با باکتری یرسینیا انتروکولیتیکا عکس این حالت اتفاق می‌افتد این باکتری در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند و با رشد آن فشار اکسیژن (PO_2) کاهش یافته و خون همولیز می‌شود در حالی که این حالت در کورد اتفاق نمی‌افتد و کشت مربوط به محتویات کورداستریل است در حالیکه در کشت مربوط به محتویات کیسه، یرسینیا رشد می‌کند. در این حالت تغییر رنگ در کیسهٔ خون مشاهده می‌شود در حالیکه در کورد مشاهده نمی‌شود. تمامی مشاهدات از کیسه و کورد باید ثبت شود.

شرایط نگهداری پلاکت پس از تهیه آن

پلاکت‌ها نسبت به تغییرات دما بسیار حساسند پس باید همیشه مانند خون کنترل شوند. بسیاری از مراکز پلاکت‌ها را در محیط مخصوصی که برای حفظ دمای ۲۰ تا ٢٤ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شده نگهداری می‌کنند. این محیط‌ها دارای سیستم‌های هشدار دهنده و کنترل کننده می‌باشند. چنانچه از محیط‌های مخصوص استفاده نشود دمای اطراف محل نگهداری پلاکت باید کنترل شود تا اطمینان یابیم که در محدودهٔ قابل قبول می‌باشد. در طول نگهداری پلاکت‌ها را روی روتاتورهای تخت، بیضی یا چرخشی قرار می‌دهند.

حمل پلاکت‌ها به مراکز درمانی

هنگام حمل پلاکت‌ها باید از مخزن‌های دارای جداره‌ای با عایق خوب و بدون یخ استفاده کرد که بتواند دمای بین ۲۰ تا ٢٤ درجه سانتی‌گراد را حفظ کند.

اطمینان از قابلیت زیست پلاکت‌ها

قابلیت زیست پلاکت‌ها به ۵ عامل بستگی دارد:

۱- ابعاد مخزن نگهدارنده

۲- مهارت‌ها و روش‌های آزمایشگاهی تهیهٔ فرآورده

۳- دمای نگهداری

٤- محیط نگهداری که شامل حجم پلاسما می‌باشد

۵- قابلیت نفوذپذیری کیسهٔ پلاستیکی نگهداری پلاکت که یک فاکتور مهم می‌باشد

روش‌های متداول نگهداری پلاکت این امکان را به ما می‌دهد که پلاکت‌ها را در مقادیر مختلف پلاسما به مدت ۳ تا ۵ روز بسته به نوع کیسه در دمای اطاق (۲۰ تا ٢٤ درجه سانتی‌گراد) نگهداری کنیم لازم به ذکر است که تاریخ انقضای پلاکت کنسانتره توسط سازمان انتقال خون با توجه به زمان تولید و نوع کیسه بر روی کیسه قید می‌گردد. امروزه استفاده از ظروف نگهداری پلاکتی متداول شده که متابولیسم پلاکت‌ها را تسهیل کرده و اجازه می‌دهد میزان زیادی O_2 و CO_2 که نقش عمده‌ای در حیات پلاکت‌ها در خارج از بدن دارند از جدار کیسه تبادل شود.

هر کیسهٔ نگهداری باید به فرآورده اجازه دهد که با توجه به نیمه عمر فرآورده حداکثر فعالیت متابولیک خود را داشته باشد. کیسه‌ها باید تبادل گاز را میسر کنند. با این حال بعضی مواد به‌کار رفته در این کیسه‌ها برای بیمار مضر بوده و برخی از آنها برای محیط زیست نیز مضرند.

شرایط نگهداری گرانولوسیت پس از تهیه آن

گلبول‌های سفید نیز به دمای یخچال حساس بوده و باید در دمای اطاق نگهداری شوند. گلبول‌های سفید به روش آفرزیس تهیه می‌شوند و پس از تهیه باید به سرعت و در مدت کمتر از ٢٤ ساعت مصرف شوند.

فرآورده‌های پلاسمایی منجمد

FFP و کرایوپرسی‌پیتیت را می‌توان به مدت یکسال پس از خونگیری در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. وقتی FFP یا کرایو ذوب می‌شود باید در دمای ۱ تا ٦ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شود. اگر فرآورده‌ها برای تهیهٔ فاکتورهای انعقادی پایدار به کار می‌روند. باید طی ٢٤ ساعت پس از ذوب شدن تزریق شوند. FFP که طی ٢٤ ساعت پس از ذوب شدن مورد استفاده قرار نگیرد بعنوان پلاسمای فاقد کرایو (CPP: Crayo Poor Plasma) به‌کار می‌رود.

حمل فرآورده‌های منجمد به مراکز درمانی

FFP و کرایوپرسی‌پیتیت را باید در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد یا پایین تر حمل کرد. برای حفظ حالت انجماد باید یخ خشک به‌کار برد. یخ خشک را باید در ته مخزن (دارای جدارهٔ با عایق خوب)، بین فرآورده‌ها و همچنین در بالای مخزن قرار داد. از آنجایی که فرآورده‌های منجمد شکننده هستند به هنگام حمل باید مراقب شکستن جدار فرآورده باشیم. استفاده از مواد بسته‌بندی خشک یا کیسه‌های پلاستیکی حاوی هوا برای این منظور مفید است، ولی نباید مانع از عمل سرد کردن توسط یخ خشک شوند.

بطور کلی، روش حمل و نقل و کنترل دما باید توسط سازمان انتقال خون تعیین شود. روش‌های حمل و نقل ممکن است با فصل، تغییرات آب و هوایی و مسافت حمل و نقل تغییر کند. سازمان انتقال خون باید با همکاری مراکز مصرف کنندهٔ خون، کیفیت خوب فرآورده‌های خود را تا رسیدن و مصرف در مراکز مربوطه کنترل کند. حمل و نقل مناسب همهٔ فرآورده‌ها این تضمین را ایجاد می‌کند که فرآورده حداکثر قدرت حیات خود را حفظ کرده و پاسخ مثبت مورد انتظار را در بیماری که این فرآورده را دریافت می‌کند ایجاد می‌نماید.

دور ریختن فرآورده‌های تأیید نشده

در روش‌های دور ریختن فرآورده‌های تأیید نشده باید تضمین شود که گزارش مناسبی از دور ریختن نگهداری می‌گردد. این شامل این موارد است:

* شمارهٔ اهدای خون
* هویت فرآورده
* دلیل دور ریختن
* تاریخ دور ریختن
* هویت فردی که فرآورده را دور می‌ریزد

لازم است مطمئن شویم که کلیهٔ فرآورده‌ها و نمونه‌هایی که از خون‌های اهدایی خطرناک تهیه شده‌اند بصورت سالم دور ریخته می‌شوند.

منابع

1) Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom 5th Edition 2001. Printed the UK for the stationary office

2) Harmening, Denise M.; Modern Blood Banking and Transfusion Practices; F.A. Davis Company; 4th ed, 1999.

3) Rudmann, Sally V.; Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine, W.B.Saunders 1995. Printed in U.S.A

4) Walker, Richard H.; Technical Manual. of the American Association of Blood Banks; AABB; 13th ed, 1999.