

الزامات آزمون کومبز

● دکتر کامران عطاردی

دکترای هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون، استادیار موسسه

عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون

k.katarodi@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 هم‌گلوبولین‌سیون نظیر پلی اتیلن گلیکول، سرم فیزیولوژی با قدرت یونی کم، آلبومین و انواع آنزیم‌ها، بسیاری از آنتی بادی‌های از نوع IgG قادر به ایجاد هم‌گلوبولین‌سیون نیستند. معرف آنتی گلوبولین با ایجاد پل بین گلبول‌های قرمز از پیش حساس شده با آنتی بادی یا کمپلمان، تشخیص هم‌گلوبولین‌سیون 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 تزریق خون

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 بی‌مهری 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 فنوتیپ‌های 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



غیر مستقیم آنتی گلوبولین استفاده می‌شود.

□ معرف‌های آنتی گلوبولین

معرف‌های آنتی گلوبولین متفاوتی در دسترس بوده و هر آزمایشگاه یا سرویس بانک خون با توجه به هدف خود در ردیابی اتصال آنتی بادی یا اجزاء کمپلمان یا هر دو به گلبول‌های قرمز از این معرف‌ها استفاده می‌کنند. معرف‌های چند قطبی (poly specific) با دارا بودن آنتی بادی‌های پلی کلنال خرگوشی بر علیه IgG انسانی و آنتی بادی‌های منوکلنال موشی بر علیه اجزاء C3b و C3d، عمدتاً در آزمون مستقیم آنتی گلوبولین به منظور ارزیابی حساس شدن 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 آلوآنتی‌بادی‌ها یا اتوآگلوتینین‌های واکنش‌گر در سرما، بیشتر تمایل به استفاده از معرف‌های قطبی (mono specific) با ویژگی واکنش علیه IgG دارند.

□ الزامات نحوه انجام آزمون آنتی گلوبولین

فارغ از نحوه انجام آزمون کومبز به روش مستقیم یا غیر مستقیم و استفاده 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 آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز پوشیده شده با IgG کم است لذا پس از سانتریفیوژ، نتیجه را در اسرع وقت مورد ارزیابی قرار دهید.

- وجود ذرات گرد و غبار در لوله آزمایش و فیبرین یا رسوب‌های سرمی در نمونه منجر به مجتمع شدن گلبول‌های قرمز و حصول نتیجه مثبت کاذب خواهد شد. از طرفی گرمای زیاد (حین یخ‌گشایی نمونه‌ها) یا فریز کردن و یخ‌گشایی مکرر نمونه با کاهش واکنش پذیری سرم‌ها 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 آنتی گلوبولین را فریز نکنید و مراقب

آلودگی میکروبی آن باشید چرا که معرف آنتی گلوبولین قدرت واکنش خود را متعاقب فریز شدن یا آلودگی باکتریایی از دست می‌دهد. استفاده از قطره چکان‌های آلوده یا قطره چکان‌های سایر معرف‌ها منجر به آلودگی معرف آنتی گلوبولین به سایر پروتئین‌ها می‌شود. هرگز سر لوله‌های آزمایش را با انگشت یا دست لمس ننمایید. در تمامی موارد فوق شاهد حصول نتایج منفی کاذب خواهیم بود.

- سانتریفیوژ بیش از حد متعارف از یک سو با تجمع گلبول‌های قرمز به طوری که به راحتی از لوله جدا نمی‌شوند، ظاهری شبیه نتیجه آزمون مثبت را از خود بروز می‌دهند و از سوی دیگر در پاره‌ای موارد جدا سازی آن‌ها از ته لوله با تکان‌های شدید منجر به باز شدن آگلوتیناسیون واقعی می‌شود. سانتریفیوژ کمتر از حد متعارف هم ممکن است برای ایجاد آگلوتیناسیون کافی نباشد. پس به منظور احتراز از حصول نتایج منفی و مثبت کاذب به علت سانتریفیوژ 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 سلول‌های واجد نتیجه مثبت در آزمون مستقیم کومبز تا زمان جداسازی عوامل ایجاد کننده آن از سطح گلبول‌های قرمز مورد آزمایش واجد نتیجه مثبت غیر قابل تفسیر در آزمون غیر مستقیم کومبز خواهند بود. ناگفته پیداست عدم اضافه نمودن سرم یا معرف آنتی گلوبولین منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب خواهد شد.

- غلظت زیاد گلبول‌های قرمز، تشکیل آگلوتیناسیون ضعیف را به تأخیر می‌اندازد. از طرفی رویت آگلوتیناسیون در سوسپانسیون‌های واجد غلظت کم گلبول قرمز با مشکل مواجه می‌شود لذا پیوسته از گلبول‌های قرمز ۰.۵-۰.۳٪ استفاده نمایید.

- به منظور اجتناب از پدیده‌های pre zone و post zone پیوسته نسبت مناسب سلول به سرم یعنی یک قطره گلبول قرمز ۰.۵-۰.۳٪ در مقابل دو قطره سرم یا پلاسما را رعایت نمایید.

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

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.

۷-۷/۲ به عنوان محلول شستشو استفاده نمایید.
- اجزاء کمپلمان غالباً در ۴ درجه سانتی‌گراد 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 آنتی‌بادی‌ها نظیر anti-Jk^b و nti-Jk^a 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 تأکید 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 آنتی گلوبولین 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

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). *Immunoematology 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.