Comparison between gel and tube methods in antibody screening by using Indirect Coombs in hemoglobinopathies patients in Latakia

Dr. Suzanne Alshimali*
Dr. Mohamad Ayman Awama**
Saraa Baddour***

(Received 24 / 10 / 2021. Accepted 8 / 2 / 2022)

□ ABSTRACT □

Antibody screening is of great importance both before blood transfusion, and in the diagnosis of hemolytic transfusion reaction (HTR) and hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN). Anti-human Globulin Test (AHGT), also known as Coombs Test, remains the most important test that is widely used in antibodies detection. The standard gold method for conducting this test has been the conventional tube test, but this method is not without some disadvantages, so other better methods were developed and came into use such as, solid phase tests; which include the Gel Test. This technique has spread rapidly because of its speed, ease of performance, high sensitivity and specificity as reported by several studies, although some other reports described a relative increase in some nonspecific reactions.

In this study, we aim to compare the tube and gel methods in detecting antibodies formed against red blood cells alloantigens in thalassemia and sickle cell disease patients in Latakia.

We conducted antibodies screening by gel and tube methods in parallel for 70 patients using IAT in Liss-coombs at 37º, and compared the results of both methods.

According to our findings, the tube method remains a good option with high sensitivity and specificity.

Key words: Indirect Coombs, Antibodies, Gel test, Blood transfusion, Tube test.

*Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Tishreen University, Lattakia-Syria. Suzanne.alshimali@tishreen.edu.sy

** Assistant Professor, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia-Syria. aymanawama@yahoo.fr

***Postgraduate Student, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia-Syria. saraa.baddour@ tishreen.edu.sy

كشف الأضداد المناعيَّة المتشكِّلة تجاه مستضدات الكريات الحمر لدى مرضى اعتلالات الخضاب في اللاذقية بطريقة كومس اللامباشر؛ مقارنة بين طريقتي الهلام والأنابيب

د. سوزان الشّمالي*

د. محمد أيمن عوّامة**

سراء بدّور***

(تاريخ الإيداع 24 / 10 / 2021. قُبِل للنشر في 8 / 2 / 2022)

□ ملخّص □

يكتسب كشف الأضداد المناعية أهمية بالغة سواءً قبل نقل الدم أو في تشخيص كلٍّ من التفاعلات الانحلالية التالية لنقل الدم والداء الانحلالي عند الجنين/الوليد. ما زال اختبار ضد الغلوبولين البشري Anti-Human Globulin Test/AHGT والذي يعرف أيضاً باختبار كومس Coombs test أهم الاختبارات المستخدمة في كشف الأضداد المناعية. إنَّ الطريقة المعيارية الذهبية لإجراء هذا الاختبار هي طريقة الأنابيب التقليدية. إلا أنَّ هذه الطريقة لا تخلو من بعض السلبيات، لذلك تم تطوير تقنيات أخرى كاختبارات الطور الصلب Solid phase، ومن أنواعها تقنية الهلام Gel test التي انتشرت بسرعة نظراً لسرعتها وسهولة إجرائها وحساسيتها ونوعيتها العاليتين كما أوردت العديد من الأبحاث، رغم أن بعض الدراسات الأخرى أظهرت زيادة نسبية في بعض التفاعلات غير النوعية.

نهدف في هذه الدراسة إلى المقارنة بين طريقتي الأنابيب والهلام في كشف الأضداد المناعية المتشكلة تجاه مستضدات الكريات الحمر لدى مرضى فقر الدم المنجلي والتلاسيميا في محافظة اللاذقية.

تم إجراء مسح الأضداد المناعية عند 70 مريضاً بطريقتي الهلام والأنابيب وفق مبدأ كومس اللامباشر وقارنا نتائج الطريقتين. ووفقاً للنتائج التي توصلنا إليها لاحظنا أنه مع تطور تقنيات إجراء اختبار كومس اللامباشر، تبقى طريقة الأنابيب خياراً جيداً ذا حساسية ونوعية عاليتين.

الكلمات المفتاحية: كومس اللامباشر، الأضداد المناعية، اختبار الهلام، نقل الدم، اختبار الأنابيب

* مدرّسة – قسم الطب المخبري–كلية الطب البشري–جامعة تشرين–اللاذقية–سوريا Suzanne.alshimali@tishreen.edu.sy

** مدرّس – قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة–كلية الصيدلة–جامعة تشرين–اللاذقية–سوريا aymanawama@yahoo.fr

*** طالبة دراسات عليا–قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة–كلية الصيدلة–جامعة تشرين–اللاذقية–سوريا saraa.baddour@ tishreen.edu.sy

مقدمة

يعتبر نقل الدم إجراءً هاماً ومنقذاً للحياة في العديد من الأمراض والحالات السريرية التي يكون فيها تصحيح نقص الأكسجة الناتج عن فقر الدم الحاد أو المزمن بالغ الأهمية كما هو الحال في النزوف الحادة، مرضى اعتلالات الهيموغلوبين (مثل فقر الدم المنجلي والتلاسيميا) [1]، وكذلك مرضى الأورام [2]. ومع ذلك، قد يترافق نقل الدم مع العديد من المضاعفات التي قد تكون مميتة أحياناً [3]. يعتبر تشكل الأضداد تجاه مستضدات الكريات الحمر الغريبة التي يفوق عددها 300 مستضد من التحديات الهامة في طب نقل الدم [4]. تكون الأضداد المتشكلة تجاه مستضدات الحمر عادة إما من نمط IgM أو IgG.

باستثناء أضداد الزمرة ABO الطبيعية والنظامية وواسعة الطيف الحراري، ليس لأضداد IgM أهمية سريرية ملحوظة نظراً لكونها أضداداً باردة (أي أنَّ درجة حرارة التفاعل المثلى لها 4-22°). أما بالنسبة لأضداد IgG فهي أضداد مناعية خيفية alloimmune غالباً وليست طبيعية الحدوث، أي تنشأ عقب التعرض لمستضد مخايف (نقل دم أو حمل). تعتبر هذه الأضداد دافئة (تعمل في درجة حرارة الجسم)، أحادية الجزيئة/ثنائية التكافؤ وغير راصة، على خلاف أضداد IgM كبيرة الحجم (خماسية الجزيئة pentamer) [5، 6].

لم يكن ممكناً كشف أضداد IgG قبل عام 1945، حينما قدم العالم روبن كومس مصل ضد الغلوبلين البشري Anti-human Globulin (AHG) أو ما أصبح يعرف نسبة له بمصل كومس Coombs serum [7]. يحوي مصل كومس على أضداد موجهة ضد الجزء الثابت Fc من الأضداد البشرية IgG، وأحياناً قد يستهدف المتممة أيضاً تجاه الجزء C3d [8]. ومنذ ذلك الوقت، أصبح من الممكن عيانياً كشف ارتباط الأضداد IgG إلى مستضداتها الموافقة على سطح الكريات الحمراء عبر إضافة AHG الذي يقوم بتوليد شبكة ارتصاص مرئية بالعين المجردة. إن أضداد IgG هي أضداد طاهية ولها مستقبلات على سطح البالعات الكبيرة التي تلتهم الكريات الحمر المغطاة بأضداد IgG. يسمى ذلك بالانحلال خارج الأوعية Extravascular، وهذه هي آلية حدوث الارتكاس الانحلالي الآجل التالي لنقل الدم delayed hemolytic transfusion reaction\DHTR والذي تسببه عادة أضداد IgG المخايفة [9، 10].

يشير مفهوم "الأضداد الهامة سريرياً" Clinically Significant Antibodies إلى قدرة الضد على إحداث ارتكاسات انحلالية تالية لنقل الدم Hemolytic transfusion reaction (HTR) تتراوح شدتها من خفيفة إلى شديدة، وكذلك يشير هذا المصطلح إلى قدرتها على إحداث الداء الانحلالي لدى الأجنة وحديثي الولادة Hemolytic disease of the fetus and newborn (HDFN) وذلك بعد انتقالها من الأم إلى الجنين عبر المشيمة. أما مخبرياً فتتصف الأضداد الهامة سريرياً بأنها من النمط IgG غالباً، فعَّالة في الدرجة 37°، وتُكشَف باختبار ضد الغلوبلين البشري اللامباشر Indirect antiglobulin test\IAT [9].

اختبار ضد الغلوبلين البشري (اختبار كومس) (AHG) Anti-human globulin:

هو الاختبار الأساسي في عملية البحث عن الأضداد المناعية اللانظامية irregular المتشكلة تجاه مستضدات الكريات الحمر. يسمح اختبار AHG بكشف أضداد IgG غير الراصة بطبيعتها، حيث يستخدم لتحري الكريات الحمر المحسسة بأضداد IgG (الغيرية أو الذاتية) ومكونات المتممة. من الممكن أن يكون هذا التحسيس sensitization قد حدث داخل العضوية الحية In vivo وعندها لا يتطلب الكشف عن وجودها على سطح الكريات الحمر سوى إضافة مصل كومس وإظهار التراص، وهذا ما يدعى تفاعل كومس (ضد الغلوبلين) المباشر Direct Antiglobulin

Test/DAT، الذي يُطلب إجراؤه من أجل تشخيص فاقات الدم الانحلالية المناعية الذاتية AIHA Autoimmune hemolytic anemia والمحرضة بالأدوية، الارتكاسات الانحلالية التالية لنقل الدم HTR، والداء الانحلالي عند الوليد [11].

أما في تفاعل كومس (ضد الغلوبلين) غير المباشر IAT فيتم تحسيس الكريات الحمر في المخبر In vitro، وهو من أكثر الاختبارات شيوعاً في مخابر أمصال الزمر الدموية وبنوك الدم على الإطلاق، ومن أهم استخداماته: كشف وجود الأضداد المناعية في المصل سواء تجاه كريات دم المتبرع (اختبار التصالب Crossmatching) أو تجاه الكريات الحمر الماسحة المنمطة بشكل موسع (اختبار مسح الأضداد المناعية/اللانظامية Antibody screen)، وتحديد هويتها (Antibody identification) وعيارها (Antibody titration) [12].

الطرق المستخدمة في تطبيق اختبار ضد الغلوبلين:

تنوعت التقنيات المستخدمة في إجراء هذا الاختبار بدءاً من طريقة الأنابيب التقليدية Conventional Tube Test (CTT)؛ وهي أول الطرق استخداماً منذ مطلع القرن العشرين، وما زالت شائعة الاستخدام على نطاق واسع حتى الآن، كما تعتبر أيضاً الطريقة المعيارية Standard [13]. تم لاحقاً تطوير طرق يحدث فيها التفاعل في الوسط الصلب Solid phase كطريقة الارتصاص ضمن العمود Column Agglutination Technique (CAT) التي يمثلها بالدرجة الأولى اختبار الهلام Gel test [14].

1- طريقة الأنابيب التقليدية CTT:

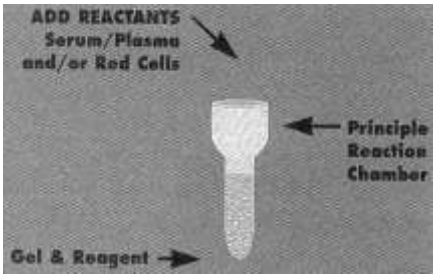
استُخدمت بدايةً كطريقة معيارية في الدراسات الدموية المناعية كاختبار كومس المباشر من أجل تشخيص فقر الدم الانحلالي المناعي الذاتي وكذلك من أجل مسح الأضداد في طب نقل الدم، كما عُرفت هذه الطريقة بكونها طريقة قيمة وغير مكلفة لإجراء اختبار كومس اللامباشر من أجل تحديد أضداد الكريات الحمر الهامة سريرياً.

يوجد العديد من العوامل التي تؤثر في تكرارية وموثوقية هذه الطريقة [15]، كما أنها طويلة ومستهلكة للوقت والذي يمكن أن يؤخر نقل الدم في الحالات الطارئة. تتصف هذه الطريقة أيضاً بأنها مجهدة وعرضة لحدوث الأخطاء بسبب مراحل العمل المعقدة (الحاجة إلى الغسل عدة مرات وبعناية)، كما أنها تتطلب خبرة الفاحص من أجل قراءة النتائج وتحديد درجة التفاعل، ولا يمكن قراءة النتيجة سوى مرة واحدة فقط. ذكرت الدراسات أيضاً إمكانية حدوث ضياع للأضداد المرتبطة بألفة منخفضة على سطح الكريات الحمر أثناء عملية الغسل. تبدي هذه التقنية إنتاجية منخفضة Low Reproducibility وحساسية متغيرة ومن الصعب أن يتم معايرتها بين المخابر المختلفة [13-16].

2- اختبار الهلام Gel test:

تم تطوير اختبار الهلام عام 1985 من قبل الدكتور إيف لابيير Dr.Yves Lapierre في مدينة ليون Lyon الفرنسية. أجرى الدكتور لابيير بحوثاً حول هذه التقنية الجديدة في محاولة لتطوير تفاعلات أكثر استقراراً stable في اختبارات بنك الدم للوصول إلى نتائج أكثر قابلية للتكرار مقارنةً مع طريقة الأنابيب التقليدية [17]. ركزت جهود لابيير على ضبط متغيرين نوعيين في نظام اختبار الأنابيب التقليدي وهما: إعادة التعليق الفيزيائي للكريات الحمر بعد التنبيذ، وتفسير تفاعلات التراص الدموي. وتحرَّى في بحثه أوساطاً مختلفة من الجيلاتين، هلام الأكريل أميد، الخرزات الزجاجية وغيرها في محاولة لحجز وقنص الكداسات agglutinates خلال مرحلة التثقيل أو التنبيذ، وأظهرت جزئيات الهلام أنها قد تكون المادة المطلوبة.

وجد د. لابيير أنه يمكنه إنجاز إجراء اختبار ضد الغلوبلين دون الحاجة إلى غسيل متكرر للكريات قبل إضافة مصل ضد الغلوبلين البشري AHG وأيضاً دون الحاجة لإضافة كريات شاهدة لكل اختبارات AHG السلبية؛ وهما مرحلتان متطلبتان للجهد والوقت والخبرة في اختبار الأنابيب التقليدية. يتم في اختبار الهلام التنبيذ المعاير المضبوط للكريات الحمر خلال الهلام الممزوج بالكواشف المناسبة والمعلقة مسبقاً في أنابيب صغروية microtubes خاصة. يُستخدَم عادة في اختبار الهلام البطاقة البلاستيكية الخاصة وتقيس حوالي 5×7 سم وتتألف من 6 آبار (كما سيرد شرحها لاحقاً)، كل منها مؤلف من حجرة تفاعل علوية تكون أوسع من القسم السفلي الطويل والضيق الذي يشار إليه بالعمود column. إن شكل وطول البئر يؤمن سطحاً واسعاً لتماس كبير بين الكريات الحمر والهلام. إنَّ جزئيات الهلام مسامية وبالتالي فإنها تخدم كوسط تفاعل ومرشحة filter في آنٍ واحد، حيث أنها تقوم بنخل الجزيئات اعتماداً على حجم كداسة الكريات الحمر الموجودة في البئر أثناء التنبيذ. تحتجز جزيئات الهلام التكدسات الكبيرة منها ولا تسمح لها بأن ترحل خلال الهلام، فتبقى الكريات الحمر المرتصة ثابتة أو معلقة في الهلام. أما الكريات غير المرتصة فيمكن لها أن ترحل عبر الهلام بدون إعاقة مشكلة تجمعاً pellet في القاع. وعلى عكس التراص الملاحظ مع الطرق التقليدية في الأنابيب، فإن التفاعلات في الهلام ثابتة تسمح بالمراقبة أو المراجعة بعد فترة من الزمن. يمكن بالإجمال أن تُلخَّص محاسن اختبار الهلام في: الحساسية العالية، وإمكانية توحيد طرق العمل standardization، بالإضافة إلى أن قراءة التفاعل نوعية وثابتة عدة أيام على عكس الأنابيب التي يجب قراءتها على الفور ولمرة واحدة، كما يمكن تصويرها وتوثيقها بسهولة. تعتبر أيضاً طريقة سهلة وقصيرة مما يزيد الإنتاجية، ولا تحتاج إلا لحجم قليل من العينة، وتقلل خطر التلوث، بالإضافة إلى أنها قابلة للأتمتة الجزئية والكاملة [14، 18، 19].



يعتمد اختيار التقنية التي سيتم استخدامها في بنوك الدم على توفر الاختبار، كلفته، المهارات التقنية اللازمة، حجم العمل في المخبر، حساسية ونوعية الطريقة وإمكانية الأتمتة [20].

في بلدنا، ما زالت طريقة الأنابيب هي الطريقة الأكثر انتشاراً في أغلب بنوك الدم، مع الإشارة إلى أن طريقة الهلام ورغم ارتفاع كلفتها إلا أنها مستخدمة في قسم لا يستهان به من المشافي والمخابر وبنوك الدم.

أهمية البحث وأهدافه

يعد تشكل الأضداد المناعية عقب عمليات نقل الدم (خاصة المتكرر) والحمل من المشاكل الهامة التي تواجه الطبيب السريري والمخبري على حد سواء. قد يسبب تشكل هذه الأضداد تفاعلات انحلالية (عاجلة أو آجلة) ممكن أن تكون شديدة وتنتهي بالموت، أو قد يؤدي إلى حدوث الداء الانحلالي عند الجنين/ الوليد الذي قد ينتهي بعقابيل خطيرة. كما أن تشكل الأضداد المناعية يعيق بنك الدم من تأمين وحدات دم ملائمة للمرضى بالزمن المناسب. ما زال اختبار كومس اللامباشر IAT أهم الاختبارات المستخدمة في كشف الأضداد المناعية وأكثرها شيوعاً، فاختبارات التصالب، مسح الأضداد المناعية، تحديد هوية الأضداد وعيارها، جميعها تعتمد على هذا الاختبار.

ونظراً لأهمية الـ IAT في تأمين وحدات الدم الآمنة والوقاية من التفاعلات الانحلالية التالية لنقل الدم، وتشخيصها، وتشخيص الداء الانحلالي عند الجنين/الوليد، فإن لحساسية الطريقة المستخدمة في إجرائه ونوعيتها انعكاسات وتأثيرات

هامة. إن أكثر الطرق استخداماً لإجراء هذا الاختبار هي طريقة الأنابيب التقليدية –الأقدم والأقل كلفة– وطريقة الهلام والتي ازداد انتشارها مؤخراً. ونظراً لندرة الدراسات السابقة التي تقارن بين هاتين الطريقتين في بلادنا، قمنا بإجراء هذه الدراسة بهدف المقارنة بين طريقتي الهلام والأنابيب في اختبار مسح الأضداد لدى مرضى اعتلالات الخضاب في مدينة اللاذقية.

الدراسة العملية:

1- **العينات:** شملت الدراسة 70 مريضاً من مرضى فقر الدم المنجلي والتلاسيميا الذين تعرضوا لنقل دم متكرر، والمراجعين لكل من مشفى تشرين الجامعي ومشفى الوطني ومركز التلاسيميا في اللاذقية، في الفترة الممتدة بين آب 2020 و آذار 2021، تم جمع عينات دم كامل على أنابيب EDTA وذلك بعد الحصول على الموافقة المستنيرة لهؤلاء المرضى أو لذويهم.

بعد جمع العينات الدموية، تم تثفيلها من أجل الحصول على طبقة البلاسما وتجميدها بالدرجة C° 30- إلى حين إجراء الاختبارات.

2- الطرق والكواشف المستخدمة:

1- مسح الأضداد بطريقة كومس اللامباشر في الهلام باستخدام رعيل الكريات الماسحة التجارية:

تم استخدام بطاقات الهلام "LISS-Coombs gel card (INVITROGEL TEST.SYSTEM, Germany) ، والتي تحوي ستة آبار مملوءة بالهلام مع ضد الغلوبلين البشري AHG عديد النوعية (anti- IgG + anti-C)، بطاقة لكل عينتين، ورعيل من ثلاث كريات كاشفة 3-cells panel (ReaCell I, II, III; screening cells,) Hungary REF:41180 وهي كريات O تحمل على سطحها جميع مستضدات الزمر الدموية الهامة سريرياً ومحضرة بتركيز 0.8%) الشكل (1)، وتم اتباع تعليمات الشركة المصنعة المرفقة بالعتائد kits.

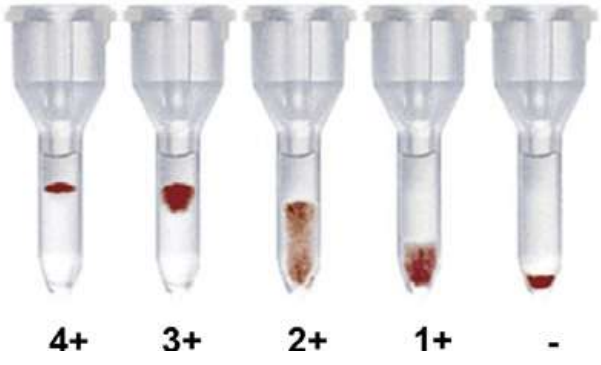
بعد تذويب عينات البلاسما المجمدة بوضعها في حمام مائي بدرجة 37°، والتأكد من وصول حرارة الكريات الكاشفة إلى درجة حرارة الغرفة، تم وضع 25 مكل من بلاسما المريض في كل بئر من الآبار الثلاثة المخصصة لكل مريض في بطاقة الهلام. ومن ثم تم إضافة 50 مكل من كل من معلقات كريات الاختبار I , II , III بعد مزجها بلطف ونقلها إلى الحاضنة الخاصة ID-incubator بدرجة حرارة 37° لمدة 15 دقيقة، وبعد ذلك تم تثفيلها في المثفلة الخاصة بهذه البطاقات لمدة 10 دقائق وقراءة النتائج.

الشكل (1). بطاقة الهلام ورعيل الكريات الماسحة التجارية

تم تحديد درجة التفاعلات من 0 إلى 4 كالتالي:

- 4+: عند تجمع الكريات الحمر المرتصة على شكل عصابة متماسكة solid band في أعلى عمود الهلام

- 3+: يكون تجمع الكريات الحمر المرتصة في النصف العلوي من الهلام مع بعض التجمعات المتبعثرة إلى الأسفل منها
- 2+: عند تبعثر هذه التجمعات على طول العمود مع عدد قليل يتجمع أسفل العمود
- 1+: في حال تواجد التجمعات في النصف الأسفل من عمود الهلام مع وجود ترسب لبعض الكريات الحمر غير المرتصة في الأسفل.
- في حين تظهر التفاعلات السلبية (0) على شكل زر متجمع pellet من الكريات الحمر في أسفل عمود الجل مع غياب وجود تراص ضمن الهلام. الشكل (2).



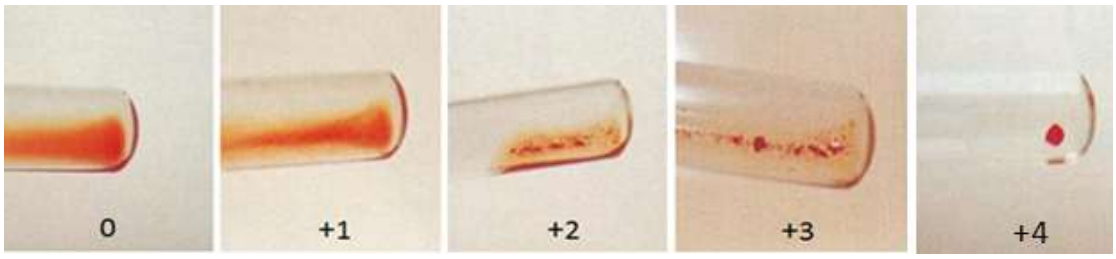
الشكل (2). درجات نتائج التفاعل في الهلام

أما تفاعلات الحقل المختلط Mixed – Field (M.F) فيتم التعرف عليها كطبقة من كداسات الكريات الحمر في قمة الهلام يصاحبها تجمع pellet في القاع.

2- مسح الأضداد بطريقة كومس اللامباشر باستخدام طريقة الأنابيب ورعيل الكريات الماسحة التجارية:

تم إجراء مسح الأضداد في الأنابيب للعينات السابقة باستخدام رعيل الكريات الماسحة التجارية المحضرة بتركيز 3% (ReaCell I, II, III; screening cells, Hungary REF:41120):

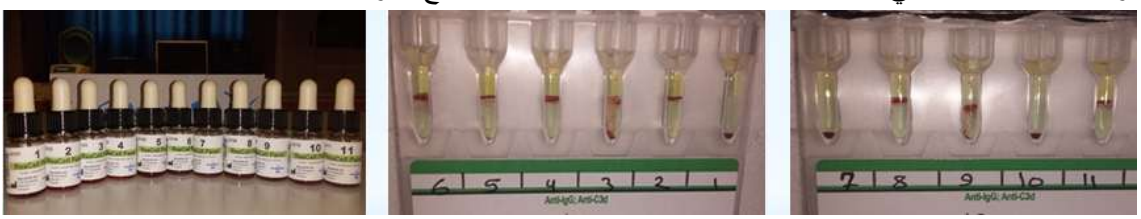
في أنبوب الاختبار نضع حجم من بلاسما المريض + حجمين من معلق الكريات الكاشفة 3%، تمزج جيداً (بالرج اللطيف) وتحضن في محم مائي 37 درجة لمدة 15 دقيقة (كون الكريات الكاشفة معلقة في محلول LISS). ثم يغسل المزيج 3 مرات على الأقل بالمحلول الملحي الفيزيولوجي Nacl 0.9% ويُراعى التخلص من كامل المحلول الملحي في نهاية كل غسيل قدر الإمكان. ومن ثم تُعلَّق الكريات بالرج اللطيف، ويضاف حجمين من مصل كومس عديد النوعية (المصل المضاد للغلوبلين الإنساني) polyspecific AHG وتمزج جيداً. ثم يثفل الأنبوب (RCF=1000) لمدة دقيقة. نعيد تعليق الكريات بلطف، ونقرأ التراص عيانياً كما يوضح الشكل (3). في حال السلبية العيانية، يمكن التأكد من النتيجة باستخدام المجهر الضوئي بوضع قطرة من معلق التفاعل على شريحة زجاجية. كما قمنا بإضافة شاهد كومس Coombs control إلى جميع العينات السلبية وهو عبارة عن كريات محسسة بـ IgG، وبالتالي يجب أن يظهر تراص دموي لهذه الكريات بواسطة anti – IgG الموجود في كاشف AHG في كل عينة سلبية حقيقية. وإذا لم يحدث التراص الدموي عقب إضافة هذه الكريات المحسسة فإن نتيجة التفاعل تعتبر غير صالحة (سلبية كاذبة) ويجب إعادة الاختبار مع الانتباه إلى كفاءة مراحل الغسل.



الشكل (3). درجات نتائج التفاعل في الأنابيب

3- تعيين هوية الأضداد بطريقة كومس اللامباشر في الهلام باستخدام رعيل الكريات الماسحة التجارية:

في حال إيجابية مسح الأضداد، ولتعيين هوية الضد الموجود، قمنا بمفاعلة كل من العينات الإيجابية مع رعيل 11 كرية منمطة كاشفة (ReaCell Panel, Hungary REF: 43100) باستخدام بطاقات الهلام (بطاقتين لكل مريض) كما يوضح الشكل (4). تم اتباع الخطوات السابقة ذاتها، وتسجيل النتائج على لوحة المستضدات antingen table المرفقة بالكيت حيث يعطي كل ضد نمطاً خاصاً مختلفاً من التفاعلات مع الكريات الكاشفة.



الشكل (4). تعيين هوية الضد باستخدام بطاقات الهلام ورعيل الإحدى عشرة كرية

4- تعيين هوية الأضداد بطريقة كومس اللامباشر في الأنابيب باستخدام رعيل الكريات الماسحة التجارية:

تم تعيين هوية الضد للعينات الإيجابية السابقة باستخدام رعيل ال 11 كرية في الأنابيب باتباع خطوات إجراء طريقة الأنابيب المذكورة سابقاً، وأيضاً تم تسجيل النتائج على لوحة المستضدات المرفقة بالكيت.

النتائج والمناقشة

النتائج:

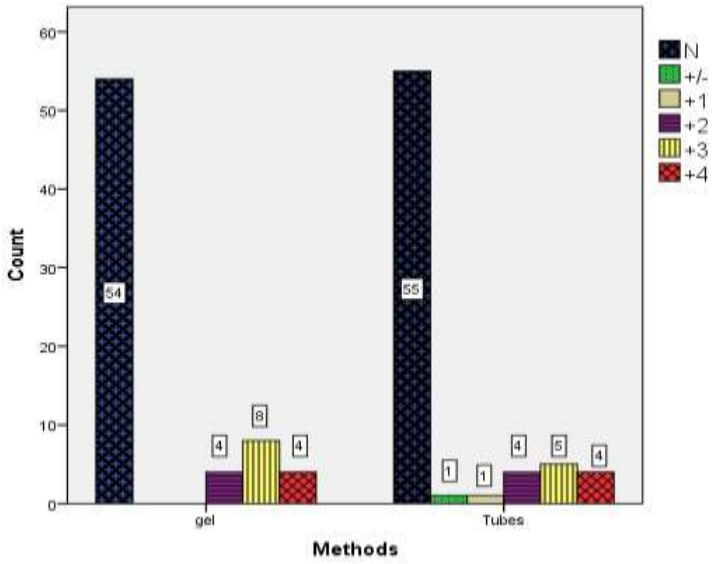
عند إجراء مسح الأضداد للعينات المأخوذة من 70 مريضاً بكل من طريقتي الأنابيب والهلام بشكل متوازي وباستخدام الكريات الكاشفة المنمطة ذاتها، حصلنا على 16 عينة إيجابية في الهلام، في حين كشفت طريقة الأنابيب وجود الأضداد في 15عينة من العينات الإيجابية السابقة، وكانت جميع العينات سلبية مسح الأضداد في الهلام سلبية أيضاً باستخدام طريقة الأنابيب.

بدايةً عند قراءة نتائج التفاعلات لاحظنا أن 68 عينة من هذه العينات أعطت نتائج موافقة تماماً لما نتج لدينا عند المسح باستخدام تقنية الهلام، إلا أن العينتين المتبقيتين –والتي أظهرت إيجابية بالهلام– لم تبديان تراصاً عيانياً عند

إجراء المسح بطريقة الأنابيب، ولكن تبين بالقراءة المجهرية وجود إيجابية خفيفة جداً (±) في إحدى هاتين العينتين (بعض التجمعات المتناثرة للكريات الحمر بالتكبير 40x) وبقيت النتيجة نفسها مع تكرار فحص العينة.

كانت درجة التفاعلات الإيجابية ذاتها في الطريقتين في حوالي 80% من الحالات أما الحالات المتبقية والتي أظهرت اختلافاً في درجة إيجابية التفاعل (ثلاث عينات) فقد كانت الإيجابية أقوى في الهلام، إلا أن هذه الاختلافات لم تكن ذات أهمية إحصائية (P=0.616).

يوضح الشكل (5) نتائج مسح الأضداد بالطريقتين ودرجات الإيجابية في كل منهما.



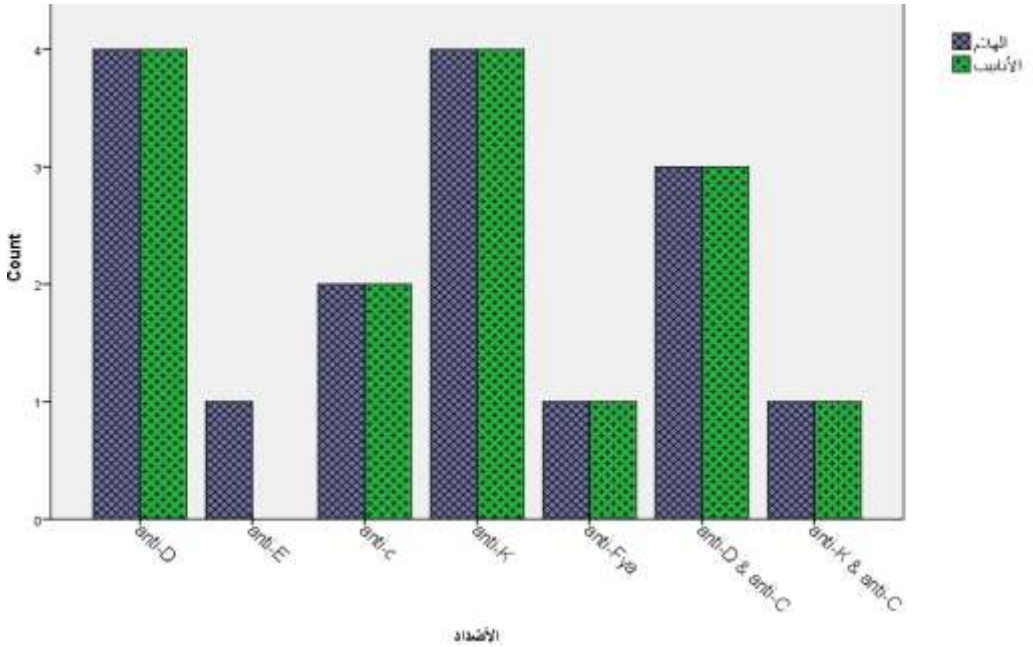
الشكل (5). نتائج مسح الأضداد بطريقتي الهلام والأنابيب ودرجات الإيجابية في كل منهما

عند مقارنة نتائج الطريقتين تبين أن حساسية طريقة الأنابيب مقارنة بطريقة الهلام 93.8%، في حين كانت النوعية 100%، ولم تكن هذه الفروقات هامة إحصائياً (P=0.839) كما يظهر الجدول رقم (1).

الجدول رقم (1). مقارنة نتائج طريقتي الهلام والأنابيب

		مسح الأضداد بالهلام	
		إيجابي	سلبي
مسح الأضداد بالأنابيب	إيجابي	(93.8%) 15	0
	سلبي	1	(100%) 54
العدد الكلي (70)		16	54

في اختبار التعرف على الأضداد، لاحظنا أنه في 75% من الحالات كانت الأضداد وحيدة النوعية، في حين كان 25% منها متعددة/ثنائية النوعية. كانت الأضداد التي تمكننا من كشفها بكل من الطريقتين هي أضداد مهمة سريرياً تنتمي إلى نظام RH (anti–D، anti–C، anti–c)، كيل (anti–K) ودوفي (anti–FY^a) في حين كان الضد الذي لم نتمكن من كشفه عند استخدام تقنية الأنابيب هو anti–E. يظهر الشكل (6) نوعية الأضداد التي تم تحديدها باستخدام كلتا الطريقتين لدى المرضى الممنَّعين.



الشكل رقم (6). نوعية الأضداد التي تم تحديدها باستخدام كل من طريقتي الهلام والأنابيب

المناقشة:

إن اختبار مسح الأضداد المناعية هو جزء أساسي من عملية التوافق قبل نقل الدم Pretransfusion compatibility testing إلى جانب اختبار التصالب. كما أنه مهم في تشخيص الارتكاسات الانحلالية التالية لنقل الدم، خاصة عند المرضى المعتمدين على نقل الدم، وفي مراقبة الحمل و تشخيص الداء الانحلالي عند الأجنة وحديثي الولادة HDFN. بعد مرور أكثر من سبعة عقود على اكتشاف اختبار كومس اللامباشر IAT، لايزال الطريقة الأساسية المعتمدة في إجراء مسح الأضداد [12]، مع ظهور تقنيات متعددة لإجرائه إلى جانب طريقة الأنابيب التقليدية [14]. يوجد حالياً عدة طرق مستخدمة في مسح الأضداد متوفرة في مراكز الدم المختلفة. من هذه التقنيات اختبار الهلام الذي يعتبر الأوسع انتشاراً في كثير من البلدان، وقد أصبح مستخدماً في سوريا منذ عدة سنوات. تجدر الإشارة إلى أنه يتم الاعتماد عليه في إجراء مسح الأضداد والتصالب في مشفى تشرين الجامعي كما في العديد من المخابر وبنوك الدم الأخرى في بلدنا، بينما ما زالت طريقة الأنابيب هي الأكثر شيوعاً (غالباً بسبب الكلفة العالية لاختبارات الهلام). تعتبر هذه الدراسة الأولى من نوعها للمقارنة بين الطريقتين في محافظة اللاذقية.

اختلفت الدراسات حول حساسية ونوعية هذه الطرق، فعلى الرغم من وجود دراسات تعتبر أن حساسية تقنية الهلام أفضل من طريقة الأنابيب التقليدية [21–24]، إلا أن نوعية وحساسية الأنابيب كانت في دراستنا مقاربة لما هي عليه في الهلام حيث بلغتا 100% و 93.8% على التوالي ودون وجود فروقات هامة إحصائياً بين الطريقتين. قد تكون الحساسية المنخفضة للأنابيب في بعض الدراسات مقارنة بالحساسية الجيدة التي توصلنا إليها في دراستنا عائدة إلى عدم استخدامهم شاهد كومس، وبالتالي من الممكن أن تكون السلبيات الكاذبة ناجمة عن استهلاك مصل كومس من قبل الأضداد الحرة المتبقية في المصل نتيجة عدم كفاءة عملية الغسل. كما قد يكون اختلاف نتائج الحساسية بين الدراسات عائداً إلى اختلاف نوعية الأضداد المتشكلة في كل بلد واختلاف حساسيتها للكشف بين طريقة وأخرى. أما

بالنسبة للسلبية الكاذبة التي حصلنا عليها عند مسح أحد العينات في الأنابيب بعد التأكد من سلبيتها تحت المجهر وباستخدام شاهد كومس، فقد تكون عائدة إلى احتمالية كون الضد الذي لم يتم كشفه ضعيف الارتباط وبالتالي حدث شطف له عن سطح الكريات الحمر أثناء عملية الغسل [13].

الاستنتاجات والتوصيات

إذاً وفقاً للنتائج التي توصلنا إليها في هذه الدراسة نلاحظ أنه على الرغم من مزايا تقنية الهلام من حساسية مرتفعة، سهولة وسرعة إجرائها، إمكانية التوثيق والأتمتة وغيرها، إلا أن طريقة الأنابيب تبقى خياراً مناسباً (عند إجرائها بشكل معياري) على الرغم من صعوبة إجرائها وعدم ثباتية نتائجها وحاجتها للوقت والجهد والخبرة وذلك في ظل غلاء بطاقات الهلام وعدم توفرها وحاجتها إلى أجهزة مرافقة (حاضنة خاصة، مثفلة خاصة).

نوصي بإجراء دراسة مستقبلية شاملة لنوعيات أضداد إضافية عن تلك التي تضمنتها دراستنا. وكذلك نشير إلى أهمية إجراء دراسات أخرى من أجل مقارنة هاتين الطريقتين في كل من اختبار كومس المباشر، التصالب وعيار الأضداد.

References:

1.Weatherall, D.J. and J.B. Clegg, *Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem.* Bulletin of the World Health Organization, 2001. **79**: p. 704-712.

2.Schrijvers, D., *Management of anemia in cancer patients: transfusions.* The oncologist, 2011. **16**: p. 12-18.

3.Health, U.D.o. and H. Services, *Fatalities reported to the FDA following blood collection*. 2016.

4.Storry, J., et al., *International society of blood transfusion working party on red cell immunogenetics and terminology: report of the Seoul and London meetings.* ISBT science series, 2016. **11**(2): p. 118-122.

5.Reid, M. and C. Lomas-Francis, *The Blood Group Antigen Facts Book. ed Second Academic Press.* San Diego, CA, 2004.

6.Tormey, C.A., J. Fisk, and G. Stack, *Red blood cell alloantibody frequency, specificity, and properties in a population of male military veterans.* Transfusion, 2008. **48**(10): p. 2069-2076.

7.Coombs, R., A. Mourant, and R. Race, *A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins.* British journal of experimental pathology, 1945. **26**(4): p. 255.

8.Champagne, K., et al., *Comparison of affinity column technology and LISS tube tests.* Immunohematology, 1998. **14**(4): p. 149-151.

9.Poole, J. and G. Daniels, *Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine.* Transfusion medicine reviews, 2007. **21**(1): p. 58-71.

10.Flegel, W.A., *Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis.* Transfusion, 2015. **55**(S2): p. S47-S58.

11.Parker, V. and C.A. Tormey, *The direct antiglobulin test: indications, interpretation, and pitfalls.* Archives of pathology & laboratory medicine, 2017. **141**(2): p. 305-310.

12.Harmening, D.M., *Modern blood banking & transfusion practices*. 2018: FA Davis.

13.Mehta, N., et al., *Verification of column agglutination technology with conventional tube technology for naturally occurring antibody titration.* Global Journal of Transfusion Medicine, 2016. **1**(2): p. 46.
14.Rumsey, D. and D. Ciesielski, *New protocols in serologic testing: A review of techniques to meet today's challenges.* IMMUNOHEMATOLOGY-WASHINGTON DC-, 2000. **16**(4): p. 131-137.
15.Adriaansen, M.J. and H.E. Perry, *Validation of column agglutination technology for blood group alloantibody titration.* New Zealand Journal of Medical Laboratory Science, :(3)67 .2013p. 92.
16.Bajpai, M., R. Kaur, and E. Gupta, *Automation in immunohematology.* Asian journal of transfusion science, 2012. **6**(2): p. 140.
17.Lapierre, Y., et al., *The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions.* Transfusion, 1990. **30**(2): p. 109-113.
18.Malyska, H. and D. Weiland, *The gel test.* Laboratory Medicine, 1994. **25**(2): p. 81-85.
19.Blomme, S., E. De Maertelaere, and E. Verhoye, *A comparison of three column agglutination tests for red blood cell alloantibody identification.* BMC research notes, 2020. **13**(1): p. 1-6.
20.Garg, S., et al., *Comparison of micro column technology with conventional tube methods for antibody detection.* Journal of laboratory physicians, 2017. **9**(2): p. 95.
21.Varshney, L. and S. Gupta, *COMPARISON BETWEEN CONVENTIONAL TUBE TECHNIQUE AND COLUMN AGGLUTINATION TECHNIQUE FOR ANTIBODY SCREENING AND IDENTIFICATION AT MGM BLOOD BANK, NAVI MUMBAI.* Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, 2017. **6**(92): p. 6551-6556.
22.Swarup, D., et al. ،*Comparative study of blood cross matching using conventional tube and gel method.* Medical Journal Armed Forces India, 2008. **64**(2): p. 129-130.
23.Pinkerton, P., et al., *An evaluation of a gel technique for antibody screening compared with a conventional tube method.* Transfusion Medicine, 1993. **3**(3): p. 201-205.
24.Sigdel, A., et al., *Comparison between the Manual Method of Indirect Coombs via Gel Technology and Solid Phase Red Cell Adherence.* Maedica, 2021. **16**(2): p. 200.