



Pretransfusion Protocols & Tests

Peyman Eshghi

Prof. of Pediatric Hematology &
Oncology

1405-02

مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی مادرزادی کودکان



GOAL:
GETTING
THE RIGHT BLOOD
TO THE RIGHT PATIENT
AT THE RIGHT TIME

مرکز تحقیقات بیماری های خونی مادرزادی کودکان





ANNUAL SHOT REPORT 2021

SHOT is affiliated to the Royal College of Pathologists
This report is produced by SHOT working with MHRA



edia

matologic

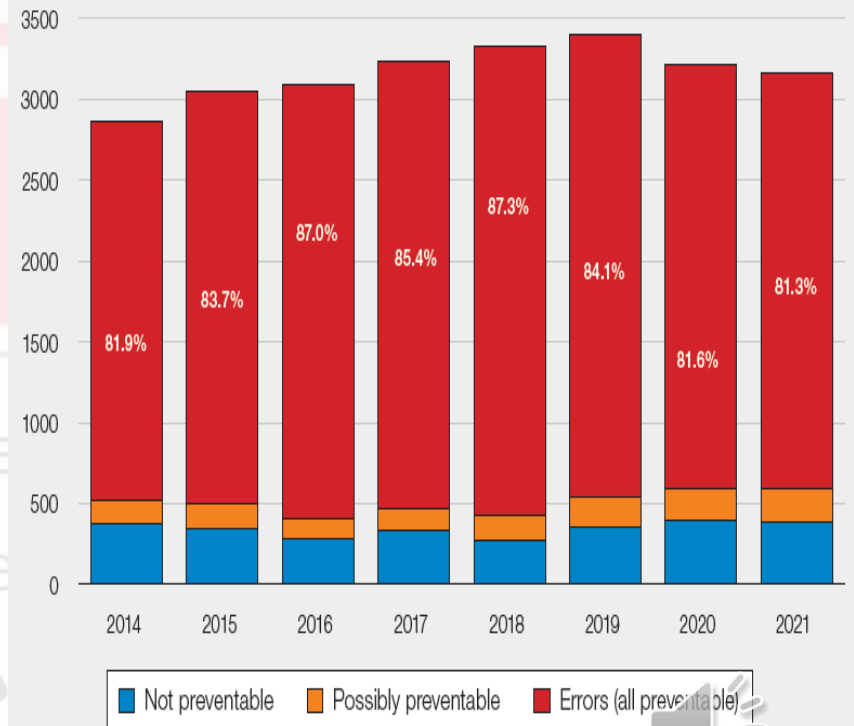
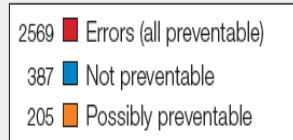
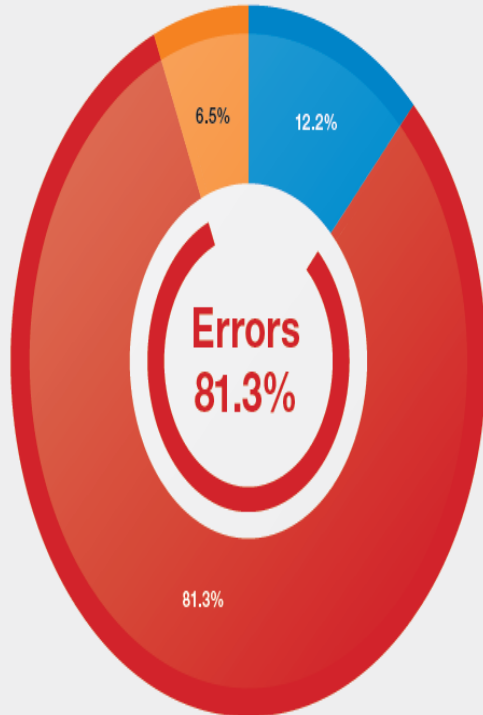
Disorders Research Center

مرکز تحقیقات بیماری های خونی مادرزادی کودکان

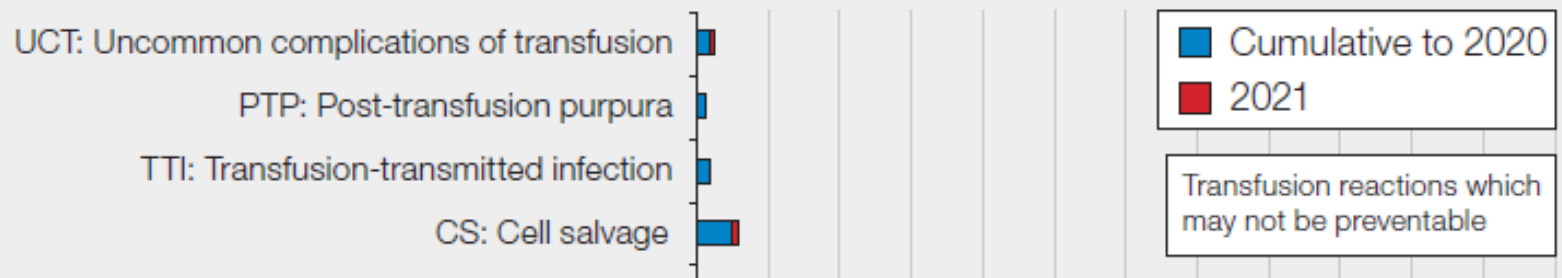


Errors as a percentage of total reports 2014-2021

ANNUAL SHOT REPORT 2021



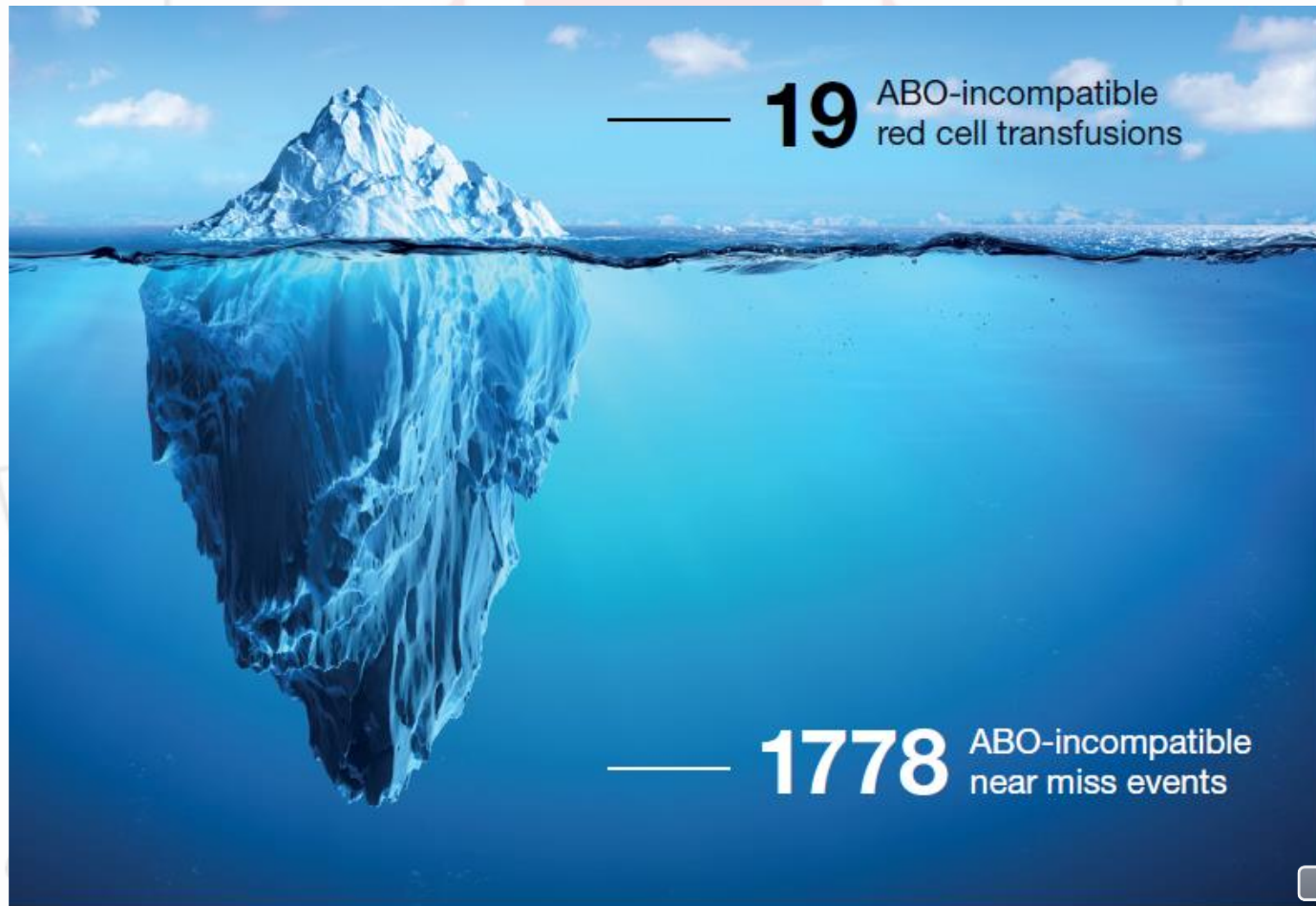
Cumulative data for SHOT categories 1996-2021 n=27008



Transfusion reaction	Risk of transfusion reaction based on SHOT data 2012-2021
Febrile, allergic or hypotensive reactions	1 in 8,138
Transfusion-associated circulatory overload	1 in 23,175
Haemolytic transfusion reactions	1 in 55,216
Pulmonary non-TACO	1 in 117,530
Post-transfusion purpura	1 in 3,085,171
Transfusion-associated graft vs host disease	1 in 24,681,368



ABO-incompatible transfusions 2016-2021



- 1/ Assess the patient's clinical need.
- 2/ Inform the patient and/or relatives about the proposed transfusion treatment
- 3/ Record the indications for transfusion in the patient's notes.
- 4/ Select the blood product and quantity required. Use a guide for common surgical procedures.

5/ Complete the blood request form accurately and legibly.

6/ If blood is needed urgently, contact the blood bank by telephone immediately.

7/ Obtain and correctly label a blood sample for compatibility testing.

8/ Send the blood request form and blood sample to the blood bank.

9/ Laboratory performs pre-transfusion antibody screening and compatibility tests and selects compatible units.

10/ Delivery of blood products by blood bank or collection by clinical staff.

11/ Store blood products in correct storage conditions if not immediately required for transfusion.

12/ Check identity on: Patient & Blood product & Patient's documentation.

13/ Administer blood product.

14/ Record in the patient's notes:

- Type and volume of each product transfused
- Unique donation number of each unit transfused
- Blood group of each unit transfused
- Time at which the transfusion of each unit commenced
- Signature of the person administering the blood.

15/ Monitor the patient before, during and on completion of the transfusion.

16/ Record the completion of the transfusion.

17/ Identify, Record and respond immediately to any adverse effect.



آزمایش های سازگاری قبل از تزریق خون

Pre-transfusion compatibility tests

Principle and Practice for clinicians to:

- Do the Right tests
- In Right patients
- By Right methods

And To Prevent :

- Pre-Analytical Errors
- Analytical Errors

مرکز تحقیقات بیماری های خونی مادرزادی کودکان



References

1. Modern Blood Banking&Transfusion Practices,7t edition, 2019,Denis M.Harening
2. Immunohematology: Principles and Practice, Third Edition, Eva D. Quinley , 2011
3. WHO manual for Clinical Use of blood , <http://www.who.int/ehb/en/> 2012
4. Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories: British Committee for Standards in Haematology (**Date for guideline review: July 2014**)
5. Red Blood Cell Transfusion: A Clinical Practice Guideline from the AABB” Ann Intern Med. 2012;157:49-58
6. Transfusion Medicine Best Practices Guidelines for Pre-Transfusion Testing (Type and Screen, and Crossmatch): NL2011-032 -TMP Version: 2.0 Effective Date: 2014-11-24
7. اطلس جامع انتقال خون:سیما ذوالفقاری انارکی ,انتشارات تیمور زاده, 1393



اقدامات قبل از تزریق خون

- شناسایی و تایید هویت گیرنده: در مراحل نمونه گیری و تزریق
- شناسایی و تطبیق نمونه خون با درخواست
- ABO, Rh
- Ab screening
- مقایسه نتایج با نتایج قبلی (در صورت موجود بودن):
 - 30% آنتی بادی های غیر منتظره در طی 1 سال و 50% در طی ده سال به حد غیر قابل تشخیص افت میکند و ممکن است در بررسی فعلی تشخیص داده نشود¹.
- تایید گروه خونی:
 - ABO همه فرآورده ها
 - تایید مجدد Rh در فرآورده های Rh منفی
- انتخاب خون مناسب با نتایج فوق
- برچسب گذاری فرآورده با اطلاعات گیرنده
- ارسال فرآورده و تحویل آن به بخش
- بررسی مایع فوری قبل از تزریق

تایید هویت

- راه های تایید هویت:
 - بیماران بستری (هویتی که بیمار با آن بستری شده است):
 - بیماران بستری عادی : مچ بند
 - بیماران ویژه (نوزادان نارس, زمان جراحی, مشکلات سوختگی و پوستی و...): زانوبند, پیشانی بند
 - بیماران اورژانس و بیهوش فاقد هویت: کد مخصوص و تعریف شده
 - سرپایی: کارت شناسایی عکس دار بیمار, والدین و همراه قانونی
- مشخصات مچ بند:
 - نام و نام خانوادگی:
 - تاریخ تولد:
 - کد ملی:
 - جنسیت:
 - شماره پرونده:
 - بارکد:

نمونه گیری

- لخته و/یا حاوی ضد انعقاد EDTA (نمونه ضد انعقاد ترجیح دارد، ولی در صورت اکان هردو نمونه گرفته شود) ؛ **ضد انعقاد هپارینی نباشد**
- EDTA - مخصوص روشهای اتوماتیک است؛ جهت **DAT** توصیه میشود؛ آنتی بادی های ضعیف و وابسته به کمپلمان با این نمونه ها احتمال دارد miss شود
- - لخته (سرم): در صورت همولیز، مثبت کاذب در IAT و back type محتمل است
- **در صورت نمونه گیری از IV Line , 5- 10 سس سی اول ارزش ندارد.**
- بررسی ظاهر نمونه توسط نمونه گیر:
- - اگر همولیز است نمونه گیری مجدد و/یا ذکر در برگه ارسال نمونه
- تایید هویت توسط نمونه گیر و پرستار (دونفر)
- برچسب گذاری بلافاصله پس از نمونه گیری بر بالین بیمار
- مشخصات برچسب:
- - مشخصات برچسب بارکد دار هویت بیمار
- - برچسب اضافی نمونه گیری:
- تاریخ و ساعت نمونه گیری
- نام بخش
- نام و/یا کد پیگیری پرسنلی خون گیر

آزمایش های سازگاری قبل از تزریق خون
که در بانک خون بیمارستانها باید انجام شود:

- ABO,Rh
- Ab screening
- Cross match
- Direct Antiglobulin test (DAT)
- Indirect Antiglobulin test(IAT)

Pediatric Congenital Hematologic
Disorders Research Center

مرکز تحقیقات بیماری های خونی مادرزادی کودکان



آزمایش های سازگاری قبل از تزریق خون
که در آزمایشگاه ایمنوهماتولوژی رفرانس باید انجام شود:

- Ab identification (Ab panel test)
- Elusion test:
 - جدا کردن آنتی بادی های روی گلبول قرمز در مواردی که کومبس مثبت است به روشهای مختلف
- Elusion Identification:
 - تعیین ماهیت و نوع آنتی بادی های جدا شده در تست قبلی
- Hemolysin test:
 - تعیین تیتر آنتی بادی های موجب لیز
- Cold agglutinin titration
- Drug Ab detection test by Drug-treated RBC



Pre-transfusion Testing

Test	Reagent	Cell	Purpose	Time
ABO forward testing	- anti-A & anti-B [plus anti A&B if desired] reagents. Anti-B reagents should not react with acquired B.	Recipient/Unit RBC (4-6% saline suspension after CF)	Detect recipient's blood group & Rh-D	25 min
ABO reverse testing	Recipient/Unit serum/plasma	Standard A1 & B cells		
Rh testing (detecting D)	IgM monoclonal anti-D reagents which to detect D antigen (Not D ^w) directly in RT	Recipient/Unit RBC (4-6% saline suspension after CF)		
Rh testing (detecting D ^w)	IgG Monoclonal anti-D which should detect D^w by IAT	Unit (4-6% saline suspension after CF)	Detecting D ^w [in recipients is not mandatory]	50 min
Ab screening	Recipient serum/plasma	screening O cells	Detect unexpected(non-ABO) Ab's in recipient's plasma	50 min
Full Cross match	Recipient serum/plasma	Donor Unit RBC (4-6% saline suspension)	Compatobility of the selected blood unit's RBC with the recipien`'s plasma	60 min
Immediate Spin (IS) Cross match	Recipient serum/plasma	Donor Unit RBC (4-6% saline suspension after CF)	Ensure ABO compatibility	10 min

Control A1 & B Cells

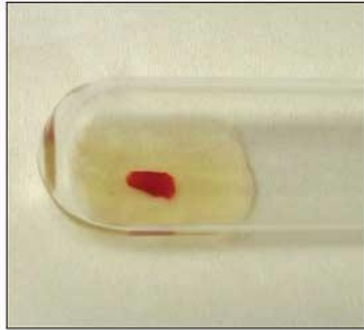
- Positive and negative controls should be used to ensure accuracy of the reagents on a regular basis at least **once every 12 hours** according to :
 - the length of time that reagents have been out of temperature control on the analysers
 - OR when the analyser is in use
 - OR when changing reagent lot numbers
 - OR when starting up an analyser .

Table 2 – Use of positive and negative controls for ABO/D grouping

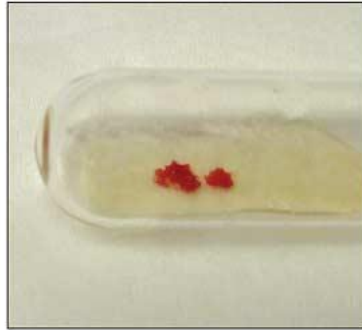
Reagent	Positive control cells	Negative control cells
Anti-A	A	B
Anti-B	B	A
Anti-D	D positive	D negative



Tube testing



4+ Reaction



3+ Reaction



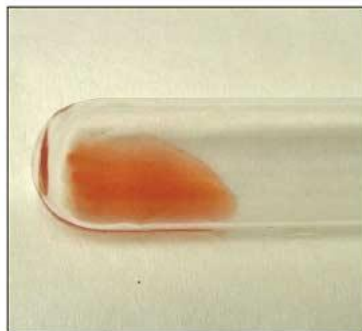
2+ Reaction



1+ Reaction



Hemolysis



Negative reaction

Strength of Reaction

Appearance

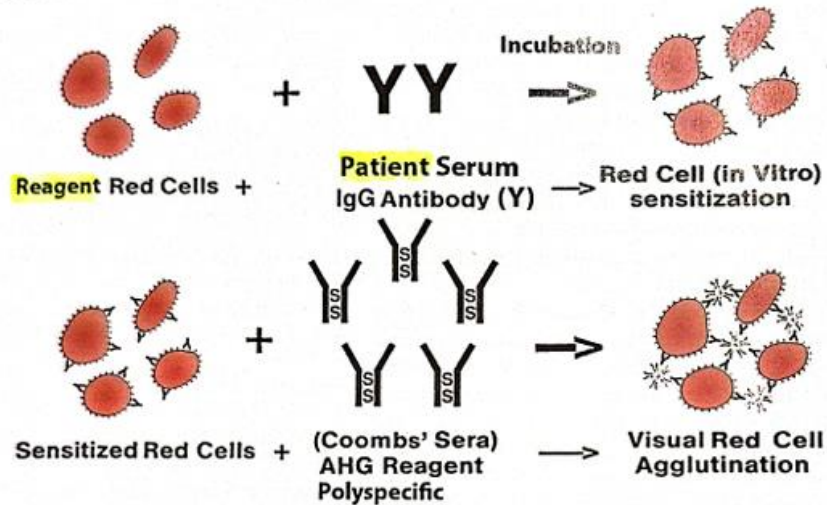
4+	زمینه شفاف	<u>A single</u> agglutinate, no free cells
3+	زمینه شفاف	Strong reaction, many large agglutinates
2+	زمینه نیمه شفاف	Large agglutinates with many smaller clumps, <u>no free cell</u>
1+	زمینه کدر و قرمز	<u>Many small</u> agglutinates and <u>a background of free cells</u>
+/-	زمینه کدر و قرمز	<u>Few</u> agglutinates and weak agglutinates microscopically
0		An even cell suspension, <u>no agglutinates</u> detected

آیینہ مقعر:
جهت یافتن و
ارزیابی سائز
وتعداد تجميع
های سلولی

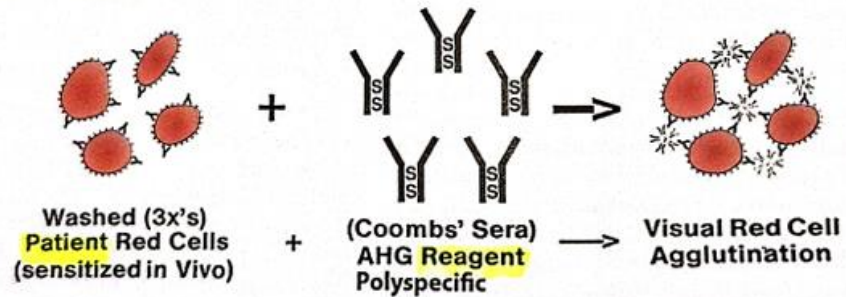
میکروسکوپ:
جهت یافتن
سلولهای آزاد

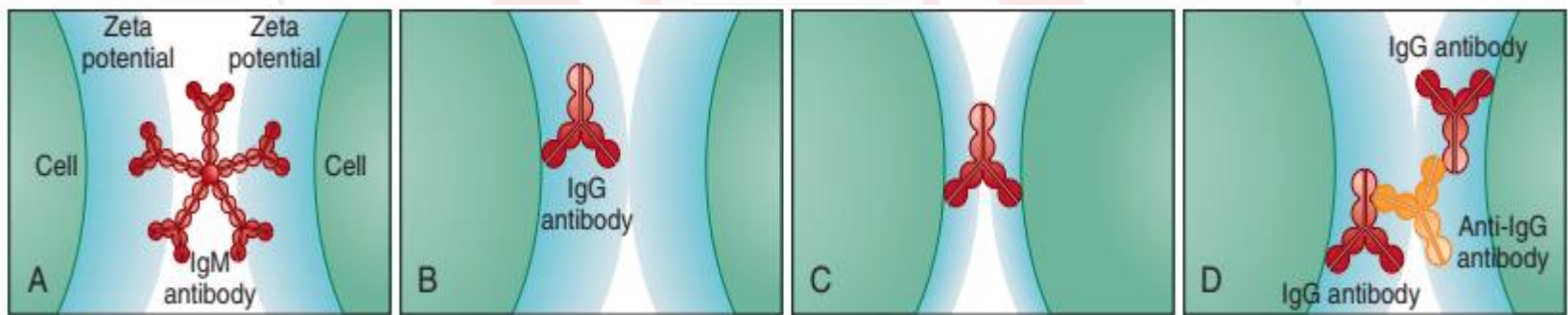
DAT& IAT

A. Indirect AHG



B. Direct AHG





Albumin;
Enzyme;Low
Ionised Saline:etc



مراحل انجام تست IAT

1. **3 لوله برای هر بیمار : دو قطره پلاسما (یا سرم) بیمار در هر لوله + یک قطره سلول:**

- درمورد بیمار در هر لوله از یک نوع سلول معرف استفاده میشود
- در کراس ماچ با کیسه دهنده از سلول های کورد کیسه استفاده میشود

2. **مرحله بررسی آگلوتیناسیون/همولیز در دمای اتاق پس از:**

1. مخلوط کردن فوری IS : ناسازگاری ABO و آنتی بادی های سرد با قدرت بالا
2. انکوباسیون 15 دقیقه ای در دمای اتاق (اختیاری): آنتی بادی های سرد کم اهمیت بالینی

3. **مرحله حساس کردن گلبول قرمز (برقراری اتصال با آنتی بادی احتمالی) با انکوباسیون در 37 درجه با اضافه کردن تسریع کننده های آگلوتیناسیون :**

- 30` : آلبومین 22%
- Low ionic strength saline (LISS) : 10-15`
- Polyethylen glycol (PEG) : 10-15`

گاهی آنتی بادی های IgG بویژه از خانواده Rh در تشخیص Dw و آنتی بادی های ضد کمپلمان در همین مرحله آگلوتیناسیون و لیز می دهند

4. **مرحله AHG :**

1. **شستشو با سالین (تازه یکماه قبل از انقضا) برای خارج کردن آنتی بادی های آزاد مزاحم :**

1. شستشو با نرمال سالین (حداقل 3 بار و ترجیحا 4 تا 5 بار) بلافاصله بعد از انکوباسیون بطوریکه آنتی بادی های چسبیده به گلبول های قرمز فرصت آزاد شدن مجدد و خروج از محیط را پیدانکنند. دقت شود تمام سالین شستشو در هر نوبت دور ریخته و تمام گلبول های رسوب کرده شستشو شود.
2. افزودن یک تا دو قطره AHG جهت آگلوتینه کردن گلبولهای پوشیده شده از آنتی بادی

5. **مرحله تایید نهایی برای تایید صحت مراحل قبلی :** افزودن چک سل (سلول پوشیده شده با آنتی بادی از قبل) به لوله ها در این مرحله حتما باید آگلوتیناسیون رخ دهد.

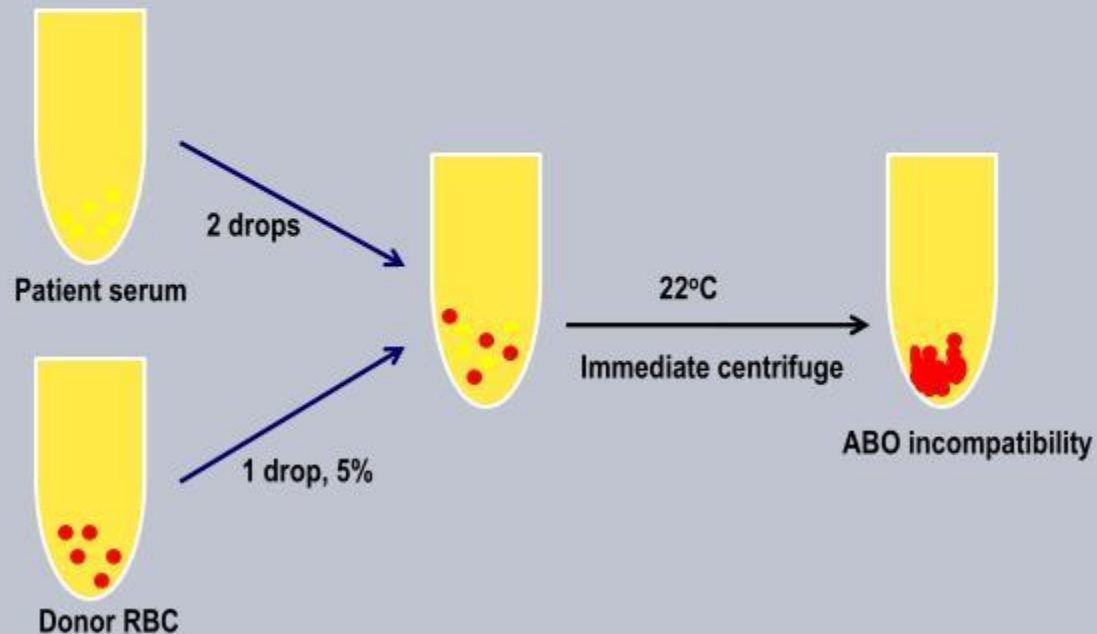
screen cells+
patient's
plasma/serum

Test performance: Phases of IAT

Phase	Incubation	Purpose
RT immediate spin	None	Detects ABO incompatibility and strongly reactive cold antibodies.
RT	15 min	Optional : non-significant cold Abs
37°C incubation	Time varies depending on enhancement medium used Albumin; Enzyme; Low Ionised Saline; etc.	Reading at this phase is optional
Wash	No incubation time; washing should be uninterrupted	Removes unbound proteins.
Antiglobulin	No incubation	Detects IgG or complement bound to red cells.
Check cells	No incubation	Agglutination proves antiglobulin serum was added, washing was adequate, and antiglobulin serum has anti-IgG reactivity.

Immediate Spin Technique (IST)

- ✓ Detects only IgM antibody, reactive at 22°C.
- ✓ Clinically significant IgG antibody reactive at 37°C not detected



کراس ماچ فوری در هنگام نیاز به خون (IS)

مخلوط کردن سوسپانسیون 2-5% گلبول قرمز کیسه خون
با سرم / پلاسمای بیمار

سانتریفیوژ و مشاهده آگلوتیناسیون

عدم آگلوتیناسیون و همولیز: تزریق خون در
صورت ظاهر سالم کیسه خون

بروز آگلوتیناسیون و همولیز:
خون نامناسب و ادامه جستجو

مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی



غربالگری آنتی بادی Ab screening

- هدف: یافتن آنتی بادی های غیر منتظره غیر ABO & D که اهمیت بالینی دارند:

- بیماری همولیتیک نوزاد یا جنین ایجاد میکنند
- واکنش همولیتیک پس از تزریق می دهند
- عمر گلبولهای قرمز را به میزان قابل توجهی کاهش می دهند
- این آنتی بادی ها غالبا بدنبال حاملگی یا تزریق خون قبلی و با احتمال کمتر تاثیر داروها بر گلبول های قرمز بروز می کنند
- مهمترین آنتی بادی هایی که واکنش شدید بالینی میدهند عبارتند از:
 - Rhesus: C, c, E, e
 - Kell
 - Duffy
- سایر آنتی بادی های مهم غیر منتظره: Kidd, S, s, Le_a
- آنتی بادی های P1 و Le_b نیز گرچه اهمیت بالینی ندارند ولی آنتی ژن های مذکور در چک سل های استاندارد باید باشند.

شباهت و تفاوت های غربالگری آنتی بادی نسبت به کراس ماچ کامل روتین

- هدف: یافتن آنتی بادی های غیر منتظره غیر ABO & D که اهمیت بالینی دارند
- روش انجام مشابه : هر دو به روش IAT انجام می شوند
- متد ارزیابی واکنش در هر دو یکی از سه روش زیر است:
 - Gel technology; microplates; tube test
- در کراس ماچ سلول های کورد کیسه خون استفاده میشود ولی در غربالگری آنتی بادی نیاز به سلول استاندارد معرف داریم که واجد آنتی ژن های زیر باشد :
 - D, C, E, c, e, M, N, S, s, P1, Lea, Leb, K, k, Fya, Fyb, Jka, Jkb
 - حداقل دو سلول معرف برای هر تست لازم است.. هر سلول از یک فرد گرفته شده باشد و حداقل یک فرد برای آنتی ژنهای Fya, Fyb, Jka, Jkb, S and s هموزیگوت باشد.
 - با هر سلول معرف یک تست گذاشته میشود و نباید سلول ها را تجمیع و سپس تست گذاشت.
- در هر دو روش نمونه خون بیمار تا سه روز قبل از آزمایش که در دمای 1-6 درجه یخچال نگهداری شود مورد قبول است
- در هر دو روش , بدنبال تزریق خون نمونه بیمارگیرنده خون و نمونه گلبولهای قرمز دهنده خون (قسمت دوم کورد کیسه) باید به مدت 7 تا 10 روز در دمای در دمای 1-6 درجه یخچال جهت ارزیابی عوارض احتمالی انتقال خون نگهداری شود

ارجحیت های غربالگری آنتی بادی

(“group and save” or “group, screen and hold”)

نسبت به کراس ماچ کامل روتین

- پیدا کردن آنتی بادی های غیر منتظره بدون نیاز به کیسه خون (آزمایش بر روی خود بیمار)
- مدت زمان مساوی یا کمتر مورد نیاز
- فرصت کافی برای انجام در شیفیت نیروهای مجرب و کافی
- در صورتیکه غربالگری مثبت شود : فرصت کافی قبل از تزریق ضروری , برای یافتن خون مناسب داریم
- در صورتیکه غربالگری منفی شود :
- هرگاه خون فوری مورد نیاز بود: تنها با یک تست IS 10 دقیقه ای خون آماده میشود
- کورد کیسه های خون بیهوده مصرف نشده و تعداد دور ریختن خون ناشی از اتمام کورد های تشخیصی کاهش می یابد
- توانایی برای استفاده از جدول MSBOS برای جراحان بدون رزرو بیمورد خون

Example of a Reagent Red Cell Panel for Antibody Identification

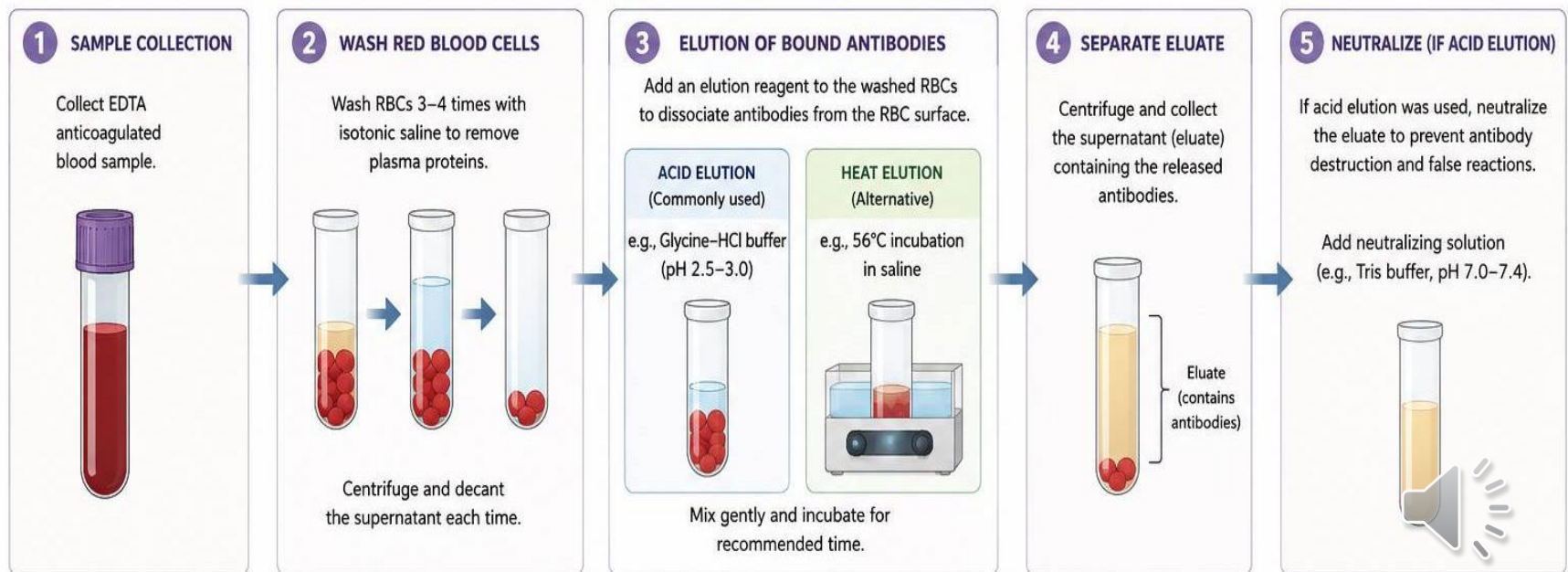
"cross-out," "rule-out," or "exclusion" method:

- If an antigen is *present* on the red cell and the patient sample *was not reactive* with it, the presence of the corresponding antibody may tentatively be excluded.

Cell	Rh								MNS				Kell				Pt	Lewis		Duffy		Kidd		Others	Cell	Results
	D	C	E	c	e	f	C ^w	V	M	N	S	s	K	k	Kp ^a	Js ^a	Pt	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b			37C AHG
1	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	Bg(a+)	1	
2	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0		2	
3	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	+	+	3	
4	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0		4	
5	0	0	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+		5	
6	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	0	+		6	
7	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0		7	
8	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+		8	
9	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+		9	
10	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	+	Yt(b+)	10	
11	+	+	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+		11	
AC																									AC	

+ indicates presence of antigen, 0 indicates absence of antigen; AC = autocontrol, AHG = antihuman globulin.

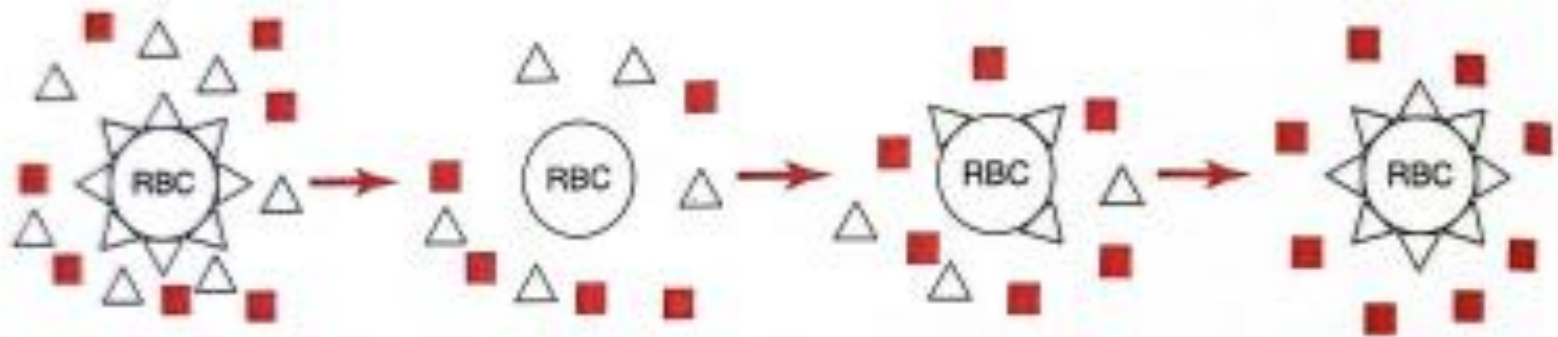
- **Washing: Mixing with N/S and Centrifuge just to exit unbounded Abs**
- **Elution: Treat (Acid;Enz.;Heat) to dissociate “bounded” Abs THEN Centrifuge to collect Eluate serum containing Bounded Abs & uncoated RBC**
- **When testing the “Eluate” the last wash must be tested in parallel to detect the presence of “unbounded” antibodies.the result should be Non-reactive. Otherwise the Eluate is not valid for identification of bounded Abs by IAT.**



Auto-adsorption

ELUTION*

Auto-
adsorption



Initial sample. Autoantibody (triangle) has coated patient's RBCs in vivo, and is free in the serum. Alloantibody (square) is also present in the serum.

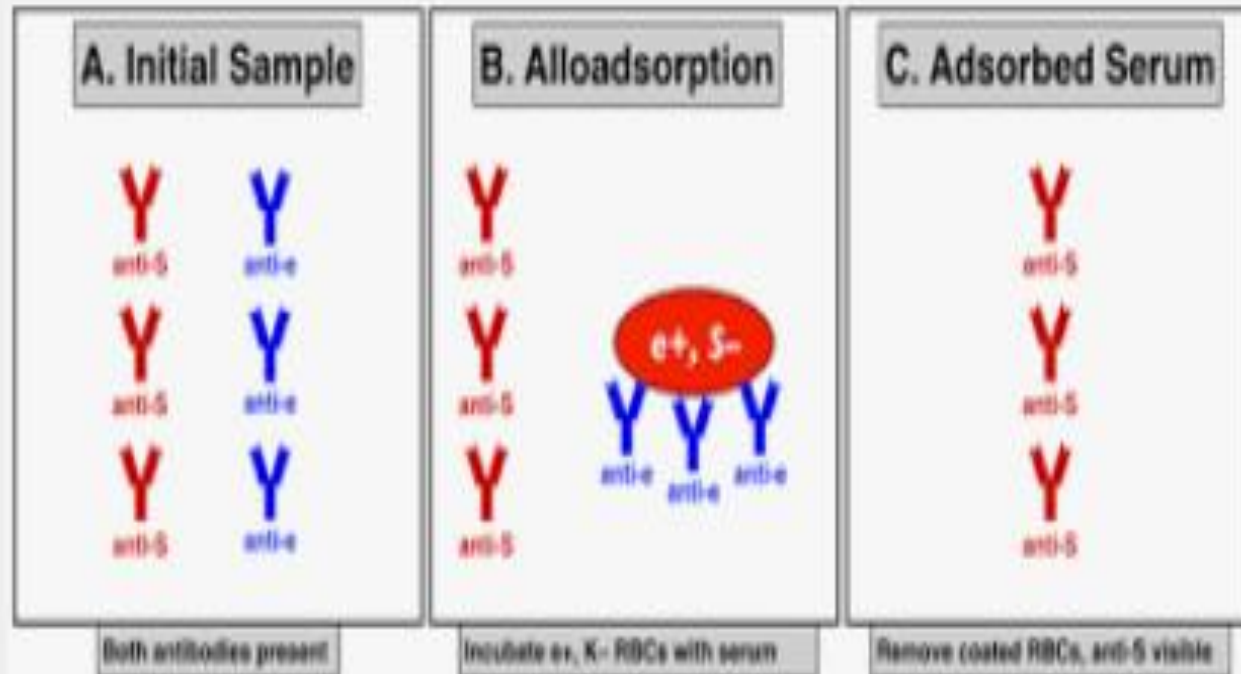
Patient's cells have been treated to remove bound autoantibody from the cells. This is performed prior to performing the adsorption step.

Adsorption step. Treated patient cells are incubated with patient serum. Autoantibody present in the serum begins to adsorb onto the patient's cells. Alloantibody remains in the serum.

Adsorption is complete. All of the autoantibody has been removed from the patient's serum. The adsorbed serum may be harvested and tested to identify the alloantibody that is present.

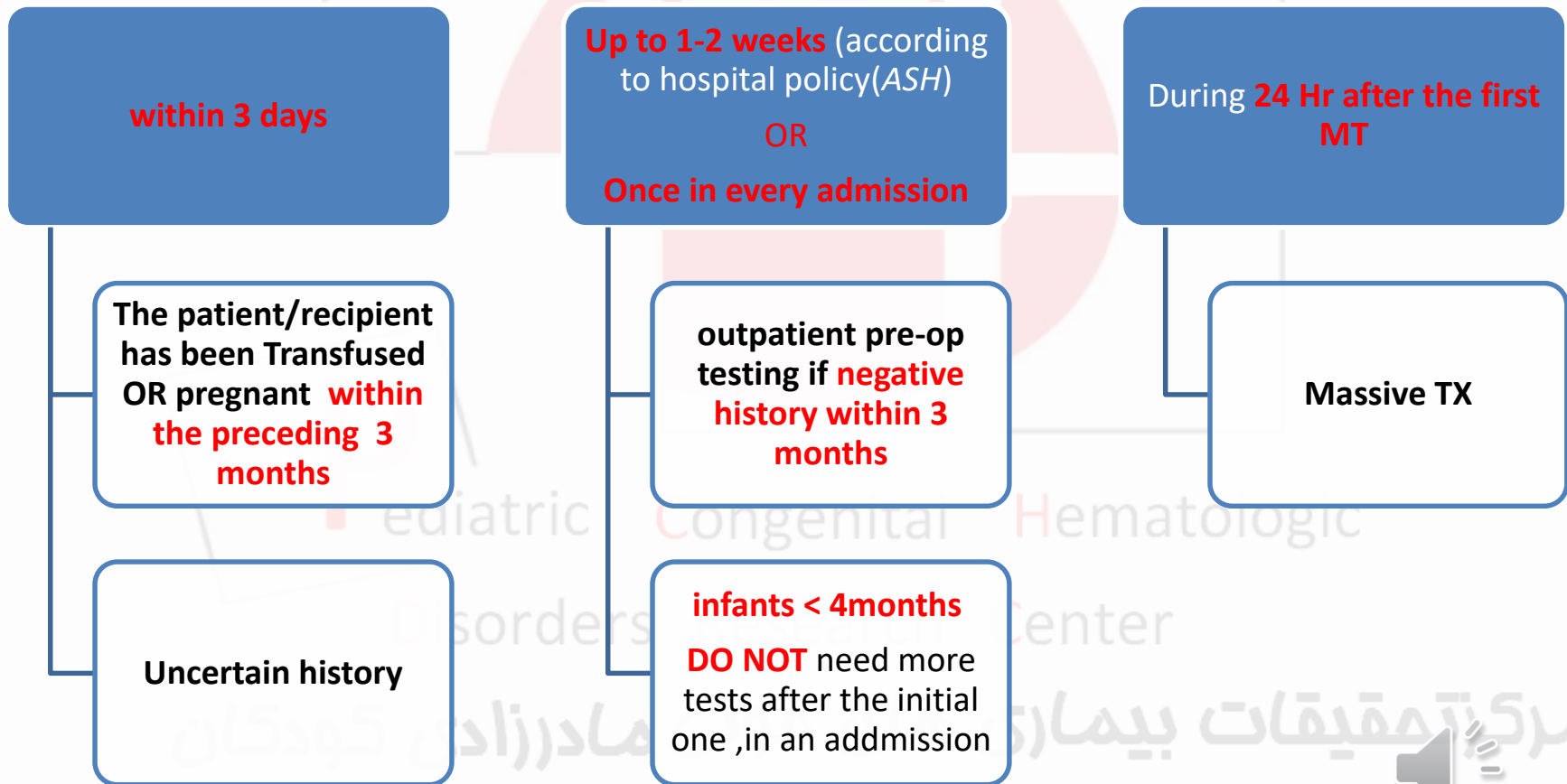
Adsorbed serum can be tested against RBC panel for the presence of unadsorbed Alloantibodies

Allogenic Eluation OR Adsorption test



When autologous RBC insufficient OR the patient has been transfused recently (last 3 months), as the second choice phenotypically matched adsorption may be employed instead of Auto-adsorption

Frequency of sampling for Pretransfusion Tests



NOTE-1:

Date of sampling is day 0
And date of expire is at 24th Hours of day 3

NOTE-2:

Samples should be kept at 2-8°C



How to store blood samples for Pre-TX testing

Table 1 – Working limits for use of stored whole blood and plasma for pre-transfusion testing

Patient Type	Sample Type		
	Whole blood at room temperature	Whole blood at 2-8°C	Plasma at -30°C
Patient transfused or pregnant in last 3 months	Up to 48 hours	Up to 3 days ¹	N/A
Patient not transfused and not pregnant in last 3 months	Up to 48 hours	Up to 7 days	3 months
¹ This is the time between the sample being taken and the subsequent transfusion			

British Guidelines for pre-transfusion compatibility procedures in blood transfusion laboratories

Sample retention

- Rational:
 - To ensure that repeat ABO grouping of the pre-transfusion sample can be performed in the event of an acute transfusion reaction.
 - For investigation of delayed transfusion reactions (*SHOT, 1996 to 2010*).
- Should be retained at 1-6° :
 - For **a minimum 7-10 days after transfusion [OR 3 days (*British*)]**
- Previous record review and compare with current results:
 - Avoiding amnestic response

