

Τεχνικές καθορισμού ομάδων αίματος

ΜΑΘΗΜΑ: ΑΙΜΟΔΟΣΙΑ (Γ'εξ.)

Εισηγήτρια: Πατεράκη Μαρία
Νοσηλεύτρια Τ. Ε.

Σύστημα ABO

- Τι είναι ερυθοκύτταρικο αντιγόνο;
- Είναι όλα τα ερυθοκύτταρικο αντιγόνα τα ίδια;
- Ποια ερυθοκύτταρικο αντιγόνα περιλαμβάνει το σύστημα ομάδων ABO;

Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A B D

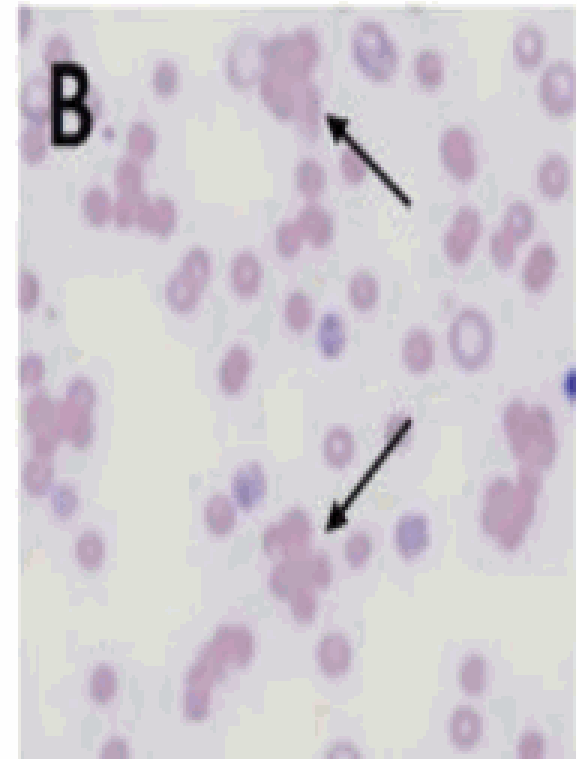
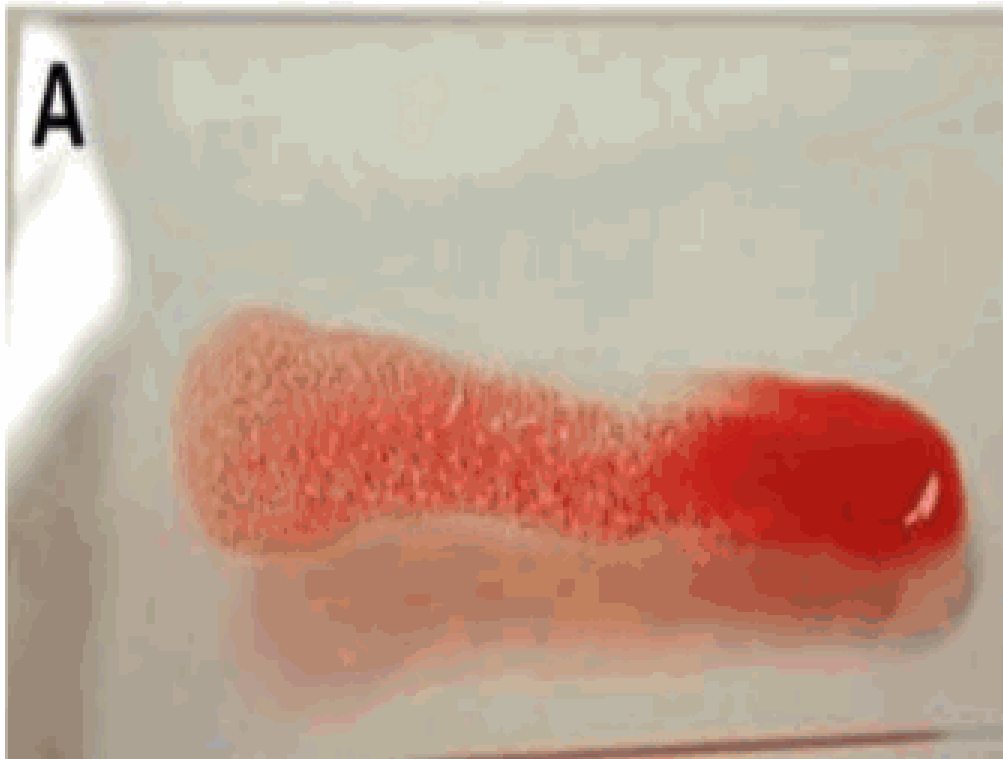
Τι θέλουμε να βρούμε.

Τι αντιγόνα υπάρχουν πάνω στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθροκυττάρων και είναι A, B, AB, D.

Στο εργαστήριο *in vitro* θέλουμε να προκαλέσουμε ενώση του αντιγόνου που υπάρχει στα ερυθρά με ένα αντίσωμα που είναι γνωστό και το βάζουμε εμείς.

Όταν προσθέσουμε το κατάλληλο αντίσωμα αυτό πλησιάζει το ερυθρόκύτταρο και συνδέεται με το αντίστοιχο αντιγόνο φτιάχνοντας ένα ζευγάρι, το ζευγάρι αυτό θα ενωθεί με άλλο ζευγάρι κ.ο.κ. μέχρι να κολλήσουν όλα μεταξύ τους αυτό το φαινόμενο λέγεται συγκόλληση και σχηματίζονται κροκίδες.

Αιμοσυγκόλληση



Τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων A B D

- Χρησιμοποιούμε πρόσφατο ολικό αίμα με αντιπηκτικό EDTA ή συμπυκνωμένα ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Το αίμα πρέπει να έχει ληφθεί το τελευταίο 24ωρο και να μην είναι αιμολυσμένο ούτε να έχει μικροθρόμβους.

Προσδιορισμός Ομάδων αίματος

Αντιοροί: Είναι ειδικοί όροι με αντισώματα και για αυτό λέγονται και αντιοροί.

Εαν έχουν αντισώματα αντι-A λέγονται μονοκλωνικοί, αν έχουν αντί-B λέγονται πολυκλωνικοί. Οι αντιοροί έχουν ελεγχθεί για ιούς ή άλλου είδους αντισώματα, βρίσκονται σε σταγοναμετρικά φιαλίδια. Έχουν ημερομηνία λήξης και συντηρούνται στο ψυγείο στους 4° C, πριν από τη χρήση τους παραμένουν για 20 λεπτά σε θερμοκρασία χώρου.

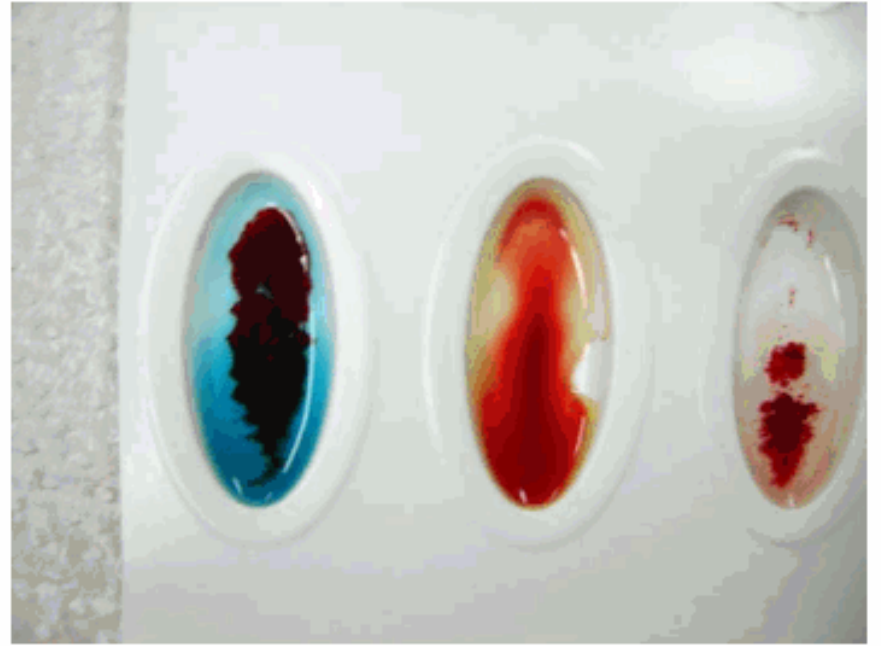
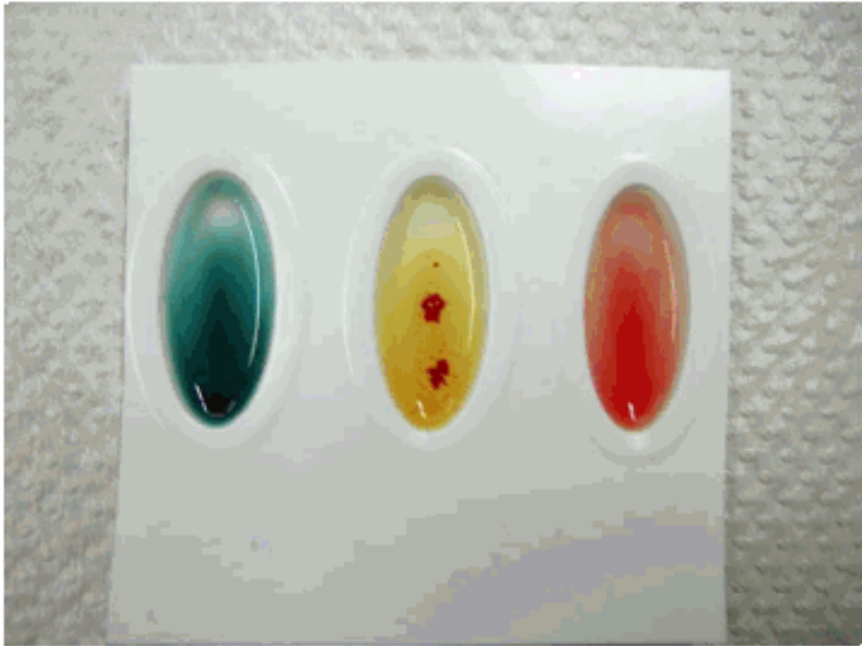
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΜΑΔΑΣ ΑΙΜΑΤΟΣ



Προσδιορισμός Ομάδων αίματος

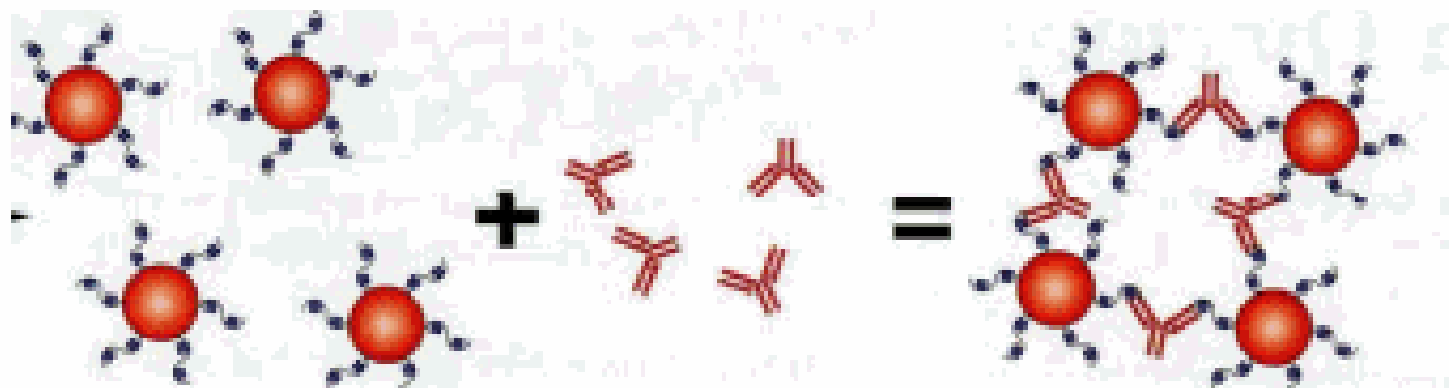
Τεχνική:

- Φοράμε γάντια.
- Συγκεντρώνουμε τα υλικά μας στον πάγκο εργασίας (Αντικειμενοφόρες πλάκες, ανιόρους, ξύλινα ραβδάκια)
- Βάζουμε πάνω στο αριστερό τμήμα της αντικειμενοφόρου πλάκας μία σταγόνα αντί όρου-A και στο δεξί τμήμα μία σταγόνα αντί ορού-B.
- Μεταφέρουμε μία σταγόνα αίματος δίπλα στη σταγόνα αντί A και μία δίπλα στη σταγόνα αντί B.
- Τα αναμιγνύουμε κυκλικά με ένα ξύλινο ραβδάκι.
- Ανασηκώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα και την ανακινούμε με κυκλικές κινήσεις, εφόσον δημιουργηθεί συγκόλληση θα είναι ορατή σε διάστημα δύο λεπτών.
- Επιβεβαιώνουμε τη συγκόλληση παρατηρώντας το διαφανοσκόπιο.



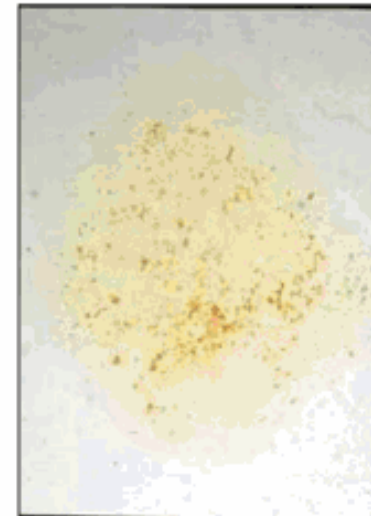
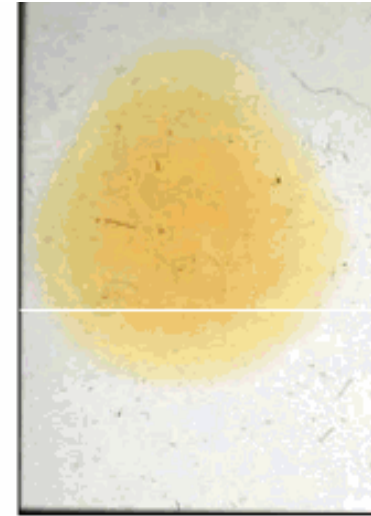
Αποτελέσματα

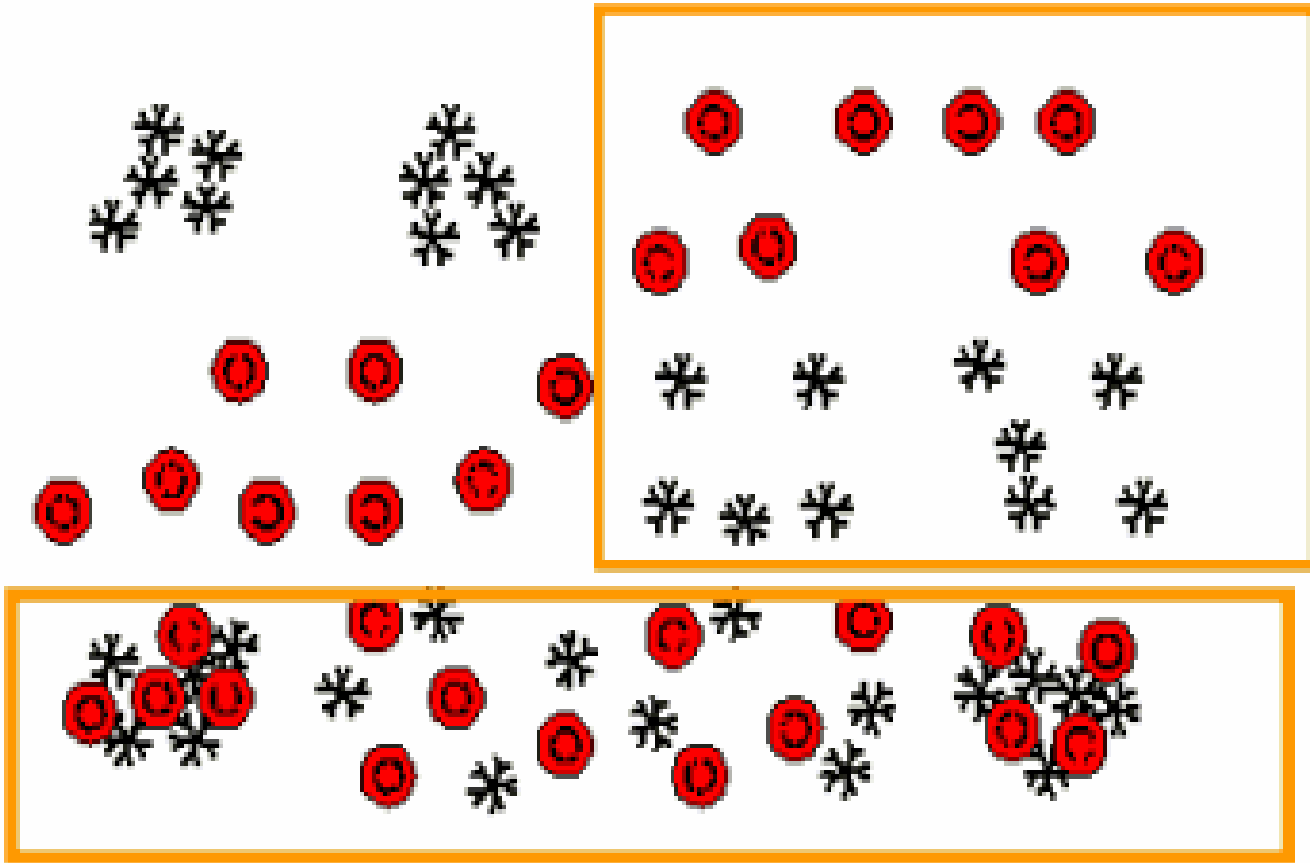
- **Θετικό:** σημαίνει ότι έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκιδών. Άρα τα ερυθροκυτταρικά αντιγόνα έχουν συνενωθεί με τα ομόλογα αντισώματα. Αν η συγκόλληση γίνει εκεί που τοποθετήθηκε η σταγόνα με τον αντί-A ορό αποκαλύπτεται η ύπαρξη αντιγόνου A στα ερυθροκύτταρα. Αν η συγκόλληση γίνει εκεί που τοποθετήθηκε η σταγόνα με τον αντί-B ορό αποκαλύπτεται η ύπαρξη αντιγόνου B στα ερυθροκύτταρα.
- **Αρνητικό:** δεν έγινε συγκόλληση και για αυτό δεν σχηματίστηκαν κροκίδες αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα A ή B για αυτό δεν έγινε η συνένωση με τους αντί-A ή τους αντί-B όρους.
- Αν τέλος η συγκόλληση γίνει και στις δύο σταγόνες των αντί ορών σημαίνει ότι υπάρχουν ερυθροκυτταρικά αντιγόνα A και B.



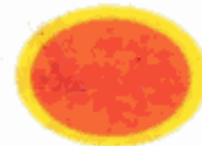
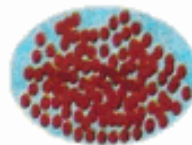
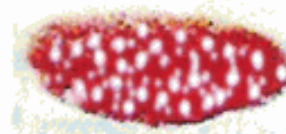
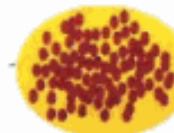
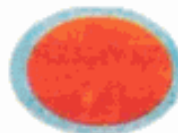
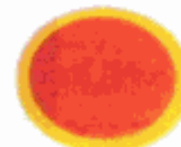
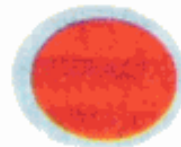
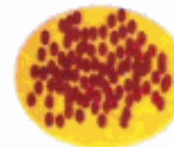
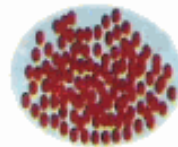
Καθορισμός ομάδας αίματος Συγκολλητινοαντίδραση

Στην ουσια πρόκειται για ανίχνευση αντιγόνων στα ερυθρά με ειδικούς αντί-ορούς και αντισωμάτων στον ορό με γνωστά αντιγονικά ερυθρά.





**ΒΡΕΙΤΕ ΤΙΣ
ΟΜΑΔΕΣ
ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΤΟ
ΣΧΗΜΑ**



Προσδιορισμός Ομάδων αίματος

Τεχνική σε σωληνάριο

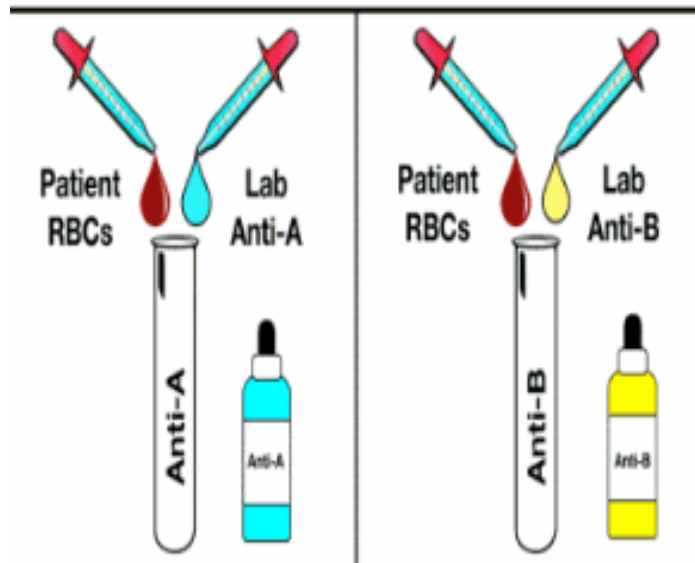
Αν η τεχνική προσδιορισμού των αντιγόνων σε αντικειμενοφόρο πλάκα δεν δώσει σαφή αποτέλεσμα ή έχουμε λόγους να αμφιβάλλουμε για την αξιοπιστία τους, επαναλαμβάνουμε τον προσδιορισμό με την τεχνική σε δοκιμαστικό σωληνάριο.

Χρησιμοποιούμε τους ίδιους αντί ορούς που χρησιμοποιούμε για την μέθοδο σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Τεχνική:

- Χρησιμοποιούμε καθαρά σωληνάρια και γράφουμε πάνω την ένδειξη αντί A αντί B.
- Τοποθετούμε μία σταγόνα του αντίστοιχου αντί ορού σε κάθε σωληνάριο.
- Προσθετούμε με μία πιπετα παστερ μία σταγόνα εναιωρήματος ερυθρών σε κάθε σωληνάριο.
- Φυγοκεντρούμε στις 1000 στροφές για 15 με 30 δευτερόλεπτα της ώρας
- Ανακινούμε το περιεχόμενο των σωληναρίων με απαλά χτυπήματα στο εσωτερικό μέρος της παλάμης.
- Παρατηρούμε μακροσκοπικά τη δημιουργία ή μη συγκόλλησης.
- Μεταφέρουμε μία σταγόνα από κάθε δοκιμαστικό σωληνάριο επάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
- Επιβεβαιώνουμε την συγκόλληση παρατηρώντας στο διαφανοσκόπιο.

Καθορισμός ομάδας αίματος



	Patient RBCs	Patient RBCs	Patient Plasma	Patient Plasma
	Anti-A Antibody	Anti-B Antibody	Type A RBCs	Type B RBCs
O				
A				
B				
AB				

Τεχνική προσδιορισμού των αντισωμάτων στον ορό ή στο πλάσμα

Τι θέλουμε να βρούμε;

Ποια αντίερυθροκυτταρικά αντισώματα έχει στον ορό του ένας άνθρωπος.

Στο εργαστήριο λοιπόν αναζητάμε τα αντισώματα του ορού του ασθενούς που πρέπει να τα φέρουμε σε επαφή με ερυθροκύτταρα γνωστού αντιγόνου.

Η αναζήτηση συγκολλητινών (αντισώματα) δηλ. με τη βοήθεια γνωστών συγκολλητινογονων (αντιγόνα), βασίζεται στο αξίωμα ότι υπάρχουν οι συγκολλητίνες στον ορό ή στο πλάσμα όταν δεν υπάρχουν τα αντίστοιχα συγκολλητινογόνα στα ερυθρά αιμοσφαίρια.

Εξετάζουμε όρο ή πλάσμα;

Το δείγμα δεν πρέπει να είναι αιμολυμένο.

- Εναιώρημα 25% ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας Α.
- Εναιώρημα 25% ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας Β.

Η ελληνική αιματολογική εταιρεία προτείνει τη χρησιμοποίηση εναιωρήματος ερυθρών αιμοσφαιρίων ομάδας Ο ως αρνητικό μάρτυρα. Σε αυτή την περίπτωση επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα τοποθετούμε τρεις σταγόνες.

Τεχνική:

- Συγκεντρώνουμε τα υλικά μας στον πάγκο εργασίας (Αντικειμενοφόρες πλάκες, ανιόρους, ξύλινα ραβδάκια).
- Βάζουμε με πιπέτα παστέρ δύο ή τρεις σταγόνες από το δείγμα πάνω στην αντικειμενοφορο πλακα.
- Ανακινούμε το εναιώρημα μέχρι να ομογενοποιηθεί.
- Προσθέτουμε μία σταγόνα εναιωρήματος ομάδας A και ομάδας B αντίστοιχα.
- Τα αναμιγνύουμε κυκλικά με ένα ξύλινο ραβδάκι, ξεχωριστό για κάθε σταγόνα.
- Ανασηκώνουμε την αντικειμενοφορο πλάκα και την ανακινούμε με κυκλικές κινήσεις, εφόσον δημιουργηθεί συγκόλληση θα είναι ορατή σε διάστημα δύο λεπτών.
- Επιβεβαιώνουμε τη συγκόλληση παρατηρώντας το διαφανοσκόπιο.

ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ Σε σωληνάριο



4+ Agglutination



3+ Agglutination



2+ Agglutination



1+ Agglutination



Negative

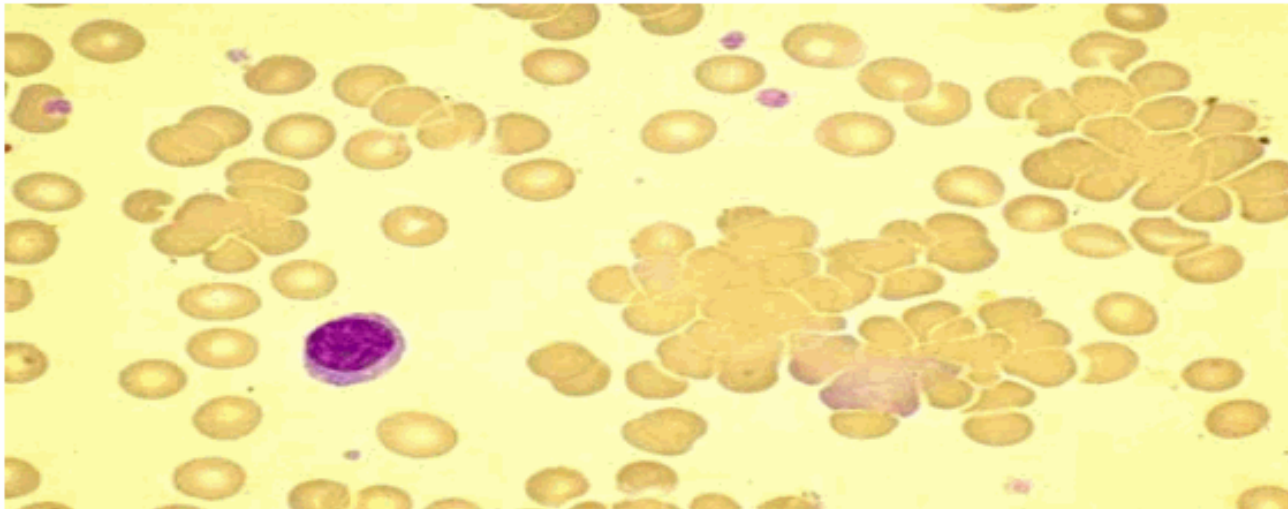
Αποτελέσματα

- **Θετικό:** Έγινε συγκόλληση η οποία φαίνεται με το σχηματισμό κροκίδων.
- **Αρνητικό:** δεν έγινε συγκόλληση και για αυτό δεν σχηματίστηκαν κροκίδες.

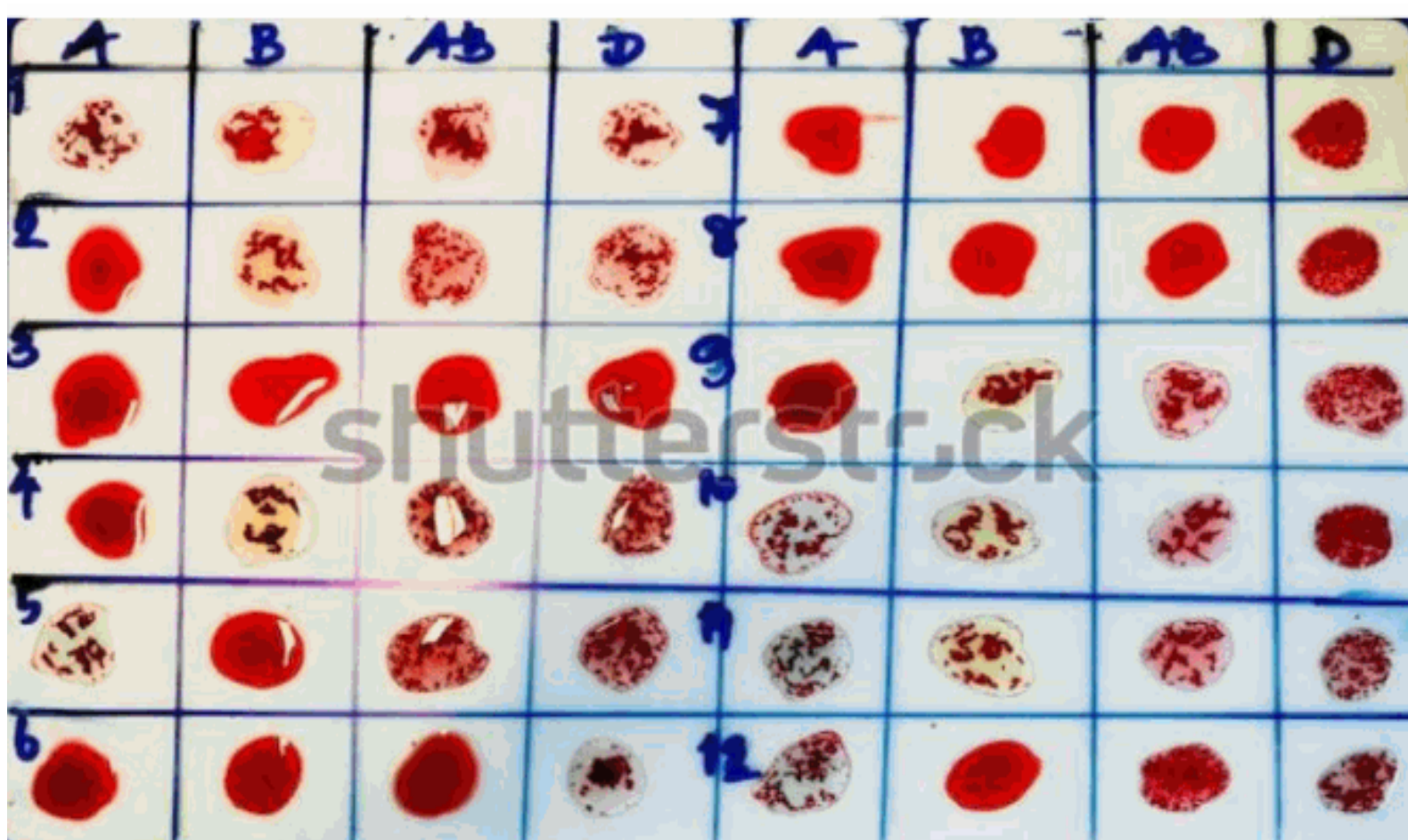
ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ

Επί πλάκας

- Εικόνα σε διαφανοσκόπιο
- Είναι το αποτέλεσμα της σύνδεσης που εμφανίζεται με την εικόνα της συγκόλλησης



Αιμοσυγκόλληση επί πλάκας



Προσοχή

- Το επίπεδο των αντί A και αντί B αντισωμάτων είναι χαμηλότερο στα ηλικιωμένα άτομα.
- Τα αντισώματα του όρου αρχίζουν να παράγονται μετά τη γέννηση του ανθρώπου. Η παραγωγή τους αυξάνεται στα πρώτα 5 έως 6 χρόνια της ζωής και παραμένει στάσιμη σε όλη την υπόλοιπη ζωή.

Τεχνική προσδιορισμού αντισωμάτων στον όρο ή στο πλάσμα σε σωληνάριο

Συμβαίνει το ίδιο όπως και στα αντιγόνα, για κάποιο λόγο δεν έχουμε σαφή αποτελέσματα, χρησιμοποιούμε αυτήν την τεχνική.

Υπενθυμίζουμε ότι το αίμα δεν πρέπει να είναι αιμολυμένο.

Αντιγόνα Rhesus

Ότι ισχύει για το σύστημα ABO ισχύει και για το σύστημα Rhesus.

Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις ειδικές τεχνικές πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα ή σε σωληνάριο.

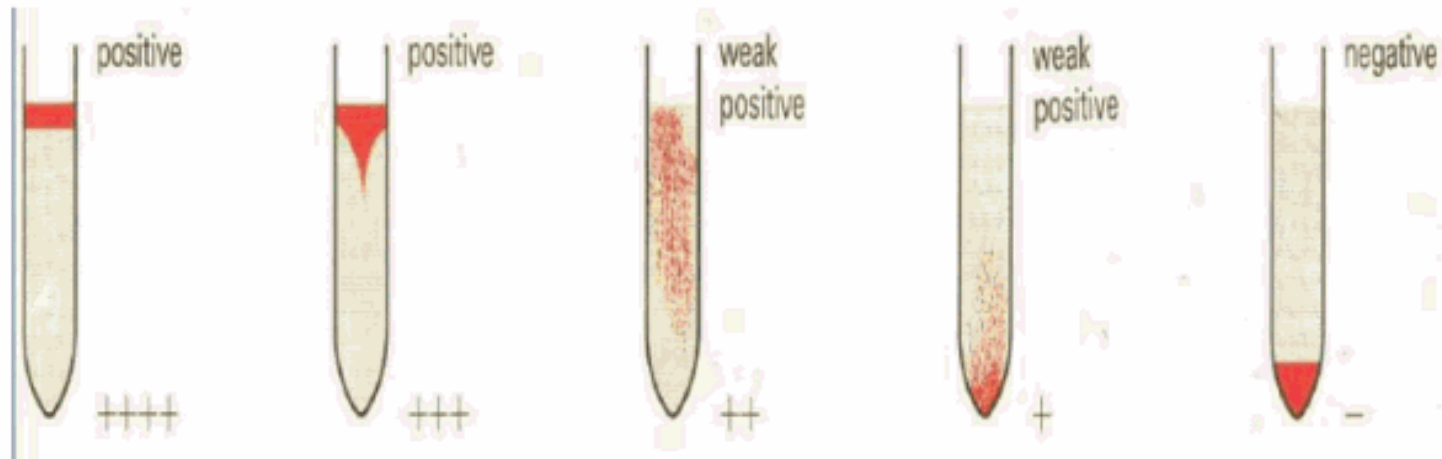
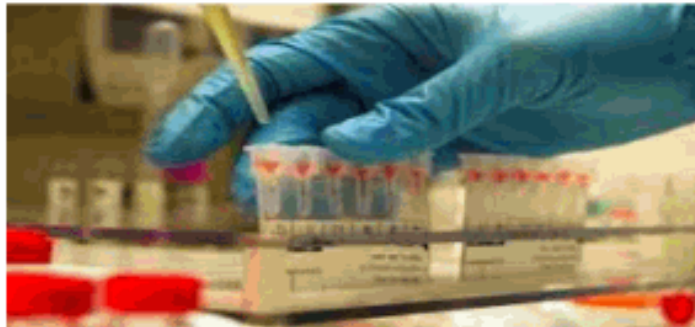
Ανίχνευση αντιγόνου kell

Τεχνικές καθορισμού αντιγόνων ABO-Rhesus

- **ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ**
- Επι πλάκας
- Σε σωληνάριο
- Σε μικροστήλες
- **ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ**
- Μέθοδος στερεάς φάσης
- Μικροσφαιρίδια γέλης
- **ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ**
- PCR
- REAL TIME PCR

ΗΜΙΑΥΤΟΜΑΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Αντίδραση αιμοσυγκόλλησης τεχνική μικροστηλών (βαθμονόμηση αντιδράσεων)



Τυποποίηση ομάδας επί μικροστηλών

A+

O+

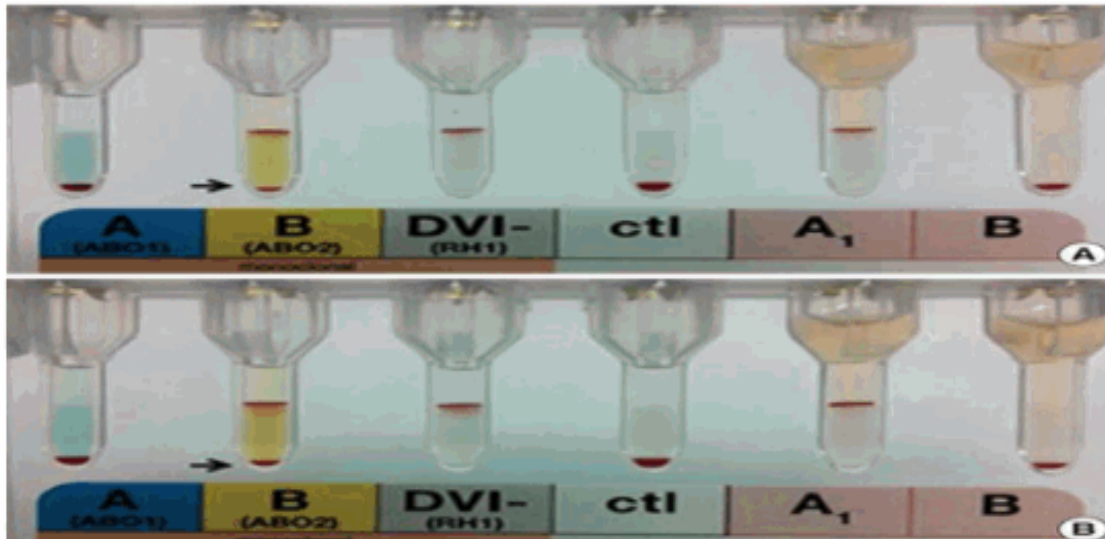


ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ

τεχνική μικροστηλών αιμοσυγκόλλησης

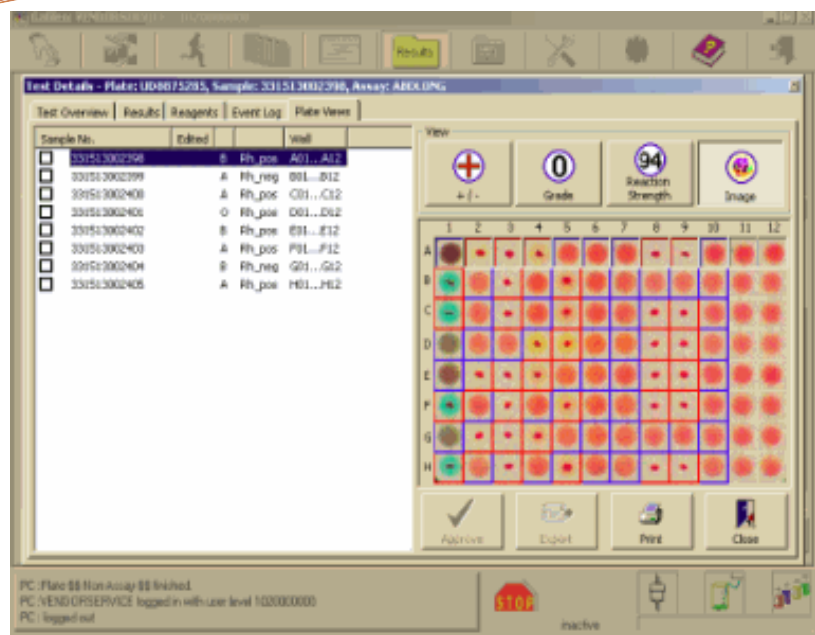
Η μέθοδος στηρίζεται σε τεχνολογία στήλης με μικροσφαιρίδια

- Οι κασέτες έχουν ενσωματωμένους αντιορούς σε στήλες με γυάλινα μικροσφαιρίδια για τον έλεγχο των ομάδων αίματος, για την εκτέλεση συμβατότητας & για τις δοκιμασίες Coombs
- Οι αντιδράσεις διακρίνονται σε βαθμίδες έντασης (neg,+/-, 1,2,3,4, μεικτός πληθυσμός)

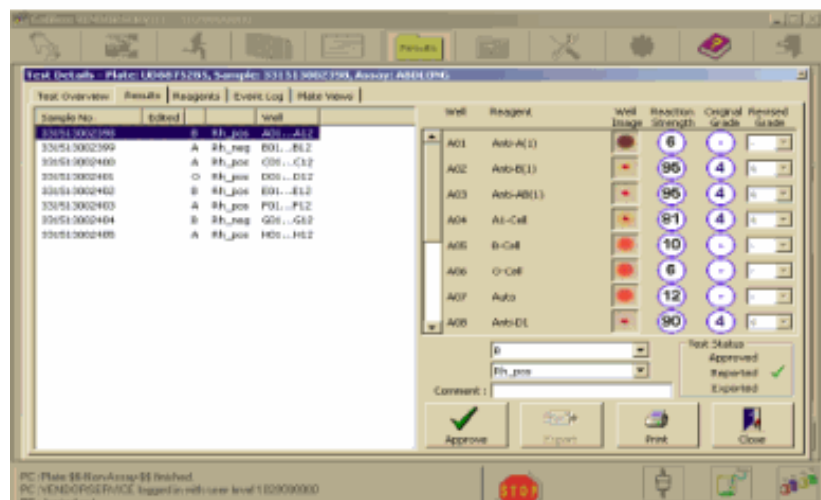


ΣΗΜΕΡΙΝΟ STATUS ΤΗΣ ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ (σε σχέση με τον αυτοματισμό)

- Ο προμεταγγισιακός έλεγχος των ασθενών καλύπτεται με τη τεχνική μικροστηλών αιμοσυγκόλλησης σε εξαιρετικά υψηλό ποσοστό από 2 Αναλυτές που αυτοματοποιούν μία μεγάλη σειρά εξετάσεων



ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ
μέθοδος στερεάς φάσης
ABORhD/RVS
Χαρακτηρισμός ομάδας
διαβάθμιση αντίδρασης



Καθορισμός Ομάδας αίματος

- ΥΠΟΧΡΕΩΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΜΕ ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ ΜΕΘΟΔΟ ΑΙΜΟΣΥΓΚΟΛΛΗΣΗ
- **ΕΥΘΕΙΑ:** ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΤΙΓΟΝΩΝ ΑΒΟ ΕΠΙ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΩΝ
- **ΑΝΑΣΤΡΟΦΗ :** ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΦΥΙΚΩΝ ΙΣΟΣΥΓΚΟΛΛΗΤΙΝΩΝ ΑΝΤΙ-Α ΚΑΙ ΑΝΤΙ-Β ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΟΥΣ
- Τα ευρήματα από την ευθεία και την ανάστροφη πρέπει να ταυτίζονται!!!

• Illustration of the forward and reverse grouping reaction patterns of the ABO groups using a blood group tile

	Anti-A	Anti-B	Anti-AB		A cells	B cells	O cells
A							
B							
AB							
O							

Προμεταγγισιακός έλεγχος

Έλεγχος ασθενούς

- Πλήρης ομάδα ορθή με ανάστροφη
- Έμμεση coombs
- Άμεση coombs όταν ζητείται
- Φαινότυπος Rhesus
- **Διασταύρωση** στους 37 και στο περιβάλλον
- Ταυτοποίηση ερυθροκυττάρων αντιγόνων επί θετικού αποτελέσματος έμμεσης coombs
- Επιβεβαίωση ABO / rhesus D μονάδας και ασθενούς

Διασταύρωση

Αφού έχει επιλεγεί το αίμα, το οποίο θα χορηγηθεί στον ασθενή, ακολουθεί η διασταύρωση του αίματος του δέκτη με εκείνο του δότη.

Η διασταύρωση έχει σαν σκοπό την ανίχνευση (πριν γίνει η μετάγγιση) αντισωμάτων τέλειων ή ατελών - στον ασθενή - δέκτη, που πιθανόν θα κατέστρεφαν τα ερυθρά του δότη μετά τη μετάγγιση.

Στη διαδικασία της διασταύρωσης χρησιμοποιούνται διάφορα υποστρώματα, τα οποία ελέγχονται σε διάφορες θερμοκρασίες και φέρνουν σε επαφή τον ορό του δέκτη με τα ερυθροκύτταρα του δότη.

Διασταύρωση

Η διασταύρωση είναι μια δοκιμαστική μετάγγιση, όπου σε δοκιμαστικό σωλήνα αναμιγνύονται τα ερυθροκύτταρα του δότη με ορό του λήπτη ώστε να φανεί το ενδεχόμενο σοβαρής αντίδρασης στη μετάγγιση.

- **Σωληνάριο γενικής:** Προσδιορισμός ABO και Rh, διασταύρωση αίματος.
- **Vasserman:** Χειροκίνητος προσδιορισμός ομάδας, ορός για επαλήθευση ομάδας η διενέργεια έμμεσης coombs.

Διασταύρωση

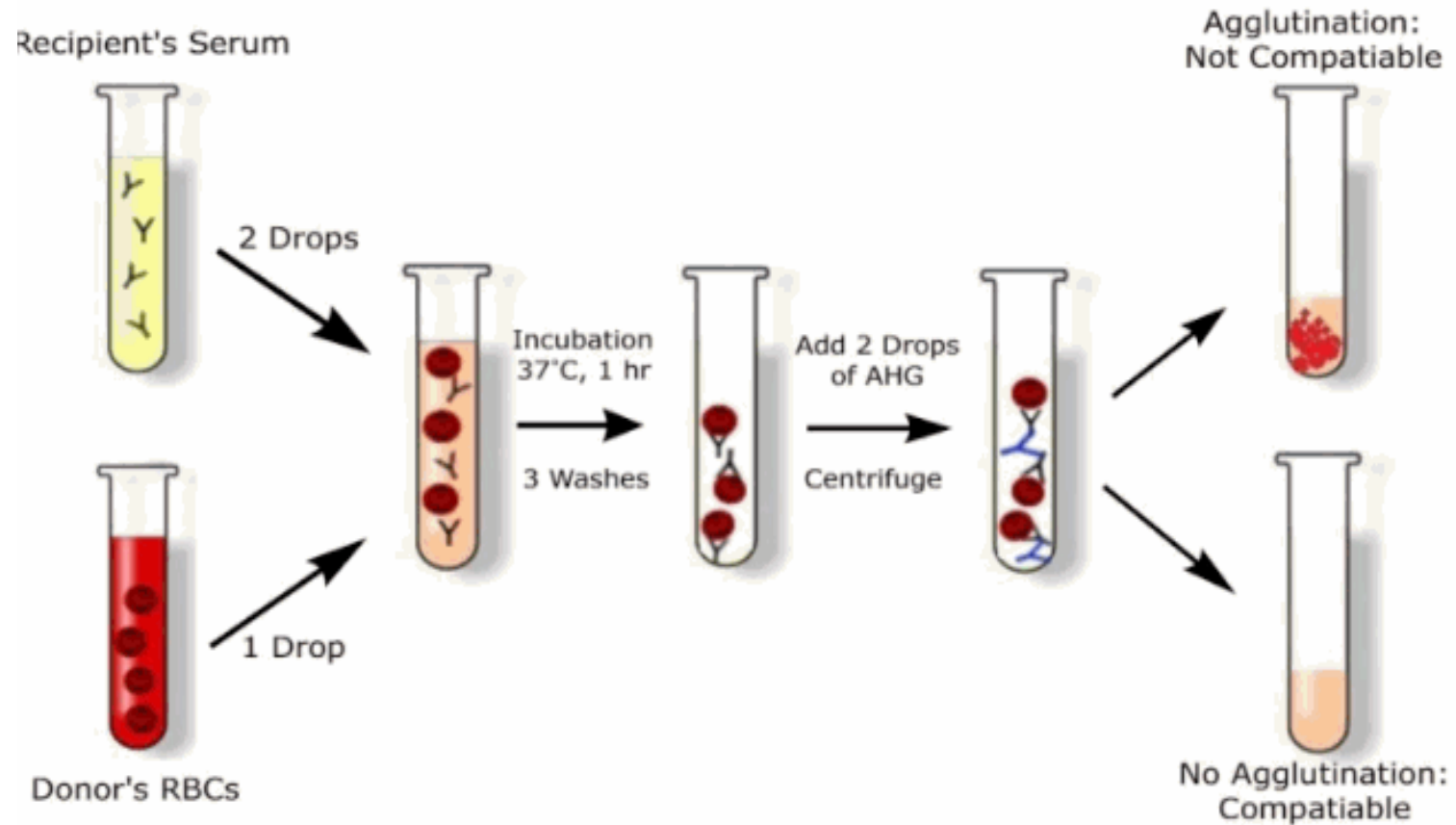
Η πιο θανατηφόρος αντίδραση που σχετίζεται με τη μετάγγιση είναι η ασυμβατότητα ABO προκαλώντας ενδοαγγειακή αιμόλυση που προκαλείται από το συμπλήρωμα !

- Εάν από τον έλεγχο με διασταύρωση αποκαλυφθούν **αντισώματα** τα οποία θα κατέστρεφαν τα ερυθρά του δότη, τότε το αίμα που έχει επιλεγεί απορρίπτεται για τη συγκεκριμένη μετάγγιση και ακολουθεί διασταύρωση για άλλη μονάδα αίματος.
- Πρέπει να σημειωθεί. ότι παρά την προσπάθεια για σωστή τεχνική διασταύρωσης και παρότι χρησιμοποιούνται όλο και πιο εξελιγμένες τεχνικές για την ανίχνευση πλήρων ή ατελών αντισωμάτων στον ορό του δέκτη, δεν μπορεί πάντα να εξασφαλισθεί **η φυσιολογική επιβίωση των ερυθροκυττάρων** που θα μεταγγισθούν στο δέκτη και ούτε να προληφθεί η **ανοσοποίηση** του δέκτη.

Διασταύρωση

- Η διασταυρούμενη αντιστοίχιση περιλαμβάνει την ανάμιξη των RBC δότη με τον ορό του λήπτη για την ανίχνευση θανατηφόρων αντιδράσεων
- Έχει τρεις φάσεις στις οποίες :
- η πρώτη φάση (1-5 λεπτά) περιλαμβάνει ανίχνευση της ασυμβατότητας ABO και ανίχνευση αντισώματος κατά συστημάτων MN, P και Lewis.
- Η δεύτερη φάση (30-45 λεπτά σε αλβουμίνη και 10-20 λεπτά σε διάλυμα χαμηλού ιοντικού άλατος) περιλαμβάνει επώαση αντιδραστηρίων πρώτης φάσης στους 37 ° C για ανίχνευση ατελών αντισωμάτων του συστήματος Rh.
- Η τρίτη φάση συνίσταται στην προσθήκη ορών αντι-σφαιρίνης στα επωασθέντα αντιδραστήρια δεύτερης φάσης για την ανίχνευση ατελών αντισωμάτων Rh, Kidd, Kell και Duffy.
- Μεταξύ των τριών φάσεων, οι δύο πρώτες φάσεις είναι πιο σημαντικές καθώς ανιχνεύουν αυτούς που εμπλέκονται σε θανατηφόρο HTR.
- Ο συνολικός χρόνος που απαιτείται για τις τρεις φάσεις είναι μεταξύ 45 και 60 λεπτών.

Διασταύρωση





ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ!