الزامات آزمون کومبز

● **دکتر کامران عطاردی**
دکترای هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، استادیار موسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون
k.atarodi@ibto.ir

❑ چکیده

بسیاری از پیشرفت‌های اخیر در طب انتقال خون مدرن، مرهون ابداع آزمون آنتی گلوبولین یا آزمون کومبز است. بی شک بدون این ابداع، آسیب شناسی بسیاری از کم خونی‌های همولیتیک همچنان ناشناخته باقی می‌ماند و همچنان شاهد رخدادهای همولیتیک تزریق خون دست کم از نوع دیررس می‌بودیم. علیرغم به کارگیری مواد تقویت کننده واکنش‌های هماگلوتیناسیون نظیر پلی اتیلن گلیکول، سرم فیزیولوژی با قدرت یونی کم، آلبومین و انواع آنزیم‌ها، بسیاری از آنتی بادی‌های از نوع IgG قادر به ایجاد هماگلوتیناسیون نیستند. معرف آنتی گلوبولین با ایجاد پل بین گلبول‌های قرمز از پیش حساس شده با آنتی بادی یا کمپلمان، تشخیص هماگلوتیناسیون را میسر می‌سازد. در این نوشتار الزامات نحوه انجام آزمون کومبز، کنترل کیفی و معتبر ساختن نتایج آن به اختصار مورد بررسی قرار گرفته است.

کلمات کلیدی: طب انتقال خون، آزمون آنتی گلوبولین، کم خونی همولیتیک، عارضه دیررس همولیتیک تزریق‌خون

❑ آزمون آنتی گلوبولین

آزمون آنتی گلوبولین یا کومبز مبتنی بر القاء تولید آنتی‌بادی بر علیه پروتئین‌های بیگانه در حیوانات آزمایشگاهی است. این آنتی بادی‌ها (آنتی گلوبولین) با آنتی ژن‌ها (نظیر ایمونوگلوبولین یا اجزاء کمپلمان) به صورت سرمی یا متصل به غشاء گلبول‌های قرمز واکنش می‌دهند. این حقیقت در آغاز سال ۱۹۰۸ به وسیله Moreschi از طریق آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز خرگوش کت شده با ایمونوگلوبولین بز به وسیله Anti goat-globulin توصیف شد. کشف Moreschi مورد بی مهری قرار گرفت تا این که چندین سال بعد گروه دیگری از محققان همین روش را ابداع کردند. Coombs، Mourant و Race در سال ۱۹۴۵ روشی را توصیف کردند که به واسطه آن آنتی بادی‌های ناقص Rh که قادر به ایجاد آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز واجد آنتی ژن Rh نبودند، مورد شناسایی قرار گرفتند. این روش که به آزمون آنتی هیومن گلوبولین یا تست کومبز مشهور شد به زودی به عنوان یک آزمون اصلی و کاربردی در ایمونوهماتولوژی جای خود را باز کرد. امروزه از این روش در تشخیص کم خونی همولیتیک اتوایمیون، کم خونی همولیتیک القاء شده به وسیله دارو، بیماری همولیتیک نوزادان، واکنش‌های همولیتیک تزریق خون، تشخیص و تعیین هویت آنتی بادی‌های ناخواسته، آزمون‌های سازگاری، تعیین فنوتیپ های فرعی گروه‌های خونی و تیتراسیون آنتی بادی استفاده می‌شود. آزمون آنتی گلوبولین به دو صورت مستقیم یا غیر مستقیم انجام می‌پذیرد. برای ردیابی آنتی بادی‌ها یا اجزاء کمپلمان متصل شده به گلبول‌های قرمز در شرایط in-vivo از آزمون مستقیم و برای ردیابی اتصال آنتی بادی یا اجزاء کمپلمان به گلبول‌های قرمز در شرایط in-vitro از آزمون

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

غیر مستقیم آنتی گلوبولین استفاده می‌شود.

❑ معرف‌های آنتی گلوبولین

معرف‌هـــای آنتی‌گلوبولیـــن متفاوتی در دســـترس بوده و هر آزمایشـــگاه یا ســـرویس بانک خون با توجه به هدف خـــود در ردیابی اتصال آنتی بـــادی یا اجزاء کمپلمان یا هر دو بـــه گلبول‌های قرمز از این معرف‌ها اســـتفاده می‌کنند. معرف‌های چند قطبی (poly specific) با دارا بودن آنتی بادی‌های پلی کلنال خرگوشـــی برعلیه IgG انسانی و آنتی بادی‌های منوکلنال موشـــی برعلیه اجـــزاء C3b و C3d، عمدتاً در آزمون مســـتقیم آنتی گلوبولین به منظور ارزیابی حساس شـــدن گلبول‌های قرمز در شرایط in-vivo مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما سرویس‌های بانک خون به دلیل احتراز از نتایج مثبت کاذب به واسطه فعال شدن کمپلمان با آلوآنتی‌بادی‌هـــا یـــا اتوآگلوتینیـــن هـــای واکنـــش گر در ســـرما، بیشـــتر تمایل به اســـتفاده از معرف‌هـــای قطبی (mono specific) با ویژگی واکنش علیه IgG دارند.

❑ الزامات نحوه انجام آزمون آنتی گلوبولین

فـــارغ از نحوه انجام آزمون کومبز به روش مســـتقیم یا غیر مستقیم و اســـتفاده از معرف‌های چند قطبی و قطبی، عواملی منجر به بروز نتایج مثبت و منفی کاذب در ارزیابی آزمون می‌شوند. با رعایت نکات ذیل می‌توان به نتایجی قابل اتکا برای تفسیر بالینی وضعیت بیمار دست یافت.

- قدرت آگلوتیناســـیون گلبول‌های قرمز پوشیده شده با IgG کم اســـت لذا پس از ســـانتریفیوژ، نتیجه را در اسرع وقت مورد ارزیابی قرار دهید.

- وجـــود ذرات گـــرد و غبار در لوله آزمایـــش و فیبرین یا رســـوب‌های ســـرمی در نمونه منجر به مجتمع شـــدن گلبول‌های قرمز و حصول نتیجه مثبت کاذب خواهد شـــد. از طرفـــی گرمای زیاد (حین یخ گشـــایی نمونه‌ها) یا فریز کردن و یخ گشـــایی مکرر نمونه بـــا کاهش واکنش پذیری ســـرم ها منجر به بروز نتایج منفی کاذب می‌شود. همچنین با افت قدرت آنتی ژنی معرف‌های گلبول قرمز در طول زمان نگهداری احتمال حصول نتایج منفی کاذب افزایش می‌یابد.

- هرگز معرف آنتـــی گلوبولین را فریـــز نکنید و مراقب آلودگی میکروبی آن باشـــید چرا که معرف آنتی گلوبولین قـــدرت واکنش خـــود را متعاقب فریز شـــدن یـــا آلودگی باکتریایی از دســـت می‌دهد. اســـتفاده از قطره چکان‌های آلوده یا قطره چکان‌های ســـایر معرف‌هـــا منجر به آلودگی معرف آنتی‌گلوبولین به ســـایر پروتئین‌ها می‌شود. هرگز سر لوله‌های آزمایش را با انگشـــت یا دســـت لمس ننمایید. در تمامی موارد فوق شـــاهد حصول نتایج منفی کاذب خواهیم بود.

- ســـانتریفیوژ بیش از حد متعارف از یک ســـو با تجمع گلبول‌های قرمز به طوری که به راحتی از لوله جدا نمی‌شوند، ظاهری شـــبیه نتیجه آزمون مثبت را از خود بروز می‌دهند و از ســـوی دیگر در پاره‌ای موارد جدا سازی آن‌ها از ته لوله با تکان‌های شـــدید منجر به باز شدن آگلوتیناسیون واقعی می‌شود. ســـانتریفیوژ کمتر از حد متعارف هم ممکن است برای ایجاد آگلوتیناسیون کافی نباشد. پس به منظور احتراز از حصـــول نتایج منفی و مثبت کاذب به‌علت ســـانتریفیوژ نامناسب، پیوسته از سانتریفیوژ کالیبر شده استفاده نمایید و در خصوص میزان دور و زمان سانتریفیوژ از دستورالعمل سازنده معرف آنتی گلوبولین تبعیت نمایید.

- قطعاً ســـلول‌های واجد نتیجه مثبت در آزمون مستقیم کومبز تا زمان جداســـازی عوامل ایجاد کننده آن از سطح گلبول‌های قرمز مورد آزمایش واجد نتیجه مثبت غیر قابل تفســـیر در آزمون غیر مســـتقیم کومبز خواهند بود. ناگفته پیداســـت عدم اضافه نمودن ســـرم یا معرف آنتی گلوبولین منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب خواهد شد.

- غلظت زیاد گلبول‌های قرمز، تشـــکیل آگلوتیناســـیون ضعیف را به تأخیر می‌اندازد. از طرفی رویت آگلوتیناسیون در سوسپانسیون‌های واجد غلظت کم گلبول قرمز با مشکل مواجه می‌شـــود لذا پیوســـته از گلبول‌هـــای قرمز ۵٪-۳٪ استفاده نمایید.

- بـــه منظـــور اجتنـــاب از پدیده‌هـــای pre zone و post zone پیوسته نسبت مناســـب سلول به سرم یعنی یک قطره گلبول قرمز ۵٪-۳٪ در مقابل دو قطره ســـرم یا پلاسما را رعایت نمایید.

- pH پایین ســـرم فیزیولوژی باعث کاهش حساســـیت آزمون کومبز می‌شود. از سرم فیزیولوژی با pH در محدوده

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

۷-۷/۲ به عنوان محلول شستشو استفاده نمایید.

- اجزاء کمپلمان غالباً در ۴ درجه سانتی گراد از سرم به گلبول قرمز متصل می‌شود، لذا در آزمون غیر مستقیم کومبز استفاده از نمونه EDTA به جای نمونه لخته ارجح است (به یاد داشته باشید اندکی از آنتی بادی‌ها نظیر nti-Jk^a و anti-Jk^b در صورت استفاده از سرم و معرف آنتی گلوبولین چند قطبی قابل شناسایی هستند). همچنین از آنجا که در لوله‌های حاوی ژل سیلیکون، اتصال اجزاء کمپلمان به گلبول‌های قرمز تسهیل می‌شود، جهت اجتناب از بروز نتیجه مثبت کاذب استفاده از لوله‌های فاقد ژل، جهت تهیه سرم مناسب برای آزمون کومبز تاکید می‌گردد.

- در پاره‌ای از موارد جدا شدن IgG از سطح گلبول قرمز منجر به کاهش تعداد IgG در سطح سلول و عدم توفیق ردیابی آن‌ها با معرف آنتی گلوبولین می‌شود. همچنین IgG های رها شده قادر به خنثی کردن معرف آنتی‌گلوبولین نیز هستند.

- اما عمده‌ترین علت ایجاد نتیجه منفی کاذب در آزمون آنتی گلوبولین خنثی شدن معرف به دلیل شستشوی ناکافی سلول‌ها و باقی ماندن بخشی هر چند اندک از سرم یا پلاسما در لوله آزمایش است، لذا به منظور تخلیه کامل سرم یا پلاسما، لوله‌ها را حداقل سه نوبت به طوری که در هر نوبت حداقل ۳/۴ لوله پر شود با سرم فیزیولوژی شستشو دهید و در نهایت با سر و ته کردن لوله آزمایش تمامی مایعات باقیمانده را از لوله آزمایش خارج نمایید. در مواردی که حجم سرم را در لوله آزمایش افزایش می‌دهید، شستشوی معمول قادر به پاکسازی حجم افزون سرم نخواهد بود. در چنین مواردی دفعات شستشو را افزایش دهید.

❑ کنترل کیفی و معتبر ساختن نتایج

با توجه به موارد مورد اشاره روایی نتایج منفی آزمون کومبز باید با استفاده از سلول‌های کنترل کومبز مورد تأیید قرار گیرند. سلول‌های کنترل کومبز، گلبول‌های قرمز پوشیده شده با IgG و گلبول‌های قرمز پوشیده شده با اجزاء کمپلمان هستند به شکلی که فقط در حضور معرف‌های آنتی گلوبولین قادر به ایجاد آگلوتیناسیون هستند. گزارش نتیجه آزمون کومبز منفی، پس از افزودن سلول‌های کنترل کومبز و قرائت آگلوتیناسیون برابر یا بیش از +۲ مجاز است.

References

1- Harvey G.Klein, David J.Anstee (2014). Molison's Blood Transfusion in Clinical Medicine, Chapter 8.

2- Mark K.Fung, Brenda J.Grossman, Christopher D.Hillyer & et al (2014). TECHNICAL MANUAL, Chapter 15.

3- Eva D.Quinley (2011). Immunohematology Principles and Practice, Chapter 6.

4- Sally V.Rudmann (2005) Textbook of Blood Banking and Transfusion Medicine, Chapter 1.

5- Richard A. McPherson, Matthew R. Pincus (2017). HENRY'S CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT BY LABORATORY METHODS, Chapter 35.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]