



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه
میکروبیولوژی



آزمایشگاه ایمونولوژی

تست کومبس مستقیم و غیر مستقیم

1

تست کومبس

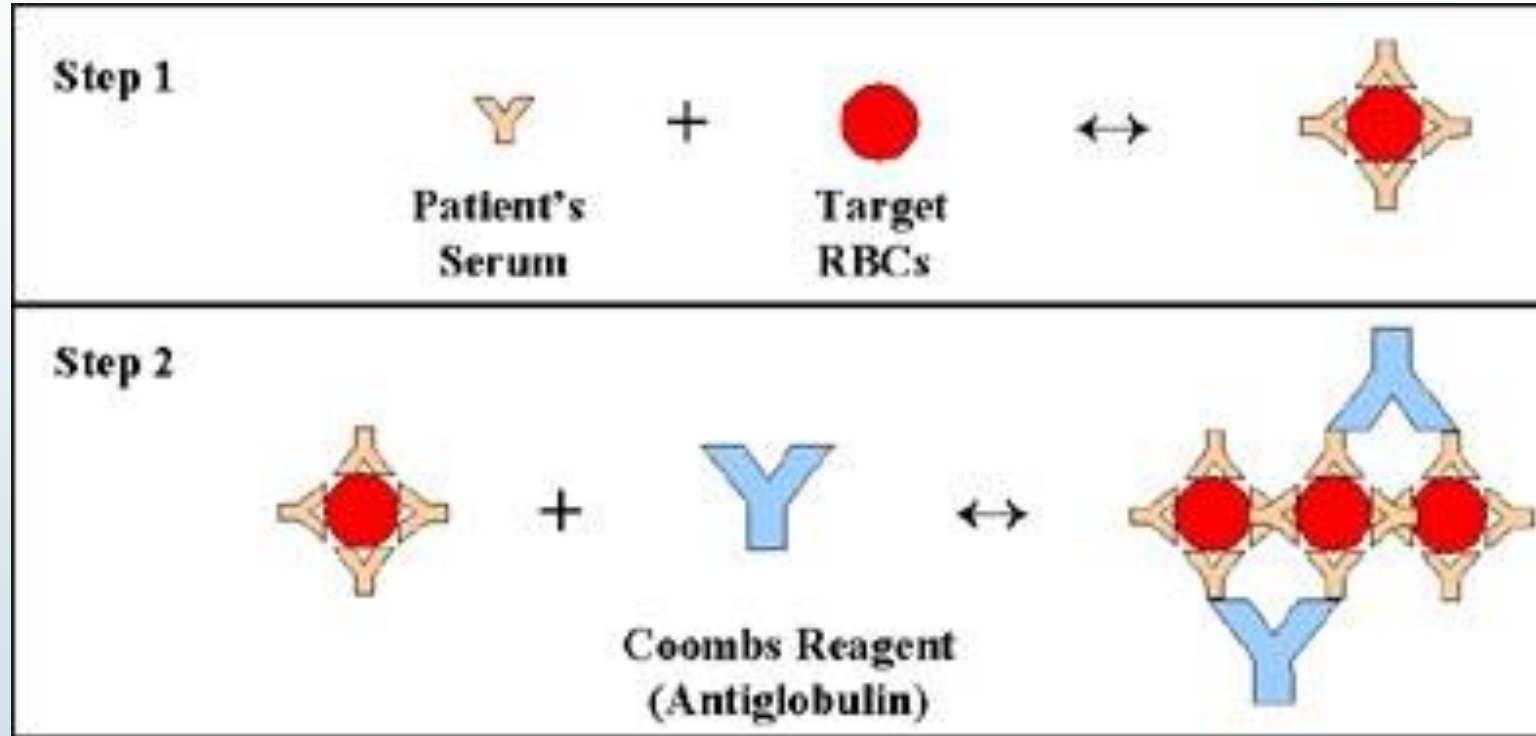
از این تست برای شناسایی آنتیبادیهای ناقص که بر روی RBC نشسته و آنها را حساس کرده است استفاده می‌شود. این تست به دو روش مستقیم و غیرمستقیم انجام می‌شود. اساس این تست بر ایجاد شبکه بین آنتیبادیهای ناقص در سطح گلبولهای قرمز حساس شده توسط (AHG) برای ایجاد آگلوتیناسیون می‌باشد. این تست در دو مرحله کلی انجام می‌شود:

۱. مرحله حساس شدن

۲. اضافه کردن معرف کومبس

تست کومبس مستقیم و غیر مستقیم

تست کومبس مستقیم و غیر مستقیم جهت بررسی آنتی بادی ضد گلبول قرمز انجام می شود و حساسیت نسبت به Rh را مشخص می کند.

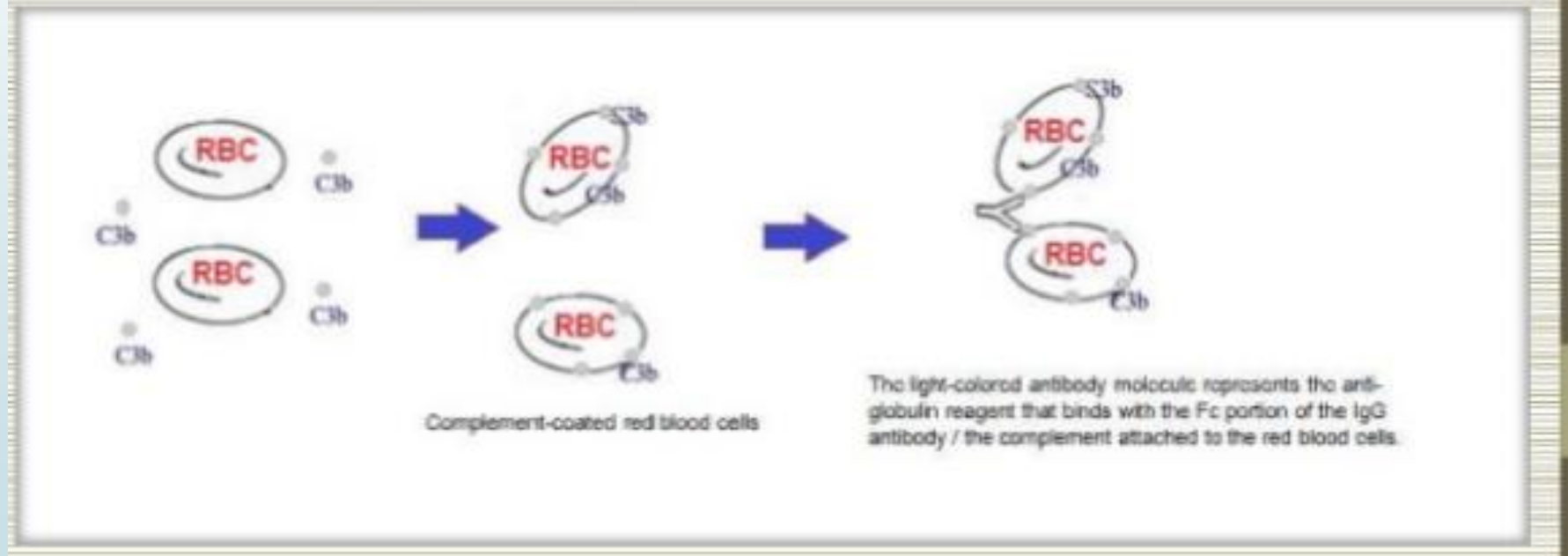




تهیه کننده: سهیلا عباسی

PRINCIPLE

- This will form a "**bridge**" between the antibodies or **complement coating the red cells**, causing agglutination.
- The coating (sensitization) of red cells can occur **in vivo** or **in vitro** following incubation at 37°C with serum containing antibody.



تست کومبس مستقیم (DAT) در سال ۱۹۴۵ آقای کومبس با همکارانش گروهی از آنمی‌های همولیتیک را که علتش گروهی از آنتی‌بادی‌ها بودند تشخیص دادند به همین دلیل روند این آزمایش را "کومبس" نام‌گذاری کردند.

کومبس مستقیم، حساس شدن گلبولهای قرمز را در داخل گردش خون توسط آنتی‌بادی و یا اجزاء کمپلمان و یا هر دو را نشان می‌دهد.

در حالت عادی برای مثال RBC با چندین IgG یا اجزا کمپلمان (حدود ۴۰ تا ۵۰) آغشتگی دارد، اما زمانی کومبس + است که این اتصالات بیشتر باشد (حدود ۵۰۰).

در اثر این اتصالات، بدن واکنش می‌دهد مثلاً ماکروفاژ با Fc رسپتورهای خود به Fc آنتی‌بادی‌های متصل به RBC می‌چسبد و باعث تخلیه آن می‌شود و این تست برای تشخیص و جلوگیری از این واکنش انجام می‌شود.

موارد کاربرد

۱. تشخیص آنمی اتوایمیون یا hemolytic anemia ناشی از تولید اتوانتی بادی علیه گلبول های قرمز خودی است.
۲. بیماری های همولیتیکی نوزادان یا erythroblastosis fetalis که به علت ناسازگاری خونی خصوصا Rh بین مادر و جنین است.
۳. کم خونی همولیتیک متعاقب مصرف برخی از داروها
۴. کم خونی همولیتیک در نتیجه آلو آنتی بادی های ناشی از تزریق خون که اخیراً به بیمار صورت گرفته است.
۵. هموگلوبینوری حمله ای سرد (PCH)

➤ گروه خونی انسان توسط مارکرهای مشخص (به نام آنتی ژن) در سطح سلول های قرمز خون مشخص می شود. در صورت انتقال خون، خون تزریق شده باید مطابق با نوع شما باشد. این بدان معنی است که خون تزریق شده باید همان آنتی ژن های گلبول قرمز شما را داشته باشد.

➤ اگر انتقال خون با آنتی ژن های متفاوت از خون شما (خون ناسازگار) انجام شود، سیستم ایمنی بدن سلول های خونی تزریق شده را از بین می برد. این عمل واکنش ترانسفوزیون نامیده می شود و می تواند باعث بیماری جدی یا حتی مرگ شود. به همین دلیل تطابق با گروه خونی بسیار مهم است.

حساسیت به Rh

10

➤ **Rh** یک آنتی ژن است. نام کامل این آنتی ژن عامل **Rhesus** است.

➤ اگر یک زن باردار با خون **Rh** منفی باردار شود و جنینی با خون **Rh** مثبت داشته باشد، ممکن است حساسیت به **Rh** رخ دهد. اگر پدر

خون **Rh** مثبت داشته باشد، احتمالاً کودک هم مثبت خواهد بود. حساسیت **Rh** هنگامی اتفاق می افتد که خون کودک در دوران بارداری یا زایمان با خون مادر مخلوط شود. این باعث می شود سیستم ایمنی بدن مادر در بارداری های بعدی آنتی بادی را علیه گلبول های قرمز کودک بسازد.

➤ این پاسخ آنتی بادی را حساس سازی **Rh** می نامند و بسته به این که چه موقع رخ دهد، می تواند گلبول های قرمز کودک را قبل یا بعد از تولد از بین ببرد. در صورت بروز حساسیت، جنین یا نوزاد ممکن است دچار مشکلات خفیف تا شدید (به نام بیماری **Rh** یا اریتروبلاستوز جنین) شود. در موارد نادر، اگر بیماری **Rh** درمان نشود، جنین یا نوزاد ممکن است بمیرد.

➤ یک زن با خون **Rh** منفی می تواند از ایمونوگلوبولین **Rh** مانند **RhoGAM** استفاده کند که تقریباً همیشه حساسیت را متوقف می کند. مشکلات ناشی از حساسیت به **Rh** از زمان ایجاد ایمونوگلوبولین **Rh** و تزریق آن حین و بعد از زایمان بسیار نادر شده است.

کم خونی همولیتیک خود ایمنی

- نوعی از کم خونی همولیتیک به نام کم خونی همولیتیک خود ایمنی، یک بیماری نادر است که باعث می شود پادتن ها در مقابل گلبول های قرمز خون شخص ساخته شوند.
- دو آزمایش خون می تواند آنتی بادی هایی که به گلبول های قرمز حمله می کنند را بررسی کند: آزمایش مستقیم Coombs و آزمایش غیر مستقیم Coombs .
- آزمایش مستقیم Coombs بر روی نمونه ای از گلبول های قرمز از بدن انجام می شود و آنتی بادی هایی را که قبلاً به گلبول های قرمز وصل شده اند، تشخیص می دهد. آزمایش غیر مستقیم Coombs روی نمونه ای از قسمت مایع خون (سرم) انجام می شود. آنتی بادی های موجود در جریان خون را تشخیص می دهد که می توانند به گلبول های قرمز خاصی وصل شوند و در صورت بروز اختلاط خون به مشکلاتی منجر می شوند.
- در حال حاضر در ایران آزمایش کومبس Coombs در حاملگی بین هفته های ۲۸ تا ۳۲ بارداری انجام می شود. در صورت بروز حساسیت آمپول روگام در همان هفته ها و نوبت دوم تا ۷۲ ساعت پس از زایمان برای مادر تزریق می شود.

تست Coombs مستقیم

➤ آزمایش مستقیم Coombs آنتی بادی های متصل به گلبول های قرمز شما را پیدا می کند. آنتی بادی ها ممکن است آن هایی باشند که بدن شما به دلیل بیماری ساخته یا آن هایی که در انتقال خون دریافت می کنید.

➤ آزمایش مستقیم Coombs همچنین ممکن است روی یک نوزاد تازه متولد شده با خون Rh مثبت انجام شود که مادر وی خون Rh منفی دارد. این آزمایش نشان می دهد که آیا مادر آنتی بادی ساخته است و آیا آنتی بادی از طریق جفت به کودک منتقل شده است یا نه.



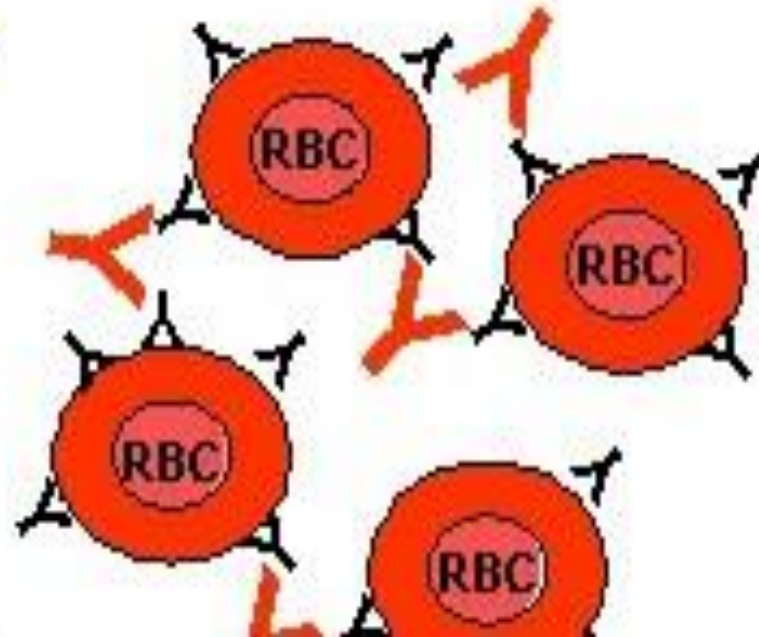
**Patient
Sample**

+



**anti- Hu IgG
Coomb's
Reagent**

=

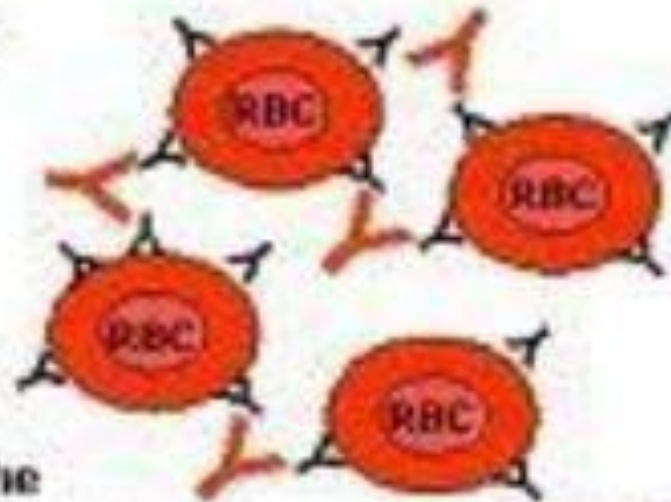


**Example: The
baby's sample is
positive for the
presence of the**

DIRECT COOMB'S TEST



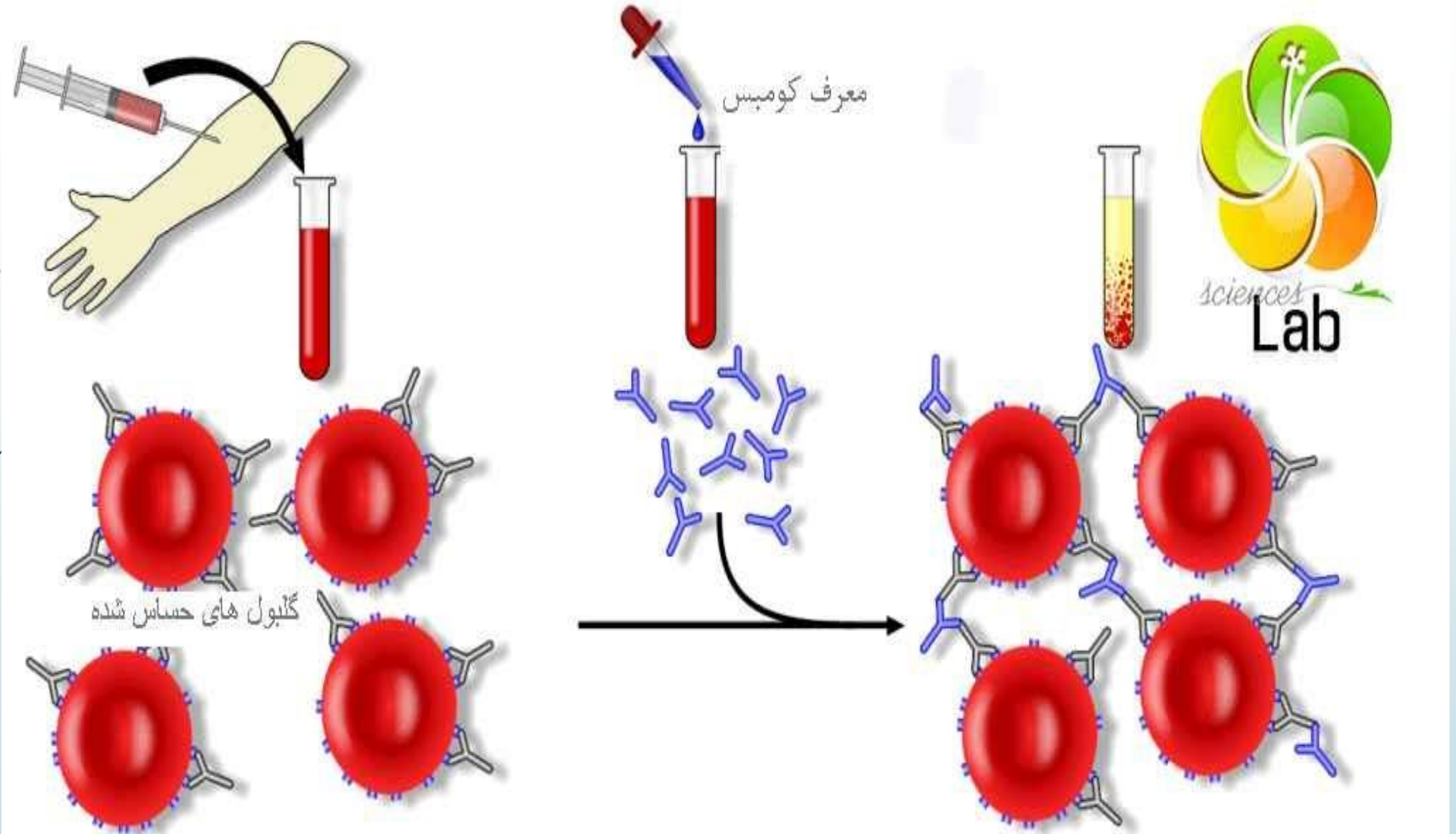
Example: The baby's sample is positive for the presence of the mother's Ab on the surface of RBCs in erythroblastosis fetalis



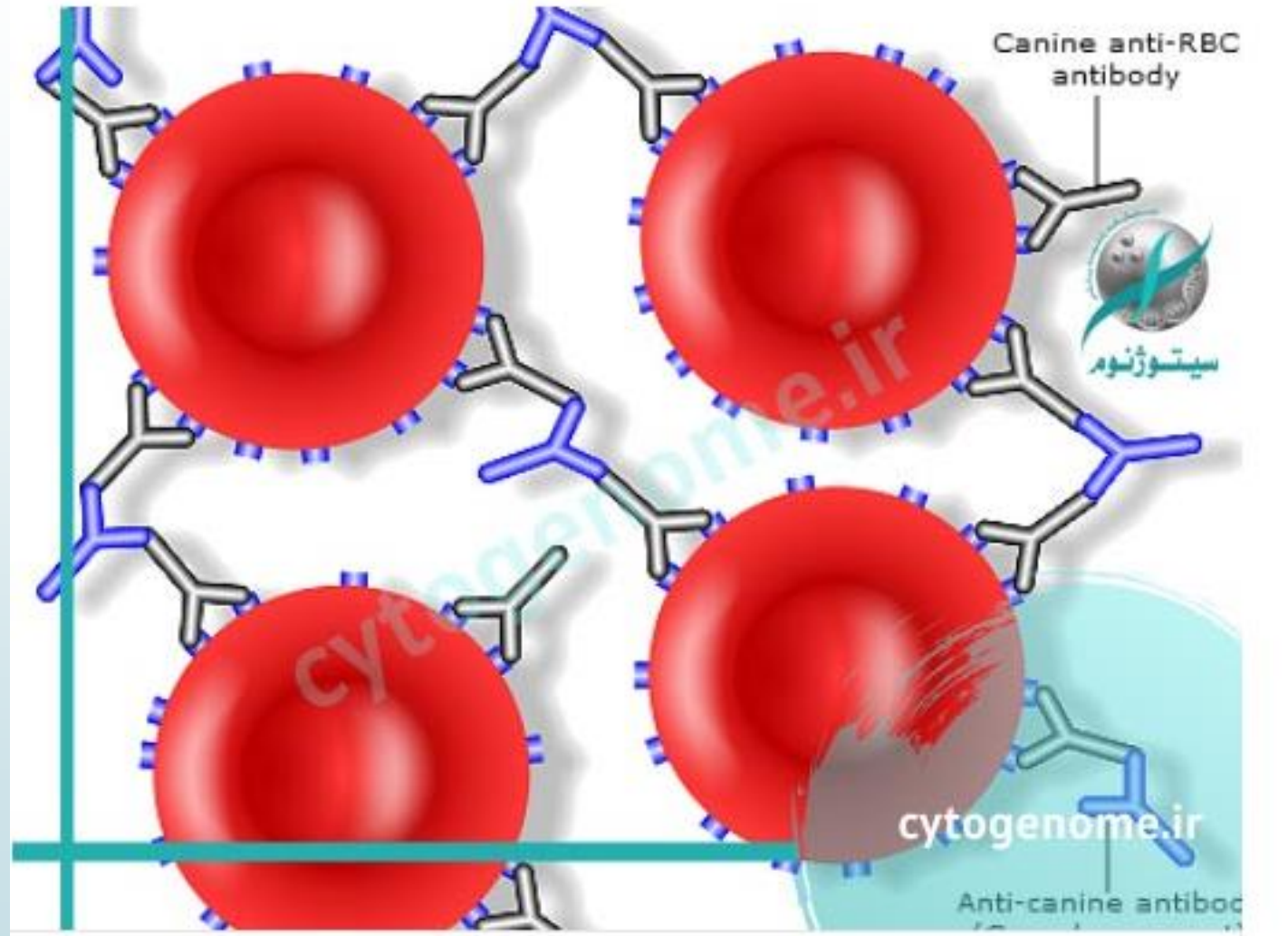
Agglutination

روش کار کومبس مستقیم:

- 1 : برای انجام این آزمایش باید دقت شود که نمونه بیمار باید حاوی ضد انعقاد EDTA یا سیترات باشد.
- 2 : مقداری از خون بیمار را برداشته و در یک لوله آزمایش با سرم فیزیولوژی سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد تهیه می شود.
- 3 : ۳ الی ۴ قطره از این سوسپانسیون را در یک لوله آزمایش دیگر ریخته و ۳ الی ۴ بار با سرم فیزیولوژی شست و شو داده می شود.
- 4 . در مرحله آخر شست و شو سرم فیزیولوژی را کاملا دور ریخته و لوله را روی یک پارچه تمیز وازگون کرده تا اینکه آخرین قطرات سرم فیزیولوژی جذب پارچه شده و گلبول های قرمز شسته در ته لوله باقی بماند.
- 5 . به لوله آزمایش یک تا دو قطره انتی هیومن گلوبولین اضافه کرده و سپس مخلوط کرده و فوراً به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شود.
- 6 . سپس لوله را آورده و به آرامی تکان می دهند و در صورتی که واکنش آگلوتیناسیون مشاهده شود نتیجه آزمایش کومبس مستقیم را مثبت گزارش می کنند.
- 7 . چنانچه واکنش آگلوتیناسیون مشاهده نشد لوله را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری می کنند و مجدداً به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ می کنند چنانچه در این مرحله واکنش آگلوتیناسیون مشاهده شد نتیجه آزمون را کومبس مثبت گزارش می کنند



تهیه کننده: سهیلا عباسی

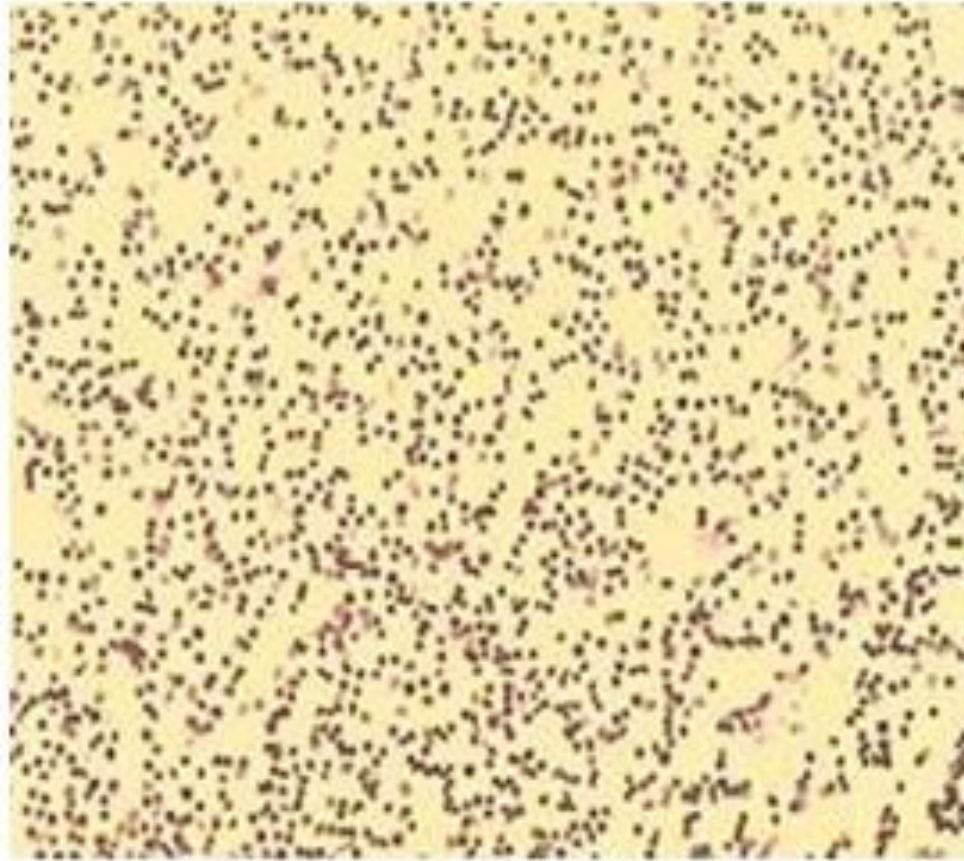


تهیه کننده: سهیلا عباسی

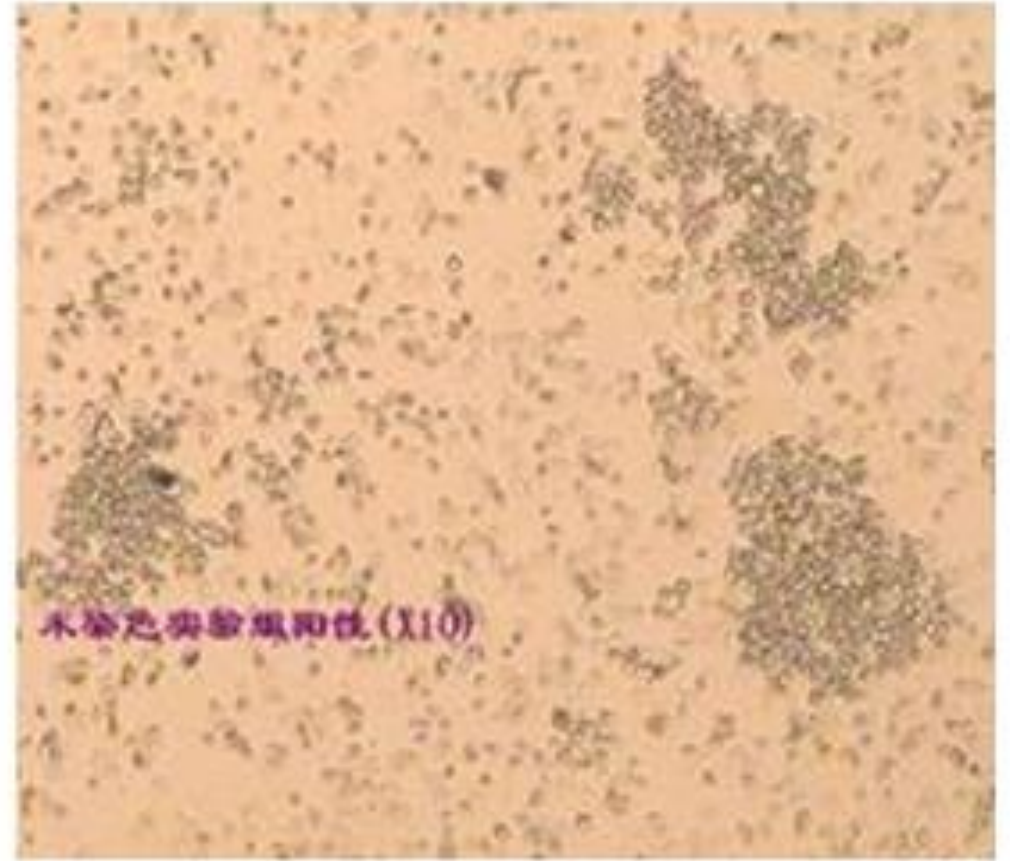


DAT negative positive

تهیه کننده: سهیلا عباسی



BMMNC-Coombs test (-)



BMMNC-Coombs test (+)

بررسی نتایج تست

- ▶ **طبیعی**
هیچ آنتی بادی یافت نمی شود. به این نتیجه آزمایش منفی گفته می شود.
- ▶ **تست مستقیم Coombs.** نتیجه آزمایش منفی بدان معنی است که خون شما آنتی بادی متصل به گلبول های قرمز شما ندارد.
- ▶ **تست Coombs غیر مستقیم.** نتیجه آزمایش منفی بدین معنی است که خون شما با خونی که از طریق تزریق دریافت خواهید کرد سازگار است.
- ▶ **آزمایش غیرمستقیم Coombs منفی برای فاکتور Rh** تیترا آنتی بادی Rh در یک زن باردار به این معنی است که وی علیه خون Rh مثبت کودک خود آنتی بادی ایجاد نکرده است. این بدان معنی است که حساسیت به Rh رخ نداده است.

بررسی نتایج تست

► غیر طبیعی

تست مستقیم Coombs نتیجه مثبت به این معنی است که خون شما آنتی بادی دارد که علیه گلبول های قرمز مبارزه می کند. این می تواند ناشی از انتقال خون ناسازگار باشد یا ممکن است به شرایطی مانند کم خونی همولیتیک یا بیماری همولیتیک نوزاد (HDN) مرتبط باشد.

► **تست Coombs غیر مستقیم**. نتیجه آزمایش مثبت بدین معنی است که خون شما با خون اهدا کننده ناسازگار است و شما نمی توانید از آن شخص خون دریافت کنید.

► اگر آزمایش تیترا آنتی بادی Rh در زنی که باردار است یا قصد بارداری دارد، مثبت باشد، بدین معنی است که وی دارای آنتی بادی در برابر خون Rh مثبت حساسیت به Rh است. او در اوایل بارداری مورد آزمایش قرار می گیرد تا گروه خونی کودک بررسی شود. اگر کودک خون Rh مثبت داشته باشد، مادر در تمام دوران بارداری از نزدیک مراقبت می شود تا از لیز شدن گلبول های قرمز خون جلوگیری شود. اگر حساسیت رخ نداده باشد، می توان با تزریق ایمنوگلوبولین Rh از آن جلوگیری کرد.

- ▶ چه چیزی بر نتایج تست تاثیر می گذارد
- ▶ دلایلی که ممکن است شما نتوانید تست را انجام دهید یا این که نتایج آن مفید نباشد شامل موارد زیر است:

▶ سابقه انتقال خون در گذشته

- ▶ در طی ۳ ماه گذشته باردار بوده باشید
- ▶ مصرف برخی داروها مانند سفالوسپورین ها، داروهای سولفا، داروهای سل، انسولین و تتراسایکلین ها

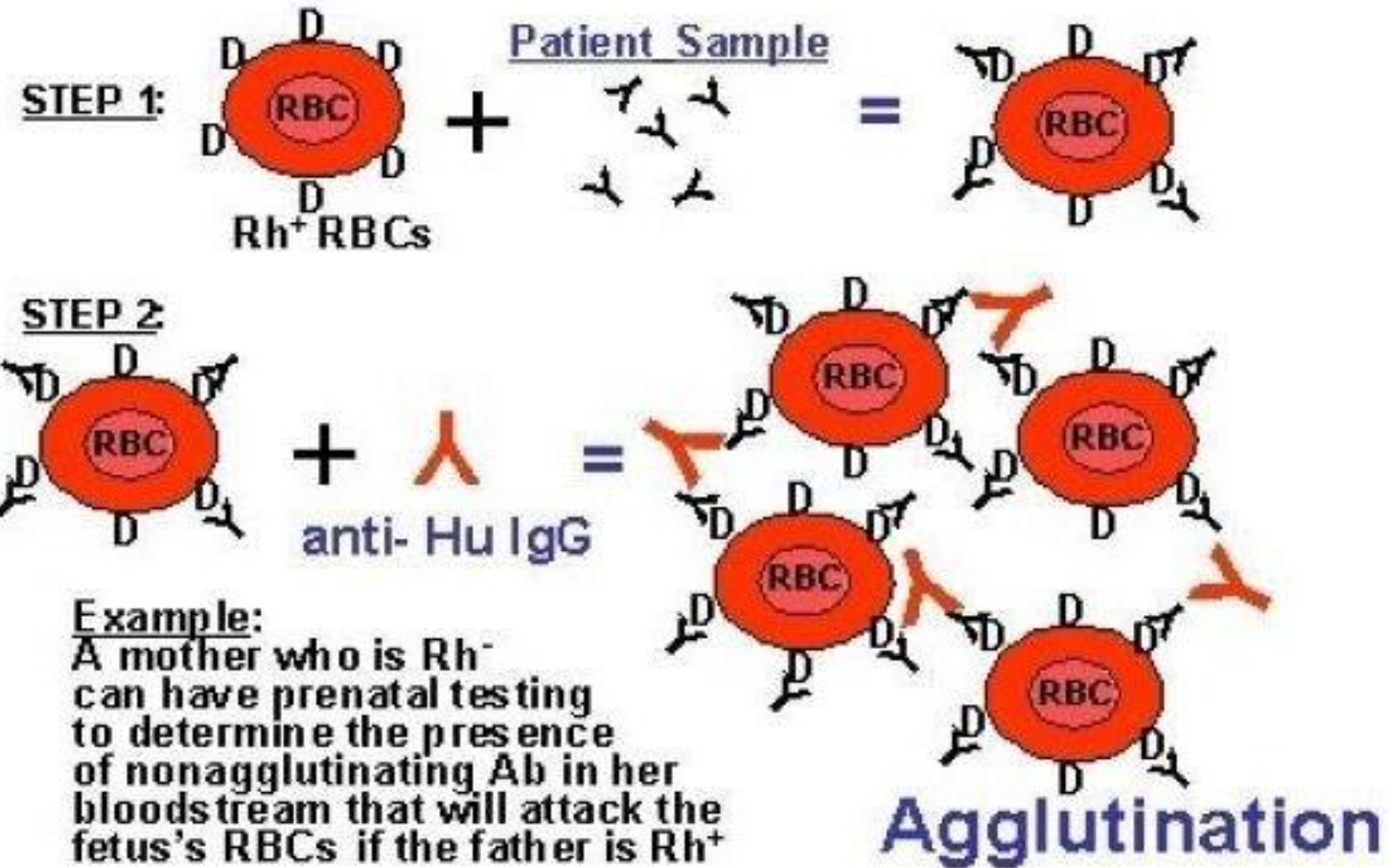
- ▶ نوزاد تازه متولد شده (که مادر وی خون Rh منفی دارد) ممکن است نیاز به آزمایش Coombs مستقیم داشته باشد تا بتوان آنتی بادی های تولید شده علیه گلبول های قرمز کودک را بررسی کرد. در صورت مثبت بودن آزمایش، ممکن است کودک برای جلوگیری از کم خونی نیاز به انتقال خون با خون سازگار داشته باشد .

تست Coombs غیر مستقیم

➤ آزمایش غیرمستقیم Coombs آنتی بادی های خاصی را پیدا می کند که در قسمت مایع خون (سرم) قرار دارند. این آنتی بادی ها می توانند به گلبول های قرمز خون حمله کنند اما به گلبول های قرمز وصل می شوند. آزمایش غیرمستقیم Coombs معمولاً برای یافتن آنتی بادی در خون گیرنده یا اهدا کننده قبل از تزریق انجام می شود.

➤ آزمایش برای تعیین این که آیا یک زن خون Rh مثبت یا Rh منفی تیترا آنتی بادی Rh دارد در اوایل بارداری انجام می شود. اگر او Rh منفی باشد، می توان برای محافظت از کودک اقداماتی انجام داد.

INDIRECT COOMB'S TEST



کاربرد آزمایش کومبس غیر مستقیم

- مادران Rh منفی که احتمالاً بر علیه آنتی ژن Rh حساس شده اند.
- آزمایش کراس مچ
- تشخیص آنتی ژن Rh Du
- تشخیص گروه های خونی Kell, Duffy, Kidd
- تشخیص آنتی بادی های ناقص یا مسدود کننده

کومبس غیرمستقیم

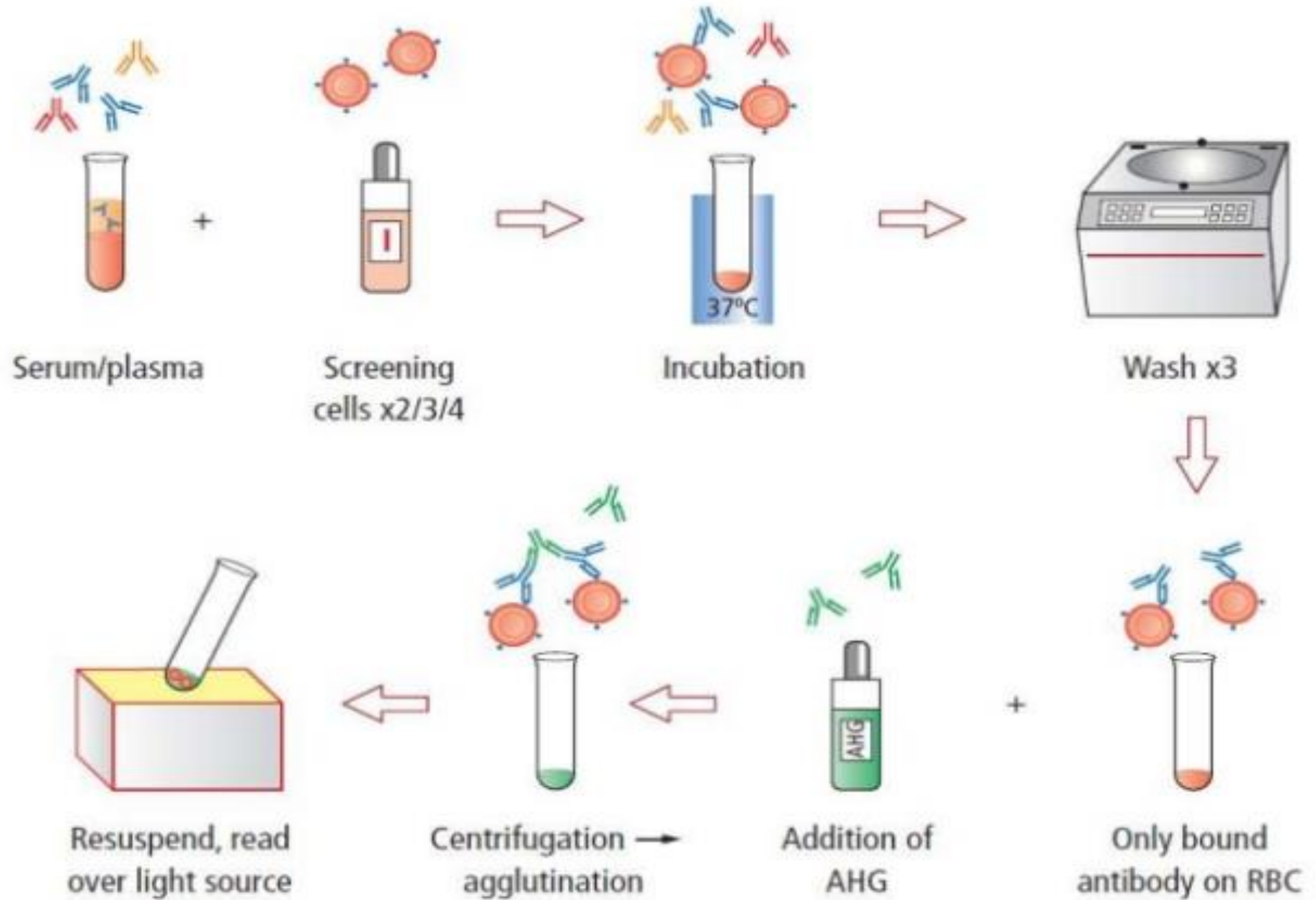
➤ از کومبس غیرمستقیم برای شناسای RBC حساس شده در محیط *In vitro* استفاده می‌شود. مرحله حساس شدن RBC ها در این روش توسط انکوباسیون انجام می‌شود. مراحل بعدی تقریبا مشابه کومبس مستقیم است. در این تست آنتی‌بادیهای ناقص، در خون مریض (مادر) وجود دارد. این آنتی‌بادیها به دو علت عمده ممکن است تولید شوند:

➤ ۱. انتقال خون

➤ ۲. زایمان اول

روش انجام تست کومبس غیرمستقیم

- ▶ ۰/۱ میلیتر از سرم بیمار را با ۰/۱ میلیتر از سوسپانسیون ۵ درصد گلبول قرمز O+ مخلوط می‌کنیم.
- ▶ سپس لوله آزمایش را به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌دهیم در این مرحله **RBC** در صورت وجود آنتی‌بادی ناقص در سرم، حساس خواهند شد.
- ▶ بعد از این مدت، لوله آزمایش را به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ می‌کنیم.
- ▶ سه بار توسط سرم فیزیولوژی شستشو می‌دهیم تا آنتی‌بادیهای غیراختصاصی حذف شوند و فقط آنتی‌بادیهای اختصاصی که به شاخصهای آنتی‌ژنی **RBC** چسبیده‌اند، باقی بمانند.
- ▶ بعد از این مراحل یک قطره **AHG** به لوله اضافه می‌کنیم.
- ▶ بعد از ۳ تا ۵ دقیقه لوله را به مدت یک دقیقه در دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ می‌کنیم و در آخر هم با زدن ضربه‌ای ضعیف آگلوتیناسیون را بررسی می‌کنیم .



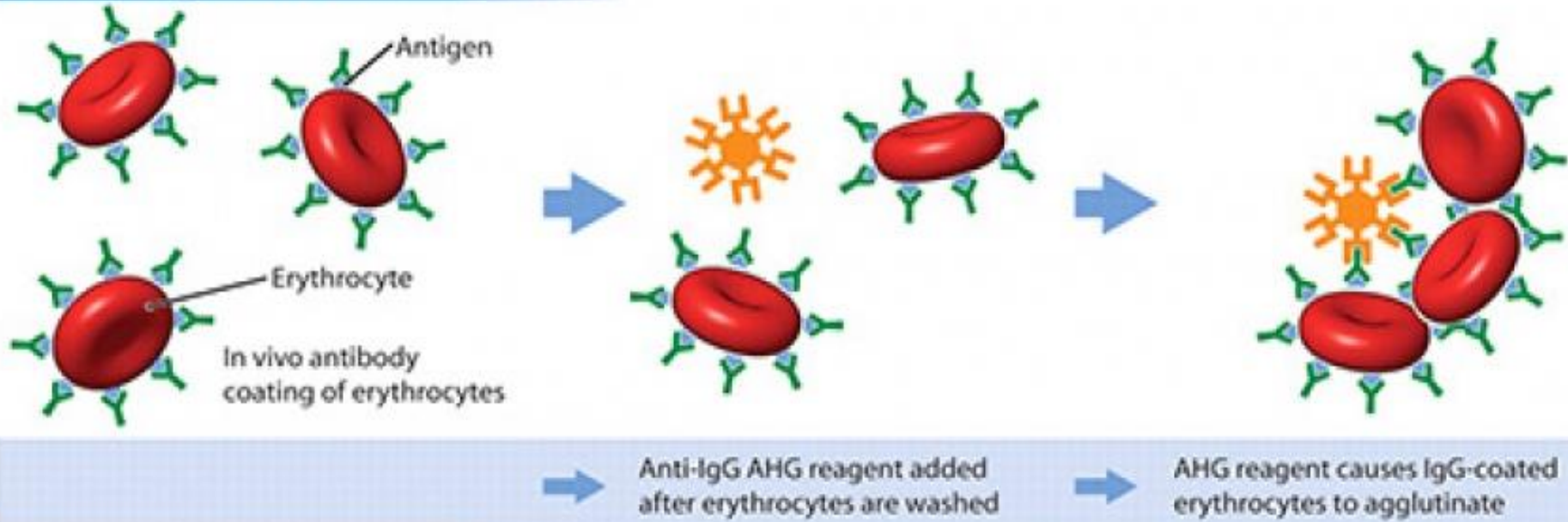
► برای بررسی وجود و یا عدم وجود این آنتی‌بادی، از سوسپانسیون ۵ درصد RBC ، گروه خونی O + استفاده می‌شود. چون آنتی‌بادیهای ناقص، شاخصهای آنتی‌ژن RBC های گروه خونی O + را حساس و با اضافه کردن AHG باعث ایجاد آگلوتیناسیون می‌شود.

► علت استفاده از O +

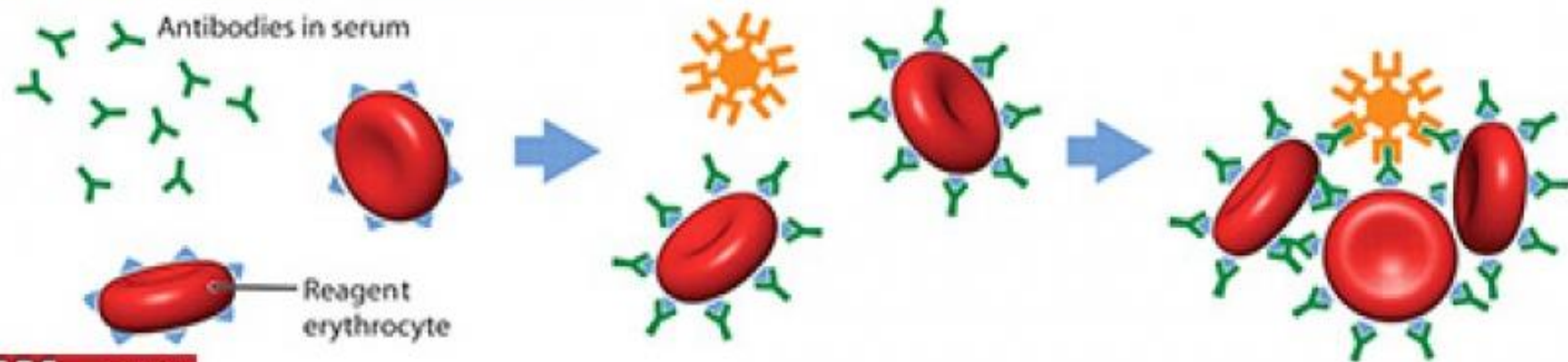
► برای اینکه ناسازگاری گروههای خونی ABO را از بین ببریم از این گروه خونی استفاده می‌کنیم چون اگر گروههای خونی A,B,AB استفاد شود، در این صورت ممکن است آنتی‌بادی ضد AB گروه خونی O باعث حساس شدن سوسپانسیون شود .

► و علت اینکه از RH + استفاده می‌کنیم این است که می‌خواهیم آنتی‌بادیهای ناقص بر روی آنتی‌ژنهای RH + بشیند و بتوانیم آگلوتیناسیون را مشاهده کنیم. اگر RH - باشد در روی RBC ، آنتی‌ژنی وجود نخواهد داشت تا RBC توسط آنتی‌بادی حساس شود .

Direct Antiglobulin Test



Indirect Antiglobulin Test



روش تهیه سوسپانسیون ۵ درصد :

- ▶ ۲ قطره خون داخل لوله آزمایش می‌ریزیم. ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به لوله اضافه می‌کنیم و در سانتریفیوژ در دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار می‌دهیم سپس مایع رویی را خالی کرده و این کار را تا ۳ بار تکرار می‌کنیم.
- ▶ سپس ۰/۱ سی سی از گلبول شسته شده و ۱/۹ سی سی سرم فیزیولوژی مخلوط می‌کنیم.

بررسی نتایج

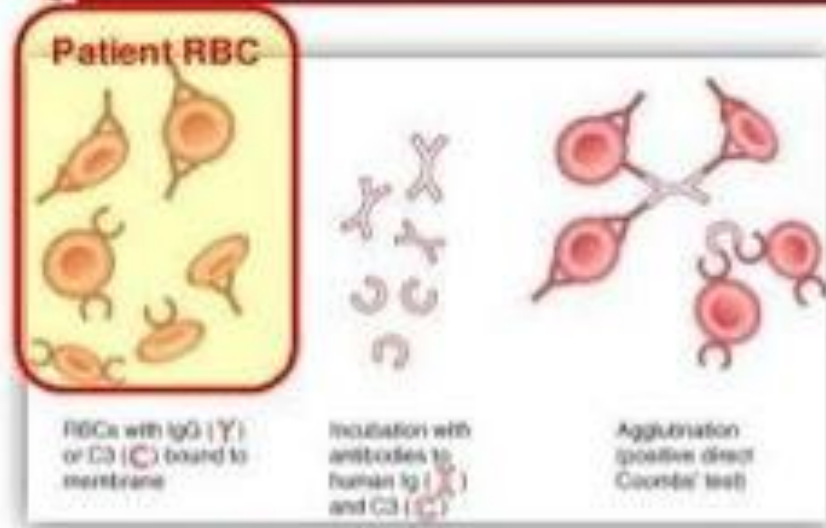
اگر آگلوتیناسیون مشاهده شود تست کومبس غیرمستقیم بیمار را مثبت گزارش می‌کنیم.

چند نکته:

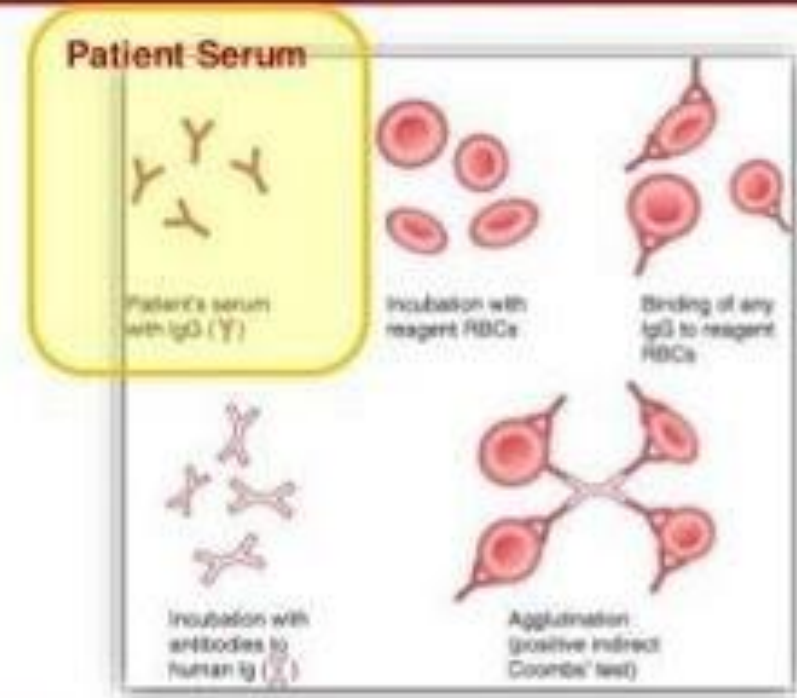
- ۱- قبل از انکوبه با اضافه کردن دو قطره آلبومین می‌توان آگلوتیناسیون را بهتر بررسی کرد .
- ۲- اگر بعد از انکوبه، آگلوتیناسیون مشاهده شود نشان دهنده این نکته است که در سرم ما آنتی‌بادی کامل وجود دارد و در واقع **Back Type** را انجام داده‌ایم .
- ۳- برای بررسی آگلوتیناسیون بهتر است از میکروسکوپ استفاده کنیم .



AIHA: Lab diagnosis – Coombs test.



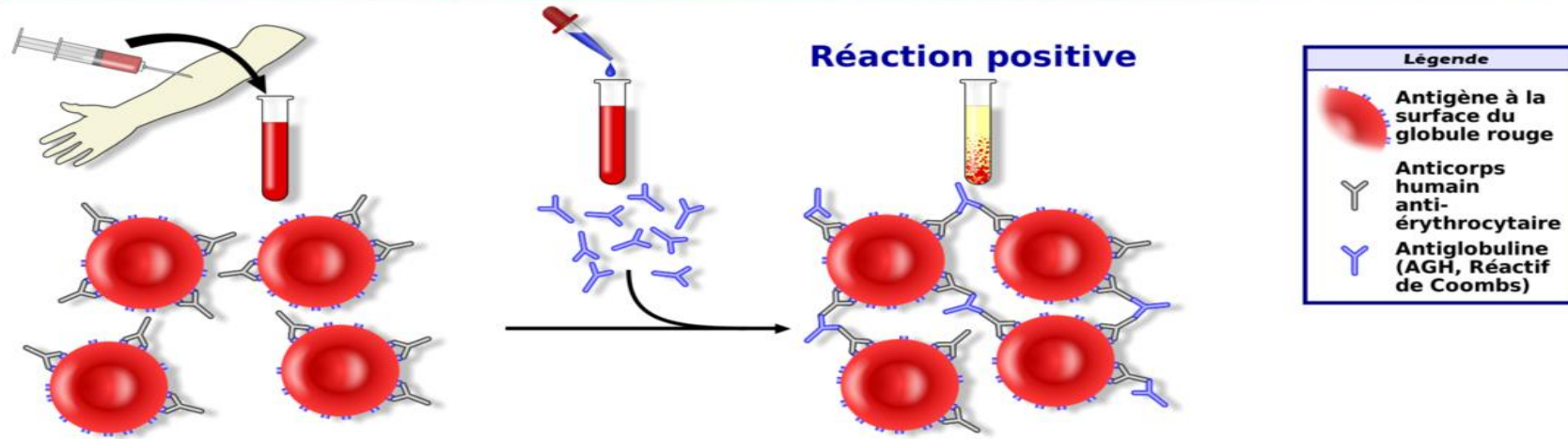
Direct Coombs Test:
(for antigen on patient RBC)



Indirect Coombs Test:
(for antibodies in the serum.)



Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline

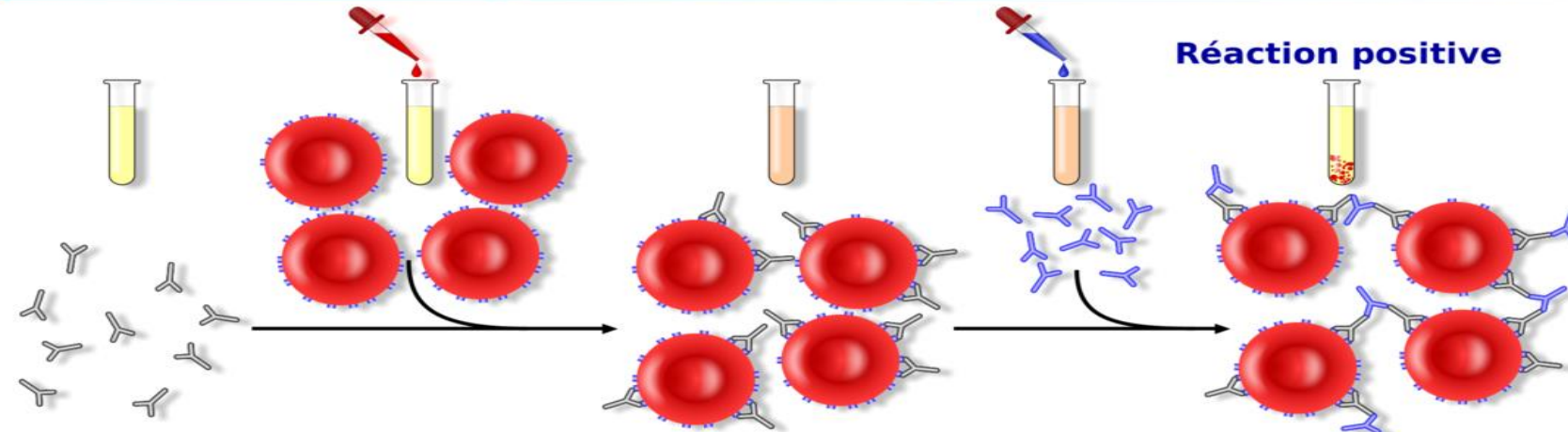


Globules rouges sensibilisés (GRS), chez un patient ayant une anémie hémolytique immunologique. Anticorps humains fixés aux antigènes des globules.

Ajout de l'antiglobuline aux GRS lavés.

Agglutination : Ponts formés par l'antiglobuline fixée aux anticorps humains.

Test de Coombs indirect / Test indirect à l'antiglobuline



Anticorps d'un sérum humain reconnaissant un antigène érythrocytaire.

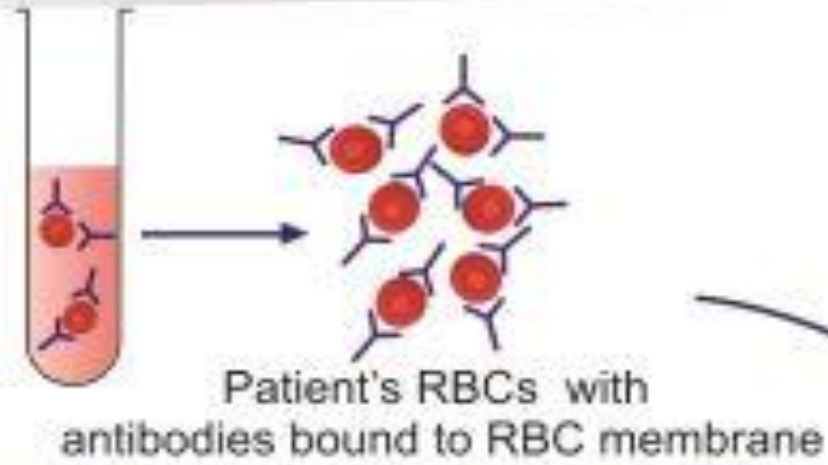
Incubation des globules dans le sérum humain.

Complexes antigène-anticorps à la surface des globules (GRS)

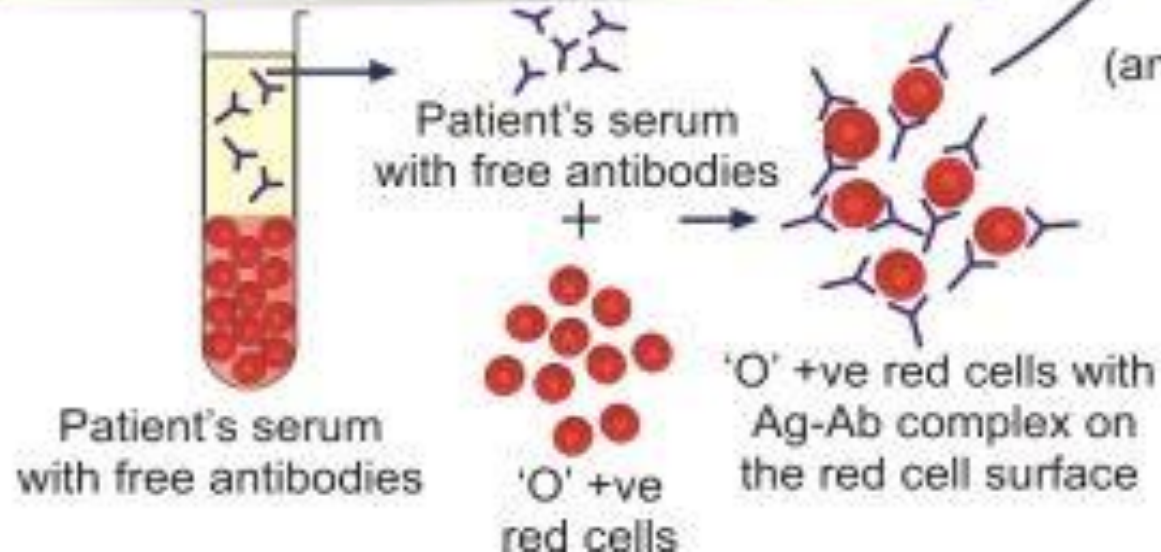
Ajout de l'AGH après lavage des GRS.

Agglutination car les globules rouges sont sensibilisés.

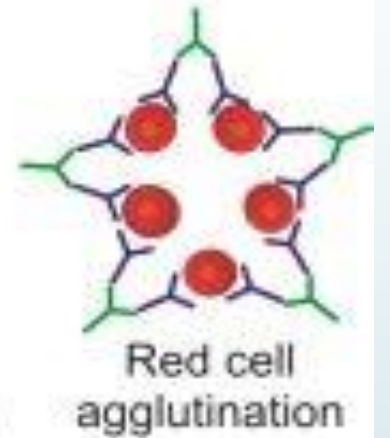
Direct antiglobulin test (DAT) (Coombs test)



Indirect (Coombs) antiglobulin test—IAT



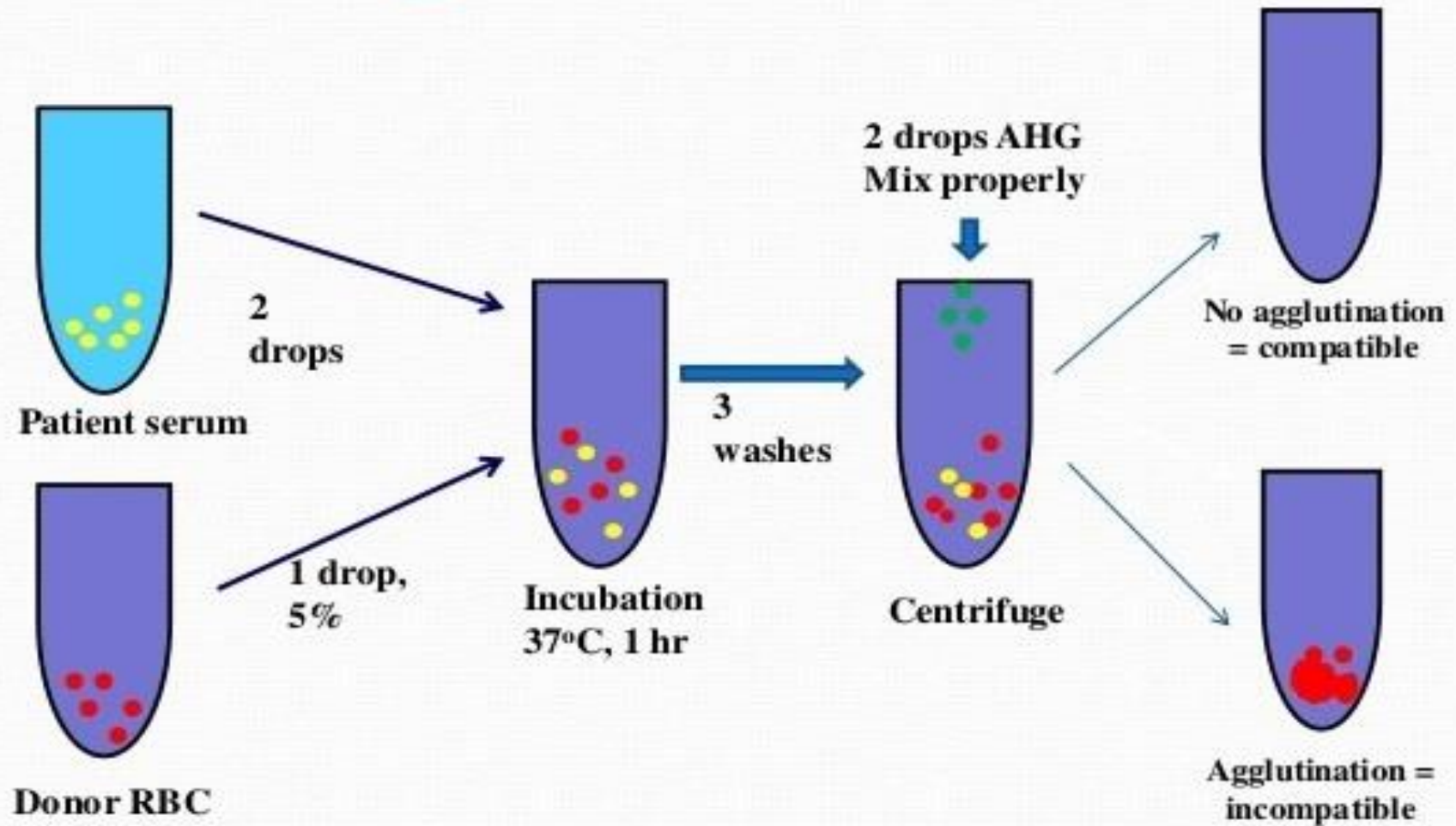
+ Coombs serum (antibodies to human globulin)



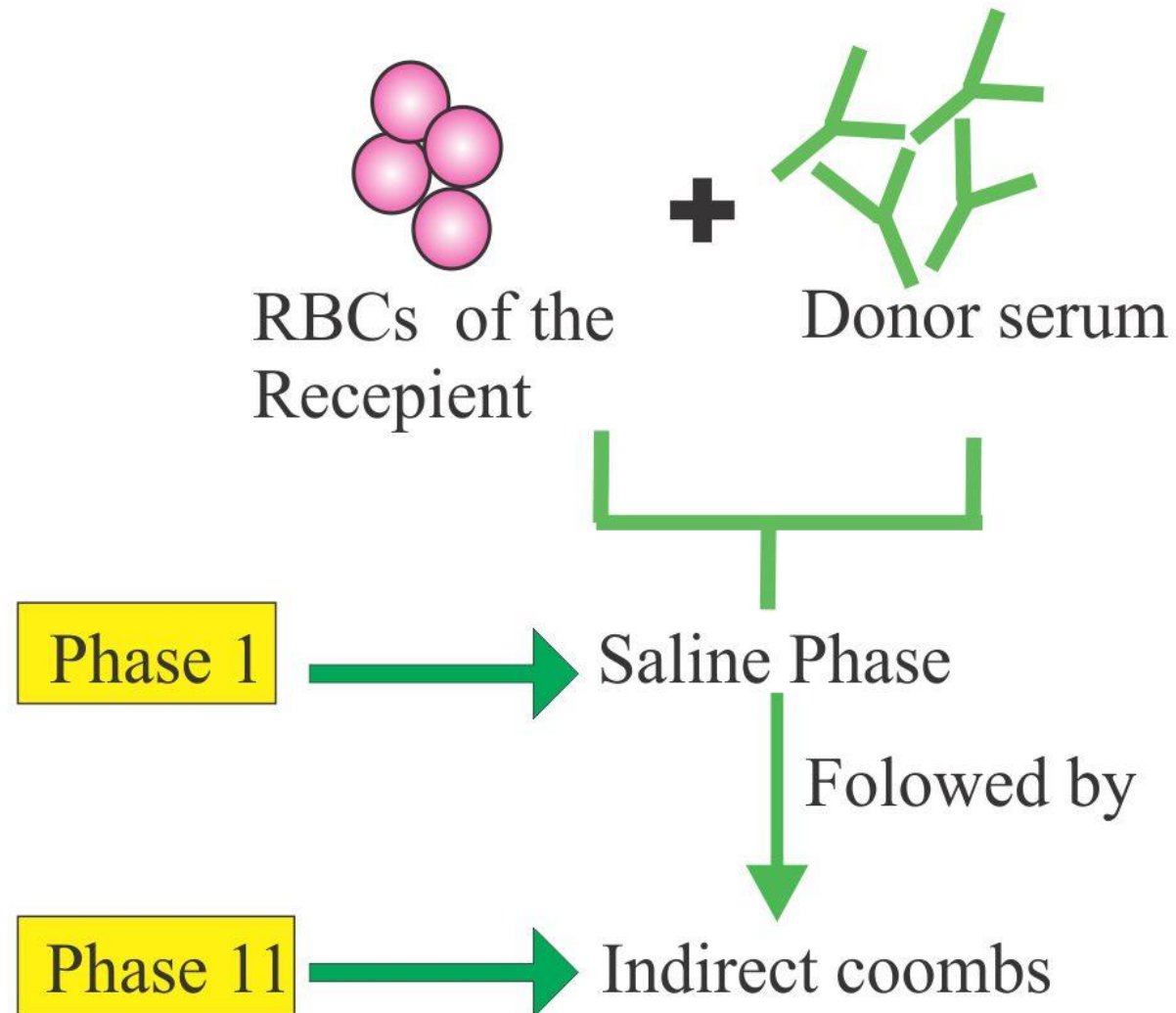
- Some incomplete antibodies will not react in a saline environment.
- Potentiators are reagents that adjust the test environment.
 - Reduce the **zeta potential**
 - Promote agglutination
 - Enhance antibody uptake

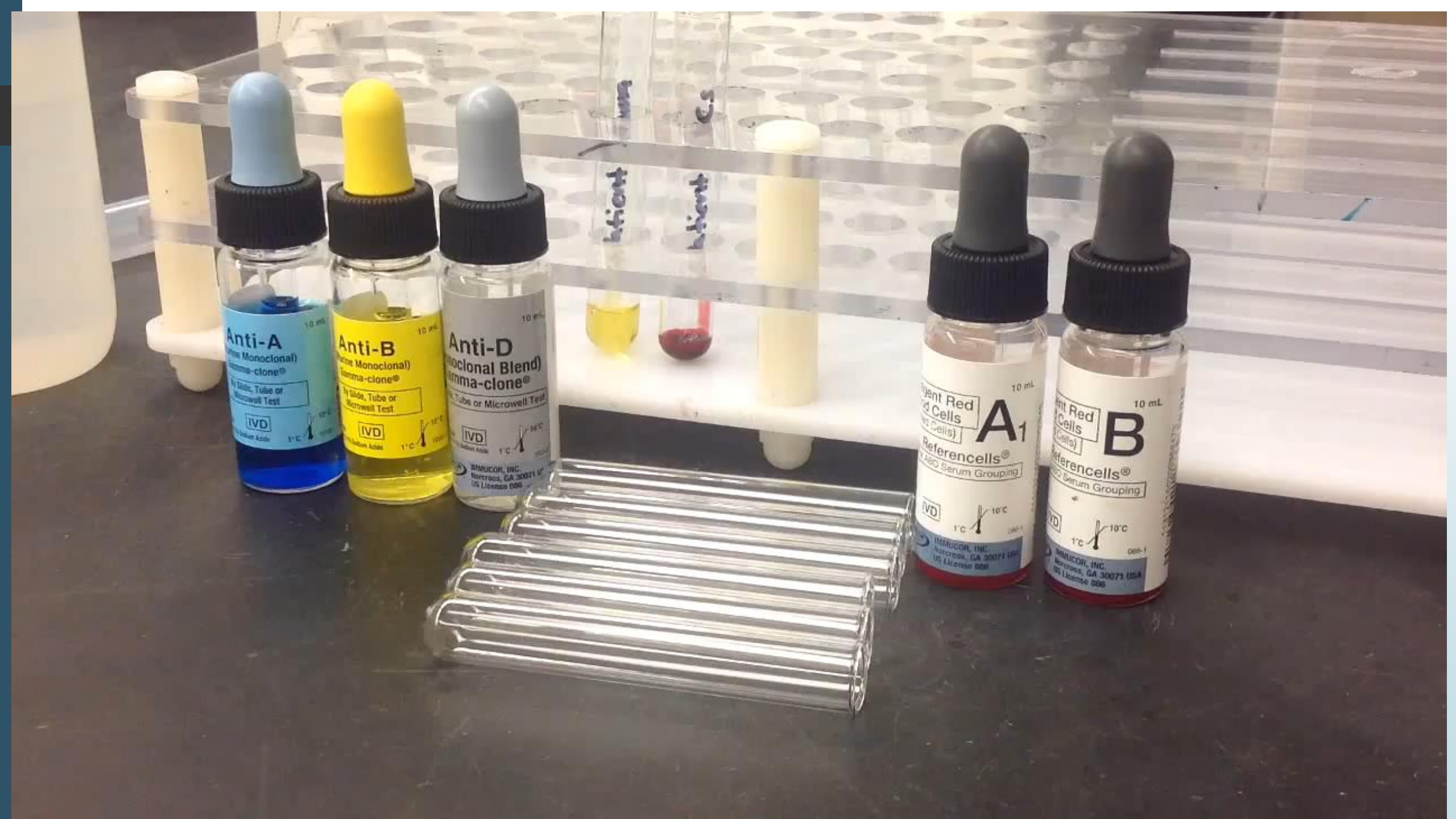


Major Cross-Match



Minor blood cross match





10 mL
Anti-A
(Monoclonal)
Gamma-clone®
By Slide, Tube or
Microwell Test
IVD
1°C

10 mL
Anti-B
(Monoclonal)
Gamma-clone®
By Slide, Tube or
Microwell Test
IVD
1°C

10 mL
Anti-D
(Monoclonal Blend)
Gamma-clone®
By Tube or Microwell Test
IVD
1°C

10 mL
Referencel Cells
A1
Referencel Cells®
ABO Serum Grouping
IVD
1°C 10°C

10 mL
Referencel Cells
B
Referencel Cells®
ABO Serum Grouping
IVD
1°C 10°C

10 mL
BANCOR, INC.
Norcross, GA 30071 USA
US License 086

10 mL
BANCOR, INC.
Norcross, GA 30071 USA
US License 086

A large, dramatic, white cumulonimbus cloud formation dominates the sky, appearing to billow and spread across the horizon. The cloud has a textured, cauliflower-like appearance with various shades of white and light grey. Below the cloud, a rural landscape is visible, featuring a large, light-colored barn with a dark roof on the left, and several smaller buildings and houses scattered across a green field. The sky above the cloud is a deep, clear blue.

THANK YOU