دکتر گل‌افشان

آزمایش‌های کومبز مستقیم و غیرمستقیم

در سال 1945 کومبز، مورانت و رایس آزمایشی را شرح دادند که توانایی شناسایی آنتی‌بادی‌های غیر آگلوتینه کننده در سرم و بر سطح گلبول‌های قرمز را داشت و به نام آزمایش کومبز متداول گردید.

آزمایش کومبز مستقیم حساس شدن یا آغشته شدن گلبول‌های قرمز با ایمونوگلوبولین و یا اجزای کمپلمان و یا هر دو را در گردش خون نشان می‌دهد.

برای شناسایی گلبول‌های قرمز آلوده به IgG و اجزای کمپلمان به ویژه C_3d احتیاج به آنتی هیومن گلوبولین (AHG) با ویژگی آنتی IgG و آنتی C_3d است که به آن آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف یا پلی اسپسفیک گویند.

گفتنی است که در غالب موارد جزء C_3d تنها ردپای کمپلمان روی گلبول قرمز است و از اینرو ویژگی آنتی C_3d در آنتی هیومن گلوبولین برای آزمایش کومبز مستقیم ضروری است. مثبت شدن کومبز مستقیم در صورتی به مفهوم همولیز و کم‌خونی همولیتیک است که با کاهش هموگلوبین، افزایش رتیکولوسیت، گلبول‌های پلی کروماژی در خون محیطی، کاهش هاپتوگلوبین و افزایش بیلی‌روبین همراه باشد و همیشه مثبت شدن آزمون کومبز مستقیم بیانگر همولیز نیست.

کاربردهای آزمایش کومبز مستقیم

کومبز مستقیم حساس شدن گلبول‌های قرمز در گردش خون توسط IgG یا اجزای کمپلمان را ارزیابی می‌کند. گلبول‌های آغشته شده با معرف آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف که دارای ویژگی آنتی IgG و آنتی C_3d است واکنش آگلوتیناسیون می‌دهند. آنتی IgG بین قسمت‌های FC مولکول‌های IgG بر سطح گلبول‌های

قرمز پل زده و آنها را آگلوتینه می‌کند. برخی از کاربردهای آزمایش کومبز مستقیم عبارتند از:

- تشخیص کم‌خونی‌های آتوایمون
- بررسی فوری واکنش همولیتیک ناشی از تزریق خون ناسازگار
- تشخیص کم‌خونی همولیتیک جنین- نوزادی ناشی از عبور آنتی‌کر از جفت
- بررسی همولیز ناشی از دارو

انواع معرف‌های آنتی هیومن گلوبولین (AHG)

الف- آنتی هیومن گلوبولین چند اختصاصی یا پلی اسپسفیک (Polyspecific)

1 -آنتی هیومن گلوبولین پلی کلونال تهیه شده از خرگوش (Rabbitpolyclonal) با خواص آنتی IgG و آنتی C_3d

2 -آنتی هیومن گلوبولین با مخلوط آنتی IgG پلی کلونال از خرگوش و آنتی C_3d/C_3b منوکلونال از موش (Murine/Rabbit blend)

3 -آنتی هیومن گلوبولین با مخلوط آنتی IgG منوکلونال و آنتی C_3d/C_3b منوکلونال

ب-آنتی هیومن گلوبولین تک اختصاصی یا منواسپسفیک (Monospecific)

1- آنتی هیومن گلوبولین با ویژگی آنتی IgG پلی کلونال از خرگوش بدون خاصیت ضد کمپلمان

2- آنتی هیومن گلوبولین با ویژگی علیه قسمت FC مولکول IgG

3- آنتی هیومن گلوبولین با ویژگی آنتی IgG منوکلونال از موش

4- آنتی هیومن گلوبولین با ویژگی آنتی C_3b/C_3d پلی کلونال از خرگوش

5- آنتی هیومن گلوبولین با ویژگی آنتی C_3d منوکلونال از موش

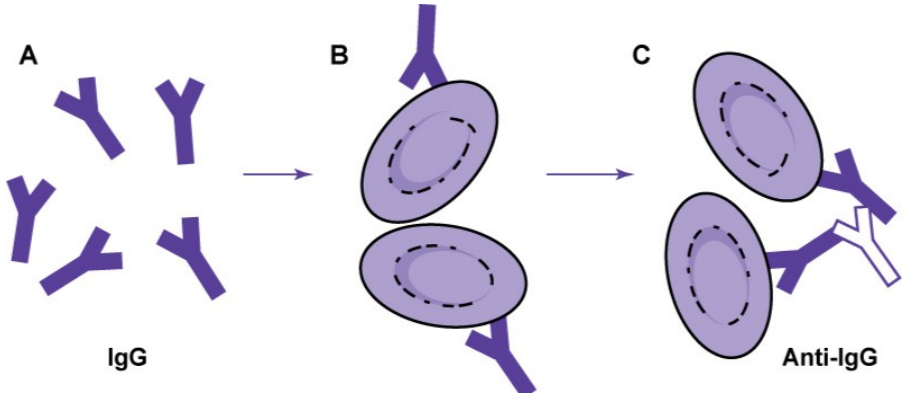
برای تهیه آنتی هیومن گلوبولین پلی کلونال از تحریک ایمنی خرگوش با تزریق ایمونوگلوبولین و اجزای کمپلمان استفاده می‌شود. این‌گونه از معرف‌های آنتی هیومن علاوه بر ویژگی آنتی IgG و آنتی C_3d ممکن است با زنجیره سبک لاندا یا کاپا از مولکول‌های IgM و یا IgA واکنش دهند و علاوه بر این ممکن است دارای خواص آنتی C_3b، آنتی C_4b، آنتی C_4d هم باشند.

پلی کلونال به مفهوم آن است که سلول‌های گوناگون لنفوسیت B خرگوش علیه اپی‌توپ‌های مختلف آنتی‌ژن تحریک شده و آنتی‌بادی می‌سازند.

برخی از سازندگان برای تولید AHG از مخلوط پلی کلونال آنتی IgG از خرگوش و آنتی C_3d منوکلونال استفاده می‌کنند. آنتی‌بادی‌های پلی کلونال از تحریک ایمنی حیوانات آزمایشگاهی مانند خرگوش بدست می‌آید و ممکن است دارای ناخالصی باشد ولی انواع منوکلونال خالص و آلودگی ندارند.

آنتی‌بادی‌های پلی کلونال با ویژگی آنتی C_3d ممکن است با اپی‌توپ‌های C_3b نیز واکنش دهند، در حالی که آنتی C_3d منوکلونال واکنش منفی یا ضعیفی با C_3b دارد.

بنا به سفارش FDA هر گونه آنتی C_3d که با C_3b نیز واکنش دهند تحت عنوان آنتی C_3d/C_3b نامگذاری می‌گردد.



کومبز مستقیم حساس شدن گلبول‌های قرمز در گردش خون توسط IgG یا اجزای کمپلمان را ارزیابی می‌کند. گلبول‌های آغشته شده با معرف آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف که دارای ویژگی آنتی IgG و آنتی C_3d است واکنش آگلوتیناسیون می‌دهند.

معرفی آنتی هیومن گلوبولین (AHG)

آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف یا پلی اسپسفیک (Polyspecific) دارای ویژگی آنتی IgG و آنتی C_3d/C_3b می‌باشد، بدین مفهوم که با گلبول‌های آغشته شده به IgG یا C_3d واکنش داده و موجب آگلوتیناسیون آنها در آزمایش کومبز مستقیم می‌گردد.

ویژگی ضد IgG آنتی هیومن گلوبولین ممکن است علیه قسمت FC مولکول IgG بوده و یا اینکه با دامنه وسیع‌تر بتواند با زنجیره‌های سبک ایمونوگلوبولین‌های آغشته شده نیز واکنش دهد. این معرف با ویژگی ضد کمپلمان قادر به واکنش با اجزای C_3d و C_3b می‌باشد.

آنتی هیومن ایمونوگلوبولینی از جنس IgG و معرفی بسیار حساس و آسیب‌پذیر است. منجمد کردن آن موجب تخریب مولکول‌های آن توسط کریستال‌های یخ می‌شود و از اینرو نبایستی آنرا منجمد ساخت. دمای نگه‌داری آن 8-2 درجه سانتی‌گراد (میانگین 4 درجه) است.

آنتی هیومن گلوبولین با اندک تماس با مشتقات خون که دارای IgG یا کمپلمان باشند به سرعت خنثی و غیرفعال می‌گردد.

برای درک بهتر از آسیب‌پذیری آنتی هیومن گلوبولین به مثال زیر توجه فرمایید.

کمتر از 2 میکروگرم در سی‌سی از مولکول‌های IgG و کمپلمان آزاد می‌تواند یک قطره از آنتی هیومن گلوبولین خالص که به لوله آزمایش در تست کومبز افزوده می‌شود را خنثی سازد.

نمونه خونی که برای آزمایش کومبز مستقیم و یا سرمی که برای آزمایش کومبز غیرمستقیم استفاده می‌شود حدوداً دارای 1.5 گرم IgG در دسی‌لیتر است که برابر 1500 میلی‌گرم در دسی‌لیتر یا 15 میلی‌گرم در سی‌سی یا 15000 میکروگرم در

سی‌سی است. توجه داشته باشید که کمتر از 2 میکروگرم از آنتی‌بادی‌های آزاد توانایی خنثی کردن یک قطره از AHG خالص را دارد !!!

بنابراین قبل از افزودن آنتی هیومن گلوبولین به لوله آزمایش در تست‌های کومبز یا کراس‌مچ بایستی آنقدر شستشو انجام شده باشد که مقدار 15000 میکروگرم IgG و کمپلمان آزاد که در خون یا سرم اولیه موجود بوده به کمتر از 2 میکروگرم رسیده باشد تا خنثی‌سازی AHG صورت نگیرد و این معرف توانایی واکنش با گلبول‌های قرمز آغشته به آنتی‌بادی و یا کمپلمان را داشته باشد.

حال چگونه می‌توان مطمئن شد که شستشوی کافی قبل از اضافه کردن AHG انجام شده است؟ از کجا اطمینان است که AHG با سرم آلوده نشده و هنوز فعال است؟

و از این روست که برای آزمایش کومبز مستقیم نخست یک سوسپانسیون اولیه از گلبول‌های قرمز تهیه می‌شود و دو تا سه قطره از سوسپانسیون 3 الی 4 بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده می‌شود. در هر بار شستن بایستی حداقل $\frac{3}{4}$ لوله آزمایش از سرم فیزیولوژی پر گردد و هر بار به طور کامل از آن خالی شود. در هر بار که سرم فیزیولوژی برای شستن اضافه می‌گردد بایستی ضربه اضافه کردن، گلبول‌های ته‌نشین شده را کاملاً از هم جدا سازد و باز از این روست که هرگز نباید دست آغشته شده به سرم یا خون با قطره چکان AHG تماس یابد، چون تمام محتویات ویال آن خنثی می‌گردد. سفارش شده است که قطره چکان‌های معرف‌های گروه‌بندی خون در هنگام استفاده به صورت تک‌تک (جداگانه) خارج شوند، چون ممکن است برای مثال به طور اشتباهی قطره چکان آنتی D که سرشار از IgG است وارد ویال آنتی هیومن گردد و تمام خاصیت آنتی IgG آن را خنثی کند.

آزمایش کومبز مستقیم

اصول آزمایش: حساس شدن یا آغشته شدن گلبول‌های قرمز به IgG و اجزای کمپلمان (C_3d/C_3b) را مورد سنجش قرار می‌دهد.

مواد لازم:

- آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف با ویژگی آنتی IgG و آنتی C_3d
- چک سل یا کومبز کنترل یا سلول حساس شده
- سرم فیزیولوژی
- نمونه خون EDTA دار

برای انجام آزمایش نخست معرف‌ها را به حرارت اتاق (24-20 درجه) برسانید و به ترتیب زیر عمل کنید:

1 -از نمونه خون بیمار یک سوسپانسیون 5-2٪، در سرم فیزیولوژی تهیه کنید.

2 -دو تا سه قطره از سوسپانسیون را برداشته و 3 الی 4 بار با سرم فیزیولوژی شستشو دهید.

3 -در مرحله آخر شستشو بعد از دور ریختن کامل سرم فیزیولوژی با واژگون کردن لوله روی گاز آخرین قطرات سالین را جذب گاز کرده تا تکمه سلولی خشک در لوله باقی بماند.

4 -فوراً یکی دو قطره آنتی هیومن گلوبولین اضافه و بسرعت به مدت 30 ثانیه با دور 3000rpm سانتریفوژ کنید.

5 -لوله را از سانتریفوژ بیرون آورده و طوری تکان دهید که حرکت مایع رویی سلول‌ها را از ته لوله جدا کند.

6 -چنانچه واکنش آگلوتیناسیون مشاهده گشت درجه واکنش آزمایش مثبت کومبز را گزارش کنید.

7 -در صورت واکنش منفی لوله آزمایش را به مدت 5 الی 10 دقیقه در حرارت اتاق نگه دارید و سپس سانتریفوژ مجدد کرده برای آگلوتیناسیون بررسی کنید.

نکته مهم: مرحله7 جهت واکنش بهتر آنتی C_3d با C_3d می‌باشد ولی واکنش آنتی IgG با گلبول‌های آغشته به IgG احتیاج به سانتریفوژ فوری دارد و تأخیر در سانتریفوژ موجب ضعیف شدن واکنش می‌گردد، از اینرو نمی‌توان بعد از اضافه کردن AHG و انکوبه کردن 5 تا 10 دقیقه برای یک بار سانتریفوژ کرد بلکه آزمایش در دو مرحله جدا صورت می‌گیرد.
با مشاهده واکنش آگلوتیناسیون در مرحله دوم سانتریفوژ، آزمایش کومبز را مثبت گزارش کنید.

نکته مهم:
چنانچه واکنش در هر دو مرحله منفی شد بیانگر آزمایش منفی کومبز است و گزارش نتیجه منفی هنگامی اعتبار دارد که از فعال بودن آنتی هیومن گلوبولین مطمئن باشید.
برای این منظور چک سل یا کومبز کنترل که به IgG یا اجزای C_3b/C_3d آغشته شده به لوله آزمایش منفی اضافه می‌شود و مجدداً سانتریفوژ می‌گردد. اگر واکنش مثبت در این حالت مشاهده شود بیانگر آن است که AHG به کار رفته شده فعال بوده و نتیجه منفی کومبز مستقیم بیمار قابل اطمینان است، ولی چنانچه با اضافه کردن گلبول‌های کومبز کنترل به لوله آزمایش منفی همچنان واکنش منفی پابرجا باشد به مفهوم کاربرد AHG از قبل خنثی شده در آزمایش است و نتیجه منفی اعتباری ندارد.
حال چگونه چک سل یا کومبز کنترل (CC) تهیه می‌شود؟

تهیه چک سل یا گلبول‌های حساس شده با کومبز مثبت در آزمایشگاه
چک سل (Check cell) یا کومبز کنترل که با علامت اختصاری CC نمایش داده می‌شود، به عنوان معرف سلولی برای کنترل کردن آنتی هیومن گلوبولین به کار

می‌رود و در واقع گلبول‌های قرمزی هستند که در آزمایشگاه با مولکول‌های IgG یا اجزای کمپلمان حساس شده‌اند.
یک آزمایش کومبز هنگامی نتیجه منفی آن قابل اعتماد است که اگر چک سل به لوله آزمایشی که کومبز آن منفی شده است اضافه گردد بتواند با آنتی هیومن گلوبولین موجود در لوله بعد از سانتریفوژ کردن واکنش آگلوتیناسیون دهد. واکنش آگلوتیناسیون در این مرحله از کنترل بیانگر آن است که از آنتی هیومن گلوبولین فعال در آزمایش استفاده شده وجواب منفی کومبز قابل اعتماد است.

روش حساس کردن گلبول‌های قرمز به IgG با استفاده از آنتی D از جنس IgG

برای تهیه چک سل آغشته به IgG می‌توان گلبول‌های قرمز ارهاش مثبت را با آنتی D از نوع IgG خالص آغشته کرد. گلبول‌های چک سل بایستی با آنتی هیومن گلوبولین واکنش 2+ بدهند. اگر گلبول‌های قرمز در حد واکنش 4+ آغشته گردند ممکن است به طور خود به خود بعد از سانتری‌فوژ شدن آگلوتینه شوند و از سوی دیگر گلبول های آغشته 4+ به علت واکنش قوی، آنتی هیومن نیمه خنثی را نمی‌تواند تشخیص بدهد.
برای تهیه گلبول‌های حساس شده به IgG نخست سریال رقت 1:2، 1:4، 1:8، 1:16، 1:32، 1:6، 1:128 و ... از آنتی D (از نوعIgG) در سرم فیزیولوژی تهیه کنید.
به هر لوله به اندازه نصف حجم سرم رقیق شده از گلبول‌های قرمز با گروه ارهاش مثبت اضافه کرده و به مدت 20 تا 30 دقیقه در حرارت 37 درجه انکوبه کنید. لوله‌ها را بعد ازمدت فوق از 37 درجه بیرون آورده و سانتریفوژ کرده و برای واکنش آگلوتیناسیون بررسی کنید. اولین لوله‌ای که واکنش آگلوتیناسیون نداده و لوله بعد از آن را برداشته و سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و بعد از خالی کردن کامل

سرم فیزیولوژی به آن AHG افزوده و با سانتریفوژ کردن درجه واکنش را یادداشت کنید.
برای مثال اگر لوله 1:32و 1:64 دو لوله‌ای باشد که با آنتی D واکنش آگلوتینه نداده‌اند به مفهوم آن است که واکنش آغشتگی (coating) داده‌اند.
اگر برای مثال مشخص شد که رقت 1:64 از آنتی D گلبول‌های قرمز ارهاش مثبت را 2+ آغشته می‌کند از اینرو شما می‌توانید برای تهیه چک سل در هر حجمی که مایل باشید رقت 1:64 از آنتی D مورد استفاده تهیه کرده و به نصف حجم آن از سوسپانسیون گلبول‌های قرمز ارهاش مثبت اضافه کرده و بعد از انکوبه نیم ساعته در 37 درجه سه بار آن را شسته و به صورت سوسپانسیون 5٪ در آورده و به عنوان چک سل از آن استفاده کنید. چک سل را برای چند روز تا زمانی که با AHG واکنش می‌دهد می‌توان در یخچال 4 درجه نگهداری کرد.

تهیه چک سل با استفاده از آمپول روگام

روگام حاوی آنتی D از جنس IgG است و هر ویال آن دارای 300 میکروگرم یا 1500 واحد بین المللی (IU) آنتی D می‌باشد.
برای تهیه چک سل چنانچه آنتی D گروه‌بندی از جنس IgG خالص در اختیار ندارید از آمپول روگام استفاده کنید. یک سریال رقت 1:2، 1:4، 1:8، 1:16، 1:32 و ... از روگام تهیه کرده و به هر لوله نصف حجم روگام رقیق شده از سوسپانسیون 5٪ گلبول‌های قرمز ارهاش مثبت اضافه کنید و لوله‌ها را بمدت 30 دقیقه در حرارت 37 درجه انکوبه کنید. با سانتریفوژ کردن لوله‌ها واکنش آگلوتیناسیون را بررسی کرده و اولین لوله‌هایی که آگلوتینه نداده‌اند را سه بار شسته و با AHG مجاور کنید و عیار روگام را برای تهیه چک سل با درجه واکنش 2+ تعیین کنید.
برای مثال اگر لوله 1:4 اولین لوله‌ای باشد که آگلوتیناسیون نداده واکنش به صورت آغشتگی داده است. گلبول‌های قرمز این عیار را سه مرتبه شسته و با تهیه سوسپانسیون 5٪ به عنوان چک سل برای کنترل روزانه AHG استفاده کنید.

منابع خطا در آزمایش کومبز مستقیم

1 -نمونه خون EDTA دار برای آزمایش کومبز سفارش می‌شود. استفاده از گلبول‌های قرمز خون لخته شده که در یخچال یا دمای اتاق نگهداری شده است موجب دریافت مثبت کاذب به علت آغشتگی با اجزای کمپلمان می‌گردد.

نکته: آنتی‌کرهای سرد حتی با عیار نرمال در سرما با گلبول واکنش داده و کمپلمان را فعال می‌کنند، در حرارت بالاتر آنتی‌بادی از گلبول جدا شده و اجزای کمپلمان به ویژه C_4d روی گلبول باقی مانده و موجب واکنش با آنتی C_3d پلی کلونال در آزمایش کومبز می‌گردد. اگر آزمایش کومبز مستقیم یک نمونه لخته شده مثبت گردید احتیاج به تکرار آزمایش با نمونه EDTA دار است.

2 -وقفه در مراحل شستشو موجب جدا شدن آنتی‌بادی از سطح گلبول و دریافت جواب کاذب منفی می‌گردد.

3 -تأخیر در سانتریفوژ مرحله اول آزمایش (مرحله‌ای که AHG اضافه می‌شود) موجب جدا شدن آنتی‌بادی از سطح گلبول و واکنش ضعیف یا منفی با آنتی IgG می‌گردد. آنتی‌بادی‌های جدا شده از سطح سلول ممکن است موجب خنثی شدن AHG گردند.

4 -استفاده از سالین با PH کمتر از 6 برای شستشو موجب کاهش حساسیت آزمایش می‌گردد.

5 -نگه‌داری سالین در ظروف شیشه‌ای یا فلزی با رها شدن یون سیلیکا موجب پیوند غیر اختصاصی پروتئین‌ها به سطح گلبول و تجمع غیر اختصاصی آنها می‌شود.

6 -نگه‌داری نامناسب AHG از قبیل منجمد ساختن آن موجب غیر فعال شدن آن می‌گردد.

7 -از استفاده از لوله حاوی ژل جدا کننده سیلیکون در نمونه‌گیری خودداری شود زیرا احتمال مثبت کاذب دارد.

8 -نمونه‌گیری از مسیر تزریق گلوکز 5 یا 10٪ وریدی به ویژه وقتی که با سوزن پهن (اندازه 16) یا کمتر از 0.5 سی‌سی نمونه‌گیری شود موجب مثبت کاذب به علت جذب غیر اختصاصی کمپلمان در محیط با کاهش قدرت یونی روی گلبول‌ها می‌گردد.

9 -سانتریفوژ بیش از حد موجب مثبت کاذب و کاهش زمان یا نیروی سانتریفوژ (under centrifiugation) موجب دریافت جواب منفی کاذب کومبز می‌گردد.

10 -آزمایش کومبز مستقیم برای مثبت شدن احتیاج به آغشتگی هر گلبول با 200 الی 500 مولکول IgG و 400 الی 1100 مولکول C_3d دارد. آغشتگی کمتر موجب دریافت منفی کاذب در تست کومبز می‌گردد.

تفسیر کاربردهای آزمایش کومبز مستقیم

آزمایش کومبز مستقیم به شناسایی گلبول‌های آغشته به IgG و کمپلمان به‌ویژه C_3d می‌پردازد و مهم‌ترین کاربرد آن عبارتند از:

1 -تشخیص کم‌خونی همولیتیک آتوایمون گرم (WAIHA)

2 -تشخیص کم‌خونی همولیتیک آتوایمون سرد یا سندرم آگلوتینین‌های سرد (CHD)

3 -تشخیص کم‌خونی همولیتیک آتوایمون گرم و سرد (Mixed type)

4 -هموگلوبین اوری حمله‌ای سرمایی (PCH)

5 -کم‌خونی همولیتیک ناشی از مصرف دارو (Drug induced)

6 -کم‌خونی همولیتیک جنین- نوزادی (HDFN)

7 -تشخیص واکنش همولیتیک ناشی از تزریق خون فوری و تأخیری

گلبول‌های قرمز نرمال ممکن است با 5 تا 90 مولکول IgG و 5 تا 40 مولکول C_3d به‌طور طبیعی آغشتگی داشته باشند. آزمایش کومبز مستقیم هنگامی مثبت می‌شود که حداقل درجه آلودگی هر گلبول قرمز با 200 الی 500 مولکول IgG یا 400 الی 1100 مولکول C_3d باشد.

شایع‌ترین کم‌خونی آتوایمون با واسطه آتو آنتی‌بادی‌های گرم است که غالباً از نوع IgG و از زیر گروه IgG_1 و IgG_3 می‌باشند. گاهی همراه یا بدون همراهی با IgG ممکن است ایمونوگلوبولین‌های دیگری مانند IgM و IgA نیز مشاهده گردند. گلبول‌های قرمز در بیشتر موارد با IgG و C_3d پوشیده شده و گاهی ممکن است تنها با IgG یا C_3d آغشته شده باشند. تولید آتو آنتی‌بادی به‌صورت ناشناخته و یا ثانویه به بیماری‌های زمینه مانند سرطان غدد لنفاوی، اختلالات لنفوپرولیفراتیو، بیماری‌های کلاژن و اسکولار مانند لوپوس و مصرف داروها است.

اگر سرم بیماری علاوه بر آتو آنتی‌بادی دارای آلو آنتی‌بادی هم باشد، یافتن خون سازگار و کراس‌مچ مشکل است. خون تزریقی بایستی حتماً با آلو آنتی‌بادی سازگار باشد و مشکل کار در این است که آتو آنتی‌بادی با واکنشی که با همه گلبول‌ها می‌دهد وجود آلو آنتی‌بادی را پوشانده و تشخیص آن را مشکل می‌کند. ممکن است بتوان با شیوه جذب، آتو آنتی‌کرها را از سرم برداشت و سرمی تهی شده از آتو آنتی‌بادی برای کراس‌مچ و تشخیص آلو آنتی بادی‌ها آماده کرد.

آگلوتینین‌های سرد

حدود 16 تا 20٪ از کم‌خونی‌های همولیتیک در گروه آگلوتینین‌های سرد هستند. آتو آنتی‌بادی‌های سرد از جنس IgM هستند که در سرما یا مناطق سرد بدن با گلبول‌های قرمز واکنش داده و کمپلمان را فعال می‌کنند. آنتی‌کرهای سرد با ورود گلبول‌های قرمز آغشته به جریان گرم مرکزی بدن از سطح گلبول جدا شده و تنها کمپلمان باقی می‌ماند. جزء C_3b کمپلمان از مهم‌ترین اجزای کمپلمان است. این

جزء در اثر عملکرد فاکتورهای I و H به IC_3b و C_3dg تبدیل می‌گردد. جزء C_3dg تحت اثر پلاسمین یا تریپسین به C_3d تبدیل می‌شود. گفتنی است که تنها ردپای آگلوتینین‌های سرد آغشتگی گلبول‌های قرمز به C_3d است و از این‌رو آنتی‌هیومن گلوبولین گسترده طیف بایستی علاوه بر آنتی IgG دارای آنتی C_3d نیز باشد.

گلبول‌های آغشته به C_3b یا IC_3b طعمه ماکروفاژ و نوتروفیل می‌گردند و این به علت دارا بودن گیرنده کمپلمان در سطح نوتروفیل و ماکروفاژ است ولی گلبول‌های آلوده به C_3d در جریان خون باقی می‌مانند و این به سبب آن است که سلول‌های فاگوسیتوز کننده دارای گیرنده برای C_3d نمی‌باشند.

بیماری‌های آگلوتینین سرد به دو صورت حاد و مزمن دیده می‌شود. نوع حاد آن غالباً در سنین جوانی و ثانویه به اختلالات لنفوپرولیفراتیو و عفونت می‌باشد. عفونت با میکروب مایکوپلاسما منجر به تولید آتو آنتی I و عفونت با ویروس اپشتین بار (EBV) منجر به تولید آتو آنتی i می‌گردد.

آتو آنتی‌بادی‌های سردی که همولیز می‌دهند غالباً دارای طیف حرارتی گسترده بوده و با گلبول قرمز در $30 \geq$ درجه واکنش داده و دارای عیار $1000 \geq$ در 4 درجه می‌باشند. آنتی‌بادی‌های سرد پاتولوژیک بندرت در بالای 32 درجه واکنش می‌دهند ولی چنانچه آلبومین به لوله آزمایش اضافه شود طیف حرارتی واکنش تا 37 درجه نیز ممکن است ادامه یابد. گاهی آنتی‌بادی‌های سرد پاتولوژیک دارای عیار کمتر از 1000 بوده ولی دارای واکنش در طیف حرارتی بالا مانند 30 درجه و یا بالاتر هستند. زمانی که آتو آنتی‌بادی‌های گرم همراه با آتو آنتی‌بادی‌های سرد هستند، عیار آتو آنتی‌بادی سرد حتی کمتر از 64 بوده اما طیف حرارتی آن تا 37 درجه ادامه دارد.

آتو آنتی‌بادی‌های سرد در اختلالات لنفوپرولیفراتیو غالباً منوکلونال با زنجیره سبک کاپا و دارای عیار بسیار بالا می‌باشند. اکروسیانوز و پدیده ری‌ناد از علائم بالینی آتو

آنتی‌بادی‌های سرد است. آتو آنتی‌بادی‌های سرد در عفونت مایکوپلاسمایی یا عفونت‌های ویروسی پلی‌کلونال و دارای زنجیره‌های سبک کاپا و لاندا هستند.

مواردی که آزمایش کومبز ممکن است مثبت شود ولی فاقد ارزش بالینی است

1 -تزریق فراورده‌های غیر همگروه مانند پلاسما، پلاکت و کرایو به بیمار ممکن است موجب مثبت شدن کومبز مستقیم به علت آغشتگی گلبول‌های بیمار با آنتی‌بادی ناسازگار شود.

2 -تست کومبز مستقیم ممکن است در بیماران پیوندی به علت دریافت آنتی لنفوسیت یا آنتی تیموسیت گلوبولین (ALG, ATG) مثبت شود به‌ویژه هنگامی که از AHG پلی‌کلونال در آزمایش استفاده گردد.

3 -تزریق ایمونوگلوبولین‌های تزریق وریدی (IVIg) برای درمان ترومبوسیتوپنی ایمونولوژیک (TIP) یا بیماران با کاهش ایمنی یا بیماران مبتلا به کاواساکی و گیلن‌باره ممکن است با آغشته کردن گلبول‌ها موجب آزمایش مثبت کومبز گردد.

4 -تست کومبز مستقیم در بیماران مبتلا به ITP (ترومبوسیتوپنی ایمونولوژیک) با گروه ارهاش مثبت که برای درمان روگام (آنتی D) گرفته‌اند ممکن است مثبت گردد.

5 -تست کومبز مستقیم نوزادی که مادر ارهاش منفی بوده و در هفته 28 حاملگی روگام دریافت داشته است ممکن است مثبت گردد. روگام دارای خاصیت آنتی D و از جنس IgG است و با عبور از جفت موجب آغشتگی گلبول‌های ارهاش مثبت جنین- نوزاد می‌گردد.

6 -لنفوسیت مهاجر در پیوند بافت با ترشح آنتی‌کر موجب آغشتگی گلبول‌های قرمز بیمار و تست مثبت کومبز مستقیم می‌گردد. برای مثال پیوند کلیه گروه O به گروه A موجب آغشته شدن گلبول‌های بیمار با آنتی A

می‌گردد؛ زیرا لنفوسیت‌های اهدا کننده در بافت کلیه اهدایی به‌طور موقت برای چند هفته آنتی‌بادی‌های دهنده ترشح می‌کند.

لنفوسیت‌های موجود در بافت پیوند شده را لنفوسیت‌های مهاجر گویند. از این‌رو چنانچه این بیماران احتیاج به خون داشتند بایستی خون تزریقی با آنتی‌بادی‌های دهنده سازگار و همگروه با بیمار باشد.

7 -هیپرگاماگلوبولینمی به علت آغشته کردن گلبول‌های قرمز ممکن است موجب آزمایش مثبت کومبز گردند.

نکته: مثبت بودن کومبز مستقیم همیشه به مفهوم همولیز گلبول‌ها نیست و گفتنی است که بین 0.3 تا 15٪ بیماران بستری دارای کومبز مستقیم و بدون همولیز هستند. شیوع کومبز مثبت در هر 1000 نفر یک نفر و یک نفر در 14000 نفر از اهداکنندگان خون است.

کم‌خونی همولیتیک ناشی از مصرف دارو

داروها با چهار سازوکار ممکن است موجب مثبت شدن کومبز مستقیم گردند.

1 -اتصال دارو به غشای گلبول و تولید آنتی‌بادی علیه آن مانند پنی‌سیلین

2 -تولید آنتی‌بادی علیه دارو و تشکیل کمپلکس ایمنی و جذب آن روی گلبول قرمز

3 -تحریک سیستم ایمنی و تولید آتو آنتی‌بادی

4 -ایجاد تغییرات در غشای گلبول و جذب غیر اختصاصی ایمونوگلوبولین‌ها روی سطح آن

هموگلوبین اوری حمله‌ای سرمایی

(paroxysmal cold hemoglobinuria) PCH

هموگلوبین اوری حمله‌ای سرمایی حدود 2 تا 5٪ موارد کم‌خونی‌های همولیتیک را شامل می‌گردد. کم‌خونی در رابطه با سفلیس گزارش شده است اما به‌طور موقتی با

بیشترین شیوع در بچه‌ها در رابطه با عفونت‌های ویروسی مانند اوریون، آبله مرغان، سرخک و سایر ویروس‌ها نیز گزارش شده است.
آتو آنتی‌بادی در PCH (هموگلوبین‌اوری حمله‌ای سرمایی) در غالب موارد ویژگی آنتی P دارد. آنتی‌بادی از جنس IgG و همولیزین دوفازه (biphasic) است، بدین مفهوم که در سرما با گلبول‌های قرمز واکنش داده و در گرما سیستم کمپلمان را فعال و منجر به همولیز می‌گردد.
آتو آنتی P به نام آنتی‌بادی دونات لانداشتاینر نیز معروف است. آزمایش کومبز در PCH تنها حضور C_3d را نشان می‌دهد ولی چنانچه گلبول‌های قرمز با سالین سرد شستشو داده شود و از آنتی‌هیومن گلوبولین سرد نیز استفاده شود ممکن است بتوان IgG هم در سطح سلول شناسایی کرد.

آزمایش کومبز غیرمستقیم

به جستجوی آنتی‌بادی‌های حائز اهمیت بالینی در گردش خون بیمار می‌پردازد. در این آزمایش سرم بیمار با گلبول‌های غربالگر یا معرف اسکرین که دارای مجموعه آنتی‌ژن‌های مهم بالینی است مجاور می‌گردد.
مشاهده واکنش آگلوتیناسیون، همولیز و یا آغشتگی گلبول‌ها به مفهوم حضور آنتی‌بادی در سرم است. برای تشخیص واکنش آغشتگی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از معرف آنتی هیومن گلوبولین استفاده می‌شود.
برخی از کاربردهای آزمایش کومبز غیر مستقیم عبارتند از:

- شناسایی و تعیین هویت آنتی‌بادی‌ها در سرم بیمار
- آزمایش کراس‌مچ که در آن سرم بیمار با گلبول‌های قرمز اهداکننده در لوله آزمایش مجاور گشته و برای واکنش آگلوتیناسیون یا همولیز یا آغشتگی مورد بررسی قرار می‌گیرد.

- گروه‌بندی برخی از گروه‌های خون که در آن معرف گروه‌بندی با گلبول‌های قرمز مجاور گشته و واکنش آغشتگی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با آنتی هیومن گلوبولین قرائت می‌گردد مانند گروه‌بندی Du و گروه‌بندی سیستم کید و ...

نقش عوامل گوناگون در واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در آزمایش‌های کراس‌مچ و کومبز غیرمستقیم تحت اثر موارد زیر قرار می‌گیرد:

1 -پ هاش (PH) محیط واکنش

2 -زمان انکوباسیون

3 -قدرت یونی محیط

4 -نسبت آنتی‌ژن به آنتی‌بادی

5 -استفاده از تقویت کننده‌های واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی

پ‌هاش مطلوب برای واکنش اکثر آنتی‌بادی‌ها حدود 7 می‌باشد. گاهی سرم فیزیولوژی مورد استفاده جهت شستشوی گلبول‌ها دارای پ‌هاش اسیدی بوده و از این‌رو از سرم فیزیولوژی بافری شده استفاده می‌شود. پ‌هاش اسیدی موجب کاهش حساسیت می‌گردد.

در آزمایش‌های سرولوژی بانک خون دو حجم سرم به یک حجم سوسپانسیون 2 تا 5٪ گلبول‌های قرمز اضافه می‌گردد.

برای تقویت واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی از محیط‌های واکنش زیر استفاده می‌گردد:

1 -واکنش در محیط با کاهش قدرت یونی Low Ionic Strength Solution (LISS)

2 -واکنش در محیط پلی اتیلن گلیکول Poly Ethylen Glycol (PEG)

3 -محیط آلبومین

4 -گلبول‌های مجاور شده با آنزیم (Enzyme treated)

5 -پلی برن (Polybrene)

6 -محیط سرم فیزیولوژی

مجاور ساختن سرم با گلبول‌های قرمز در محیط سرم فیزیولوژی احتیاج به انکوباسیون 60-30 دقیقه‌ای در 37 درجه برای شناسایی آنتی‌بادی‌های موجود در سرم دارد.

با استفاده از محلول لیس (Liss) می‌توان زمان انکوباسیون را به 15-10 دقیقه کاهش داد. کاهش قدرت یونی با کاهش پتانسیل زتا (نیروی الکترواستاتیک دافعه گلبول‌های قرمز) موجب برخورد بیشتر آنتی‌ژن با آنتی‌بادی می‌گردد.

پلی اتیلن گلیکول یک پلی‌مر محلول در آب است که با راندن آب از اطراف گلبول‌های قرمز، شانس برخورد آنتی‌ژن با آنتی‌بادی را افزایش می‌دهد.

گمان می‌رود که آلبومین 22 تا 30٪ از طریق پخش کردن بارهای الکتریسیته شانس برخورد آنتی‌ژن با آنتی‌بادی را افزایش می‌دهد.

آزمایش کومبز غیرمستقیم

هدف: جستجوی آنتی‌بادی‌ها در سرم

مواد لازم:

1- سرم فیزیولوژی

2- آلبومین 22 تا 30٪

3- محلول Liss

4- محلول PEG

5- آنتی هیومن گلوبولین چند اختصاصی یا تک اختصاصی با ویژگی آنتی IgG

6- گلبول‌های معرف اسکرین یا سلول‌های اهدا کننده
7- سرم یا پلاسمای بیمار

طرز تهیه محلول Liss یـــــــــــــــــــا محلول با قدرت یونی کم (Low Ionic Strength Solution)

1.75 گرم کلرور سدیم (Nacl) و 18 گرم گلایسین (Glycine) را در فلاسک یک لیتری ریخته و به آن 20 سی‌سی بافر فسفاته با مخلوط کردن 11.3 سی‌سی 0.15 مولار KH2PO4 و 8.7 سی‌سی از 0.15 مولار Na2HPO4 افزوده و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید. پ‌هاش را با استفاده از سود در محدود 6.7±0.1 قرار داده و به آن 0.5 گرم سدیم آزاید به عنوان نگه‌دارنده اضافه کنید. از محلول Liss به دو صورت می‌توان استفاده کرد:

الف- افزودنی به لوله آزمایش

ب- برای تهیه سوسپانسیون گلبول‌های قرمز

طرز تهیه محلول PEG یا پلی اتیلن گلیکول (Poly Ethylen Glycol)

20 گرم پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی 3350 در فلاسک ریخته و به آن 100 سی‌سی بافر فسفاته در سالین (PBS) با PH = 7/3 اضافه کنید تا محلول W/V 20٪ تهیه گردد.

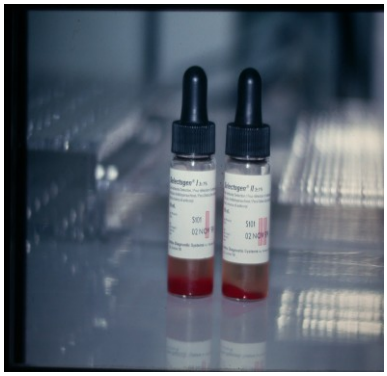
تهیه گلبول‌های معرف اسکرین برای آشکار کردن و تشخیص هویت آنتی‌بادی‌ها

گلبول‌های قرمز معرف اسکرین یا گلبول‌های غربالگر برای شناسایی و تعیین هویت آنتی‌بادی‌های موجود در سرم مورد استفاده قرار می‌گیرند.

گلبول‌های معرف اسکرین از گروه خونی "O" تهیه گردیده به‌طوری که در بردارنده تمام آنتی‌ژن‌های با اهمیت بالینی مانند D و C و c و E و e و fy^a و fy^b و Jk^a و Jk^b و K و k و Le^a و Le^b و P و M و N و S و s باشند.

البته ممکن است تمام آنتی‌ژن‌های فوق روی یک گلبول "O" اهداکننده موجود نباشد و برای مثال بتوان این مجموعه آنتی‌ژنی را با دو سلول یا سه سلول اسکرین تهیه کرد. استانداردهای انتخاب گلبول‌های گروه "O" که دارای آنتی‌ژن‌های هموزیگوت باشند به مرغوبیت سلول‌های معرف می‌افزاید چون می‌توان آنتی‌بادی‌های ضعیف و وابسته به دوزاژ را شناسایی کرد. با بکارگیری یک پانل غربالگری سه سلولی احتمال یافتن آنتی‌ژن‌های هموزیگوت بیشتر می‌شود.

یک نمونه از گلبول‌های معرف اسکرین که از دو اهدا کننده گروه "O" در ویال‌های جداگانه 1 و 2 تهیه شده است.



	Rh							MNSs				P_1	Lewis		Lutheran		Kell		Duffy		Kidd	
Cell	D	C	E	c	e	f	C^w	M	N	S	s	P_1	Le^a	Le^b	Lu^a	Lu^b	K	k	Fy^a	Fy^b	Jk^a	Jk^b
I R1R1 (56)	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+
II R2R2 (89)	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0

در شکل دو گلبول معرف اسکرین که دارای حداقل 18 آنتی‌ژن مهم بالینی می‌باشد مشاهده می‌شود

سلول‌های معرف اسکرین داری نگه‌دارنده بوده و ممکن است تا سه هفته در 4 درجه قابل استفاده باشند.

غربال کردن یا اسکرین آنتی‌بادی‌ها در سرم در موارد زیر کاربرد دارد:

1 -در بیماری که احتیاج به تزریق خون دارد
2 -خانم حامله
3 -بررسی علت بروز واکنش همولیتیک حاد و تأخیری بدنبال تزریق خون
4 -بررسی علت افزایش بیلی‌روبین و همولیز در نوزاد
5 -اسکرین سرم اهدا کننده از نظر آنتی‌بادی‌ها

تعریف آنتی‌بادی‌های حائز اهمیت بالینی و غیرمنتظره

آنتی‌بادی‌های حائز اهمیت بالینی و غیرمنتظره به غیر از آنتی A و آنتی B می‌باشند. این گونه آنتی‌بادی‌ها از جنس IgG و قادر به عبور از جفت می‌باشند و چنانچه جنین دارای آنتی‌ژن مربوطه باشد موجب کم‌خونی همولیتیک جنین-نوزادی می‌شود. آنتی‌بادی‌های غیرمنتظره در سرم نیز ممکن است موجب واکنش همولیتیک در تزریق خون به بیمار گردند و از این‌رو شناسایی آنها دارای اهمیت فراوان است. آنتی بادی های غیر منتظره در اثر تزریق خون و حاملگی و بندرت مصرف داروها شکل می‌گیرند.

گفتنی است که آنتی‌بادی‌های سیستم ABO گرچه بسیار مهم و حائز اهمیت بالینی هستند ولی وجود آنها قابل انتظار و پیش‌بینی است.

برای جلوگیری از تداخل آنتی‌بادی‌های سیستم ABO در شناسایی آنتی‌بادی‌ها از سلول‌های معرف اسکرین با گروه "O" استفاده می‌شود.

آلو و آتو آنتی‌بادی

آلو آنتی‌بادی در پاسخ به تحریک آنتی‌ژن غریبه یا غیرخودی رخ می‌دهد.

آلو آنتی‌بادی با گلبول‌های قرمز خود شخص واکنش نمی‌دهد. برای مثال اگر به بیماری با گروه ارهاش منفی، خون ارهاش مثبت تزریق شود، امکان دارد بیمار آنتی‌ارهاش سنتز کند و تا هنگامی که گلبول‌های تزریق شده در گردش خون بیمار وجود داشته باشند آزمایش کومبز مستقیم به صورت زمینه مخلوط ممکن است مثبت شود و بعد از آن آزمایش کومبز مستقیم منفی گردیده ولی آلو آنتی‌بادی در سرم وجود دارد.

آتو آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های خودی شکل می‌گیرد، آتو آنتی‌بادی با گلبول‌های قرمز بیمار واکنش داده و در این حالت آزمایش کومبز مستقیم مثبت می‌شود.

آتو آنتی‌بادی در اختلالات لنفوپرولیفراتیو، بیماری‌های خود ایمن، عفونت‌ها و مصرف داروها تولید می‌شود.

در آزمایش اسکرین آنتی‌بادی سرم یا پلاسمای بیمار در مجاورت گلبول‌های معرف اسکرین در سه فاز حرارت اتاق و 37 درجه با تقویت کننده و فاز کومبز مورد سنجش قرار می‌گیرد.
مشاهده همولیز یا آگلوتیناسیون یا آغشتگی به مفهوم واکنش مثبت است.

روش آزمایش

1 -یک لوله 75 × 10 برای هر ویال از گلبول‌های اسکرین و یک لوله برای آتو کنترل نشانه‌گذاری کنید.
2 -دو قطره سرم یا پلاسمای بیمار به هر لوله افزوده و سپس به هر لوله به طور جداگانه یک قطره از سوسپانسیون 2 تا 5٪ گلبول‌های اسکرین از هر ویال اضافه کنید (به تعداد ویال‌های گلبول اسکرین بایستی لوله شماره‌گذاری شود).
3 -لوله‌ها را به مدت 5 تا 15 دقیقه در حرارت اتاق (RT) انکوبه و سپس سانتریفوژ کرده و برای همولیز بررسی کنید. لوله‌ها را با تکان دادن ملایم برای آگلوتیناسیون و درجه‌بندی آن ارزیابی کنید نتایج واکنش‌ها را در محل مناسب صفحه آنتی‌گرام یا چارت آنتی‌ژنی سلول‌های اسکرین یادداشت کنید.
4 -دو قطره محلول Liss به هر لوله اضافه کرده و پس از مخلوط کردن بمدت 10 تا 15 دقیقه در حرارت 37 درجه انکوبه کنید (چنانچه آلبومین اضافه کرده‌اید به مدت 20 تا 30 دقیقه انکوبه کنید).
5 -لوله را سانتریفوژ کرده و درجه واکنش را در چارت آنتی‌گرام یادداشت کنید.
6 -محتوی لوله را 3 الی 4 بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده و یک تا دو قطره AHG به سوسپانسیون خشک گلبول‌های شسته شده اضافه و سانتریفوژ کنید. درجه واکنش را در چارت مربوطه یادداشت کنید.

7 -با استفاده از سلول‌های حساس شده یا چک سل از فعال بودن AHG مطمئن شوید.

8 -به تفسیر نتایج بپردازید.

مجاورت سرم بیمار با گلبول های معرف اسکرین

سلول های اسکرین	IS	37°c	AHG
ویال I	O	O	O
ویال II	O	O	+2

آزمایش کومبز مستقیم منفی است Direct coomb's test= Negative

نتیجه: احتمال یک آلو آنتی بادی از جنس IgG در سرم مطرح می شود.

مجاورت سرم بیمار با گلبول های معرف اسکرین

سلول های اسکرین	IS	37°c	AHG
ویال I	O	O	+3
ویال II	O	+2	+3

آزمایش کومبز مستقیم منفی است Direct coomb's test: Negative

نتیجه: احتمال چند آلو آنتی بادی از جنس IgG در سرم مطرح می گردد.

هنگامی که آزمایش اسکرین آنتی‌بادی با استفاده از گلبول‌های معرف اسکرین مثبت شد اقدام به شناسایی یا تعیین هویت آن می‌گردد.

برای تعیین هویت آنتی بادی احتیاج به گلبول های معرف پانل سلولی است. پانل سلولی معمولا از 10 تا 12 ویال با گروه خونی "O" تهیه می‌گردد. آنتی‌ژن‌های پانل در مجموع 10 تا 12 ویال شبیه به گلبول‌های معرف اسکرین است، با این تفاوت که آنتی‌ژن‌ها در ویال‌های مختلف پراکنده شده‌اند، با پراکنده شدن آنتی‌ژن‌ها در ویال‌های مختلف امکان شناسایی هویت آنتی‌بادی فراهم می‌شود.

تشخیص هویت آنتی‌بادی‌ها

با مثبت شدن آزمایش اسکرین آنتی‌بادی‌ها (antibody detection) اقدام به تشخیص هویت آنتی‌بادی‌ها (antibody identification) می‌گردد.

مواد لازم جهت تعیین هویت آنتی‌بادی‌ها

1 -سرم یا پلاسمای تازه (در مواردی که بیمار اخیراً حامله بوده یا تزریق خون داشته است، نمونه‌گیری تا سه روز قبل از انجام آزمایش مورد قبول است).

2 -گلبول‌های معرف پانل (پانل سلولی)

گلبول‌های معرف پانل به طور معمول در 10 تا 12 ویال مختلف وجود دارند.

3 -تقویت کننده واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی (مانند آلبومین، محلول لیس یا محلول PEG)

برای تشخیص هویت آنتی‌بادی‌ها سرم یا پلاسما با گلبول‌های ویال‌های مختلف پانل سلولی بطور جداگانه مجاور می‌گردد. برای هر ویال از گلبول‌های معرف پانل یک لوله آزمایش در نظر گرفته و واکنش در فازهای مختلف حرارتی (درجه حرارت اتاق و 37 درجه)، محیط‌های مختلف (سرم فیزیولوژی، آلبومین، لیس و ...) و فاز کومبز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

شیوه کار مانند آزمایش اسکرین آنتی‌بادی‌هاست با این تفاوت که سلول‌های معرف اسکرین در 2 تا 3 ویال تهیه می‌گردند در حالی که پانل سلولی معمولاً در 10 تا 12 ویال تهیه می‌شود، بنابراین در تشخیص هویت آنتی‌بادی‌ها به 10 الی 12 لوله جداگانه نیاز است که برای موارد زیر مورد دقت قرار می‌گیرند.

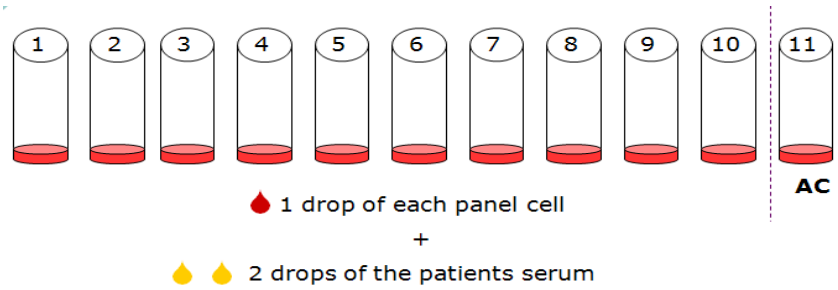
- فاز حرارتی واکنش‌ها
- بررسی الگوی واکنش‌ها در محیط‌های گوناگون
- بررسی الگوی واکنش‌ها قبل و بعد از استفاده آنزیم
- تفاوت قدرت واکنش‌ها در ویال‌های مختلف پانل
- واکنش همولیز
- فنوتیپ آنتی‌ژنی گلبول‌های بیمار
- واکنش در لوله آتو کنترل (مجاورت سرم بیمار با گلبول قرمز بیمار که در تمام مراحل بموازات آزمایش اسکرین آنتی‌بادی‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد).
- قانون 3

مثال

به واکنش سرم با پانل سلولی که از 10 ویال تشکیل شده است توجه کنید.

Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0			
2	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0			
3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+			
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+			
5	0	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+			
6	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+			
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+			
8	0	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0			
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+			
10	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0			
11	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	+			
Patient Typing																						

INTERPRETATION:



Cell Number	D	C	E	c	e	f	M	N	S	s	P1	Lea	Leb	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	IS	37	AHG
1	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	2^+	0	0
2	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	+	+	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	0	0	0
3	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~	0	+	+	~~+~~	0	~~+~~	+	~~+~~	+	+	0	~~+~~	0	0	0
4	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	2^+	0	0
5	0	0	+	~~+~~	+	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	+	+	0	0	0
6	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	+	+	0	0	0
7	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	2^+	0	0
8	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	+	+	0	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	0	0	0
9	0	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	+	+	+	2^+	0	0
10	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	~~+~~	0	0	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	0	0	0
11	0	0	0	~~+~~	~~+~~	~~+~~	0	~~+~~	0	~~+~~	0	0	~~+~~	0	~~+~~	+	+	+	+	0	0	0
Patient Typing																				0	0	0

آزمایش سرم بیمار با گلبول‌های مختلف پانل پس از حذف آنتی‌ژن‌هایی که واکنش در لوله آزمایش منفی بوده است وجود آنتی لوئیس را ثابت کرده است.

چگونه آزمایش کومبز غیرمستقیم در یک بیمارستان که امکانات سلول‌های معرف اسکرین ندارد انجام گیرد؟

پاسخ:

اگر هدف از آزمایش کومبز غیرمستقیم یافتن آنتی D در خانم حامله با ارهاش منفی باشد می‌توان سرم خانم حامله را با 3 گلبول جداگانه O^+ و 3 گلبول جداگانه O^- مخلوط و در فازهای 37 درجه و آنتی هیومن برای واکنش مشاهده کرد. چنانچه واکنش با گلبول‌های O^+ مثبت و با O^- منفی گردد به احتمال 95٪ وجود آنتی D در خانم حامله تائید می‌گردد. گفتنی است که مخلوط کردن گلبول‌ها از درجه حساسیت تست می‌کاهد.

چنانچه هدف از کومبز غیرمستقیم یافتن آنتی‌بادی غیر از آنتی D باشد بایستی برای روش استاندارد سلول معرف اسکرین در دست داشت. در غیر اینصورت سرم بیمار را با مجموعه‌ای از مخلوط دو گلبول O مثبت و دو گلبول O منفی مجاور ساخته (روی هم 2 ویال جداگانه) و چنانچه واکنشی مشاهده گردید نتیجه را به صورت زیر گزارش کنید.

Indirect coomb's is positive with lab made pool cell

و اگر واکنشی مشاهده نشد

Indirect coomb's is negative with lab made pool cell

توجه داشته باشید که در صورت استفاده نکردن از گلبول‌های استاندارد ممکن است جواب آزمایش کومبز غیرمستقیم مربوط به همان بیمار در یک آزمایشگاه مثبت و دیگری منفی شود و این به علت آن است که سلول‌های O انتخابی ممکن است از نظر ترکیب آنتی‌ژنی متفاوت باشند.