

Direkte antiglobulintest DAT- glassteknikk

Endring siden forrige versjon

Div. endringer pga nytt antihumanglobulin-reagens og ny LISS-løsning. Liss-løsning skal oppbevares i romtemperatur. Coombs-reagens (anti-human globulin) er nå fargeløs i stedet for grønnfarget. Notat VWJ 06.08.16 Holdbarhet:Ferske prøver foretrekkes. Prøvene analyseres fortløpende. Notat VWJ26.09.16

1. HENSIKT

Å standardisere metoden for direkte antiglobulintest i glass.

2. OMFANG

Omfatter alle problemstillinger med sensibiliserte erythrocytter in vivo. Utføres der gelteknikk-metoden for direkte antiglobulintest er utilfredsstillende.

3. ANSVAR OG MYNDIGHET

Gjelder for alle bioingeniører ved serologi blodbanken SØ.

4. GRUNNLAGSINFORMASJON

Pakningsvedlegg:Anti-Human Globulin Mono-Type fra Grifols

4.1 EKSTERNE REFERANSER

-

4.2 KRYSSREFERANSER

4.3 METODE, PRINSIPP

Direkte antiglobulinreaksjon avslører om pasientens erythrocytter er sensibilisert in vivo. Det vil si om erythrocyttene har bundet antistoff eller komplement på sin overflate.

Antistoff (IgG) og / eller komplement (C3b/C3d) dekkede erythrocytter agglutineres når antiglobulinreagenset tilsettes glasset.

Direkte antiglobulinreaksjon benyttes for å påvise at pasientens erythrocytter er dekket av autoantistoff (autoimmun-hemolytisk sykdom), om barnets erythrocytter er dekket av antistoff fra moren (hemolytisk sykdom hos nyfødte) eller om det er en transfusjonsreaksjon dvs. at giverens erythrocytter er dekket av antistoff fra mottaker eller omvendt.

5. MATERIELL

5.1 PRØVEMATERIALE:

Materiale:	EDTA-blod.
Volum:	1 glass.
Vurdering:	Unngå hemolyse.
Holdbarhet:	Ferske prøver foretrekkes. Prøver som ikke analyseres fortløpende etter prøvetaking skal oppbevares v/2-8°C
Oppbevaring:	1 uke i kjøleskap v/4°C.

Destruksjon:	Kastes i risikoavfall.
---------------------	------------------------

5.2 UTSTYR:

- Glass-glass 12 x 75 mm.
- Trepinner.
- Pasteurpipetter.
- Cellevasker.
- Forstørrelsesspeil.
- Overlys.
- Objektglass.
- Mikroskop.

5.4 KONTROLL:

Navn:	1.	2. Coombs Control.
Navn ved merking:	Laborasjonsnummer/neg	Coombs Control.
Oppbevaring:	Ved romtemperatur.	I kjøleskap v/4°C.
Preparering:	Behandles som prøven.	Ingen.
Hyppighet:	1 gang.	Tilsettes alle glass.
Holdbarhet:	Ingen.	Se utløpsdato på flaskene.
Helsefare:	Humant materiale behandles som smittefare.	Humant materiale behandles som smittefare.
Destruksjon:	Kastes i risikoavfall.	Kastes i risikoavfall.

5.5 REAGENS:

Navn:	1. Anti-Human-Globulin.	2. Diluent pH 7.
Navn ved merking:	Anti-Human-Globulin.	Diluent pH 7.
Oppbevaring:	I kjøleskap v/4°C.	Plastdunker/Spruteflasker/ v/romtemperatur.
Preparering:	Ingen.	Ingen.
Holdbarhet:	Se utløpsdato på flaskene.	Se utløpsdato på dunkene. Skift til ren spruteflaske en gang pr uke og merk med innhold, sign. og dato.
Helsefare:	NaN ₃ kan reagere med kobber og blylegeringer til eksplosive forbindelser av metaller og -N ₃ . Ved uhell bruk store mengder vann for å unngå azid (-N ₃) forbindelser.	Ingen.
Destruksjon:	Kastes i risikoavfallet.	Helles i utslagsvasken.

6. ARBEIDSBESKRIVELSE

6.1 FREMGANGSMÅTE

1. Merk 2 glass (12x75mm) med henholdsvis pasientens laborasjonsnummer og laborasjonsnummer/neg.

2. Tilsett 2 dråper Diluent pH 7 til hvert glass.

3. EDTA-glasset blandes godt og litt blod overføres til reagensglassene med en trepinne (eventuelt blodlegemer fra koagulert fullblod).

Suspensjonen i reagensglassene skal være ca. 3 % (sammenlign styrken på celledensiteten med screeningcellene til glassteknikk).

4. Glassene vaskes 3 ganger i cellevasker.

5. Glasset merket med laborasjonsnummer tilsettes 2 dråper antiglobulinreagens.

Glasset merket med laborasjonsnummer/neg tilsettes 2 dråper Diluent pH 7.

6. Glassene blandes og sentrifugeres i cellevasker.

7. Avlesningen skal utføres **STRAKS** etter sentrifugeringen. Både makroskopisk og mikroskopisk.

Makroskopisk avlesning:

Erytrocyttknappene ristes forsiktig løs fra bunnen av glassene over forstørrelsesspeil og med godt overlys.

Mikroskopisk avlesning:

Erytrocytsuspensjonene strykes forsiktig med pipetter bortover objektglasset. Det anvendes ren pipette til hver suspensjon.

Kontroll ved negativ avlesning:

Negativ avlesning i glasset hvor antiglobulinreagens er tilsatt, kontrolleres ved at 1 dråpe **Coombs Control** tilsettes.

Glasset sentrifugeres i cellevasker.

Avlesningen utføres makroskopisk.

Agglutinasjon skal nå fremkomme! Hvis ikke se pkt.6.3.

8. Svarregistrering:

Utredning av antistoff : Registreres på antistoffskjema samt i ProSang rutine P 551 og P 552.

Rekvirerte prøver: Registreres i ProSang i "annan analys".

Nyfødte som ikke er registrerte som inneliggende pasienter: Registreres i ProSang i "annan analys".

9. Prøvene settes i kjøleskap v/4°C.

6.2 RESULTATVURDERING

Agglutinasjon = positiv reaksjon

Agglutinasjonen graderes fra (+) til ++++

Ingen agglutinasjon = negativ reaksjon (Obs! hemolyse)

6.3 PROBLEMLØSNING

Dersom problemløsningene under ikke fører frem, kontakt overbioingeniør for serologi.

Ved positiv avlesning på autoktr.se problemløsning i prosedyre for enkelt forlik.

1. Ikke klinisk signifikante kuldeantistoff kan gi positiv antiglobulinreaksjon. NB! den negative kontrollen vil da være positiv.

Løsning :

Testceller forvarmes i vannbad ved 37°C .

Dersom det er nødvendig forvarmes også antiglobulinreagenset og vaskingen utføres manuelt med forvarmet Diluent pH 7.

2. Enkelte kliniske tilstander(f.eks. noen cancerformer) medfører dannelse av antistoff som ikke kan identifiseres og hvis betydning er usikker.

3."Forurenset" blodprøve kan gi uspesifikke reaksjoner.

Løsning :

Ta ny prøve av pasienten.

4. En lang rekke medikamenter kan forårsake immunologisk betingede hemolytiske mekanismer og dermed gi positiv DAT. De hyppigste medikamentene er metyldopapreparater (Aldomet) deretter kommer de penicillininduserte.

Løsning :

Det er viktig å forsikre seg om at det ikke finnes bakenforliggende alloantistoff ved f.eks. å se på styrken på reaksjonene ved identifikasjon. Andre teknikker kan også benyttes.

Dersom alloantistoff er utelukket gjøres parallelltesting med egne celler. Ved forlik velges det som er likt eller penere enn det med egne celler.

5. En rekke forhold ved teknikken kan gi falsk negativ antiglobulinreaksjon.

a) Gale inkubasjonsbetingelser, (temperatur).

b) For dårlig vasking og dermed "nøytralisering" av antiglobulinreagenset.

c) Uheldig sentrifugering.

d) Forsinket avlesning.

e) For kraftig resuspendering (risting).

Falsk negativ reaksjon som skyldes:

* Dårlig vasking .

* Uteglemmelse av antiglobulinreagenset.

* Ikke virksomt antiglobulinreagens

skal oppdages ved at de sensibiliserte kontrollcellene ikke gir makroskopisk agglutinasjon.

Dersom de sensibiliserte kontrollcellene gir negativ reaksjon, må DAT utføres på nytt. Den første negative avlesningen er ikke gyldig.

7. DOKUMENTASJON

- Manuell blodgrupperingsliste.
- I Prosang rutine P000 for pasientinformasjon.
- Antistoffskjema settes i blå perm merket "Kjente antistoff"
- Ved transfusjonsreaksjoner fylles respektivt skjema ut og settes i perm merket "Transfusjonsreaksjoner"

Referanser

-
-

Vedlegg