

آزمایش‌های کومبز مستقیم و غیرمستقیم

در سال ۱۹۴۵ 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 C₃d احتیاج به آنتی هیومن گلوبولین (AHG) با ویژگی آنتی IgG و آنتی C₃d است که به آن آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف یا پلی اسپسیفیک گویند.

گفتنی است که در غالب موارد جزء C₃d تنها ردپای کمپلمان روی گلبول قرمز است و از اینرو ویژگی آنتی C₃d 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 C₃d 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 اتوایمون

- 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

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 C₃d است واکنش آگلوتیناسیون می‌دهند.

معرفی آنتی هیومن گلوبولین (AHG)

آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف یا پلی اسپسیفیک (Polyspecific) دارای ویژگی آنتی IgG و آنتی C₃d/C₃b می‌باشد، بدین مفهوم که با گلبول‌های آغشته شده به IgG یا C₃d 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 وسیع تر بتواند با زنجیره‌های سبک ایمونوگلوبولین‌های آغشته شده نیز واکنش دهد. این معرف با ویژگی ضد کمپلمان قادر به واکنش با اجزای C₃d و C₃b 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 ۲-۸ درجه سانتی‌گراد (میانگین ۴ 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 ۲ 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 ۱.۵ گرم IgG در دسی‌لیتر است که برابر ۱۵۰۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر یا ۱۵ میلی‌گرم در سی‌سی یا ۱۵۰۰۰ میکروگرم در سی‌سی است. توجه داشته باشید که کمتر از ۲ 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 ۱۵۰۰۰ میکروگرم IgG و کمپلمان آزاد که در خون یا سرم اولیه موجود بوده به کمتر از ۲ 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 ۳ الی ۴ 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 (C₃d/C₃b) را مورد سنجش قرار می‌دهد.

مواد لازم:

- آنتی هیومن گلوبولین گسترده طیف با ویژگی آنتی IgG و آنتی C₃d

- چک سل یا کومبز کنترل یا سلول حساس شده

- سرم فیزیولوژی

- نمونه خون EDTA دار

برای انجام آزمایش نخست معرفها را به حرارت اتاق (۲۴-۲۰ درجه) برسانید و به ترتیب زیر عمل کنید:

۱- از نمونه خون بیمار یک سوسپانسیون ۵-۲٪، در سرم فیزیولوژی تهیه کنید.

۲- دو تا سه قطره از سوسپانسیون را برداشته و ۳ الی ۴ بار با سرم فیزیولوژی شستشو دهید.

۳- 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.

۴- فوراً یکی دو قطره آنتی هیومن گلوبولین اضافه و بسرعت به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

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

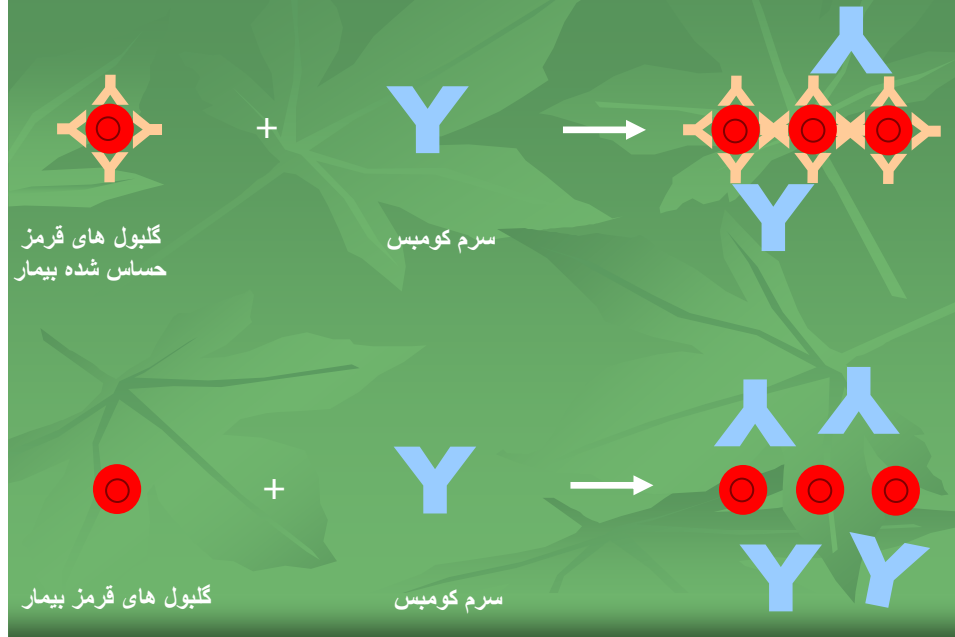
۶- چنانچه واکنش آگلوتیناسیون مشاهده گشت درجه واکنش آزمایش مثبت کومبز را گزارش کنید.

۷- در صورت واکنش منفی لوله آزمایش را به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق نگه دارید و سپس سانتریفوژ مجدد کرده برای آگلوتیناسیون بررسی کنید.

نکته مهم: مرحله ۷ جهت واکنش بهتر آنتی C₃d با C₃d می باشد ولی واکنش آنتی IgG با گلبولهای آغشته به IgG احتیاج به سانتریفوژ فوری دارد و تأخیر در سانتریفوژ موجب ضعیف شدن واکنش می گردد، از اینرو نمی توان بعد از اضافه کردن AHG و انکوبه کردن ۵ تا ۱۰ دقیقه برای یک بار سانتریفوژ کرد بلکه آزمایش در دو مرحله جدا صورت می گیرد.

با مشاهده واکنش آگلوتیناسیون در مرحله دوم سانتریفوژ، آزمایش کومبز را مثبت گزارش کنید.

Direct Coombs Test



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 ...

آزمایش کومبز غیرمستقیم

هدف: جستجوی آنتی‌بادی‌ها در سرم

مواد لازم:

- ۱- سرم فیزیولوژی
- ۲- آلبومین ۲۲ تا ۳۰٪
- ۴- آنتی هیومن گلوبولین چند اختصاصی یا تک اختصاصی با ویژگی آنتی IgG
- ۵- گلبول‌های معرف اسکرین یا سلول‌های اهدا کننده
- ۶- سرم یا پلاسمای بیمار

Indirect Coombs Test

مرحله اول



مرحله دوم

