

συμβατότητα



- 13.1 Συμβατότητα
- 13.2 Άμεση επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης
- 13.3 Έμμεση μη επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης
- 13.4 Δοκιμασίες COOMBS
 - 13.4.1 Άμεση δοκιμασία COOMBS
 - 13.4.2 Έμμεση δοκιμασία COOMBS

Όταν ολοκληρωθεί αυτή η ενότητα θα έχεις τη δυνατότητα:

- ✓ *να οργανώνεις τον τρόπο εκτέλεσης των τεχνικών συμβατότητας.*
- ✓ *να επιλέγεις τα απαραίτητα υλικά και σκεύη για την εκτέλεση των τεχνικών συμβατότητας.*
- ✓ *να εκτελείς με ασφάλεια, επιτυχία και αξιοπιστία τις τεχνικές συμβατότητας.*
- ✓ *να συγκρίνεις τα αποτελέσματα των τεχνικών και να διερευνάς τα ασύμβατα στοιχεία για μια μετάγγιση.*
- ✓ *να διατηρείς τον εργαστηριακό χώρο καθαρό.*



Αν συναντήσεις λέξεις που δε γνωρίζεις τη σημασία τους, ψάξε πρώτα στο λεξιλόγιο και μετά ρώτησε τον καθηγητή σου.

13.1. Συμβατότητα

Η ιστορία της μετάγγισης του αίματος είναι τόσο παλιά όσο και η Ιατρική. Οι άνθρωποι πίστευαν ότι το αίμα είναι η κατοικία της ψυχής και των αρετών. Οι αναγεννητικές του ιδιότητες το έκαναν μυστηριακό και προκάλεσαν τη δημιουργία μύθων.

Πρώτος ο γιατρός Philip Syng Physiks μετάγγισε αίμα από άνθρωπο σε άνθρωπο.

- **Τι σημαίνει συμβατότητα;**

Στις μεταγγίσεις, όπως και στις μεταμοσχεύσεις, κατά τις οποίες ιστός ενός ανθρώπου εισάγεται σε άλλο άνθρωπο, είναι απαραίτητο να εξασφαλιστούν οι προϋποθέσεις, ώστε ο εισερχόμενος ιστός να γίνει αποδεκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα του δέκτη (ή λήπτη). Αυτό σημαίνει ότι ο δότης με το λήπτη θα πρέπει να έχουν **ανοσολογική συγγένεια**, δηλαδή όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ομοιότητα ή ταυτότητα των σπουδαιότερων κυτταρικών αντιγόνων. Τότε η μεταμόσχευση ή η μετάγγιση είναι **συμβατή**.

- **Πώς ελέγχεται η συμβατότητα;**

Το όφελος από τη χορήγηση αίματος είναι μεγάλο. Οι υποχρεωτικές προεργασίες πριν από τη μετάγγιση ακολουθούν θεμελιώδεις κανόνες, ώστε τα αποτελέσματα των δοκιμασιών να είναι αξιόπιστα. Οι προεργασίες αυτές λέγονται **τεχνικές ελέγχου συμβατότητας**. Σκοπός των αναλύσεων είναι να εντοπιστούν όσο το δυνατόν περισσότερα πιθανά ασύμβατα στοιχεία τα οποία θα προκαλέσουν επικίνδυνες για τη ζωή του ασθενούς παρενέργειες.

- **Αν ξέρουμε τις ομάδες αίματος δότη και δέκτη γιατί χρειάζεται να γίνει ο έλεγχος συμβατότητας;**

Τα ασύμβατα στοιχεία μπορεί να προέρχονται είτε από την παρουσία πλήρων ή ατελών αντισωμάτων των συστημάτων ABO, Rhesus κ.α. είτε από την παρουσία μιας υποομάδας ή από λανθασμένο καθορισμό της ομάδας αίματος του δέκτη και του δότη.

Αν υπάρχουν αντισώματα στον ορό του δέκτη τα οποία στρέφονται εναντίον των αντιγόνων του δότη, θα καταστρέψουν τα εισερχόμενα ερυθροκύτταρα. Εμείς στο εργαστήριο (in vitro) πρέπει να ελέγξουμε την ύπαρξή των αντισωμάτων αυτών για να προλάβουμε την καταστροφή τους.

Για το σκοπό αυτό γίνεται ανάμειξη των ερυθρών αιμοσφαιρίων του δότη με τον ορό του δέκτη. Γίνεται δηλαδή "μία δοκιμαστική μετάγγιση σε σωληνάκια". Το 1940 ο ερευνητής Moss εφάρμοσε πρώτος τη δοκιμασία συμβατότητας πριν από τη μετάγγιση. Ο αντισφαιρινικός ορός που χρησιμοποίησε περιέχει αντισώματα ικανά να δεσμεύουν όλες τις σφαιρίνες του ανθρώπου.

- **Ποιες είναι οι τεχνικές διασταύρωσης;**

Υπάρχουν δύο τεχνικές δοκιμασίες διασταύρωσης. Η **άμεση** και η **έμμεση**.



Για να εκτελεστούν πρέπει προηγουμένως να γίνει μια επεξεργασία των ερυθροκυττάρων του δότη. Αναζητήσε σε προηγούμενη διδακτική ενότητα τη *βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των αιμοσφαιρίων* και τη *βοηθητική τεχνική για την παρασκευή του εναιωρήματος των ερυθροκυττάρων*.

13.2. Άμεση επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης

- **Πότε γίνεται η Άμεση Επείγουσα Δοκιμασία Διασταύρωσης;**

Υπάρχουν περιπτώσεις κατά τις οποίες απαιτείται να χορηγηθεί όσο το δυνατόν γρηγορότερα μονάδα αίματος σε κάποιον ασθενή. Στόχος του εργαστηρίου είναι, μέσα σε ελάχιστο χρόνο, σε δείγμα αίματος του ασθενούς και του δότη:

α. Να προσδιορίσει την **ομάδα αίματος** των συστημάτων **ABO** και **Rhesus**.

β. Να διερευνήσει τη **συμβατότητα** του αίματος του **δότη** με το αίμα του **δέκτη**.

Γρήγορα οργανώνονται οι τεχνικές διαδικασίες ελέγχου

συμβατότητας και πραγματοποιείται η τεχνική της διασταύρωσης, ταυτόχρονα σε διαφορετικά δοκιμαστικά σωληνάρια.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζεται ο **ορός** του **δέκτη** στον οποίο πιθανώς υπάρχουν ασύμβατα αντισώματα.



Ο ορός πρέπει να έχει διαχωριστεί από πρόσφατο δείγμα αίματος.



Ο ορός πρέπει να μην είναι αιμολυμένος.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Εναιώρημα πλυμένων ερυθρών του δότη, 5% σε NaCl 0.9%.



Το δείγμα πρέπει να είναι πρόσφατο για να είναι ισχυρή η ανοσολογική έκφραση.



Αν χρησιμοποιηθεί αντιπηκτικό, καλό είναι να επιλέγεται το EDTA για να μη δραστηριοποιείται το συμπλήρωμα.



Το πλύσιμο των ερυθρών πρέπει να είναι σχολαστικό για να μην προκύψουν πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.



Να μην τροποποιούμε αυθαίρετα την πυκνότητα του εναιωρήματος για να μην προκύψουν πλασματικά αρνητικές συγκολλήσεις.

2. Φυσιολογικός ορός NaCl 0.9% .

3. Διάλυμα λευκωματίνης 22%: Η λευκωματίνη ισχυροποιεί την αντιγονική έκφραση.



Η πυκνότητα της λευκωματίνης δεν πρέπει να τροποποιείται για να μην προκύψουν πλασματικά θετικές συγκολλήσεις.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- | | |
|-----------------------|---|
| 🔔 υδατόλουτρο 37 °C | 🔔 γάντια, στυλίδ |
| 🔔 επιτραπ. χρονόμετρο | 🔔 αυτοκόλλητες ετικέτες |
| 🔔 φυγόκεντρος | 🔔 δοκιμαστικά σωληνάρια |
| 🔔 μικροσκόπιο | 🔔 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων (στατώ) |

- 🔔 σιφώνια Pasteur
- 🔔 αντικειμενοφόρος πλάκα
- 🔔 καλυπτρίδα
- 🔔 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια, τις καλυπτρίδες και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με ευκρίνεια επάνω σε τρεις αυτοκόλλητες ετικέτες τα στοιχεία του ασθενή (ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο), όπως αυτά αναγράφονται στο αρχικό σωληνάριο συλλογής του δείγματος. Σημειώνουμε επίσης από ένα νούμερο 1, 2, 3 και τις επικολληούμε σε τρία δοκιμαστικά σωληνάρια.



Υπενθυμίζουμε:

Τα δοκιμαστικά σωληνάρια πρέπει να είναι απολύτως καθαρά.

2. Τοποθετούμε σε κάθε σωληνάριο τα υλικά, όπως αυτά αναγράφονται στον πίνακα:

ΔΕΙΓΜΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΕ ΣΤΑΓΟΝΕΣ	1	2	3
ορός δέκτη	3	3	3
εναιώρημα ερυθρών	3	3	3
πλευκωματίνη	-	-	3

Πίνακας 13.1: Αναλογίες αντιδραστηρίων και δείγματος



Η παράλειψη ή η λανθασμένη τοποθέτηση των υλικών θα οδηγήσει σε αναξιόπιστα αποτελέσματα.

3. Τηνούμε τις παρακάτω συνθήκες:

ΣΩΛΗΝΑΡΙΟ	ΣΥΝΘΗΚΗ
1 _ο	Παραμονή στους 22 °C για 15 λεπτά.
2 _ο	Επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά.
3 _ο	Επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά.

Πίνακας 13.2: Συνθήκες επώασης

4. Φυγοκεντρούμε και τα τρία σωληνάρια στις 1000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

5. Ελέγχουμε αν έγινε ή δεν έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων.

6. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

7. Μεταφέρουμε με διαφορετικά σιφώνια Pasteur μία σταγόνα από κάθε σωληνάριο επάνω σε αντικειμενοφόρο πηλίκιο και όλες τις σταγόνες τις απλώνουμε σε παράλληλες γραμμές. Για τη δημιουργία λεπτότερης στοιβάδας ερυθροκυττάρων χρησιμοποιούμε καθυπρίδα.

8. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση συγκόλλησης ή μη συγκόλλησης. Αρχικά η παρατήρηση γίνεται με τον αντικειμενικό φακό 10X και στη συνέχεια με τον αντικειμενικό φακό 40X.

Εφόσον η διαδικασία δώσει αρνητικό αποτέλεσμα, το αίμα του δότη χαρακτηρίζεται ως συμβατό με το αίμα του ασθενή και γίνεται η μετάγγιση σύμφωνα με την ομάδα αίματός του.

Στο εργαστήριο πραγματοποιείται η τεχνική της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης χωρίς περικοπές στα στάδια της διαδικασίας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. Θετικό: Έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως **ασυμβατότητα**.

Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, αν μεταγγισθεί μονάδα αίματος από το συγκεκριμένο δότη προς τον ασθενή, τότε τα ερυθροκύτταρα του δότη θα συγκολληθούν από τα υπάρχοντα αντι – ερυθροκυτταρικά αντισώματα.

Αυτό θα επιφέρει πολλούς επικίνδυνες για τη ζωή του δέκτη επιπλοκές και είναι αντίθετο με το στόχο της μεταγγισιοθεραπείας. Γι αυτό **η μετάγγιση είναι ασύμβατη**.

β. Αρνητικό: Δεν έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται **ως συμβατότητα**.

Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος ο δέκτης δεν έχει αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα για να συγκολληθούν τα ερυθροκύτταρα του δέκτη. Άρα **η μετάγγιση είναι συμβατή**.

13.3. Έμμεση μη επείγουσα δοκιμασία διασταύρωσης

Είναι μία διεξοδική ανίχνευση των περισσότερων ασύμβατων στοιχείων στον ορό του ασθενή τα οποία μπορεί να αντιδράσουν με το αίμα του δότη, ολοκληρώνεται σε τρεις φάσεις

- ▶ **Πρώτη φάση.** Κατά τη φάση αυτή (αρχική ή ψυχρή φάση) εξακριβώνονται κυρίως τα ψυχρά αντισώματα ελέγχοντας τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης μεταξύ των ερυθροκυττάρων του δότη από τον ορό του δέκτη σε θερμοκρασία δωματίου (22°C).
- ▶ **Δεύτερη φάση.** Γίνεται έλεγχος για αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων του δότη από τον ορό του δέκτη παρουσία θερμοκρασίας 37°C (φάση θερμοκρασίας). Με τις συνθήκες αυτές εξακριβώνονται τα περισσότερα είδη των πλήρων αντισωμάτων όπως τα αντι – D, αντι – E, αντι – C, της κατηγορίας των IgM.
- ▶ **Τρίτη φάση.** Τα ερυθροκύτταρα έρχονται σε επαφή με τον αντισφαιρινικό ορό. Η φάση αυτή (θερμή φάση) είναι πολύτιμη, γιατί επιβεβαιώνει την παρουσία ή μη όσων αντισωμάτων προσδιορίστηκαν κατά τις προηγούμενες φάσεις και επιπλέον ανιχνεύει τα ατελή αντισώματα. Παρ' όλη αυτά όμως δεν είναι δυνατό να ελεγχθούν όλα τα ασύμβατα στοιχεία.

Παράλληλα γίνεται επανέλεγχος των ομάδων αίματος του συστήματος ABO και του συστήματος RHESUS του δέκτη και του δότη.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό από τον δέκτη.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Ο ορός πρέπει να έχει διαχωριστεί από πρόσφατο δείγμα αίματος.

Ο ορός πρέπει να μην είναι αιμολυμένος.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- 🔧 φυγόκεντρος
- 🔧 γάντια
- 🔧 υδατόηουτρο
- 🔧 στυλός
- 🔧 επιτραπέζιο
- 🔧 αυτοκόλλητη ετικέτα
- 🔧 χρονόμετρο
- 🔧 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 🔧 δοκιμαστικό σωληνάριο
- 🔧 σιφώνια Pasteur
- 🔧 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Εναιώρημα ερυθροκυττάρων του δότη, 5% σε NaCl 0.9%

2. Φυσιολογικός ορός 0.9% NaCl: Βοηθά στο να ανιχνευτούν τα πλήρη αντισώματα, γιατί γίνεται πιο ισχυρή η ικανότητα της πλήρους σύνδεσης τους με τα αντιγόνα, σε θερμοκρασία δωματίου. Παρά την ιοντική δύναμη της λευκωματίνης που χρησιμοποιείται στη δεύτερη φάση, η αναγνώριση των αντιγόνων χρειάζεται απαραίτητα την παρουσία του NaCl.

3. Λευκωματίνη 22%: Βοηθά στο να ανιχνευτούν τα ατελή ή πλήρη αντισώματα, κυρίως εναντίον των αντιγόνων του συστήματος Kell και σπανιότερα του Rhesus.

4. Αντισφαιρινικός ορός (αντι – αντίσωμα): Είναι αντίσωμα που φτιάχνεται από άηλους ζωικούς οργανισμούς εναντίον των ανθρώπινων αντισωμάτων. Βοηθά στην ανίχνευση ποσίων και διαφορετικών αντισωμάτων των συστημάτων Rhesus, Kell συνδέοντας τα ελεύθερα Fc τμήματα των IgG αντισωμάτων.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Η χρησιμοποίηση αντιδραστηρίων μετά την ημερομηνία λήξης θα δώσει αναξιόπιστα και επικίνδυνα για τη ζωή του εξεταζόμενου αποτελέσματα.



Η ελλιπής επαναφορά της θερμοκρασίας των αντιδραστηρίων θα καθυστερήσει την ένωση αντιγόνου – αντισώματος.



Η ισχύς των αντιδραστηρίων πρέπει να ελέγχεται για να αποφευχθούν τα πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με ευκρίνεια επάνω σε αυτοκόλλητη ετικέτα τα στοιχεία του ασθενή όπως αυτά αναγράφονται στο αρχικό σωληνάριο συλλογής του δείγματος και είμαστε έτοιμοι για την πραγματοποίηση της πρώτης φάσης.

2. Βάζουμε μέσα 2 σταγόνες ορού του δέκτη.



Ο ορός πρέπει να είναι πρόσφατος και χωρίς αιμόλυση. Σε περίπτωση διαδοχικών μεταγγίσεων ζητάμε νέο δείγμα αίματος κάθε 48 ώρες.

3. Προσθέτουμε μία σταγόνα εναιωρήματος 5% ερυθρών του δότη σε φυσιολογικό ορό.

4. Αφήνουμε το μείγμα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($18^{\circ} - 25^{\circ}\text{C}$) για 30 λεπτά της ώρας. Με την επώαση θα ισχυροποιηθεί η έκφραση των πλήρων αντισωμάτων.



Αλλαγή στα θερμικά όρια και το χρόνο της επώασης δίνει πλαστά θετικά αποτελέσματα.

5. Φυγοκεντρούμε στις 1000στροφές / λεπτό για 2 λεπτά της ώρας.

6. Παρατηρούμε την όψη του υπερκείμενου υγρού για τη διαπίστωση δημιουργίας ή μη αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων.

7. Ανακινούμε το περιεχόμενο του σωληναρίου με απαλή χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.



Αν η ανακίνηση γίνει βίαια θα αποσυνδεθούν τα αντισώματα από τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα και οι ασθενείς συγκολλήσεις δε θα αξιολογηθούν με κίνδυνο να χαρακτηρισθεί το αποτέλεσμα ως αρνητικό.

8. Ελέγχουμε αν δημιουργήθηκε ή όχι συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Με αυτούς τους χειρισμούς ολοκληρώθηκε **η πρώτη φάση** της δοκιμασίας διασταύρωσης.

Σε περίπτωση **αρνητικών** αποτελεσμάτων (μη δημιουργία συγκόλλησης) συνεχίζουμε για την εκτέλεση της **δεύτερης φάσης**. Αρχικά:

9. Προσθέτουμε 3 σταγόνες λευκωματίνη.



Η ποσότητα της λευκωματίνης χρειάζεται να είναι ανάλογη με την ποσότητα του δείγματος γι' αυτό πρέπει να προσέξουμε να μην κατακρατηθεί στα τοιχώματα των σωληναρίων

10. Ανακινούμε απαλά για να αναμειχθούν τα υλικά.

11. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.



Η φυγοκέντρηση γίνεται, γιατί έτσι σταθεροποιείται το αντίσωμα επάνω στο αντιγόνο.

12. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **αιμόλυσης** των ερυθροκυττάρων.

13. Ανακινούμε το περιεχόμενο του σωληναρίου με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

14. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **συγκόλλησης** των ερυθροκυττάρων.

Αν δεν παρατηρηθεί ούτε αιμόλυση ούτε συγκόλληση των ερυθροκυττάρων, τότε:

15. Τοποθετούμε το σωληνάριο σε υδατόλουτρο 37°C για 30 – 60 λεπτά της ώρας.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Η θερμοκρασία ισχυροποιεί την ένωση αντιγόνου και αντισώματος.

16. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

17. Ελέγχουμε για αιμόλυση των ερυθροκυττάρων.

18. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης. Ελέγχουμε για συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Αν κατά το τελευταίο αυτό στάδιο της δεύτερη φάσης διασταύρωσης έχουμε **αρνητικό** αποτέλεσμα:

19. Πλένουμε τα ερυθρά 3 φορές με φυσιολογικό ορό 0,9% σε NaCl.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων απομακρύνει τα ελεύθερα αντισώματα. Αυτά, όταν υπάρχουν, δεσμεύουν τον αντισφαιρινικό ορό, και εμποδίζεται έτσι η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων, με επακόλουθο πλασματικό αρνητικό αποτέλεσμα.

20. Προσθέτουμε στο στεγνό ίζημα των ερυθροκυττάρων 2 σταγόνες πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού.

21. Ανακινούμε με απαλές κινήσεις για να αναμειχθούν τα υλικά.

22. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 2 λεπτά της ώρας.

23. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **αιμόλυσης** των ερυθροκυττάρων .

24. Ανακινούμε το περιεχόμενο του σωληναρίου με απαλή χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

25. Εξετάζουμε αν δημιουργήθηκε ή όχι **συγκόλληση** των ερυθροκυττάρων.

Για μεγαλύτερη αξιοπιστία στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και των τριών φάσεων συγκρίνουμε τα αποτελέσματα με θετικό και αρνητικό μάρτυρα.

Ο έλεγχος συμβατότητας μπορεί να γίνει και με τη μέθοδο των δύο σωληναρίων.

Η πορεία που ακολουθούμε είναι η εξής:

1. Σημειώνουμε με υαλογράφο στο πρώτο δοκιμαστικό σωληνάριο τον αριθμό 1 και στο δεύτερο σωληνάριο τον αριθμό 2.

2. Βάζουμε σε κάθε σωληνάριο 2 σταγόνες ορού του δέκτη και 2 σταγόνες εναιωρήματος ερυθροκυττάρων του δότη.

3. Προσθέτουμε μόνο στο δεύτερο σωληνάριο 2 σταγόνες λευκωματίνης.



Η ποσότητα της λευκωματίνης χρειάζεται να είναι ανάλογη με την ποσότητα του δείγματος, γι' αυτό πρέπει να προσέξουμε να μην κατακρατηθεί στα τοιχώματα των σωληναρίων.

4. Ανακινούμε τα σωληνάρια για να αναμειχθούν τα υλικά.

5. α. Φυγοκεντρούμε το πρώτο σωληνάριο στις 1500 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά της ώρας.

β. Τοποθετούμε το δεύτερο σωληνάριο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C για 30 λεπτά της ώρας και ύστερα το φυγοκεντρούμε στις 1500 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.



Αλλαγή στα θερμικά όρια και το χρόνο της επώασης δίνει πλαστά θετικά αποτελέσματα.

6. Εξετάζουμε μακροσκοπικά και μικροσκοπικά αν δημιουργήθηκε ή όχι αιμόλυση ή συγκόλληση.

Αν το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** τότε:

7. Πλένουμε τα ερυθρά αιμοσφαίρια του σωληναρίου Νο 2 με φυσιολογικό ορό, τουλάχιστον 3 φορές και απομακρύνουμε κάθε ίχνος υπερκείμενου.



ΠΡΟΣΟΧΗ !

Το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων απομακρύνει τα ελεύθερα αντισώματα. Αυτά, όταν υπάρχουν, δεσμεύουν τον αντισφαιρινικό ορό και εμποδίζεται έτσι η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με επακόλουθο πλασματικό αρνητικό αποτέλεσμα.

8. Προσθέτουμε 3 σταγόνες αντισφαιρινικό ορό.

9. Ανακινούμε για να αναμειχθούν και φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

10. Εξετάζουμε μακροσκοπικά και μικροσκοπικά αν δημιουργήθηκε ή όχι αιμόλυση ή συγκόλληση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. Θετικό: Έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως **ασυμβατότητα**.

β. Αρνητικό: Δεν έγινε αιμόλυση ή συγκόλληση των ερυθροκυττάρων και το αποτέλεσμα εκφράζεται ως **συμβατότητα**.

Σε περίπτωση **θετικού** αποτελέσματος, αν μεταγγισθεί μονάδα αίματος από το συγκεκριμένο δότη προς τον ασθενή, τότε τα ερυθροκύτταρα του δότη θα συγκολληθούν από τα υπάρχοντα αντι – ερυθροκυτταρικά αυτά αντισώματα.

Αυτό όμως θα επιφέρει πολλές **επικίνδυνες επιπλοκές** για τη ζωή του δέκτη επιπλοκές και είναι αντίθετο με το στόχο της μεταγγισιοθεραπείας. Η μετάγγιση είναι ασύμβατη.

Σε περίπτωση **αρνητικού** αποτελέσματος ο δέκτης δεν έχει αντιερυθροκυτταρικά αντισώματα για να συγκολληθούν τα ερυθροκύτταρα του δέκτη. Άρα, **η μετάγγιση είναι συμβατή**.

Χρειάζεται μεγάλη προσοχή να μην εκληφθεί ως ασυμβατότητα το **φαινόμενο της διάταξης των ερυθροκυττάρων σε στήλες** (rouleaux).

Σε μια τέτοια περίπτωση είναι απαραίτητοι οι παρακάτω χειρισμοί:

- ▶ Φυγοκεντρούμε πάλι το σωληνάριο στις 1000 στροφές / λεπτό και για 1 λεπτό της ώρας.
- ▶ Προσθέτουμε 2 σταγόνες ισότονου διαλύματος NaCl και ανακινούμε για να αναμειχθούν.
- ▶ Φυγοκεντρούμε πάλι το σωληνάριο στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.
- ▶ Εξετάζουμε μακροσκοπικά αν δημιουργήθηκε ή όχι συγκόλληση των ερυθροκυττάρων.

Σε περίπτωση ασυμβατότητας **θα γίνει συγκόλληση** των ερυθροκυττάρων.

Σε περίπτωση διάταξης των ερυθροκυττάρων σε στήλες **δε θα γίνει συγκόλληση** των ερυθροκυττάρων.

13.4. Δοκιμασίες COOMBS

- **Για ποιο λόγο γίνονται;**

Οι κυριότερες παρενέργειες από μία μετάγγιση αίματος είναι οι λοιμώξεις και οι ανοσολογικές επιπλοκές. Αν υπάρχουν πάνω στα ερυθροκύτταρα του δότη προσκολλημένα ατελή αντισώματα ή αν βρίσκονται στον ορό του δέκτη και θα προσκολληθούν μετά τη μετάγγιση, μπορεί να δημιουργηθεί σοβαρή ανοσολογική επιπλοκή. Άρα, είναι σημαντικό να μπορούμε πριν από τη μετάγγιση να αποκαλύπτουμε την τυχόν παρουσία τέτοιων ατελών αντισωμάτων.

Στην ανακάλυψη των ατελών αντισωμάτων σημαντική βοήθεια προσφέρει η δοκιμασία Coombs. Πρώτος ο Coombs το 1945 αναζήτησε τα ατελή αντισώματα στα ερυθροκύτταρα και στον ορό του αίματος και γι' αυτό δόθηκε το όνομά του στη δοκιμασία.

- **Πώς αναζητούμε τα ατελή αντισώματα;**

Η αναζήτηση των αντισωμάτων γίνεται με δύο τεχνικές διαδικασίες την **άμεση** και την **έμμεση**. Και στις δύο απαιτείται η χρήση ενός ειδικού ορού του αντισφαιρινικού ορού. Ο αντισφαιρινικός ορός παρασκευάζεται από ευαισθητοποιημένο με ανθρώπινο ορό κουνέλι. Περιέχει πολλή και διαφορετικά αντισώματα εναντίον των ανθρώπινων αντισωμάτων (σφαιρινών) και λέγεται αντιανθρώπειος ορός ή αντι – γ – σφαιρινικός ορός ή αντιορός.

Το δείγμα πριν τη χρήση του χρειάζεται επεξεργασία.



Αναζήτησε τη βοηθητική τεχνική για το πλύσιμο των αιμοσφαιρίων και τη βοηθητική τεχνική για την παρασκευή του εναιωρήματος των ερυθροκυττάρων σε προηγούμενη διδακτική ενότητα.

13.4.1 Άμεση δοκιμασία COOMBS

- **Για ποιο λόγο κάνουμε αυτήν την τεχνική;**

Η τεχνική δίνει τη δυνατότητα να εντοπισθούν αντισώματα που **έχουν ήδη επικαλύψει** τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα (ευαισθητοποιημένα ερυθρά). Γι' αυτό το λόγο η αναζήτηση γίνεται σε δείγμα ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η χρησιμότητα της τεχνικής είναι μεγάλη για τη διάγνωση:

- ▶ Αυτοάνοσων αιμολυτικών αναιμιών,
- ▶ Αιμολυτικής νόσου των νεογνών,
- ▶ Επύκντων αιμολυτικών αναιμιών, π.χ. μετά τη μετάγγιση αίματος,
- ▶ Λεμφωμάτων,
- ▶ Επίδρασης χημικών ουσιών,
- ▶ Αιμολυτικής αντίδρασης μετά τη μετάγγιση κ.α.

Απαιτείται μεγάλη προσοχή κατά την εκτέλεση, γιατί πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και δίνουν πηασματικά θετικά (+) ή αρνητικά (-) αποτελέσματα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο αντισφαιρινικός ορός επειδή περιέχει αντισώματα εναντίον των σφαιρινών του ανθρώπου, έχει την ικανότητα να ενώνεται με τα αντισώματα που βρίσκονται ήδη προσκολλημένα στα ευαισθητοποιημένα ερυθροκύτταρα.

ΔΕΙΓΜΑ

Εναιώρημα πλυμένων ερυθροκυττάρων 5% σε NaCl 0.9%.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Το δείγμα πρέπει να είναι πρόσφατο για να είναι ισχυρή η έκφραση των ανοσολογικών στοιχείων. Διαφορετικά θα προκύψουν πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.



Το αντιπηκτικό επιλογής να είναι το EDTA για να μη γίνει προσκόλληση του συμπληρώματος.



Το πλύσιμο των ερυθρών πρέπει να είναι σχολαστικό για να απομακρυνθούν τα ελεύθερα IgG αντισώματα του ορού. Αυτά, όταν υπάρχουν, δεσμεύουν τον αντιγόνο και εμποδίζεται η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων. Σε αυτήν την περίπτωση τα αποτελέσματα θα είναι πλασματικά αρνητικά.



Δεν πρέπει να τροποποιούμε αυθαίρετα την πυκνότητα του εναιωρήματος για να αποφύγουμε τις πλασματικές αρνητικές συγκολλήσεις.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. **Αντισφαιρινικός ορός (πολυδύναμος):** Ο πολυδύναμος ορός έχει ευαισθησία για πολλὰ αντισώματα
2. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - IgA
3. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - IgG
4. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - IgM
5. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - C₃d
6. **Αντισφαιρινικός ορός μονοδύναμος:** Περιέχει μόνο αντι - C₃ ή C₄

Για εκπαιδευτικούς λόγους μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο πολυδύναμος αντισφαιρινικός ορός ή ένας μονοδύναμος αντι - IgG ορός.

Οι μονοδύναμοι ταυτοποιούν με ακρίβεια την προέλευση του αντισώματος.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Η χρησιμοποίηση αντιορών μετά την ημερομηνία λήξης, θα δώσει αναξιόπιστα και επικίνδυνα για τη ζωή του εξεταζόμενου αποτελέσματα.



Η ελλιπής επαναφορά της θερμοκρασίας των αντιορών θα καθυστερήσει την ένωση αντιγόνου – αντισώματος.



Η ισχύς των αντιορών πρέπει να ελέγχεται για να αποφευχθούν τα πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα.

ΟΡΓΑΝΑ, ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

- | | |
|--------------------------|----------------------------|
| 🔔 φυγόκεντρος | 🔔 γάντια |
| 🔔 μικροσκόπιο | 🔔 στυλή |
| 🔔 διαφανοσκόπιο | 🔔 αυτοκόλλητες ετικέτες |
| ή φωτεινή πηγή | 🔔 δοκιμαστικά σωληνάρια |
| 🔔 επιτραπέζιο χρονόμετρο | αιμοηύσεως |
| | 🔔 έδρανο στήριξης |
| | δοκιμαστικών σωληναρίων |
| | 🔔 σιφώνια Pasteur |
| | 🔔 αντικειμενοφόρες πλάκες |
| | 🔔 καλυπτρίδα |
| | 🔔 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα |
| | χλωρίνης 1:10 |



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια, τις καλυπτρίδες και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Σημειώνουμε με ευκρίνεια επάνω σε έξι αυτοκόλλητες ετικέτες τα στοιχεία του ασθενούς (ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο), όπως αυτά αναγράφονται στο αρχικό σωληνάριο συλλογής του αίματος και από μία ένδειξη: Πολυδύναμος, IgG, C₃d, C₄, IgA και IgM και τις επικολλούμε σε έξι δοκιμαστικά σωληνάρια αιμοηύσεως.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !!**

Η λανθασμένη καταχώριση των στοιχείων του ασθενούς βάζει σε κίνδυνο τη ζωή του.

2. Βάζουμε δύο σταγόνες εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων στη βάση κάθε σωληναρίου.

**ΠΡΟΣΟΧΗ!**

Η ποσότητα του δείγματος χρειάζεται να είναι ανάλογη με την ποσότητα των αντιδραστηρίων γι' αυτό πρέπει να προσέξουμε να μη κατακρατηθεί στα τοιχώματα των σωληναρίων.

3. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 15 δευτερόλεπτα της ώρας.

**ΠΡΟΣΟΧΗ!**

Τηρούμε με ακρίβεια τις συνθήκες φυγοκέντρωσης για να μην καταστραφεί η μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμόλυση).

4. Απορρίπτουμε τον υπερκείμενο φυσιολογικό ορό για να πάρουμε στεγνό ίζημα ερυθροκυττάρων.

**ΠΡΟΣΟΧΗ!**

Η σχολαστική απόρριψη του υπερκείμενου υγρού απαλλάσσει το ίζημα από πιθανά ελεύθερα IgG αντισώματα, η παρουσία των οποίων δημιουργεί πλασματικά αρνητικά αποτελέσματα, επειδή θα εμποδίσουν τον αντισφαιρινικό ορό να συγκολλήσει τα ερυθροκύτταρα.

5. Προσθέτουμε στο ίζημα κάθε σωληναρίου 3 σταγόνες από τον αντίστοιχο με την ένδειξη της ετικέτας αντισφαιρινικό ορό.

6. Ανακινούμε ζωηρά για να αναμειχθούν.

7. Περιμένουμε σε θερμοκρασία δωματίου 22°C για 15 λεπτά της ώρας.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Αν δεν τηρηθεί η θερμοκρασία το αντίσωμα θα αποσυνδεθεί από το αντιγόνο και θα δώσει πλασματικά αρνητικό αποτέλεσμα.

8. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Η φυγοκέντρηση σταθεροποιεί την ένωση αντιγόνου αντι-σώματος.

9. Παρατηρούμε σε φωτεινή πηγή για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης των ερυθροκυττάρων μέσα σε χρονικό διάστημα τριών λεπτών της ώρας.

10. Καταγράφουμε τα αποτελέσματα με σταυρούς (0 – 4 +) μέσα σε χρονικό διάστημα 3 λεπτών της ώρας.

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Η ξήρανση του παρασκευάσματος θα δώσει πλαστά θετικά αποτελέσματα (θα θεωρηθεί ψεύτικη συγκόλληση).

Αν δεν είναι ευκρινής η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων τότε:

11. Μεταφέρουμε με σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Απλώνουμε τις σταγόνες σε παράλληλες γραμμές. Για να πετύχουμε λεπτότερη στοιβάδα ερυθροκυττάρων μπορούμε να καλύψουμε το παρασκεύασμα με καλυπτρίδα.

12. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο αρχικά με τον αντικειμενικό φακό 10X και στη συνέχεια με τον αντικειμενικό φακό 40X για την παρουσία ή μη ερυθροκυτταρικών σωρών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. Αρνητικό: Αν δεν παρατηρηθεί καμία συγκόλληση σημειώνουμε (0).

β. Θετικό: Σε όλες τις παρακάτω περιπτώσεις:

Αν υπάρχουν **σωροί ερυθροκυττάρων που μόλις διακρίνονται**, σημειώνουμε **1 σταυρό (+)**.

Αν υπάρχουν **μικροί αλλά πολλοί σωροί ερυθροκυττάρων**, σημειώνουμε **2 σταυρούς (++)**.

Αν υπάρχουν **μεγάλοι και πολλοί σωροί ερυθροκυττάρων**, σημειώνουμε **3 σταυρούς (+++)**.

Αν υπάρχουν **περισσότεροι μεγάλοι σωροί ερυθροκυττάρων**, σημειώνουμε **4 σταυρούς (++++)**.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

Η δοκιμασία Coombs πρέπει να είναι **αρνητική** για τα φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια.



Η άμεση δοκιμασία Coombs είναι θετική σε:

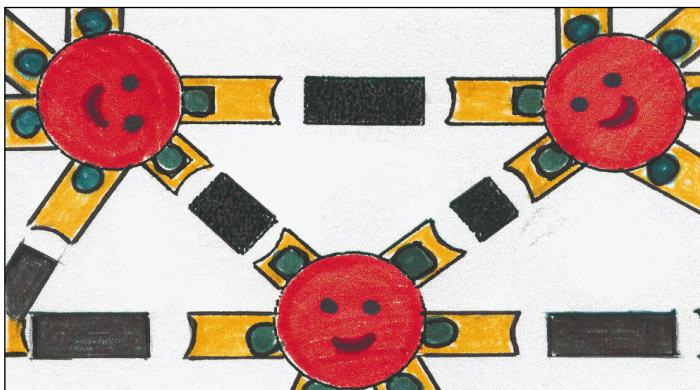
- ▶ αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία
- ▶ αντιδράσεις κατά τη μετάγγιση
- ▶ θεραπεία με ινσουλίνη
- ▶ αιμολυτική νόσο του νεογνού, κ.λπ.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

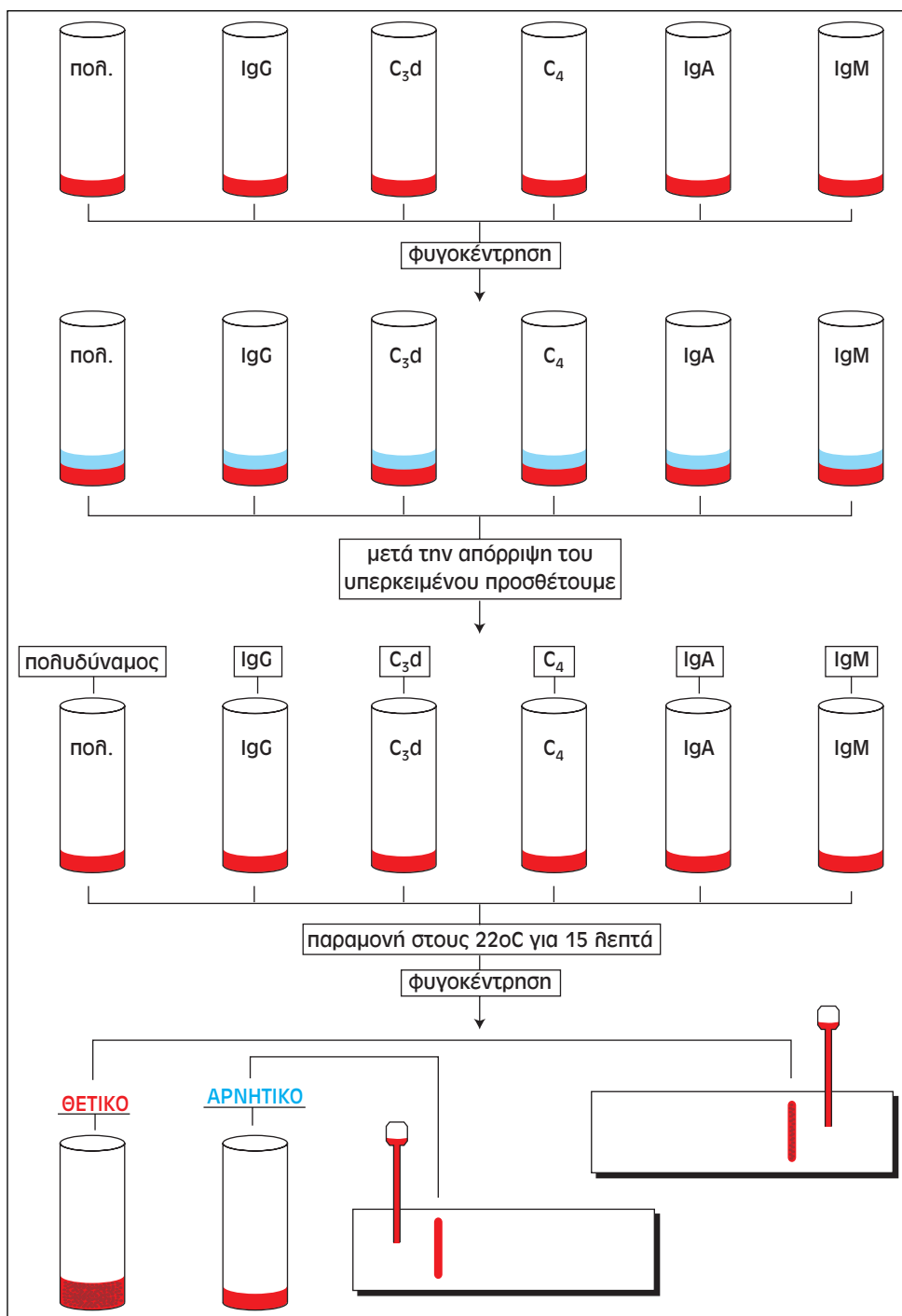
Η άμεση δοκιμασία Coombs είναι αρνητική σε:

- ▶ μη αυτοάνοσες αιμολυτικές αναιμίες, κ.λπ.

Τα ερυθροκύτταρα του εξεταζόμενου είναι ευαισθητοποιημένα, έχουν δηλαδή προσροφήσει αντισώματα . Τα αντισώματα είναι σφαιρίνες. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια λοιπόν έχουν επενδυθεί με σφαιρίνες. Οι σφαιρίνες της επιφάνειας των ερυθρών ανιχνεύονται με τον αντισφαιρινικό ορό. Ο αντισφαιρινικός ορός  λειτουργεί ως μαγνήτης και ενώνει τα ερυθροκύτταρα σε σωρούς (συγκόλληση).



Εικόνα 13.1: Η δράση του αντισφαιρινικού ορού στην άμεση δοκιμασία Coombs



Εικόνα 13.2: Άμεση δοκιμασία Coombs

13.4.2 Έμμεση δοκιμασία COOMBS

- **Τι ελέγχουμε με την έμμεση δοκιμασία Coombs;**

Με την έμμεση δοκιμασία Coombs ελέγχουμε αν **στον ορό** του ασθενή υπάρχουν αντισώματα, τα οποία θα προσκολληθούν, ύστερα από επώαση *in vitro*, σε ερυθροκύτταρα που έχουν στη μεμβράνη τους το ειδικό αντιγόνο εναντίον του οποίου στρέφονται.

- **Σε ποιες περιπτώσεις χρειάζεται να γίνει η έμμεση δοκιμασία Coombs ;**

Η έμμεση αντίδραση Coombs εκτελείται:

- ▶ Για την ανίχνευση ορισμένων αντιγόνων ,π.χ. του αντιγόνου D_u.
- ▶ Σε έγκυο γυναίκα D αρνητική, της οποίας ο σύζυγος είναι D θετικός.
- ▶ Σε γυναίκα που το νεογέννητό της παρουσίασε συμπτώματα αιμολυτικής πάθησης.
- ▶ Πριν από μετάγγιση, για την ανίχνευση των IgG αντισωμάτων που στρέφονται εναντίων των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων.
- ▶ Μετά από μετάγγιση αν παρουσιαστεί παρενέργεια.

ΔΕΙΓΜΑ

Εξετάζουμε ορό του ασθενούς ή του εξεταζόμενου ατόμου.



Υπενθυμίζουμε:

Το δείγμα πρέπει να είναι πρόσφατο.



Ο διαχωρισμός του ορού από το ολικό αίμα πρέπει να γίνει με προσοχή για να μην υπάρξει ούτε ίχνος αιμόλυσης η οποία θα δώσει πλαστό θετικό αποτέλεσμα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ελεύθερα αντισώματα του ορού με τη βοήθεια της λευκωματίνης καθιλώνονται στα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα. Στη συνέχεια ο αντισφαιρινικός ορός, ο οποίος αναζητάει τα ελεύθερα άκρα των αντισωμάτων, συνδέει το ένα ερυθρό με το άλλο ερυθρό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. Εναιώρημα 2 – 4% πλυμένων ερυθροκυττάρων ομάδας αίματος O Rh (+), τριών διαφορετικών δειγμάτων I, II, III. Δείγματα ερυθρών προσφέρονται και έτοιμα από πολλήδες εμπορικές εταιρείες.



Τα δείγματα των ερυθρών είναι από διαφορετικά άτομα για να καλύπτουν όσο το δυνατό μεγαλύτερο εύρος αντισωμάτων.

2. Λευκωματίνη 22%: Χρησιμοποιείται ως ενισχυτικό της συγκόλλησης και δίνει αποτελέσματα σε μικρότερο χρόνο επώσης

3. Αντισφαιρινικός ορός (πολυδύναμος).

**ΠΡΟΣΟΧΗ !**

Να θυμηθούμε να ελέγξουμε την ημερομηνία λήξης, τη θερμοκρασία, και την ισχύ των αντιδραστηρίων.

4. Φυσιολογικός ορός NaCl 0.9%

**ΟΡΓΑΝΑ,
ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ**

- 🧴 υδατόλουτρο (37°C)
- 🧴 επιτραπέζιο χρονόμετρο
- 🧴 φυγόκεντρος
- 🧴 μικροσκόπιο
- 🧴 γάντια
- 🧴 στυλό
- 🧴 αυτοκόλλητες ετικέτες
- 🧴 έδρανο στήριξης δοκιμαστικών σωληναρίων
- 🧴 δοκιμαστικά σωληνάρια αιμοήλσεως
- 🧴 σιφώνια Pasteur
- 🧴 αντικειμενοφόρος πλάκα
- 🧴 καλυπτρίδα
- 🧴 ποτήρι ζέσεως με διάλυμα χλωρίνης 1:10



Για να σταματήσουμε τον κύκλο μετάδοσης πιθανών λοιμώξεων, βάζουμε όλα τα χρησιμοποιημένα σιφώνια, τις καλυπτρίδες και τις αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα χλωρίνης. Τα αφήνουμε 30 λεπτά της ώρας και κατόπιν τα πετάμε στο απορριμματοδοχείο.

ΠΟΡΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗΣ

1. Γράφουμε με ευκρίνεια επάνω σε τρεις αυτοκόλλητες ετικέτες τα στοιχεία του ασθενή (ονοματεπώνυμο, πατρώνυμο) και την ένδειξη I ή II ή III.



Η λανθασμένη καταχώριση των στοιχείων του ασθενούς βάζει σε κίνδυνο τη ζωή του.

2. Βάζουμε μέσα 2 – 3 σταγόνες του εξεταζόμενου ορού.

3. Προσθέτουμε σε κάθε σωληνάριο αντίστοιχα 1 σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών 2 – 4% από τα δείγματα I, II και III και 2 – 3 σταγόνες ηευκωματίνης 22%.

4. Αναμειγνύουμε με απαλές κινήσεις.

5. Τοποθετούμε τα σωληνάρια σε υδατόλουτρο 37°C για 30 λεπτά της ώρας.



Αν δεν τηρηθεί η θερμοκρασία, το αντίσωμα θα αποσυνδεθεί από το αντιγόνο και θα δώσει πλασματικά αρνητικό αποτέλεσμα.

6. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 15 δευτερόλεπτα της ώρας.

7. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **αιμόλυσης** στο υπερκείμενο υγρό.

8. Ανακινούμε με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης και παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και καταγράφουμε το αποτέλεσμα.

Αν δεν έγινε αιμόλυση ούτε συγκόλληση τότε:

9. Προσθέτουμε φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl και πλένουμε τα ερυθροκύτταρα τρεις φορές.

**Υπενθυμίζουμε:**

Το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων απομακρύνει τα ελεύθερα αντισώματα, τα οποία δεσμεύουν το αντιδραστήριο και εμποδίζουν τη συγκόλληση των ερυθροκυττάρων με επακόλουθο πλασματικό αρνητικό αποτέλεσμα.

10. Απομακρύνουμε σχολαστικά κάθε ίχνος φυσιολογικού ορού μετά την τελευταία φυγοκέντρηση.

11. Προσθέτουμε 3 σταγόνες πολυδύναμου αντισφαιρινικού ορού (αντι – Human).

12. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

13. Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές / λεπτό για 1 λεπτό της ώρας.

14. Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.

15. Παρατηρούμε για τη δημιουργία ή μη **συγκόλλησης** των ερυθροκυττάρων σε χρονικό διάστημα 3 λεπτών της ώρας και καταγράφουμε το αποτέλεσμα.



Αν περάσει ο χρόνος, το υλικό θα ξεραθεί και υπάρχει κίνδυνος για δημιουργία ψεύτικης θετικής συγκόλλησης.



Είναι απαραίτητη η χρήση θετικού και αρνητικού μάρτυρα.

Αν δεν είναι ευκρινής η συγκόλληση των ερυθροκυττάρων:

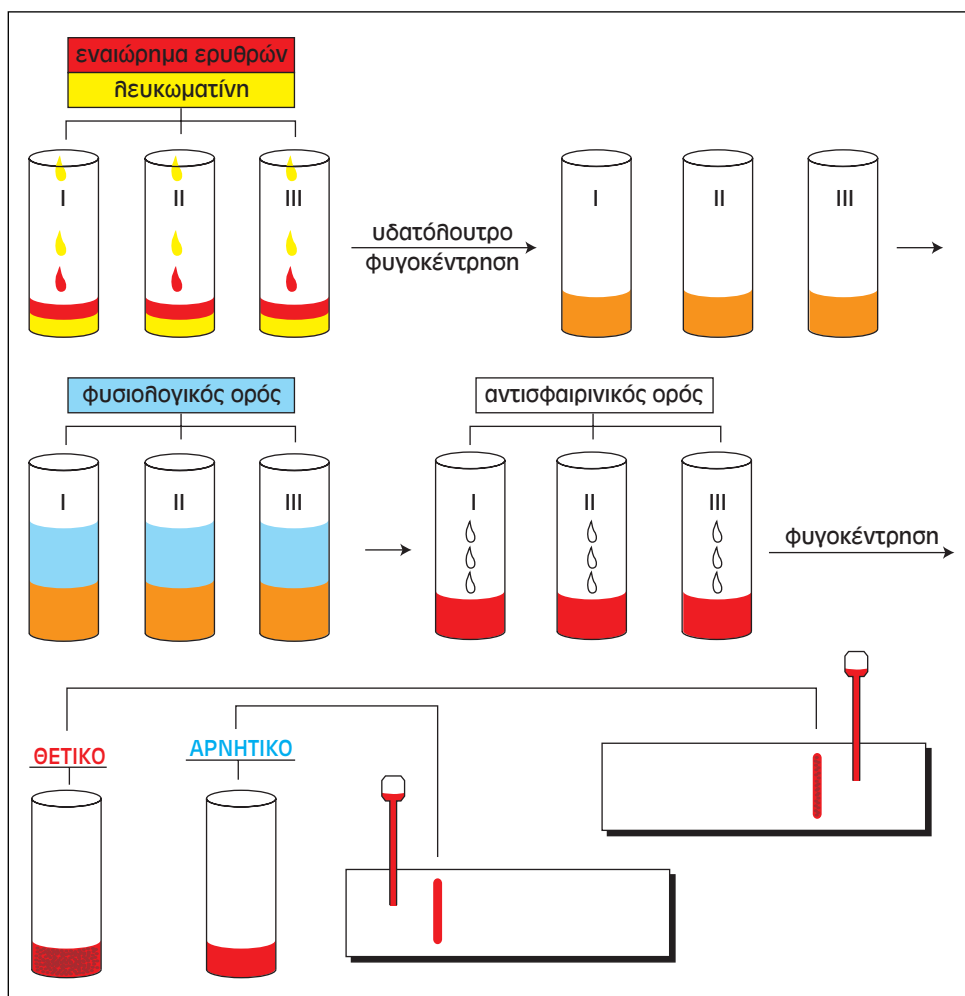
16. Μεταφέρουμε με διαφορετικό σιφώνιο Pasteur μία σταγόνα από κάθε σωληνάριο απάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα και απλώνουμε τις σταγόνες σε παράλληλες γραμμές. Για τη δημιουργία λεπτότερης στοιβάδας ερυθροκυττάρων καλύπτουμε το παρασκεύασμα με καλυπτρίδα.

17. Παρατηρούμε στο μικροσκόπιο αρχικά με τον αντικειμενικό φακό 10X και στη συνέχεια με τον αντικειμενικό φακό 40X, για την παρουσία ή μη ερυθροκυτταρικών σωρών.



Υπενθύμιση:

Προσέχουμε το υλικό να μην ξεραθεί, γιατί θα έχουμε πλασματικό θετικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 13.3: Έμμεση δοκιμασία Coombs

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- α. ΘΕΤΙΚΟ:** α₁. Έγινε **αιμόλυση**, επειδή καταστράφηκε η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος που ενεργοποιήθηκε μετά την ένωση με τα αντισώματα.
- α₁. Έγινε **συγκόλληση**. Σχηματίστηκαν σωροί ερυθροκυττάρων, επειδή υπάρχουν πολλή άνοσα αντισώματα.

β. Αρνητικό: β₁. **Δεν έγινε αιμόλυση.** Δεν καταστράφηκε η μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, επειδή το συμπλήρωμα δεν ενεργοποιείται.

β₂. **Δεν έγινε συγκόλληση,** γι' αυτό δε σχηματίστηκαν σωροί ερυθροκυττάρων, άρα δεν υπάρχουν άνοσα και πλήρη αντισώματα.

Για μεγαλύτερη αξιοπιστία στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κάνουμε σύγκριση με **θετικό** και **αρνητικό μάρτυρα**.

Η διαδικασία παρασκευής θετικού και αρνητικού μάρτυρα είναι η εξής:

- ▶ Αραιώνουμε τον αντι – D ορό του εμπορίου σε αναλογία 1:20 με φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl και τον χρησιμοποιούμε σαν ορό – δείγμα. Ως αντιδραστήριο παίρνουμε τα **ερυθροκύτταρα ατόμου ομάδας αίματος O και Rhesus θετικό**.
- ▶ Στην περίπτωση του αρνητικού μάρτυρα χρησιμοποιούμε σαν ορό – δείγμα τον αραιωμένο αντι – D ορό και ως αντιδραστήριο τα **ερυθροκύτταρα ατόμου ομάδας αίματος O και Rhesus αρνητικό**.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ


Η δοκιμασία Coombs πρέπει να είναι **αρνητική** για το φυσιολογικό ορό.

Η έμμεση Coombs είναι θετική σε:

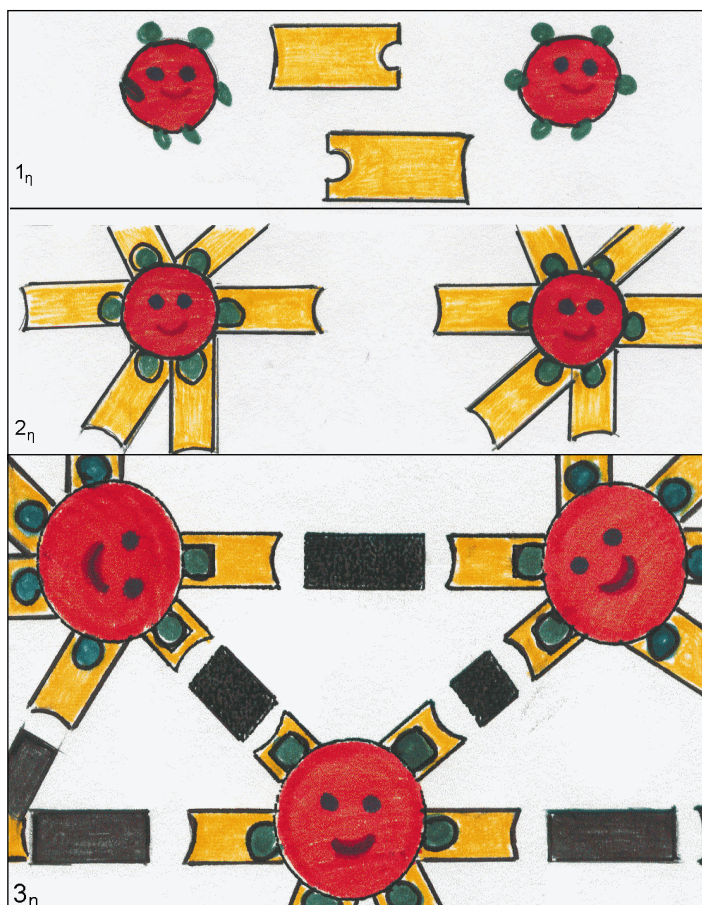
- ▶ παρουσία ειδικών αντισωμάτων
- ▶ ευαισθητοποίηση από μετάγγιση ή προηγούμενη κύηση.
- ▶ αιμολυτική αναιμία που οφείλεται σε φάρμακα.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ

• Πώς ερμηνεύεται το θετικό αποτέλεσμα;

Στον ορό του ασθενή υπάρχουν πολλή ατελή αντισώματα  (1n). Η προσθήκη της λευκωματίνης βοήθησε να κατευθυνθούν τα αντισώματα προς τις αντιγονικές θέσεις των ερυθροκυττάρων με αποτέλεσμα να τα καλύψουν (2n). Σ' αυτήν την κατάσταση, στην οποία το αντίσωμα είναι προ-

σκολλημένο στο αντίστοιχο κυτταρικό αντιγόνο, επιδρά ο αντισφαιρινικός ορός [■]. Αυτός λειτουργεί σαν "συνδετήρας" και ενώνει αυτές τις δυάδες αντιγόνο και αντίσωμα (3η). Έτσι, φέρνει τη μία κοντά στην άλλη σχηματίζοντας τους ερυθροκυτταρικούς σωρούς (συγκόλληση).



Εικόνα 13.4: Φάσεις της έμμεσης δοκιμασίας Coombs

- **Πώς ερμηνεύεται το αρνητικό αποτέλεσμα;**

Δε σχηματίζονται ερυθροκυτταρικοί σωροί (συγκόλληση) επειδή δεν υπάρχουν δυάδες από αντισώματα προσκολλημένα στο αντίστοιχο ερυθροκυτταρικό αντιγόνο. Αυτά θα τα ένωνε, αν υπήρχαν, ο αντισφαιρινικός ορός. Αφού δεν βλῆ-

που με συγκολληήσεις, δεν υπάρχουν ατελή αντισώματα με τα οποία θα ενώνονταν ο αντισφαιρινικός ορός και τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα μένουν ακάλληπτα.

• **Πώς μπορούμε να ενισχύσουμε ακόμη περισσότερο την δυνατότητα ανίχνευσης ατελών αντισωμάτων;**

1. Σε αρκετές περιπτώσεις ασυμβατότητας απαιτείται να γίνει επεξεργασία των ερυθρών **με πρωτεοϋλυτικά ένζυμα** (βρωμελαΐνη, παπαΐνη, φυσίνη). Τα πρωτεοϋλυτικά ένζυμα προκαλούν μία τροποποίηση στην εξωτερική επιφάνεια των ερυθροκυτταρικών αντιγόνων και ενισχύουν τη σύνδεσή τους με τα αντισώματα (κυρίως αντισώματα, Rhesus και Kidd) ενώ εξουδετερώνουν την έκφραση κάποιων άηλων αντιγόνων (κυρίως των M, N κ.α.)


2. Σε άηλες περιπτώσεις επιβάλλεται να γίνει ενίσχυση της συγκολλητικής ικανότητας αντιγόνου – αντισώματος με διάφορες ουσίες (π.χ. Liss), ώστε να προσδιοριστεί με αξιοπιστία το αντίσωμα.

Α Ν Α Κ Ε Φ Α Λ Α Ι Ω Σ Η

Στις ενότητες του κεφαλαίου αυτού ορίστηκε τι σημαίνει συμβατότητα και ποιο είναι το όφελος ελέγχου της συμβατότητας μεταξύ του αίματος του δέκτη με το αίμα του δότη.

Δόθηκαν όλη τα απαραίτητα στοιχεία για τον έλεγχο συμβατότητας σε μία επείγουσα κατάσταση.

Αναλύθηκαν οι τεχνικές εντοπισμού των ασύμβατων στοιχείων μεταξύ του αίματος του δέκτη και του δότη, η άγνοια των οποίων θα βάλει σε κίνδυνο τη ζωή του δέκτη.

Τα  επεσήμαναν τα βασικά σημεία για την επιτυχία των τεχνικών ως προς το σχολαστικό πλύσιμο των ερυθροκυττάρων, την καθαρότητα των σκευών, τη διαδοχή, την ποσότητα και τη θερμοκρασία των αντιδραστηρίων, τη σημασία της θερμοκρασίας επώασης, κ.λπ.

**Ας ελέγξουμε τις γνώσεις μας:**

1. Μετατρέπουμε τους πηγαϊότιτλους σε ερωτηματικές προτάσεις και δίνουμε τις αντίστοιχες απαντήσεις. Όπως: ποια είναι η αρχή της μεθόδου; Τι δείγμα χρησιμοποιούμε; κ.ο.κ.
2. Απαντάμε σε όλες τις ερωτήσεις που ακολουθούν τους πηγαϊότιτλους και ορίζουν το θέμα που αναπτύσσεται στις παραγράφους.

Ας δούμε τι καταλάβαμε:

1. Σε πόσες φάσεις ολοκληρώνεται η έμμεση δοκιμασία Coombs;
2. Ενώνουμε τις φάσεις της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης με το είδος των αντισωμάτων που ανιχνεύουμε και το είδος του αντιδραστήριου που χρησιμοποιούμε.

A. Δεύτερη	1. Ψυχρά και πλήρη	I. Διάλυμα ηευκωματίνης
B. Πρώτη	2. Ψυχρά	II. Φυσιολογικός ορός
Γ. Τρίτη	3. πλήρη	III. Αντισφαιρινικός ορός
3. Τι σχέση υπάρχει μεταξύ των αντιδράσεων των τριών σωληναρίων της άμεσης επείγουσας διασταύρωσης και των τριών φάσεων της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης;
4. Ποια στοιχεία της μακροσκοπικής παρατήρησης χαρακτηρίζουν θετική την άμεση δοκιμασία Coombs και ποια ερμηνεία δίνετε στα αποτελέσματα;
5. Ποια στοιχεία της μακροσκοπικής παρατήρησης χαρακτηρίζουν ως θετική την έμμεση δοκιμασία Coombs και ποια είναι η ερμηνεία του αποτελέσματος;
6. Το αποτέλεσμα της έμμεσης μη επείγουσας δοκιμασίας διασταύρωσης χαρακτηρίστηκε ως ασυμβατότητα. Σε τι ενέργειες θα προβούμε για να είναι ασφαχές το αποτέλεσμα; Αιτιολογούμε τις ενέργειές μας

Ας εφαρμόσουμε αυτά που μάθαμε:

1. Έχουμε ολοκληρώσει και το έβδομο βήμα της πορείας της άμεσης δοκιμασίας Coombs και διαπιστώνουμε βλάβη στη φυγοκεντρική συσκευή:
 - α. Θα συντηρήσουμε το δείγμα στους 37°C για να συνεχίσουμε αύριο;
 - β. Θα ακυρώσουμε κάθε τι που ήδη έχουμε κάνει;
 - γ. Θα παρακάμψουμε το στάδιο της φυγοκέντρησης και θα ολοκληρώσουμε την τεχνική;Αιτιολογούμε την ενέργειά μας.
2. Η πρώτη φάση της έμμεσης μη επείγουσας διασταύρωσης ήταν θετική. ενώ μετά την εκτέλεση της δεύτερης φάσης η απάντηση ήταν αρνητική.
 - α. Τι μπορεί να έχει συμβεί;
 - β. Τι θα κάνουμε στη συνέχεια;
3. Έχουμε ένα παραπεμπτικό για εκτέλεση έμμεσης δοκιμασίας Coombs σε δείγμα εγκύου γυναίκας το οποίο πρόκειται να γίνει την επόμενη μέρα.
 - α. Ποια υλικά πρέπει να βεβαιωθούμε ότι υπάρχουν στο εργαστήριο για να είμαστε έτοιμοι να εκτελέσουμε τη δοκιμασία;
 - β. Μετά την εκτέλεση της μεθόδου, το αποτέλεσμα χαρακτηρίστηκε θετικό. «Επειδή έγινε συγκόλληση 20 λεπτά μετά τη φυγοκέντρηση αφού προστέθηκε ο αντιρός (στάδιο 14)».β₁. Είναι ασφαλής η ερμηνεία του αποτελέσματος; Δικαιολογούμε την άποψή μας.
β₂. Αν τελικά είναι πράγματι θετικό το αποτέλεσμα, τι θα σημαίνει για την έγκυο γυναίκα;

Πρόταση για περαιτέρω διερεύνηση:

1. Επισκεφτείτε ένα παιδιατρικό νοσοκομείο και ζητήστε πληροφορίες για το πόσες μονάδες αίματος απαιτούνται ετησίως για την αντιμετώπιση της μεσογειακής αναιμίας στην πατρίδα μας.