

## قسمت دوم

دکتر حبیب‌الله گل‌افشان، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز



### اسکرین آنتی‌بادی‌ها در حاملگی

آنتی‌بادی حائز اهمیت بالینی به آن دسته از آنتی‌بادی‌های گروه خونی گفته می‌شود که از نوع IgG و قادر به عبور از جفت بوده و در واکنش با آنتی‌ژن مربوطه منجر به همولیز گلبول‌های قرمز جنین می‌گردند. شدت همولیز در رابطه با عیار آنتی‌بادی و تراکم آنتی‌ژن مربوطه متغیر بوده و از کم‌خونی همولیتیک خفیف جنین- نوزادی تا پدیده‌ی هیدروپس فتالیس با تولد جنین مرده و ورم‌کرده بروز می‌کند.



اسکرین آنتی‌بادی‌ها دارای دو مرحله ۱- شناسایی حضور آنتی‌بادی و ۲- شناسایی هویت آنتی‌بادی می‌باشند. چنانچه اسکرین اولیه منفی باشد دیگر نیازی به پیگیری نیست، ولی سفارش می‌شود که خانم‌های اره‌اش منفی علاوه بر اسکرین اولیه در هفته ۲۸ حاملگی هم دوباره اسکرین گردند.

برای اسکرین آنتی‌بادی‌ها نیاز به گلبول‌های قرمز اسکرین یا گلبول‌های قرمز معرف (Screen Cell) است. گلبول‌های اسکرین برای شناسایی حضور آنتی‌بادی باید دارای ویژگی‌های زیر باشند:

✓ حاوی بیشترین آنتی‌ژن‌های مهم بالینی باشند.

✓ از گروه خونی O باشند، زیرا اسکرین آنتی‌بادی‌ها به دنبال آنتی‌بادی‌های غیر از سیستم ABO می‌باشند.

- ✓ سفارش می‌شود که در تهیه سلول‌های اسکرین دوزاژ آنتی‌ژنی (Dosage) برای کشف بهتر آنتی‌بادی‌های با خاصیت دوزاژ (dosage effect) رعایت گردد.
- ✓ سلول‌های اسکرین باید طوری انتخاب گردند که هر ۵ آنتی‌ژن شایع اره‌اش یعنی D و C و E و c و e به‌ویژه به‌صورت هموزیگوت را دارا باشند و تهیه‌ی آن‌ها از گروه‌های R1 R1 و R2 R2 و rr یا هموزیگوت‌های CDe و Cde و ce سفارش شده است.
- ✓ سلول‌های اسکرین به‌صورت ویال‌های ۲تایی یا سه‌تایی از گروه خونی O به‌صورت سوسپانسیون ۲ تا ۵ درصد تهیه می‌گردند.
- ✓ گلبول‌های اسکرین علاوه بر سیستم‌های اره‌اش باید دارای آنتی‌ژن‌های مهم بالینی سیستم‌های گروه خونی کل، کید، دافی، لوتران و... باشند.
- ✓ سلول‌های اسکرین را نباید با هم مخلوط کرد بلکه به‌صورت جداگانه با سرم مجاور می‌گردند. سلول‌های اسکرین ناپیستی کدر یا همولیز باشند. گفتنی است که آنتی‌بادی علیه سیستم‌های اره‌اش، کید، کل، دافی و MNSS هنگامی با آنتی‌ژن مربوطه واکنش بهتری می‌دهد که آنتی‌ژن به‌صورت هموزیگوت روی گلبول‌های اسکرین قرار گرفته باشد؛ برای مثال چنانچه سرمی دارای آنتی‌دافی  $Fy^a$  باشد واکنش سرم با گلبول‌های اسکرین  $Fy^a+Fy^b+$  به صورت ۱+ و با گلبول‌های  $Fy^a+b-$  به صورت ۳+ درمی‌آید که به آن خاصیت دوزاژ گفته می‌شود. گلبول‌های اسکرین در حالت دوم برای آنتی‌ژن دافی a هموزیگوت بوده و اثر دوزاژ موجب واکنش قوی‌تر شده است.

Antibody	RBCs	Reaction
Anti-Jk <sup>a</sup>	Jk(a+b-) 	3+
Anti-Jk <sup>a</sup>	Jk(a+b+) 	1+

آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سرسیستم‌های اره‌اش، کید، دافی و MNSS خاصیت دوزاژ دارد بدین مفهوم که چنانچه

واکنش سرم با گلبول‌های هموزیگوت از نظر آنتی‌ژن منفی شود می‌توان گفت که سرم فاقد این گروه از

آنتی‌بادی‌هاست. حضور آنتی‌بادی‌های با اثر دوزاژ با آنتی‌ژن هموزیگوت واکنش ۳+ و با آنتی‌ژن هتروزیگوت

واکنش ۱+ می‌دهد

سلول‌های اسکرین در دو تا سه ویال با تاریخ انقضا و بروشور آنتی‌ژنی توسط سازمان‌های انتقال خون یا شرکت‌های تجاری

تهیه می‌گردد. علامت + به مفهوم حضور آنتی‌ژن و علامت 0 یا منفی به مفهوم فقدان آنتی‌ژن است.



Cell	Rh							MNSs				P <sub>1</sub>	Lewis		Lutheran		Kell		Duffy		Kidd	
	D	C	E	c	e	f	C <sup>w</sup>	M	N	S	s	P <sub>1</sub>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>
I R1R1 (56)	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	0	+	+
II R2R2 (89)	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0

سلول‌های معرف اسکرین برای شناسایی حضور آنتی‌بادی در ۲ تا ۳ ویال از گروه خونی 0 تهیه می‌شوند. سلول

اسکرین بایستی حداقل دارای ۱۸ آنتی‌ژن مهم بالینی باشد. سلول‌های اسکرین نبایستی مخلوط شوند و در تهیه

ویال‌های سه‌تایی کوشش می‌شود که حضور آنتی‌ژن‌های هموزیگوت برای خاصیت دوزاژ رعایت گردد

سلول‌های اسکرین روی هم‌رفته حاوی حداقل ۱۸ آنتی‌ژن مهم بالینی در سیستم‌های مختلف گروه خونی هستند و غالب آن‌ها

حاوی آنتی‌ژن‌های با شیوع بیشتر از ۲ درصد در جامعه هستند.



	Rh-Hr						Kell					Duffy		Kidd		Lewis		P	MNS					Lutheran	Sex-linked	PEG				
	D	C	E	c	e	C <sup>w</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	AHG	CC		
I	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	3+	3+
II	+	+	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	3+	3+
III	0	0	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	3+	3+

### سلول‌های معرف اسکرین در ویال‌های سه‌تایی

در برخی از آزمایشگاه‌ها با مخلوط کردن شناسی سه گروه مختلف O مثبت اقدام به تهیه سلول معرف اسکرین می‌کنند! لطفاً به موارد زیر فکر کنید!!!

- ✓ آیا این سلول‌های اسکرین دارای همه‌ی آنتی‌ژن‌های مهم بالینی هستند؟
- ✓ آیا مخلوط کردن موجب کاهش حساسیت و بروز واکنش‌های میکسد فیلد نمی‌گردد؟
- ✓ آیا اثرات دوزاژ رعایت شده است؟
- ✓ آیا همه‌ی آنتی‌ژن‌های مهم اره‌اش را داراست؟ آیا می‌دانید که امکان یافتن آنتی‌ژن‌های C و e در گروه منفی بیشتر است؟
- ✓ آیا جواب آزمایشگاه شما با آزمایشگاه دیگری که از مخلوط شناسی سه نوع دیگر سلول‌های O استفاده می‌کند یکسان خواهد بود؟
- ✓ آیا می‌دانید که اگر جواب آزمایش با سلول‌های اسکرین تولید خودتان مثبت باشد نیاز به آزمایش دوباره با سلول‌های اسکرین استاندارد دارد؟

✓ آیا می‌دانید اگر جواب منفی باشد نمی‌توان با قاطعیت جواب منفی را گزارش کرد؟ زیرا از ترکیب آنتی‌ژنی سلول‌های اسکرین مخلوط شده در آزمایشگاه بی‌اطلاع هستیم.

از این رو برای تست اسکرین آنتی‌بادی‌ها بایستی از سلول‌های معرف اسکرین که در تولید آن استانداردهای لازم رعایت شده باشد، استفاده کرد.

### روش استاندارد انجام آزمایش اسکرین آنتی‌بادی

دو قطره سرم بیمار را با یک قطره از گلبول‌های استاندارد اسکرین در لوله‌های جداگانه مخلوط کنید. اگر سه ویال اسکرین موجود است نیاز به سه لوله‌ی آزمایش است. در برخی از آزمایشگاه‌ها برای هر سلول اسکرین از دو لوله استفاده می‌شود که یکی در حرارت اتاق و دیگری در ۳۷ درجه قرار می‌گیرد.

مجاورت سرم با گلبول‌های اسکرین در فازهای حرارتی اتاق (RT) و ۳۷ درجه و فاز کومب (AHG) بررسی می‌شوند. از آنجاکه بیشتر آنتی‌بادی‌های حائز اهمیت بالینی در فاز ۳۷ درجه و کومب واکنش می‌دهند برخی بر این عقیده‌اند که فاز RT حذف گردد یا اینکه برای هر ویال اسکرین از دو لوله استفاده شود که یکی در RT و دیگری در ۳۷ درجه و فاز کومب آزمایش گردد. گاهی امکان دارد واکنش آنتی‌بادی‌های سرد که فاقد اهمیت بالینی هستند به دلیل فعال شدن کمپلمان تا ۳۷ درجه و فاز کومب ادامه یابد و تفسیر نتایج را مشکل کند و از این رو سفارش می‌شود که از لوله‌ی RT جداگانه استفاده شود.

برای واکنش بهتر می‌توان به لوله‌ی آزمایش در فاز ۳۷ درجه آلبومین اضافه کرد یا اینکه آنتی‌ژن - آنتی‌بادی را در محلول با قدرت یونی کم (LISS) با یکدیگر مجاور کرد.

سفارش می‌شود که همراه لوله‌های تست، لوله‌ی اتوکنترل که حاوی سرم بیمار و گلبول‌های قرمز بیمار است در شرایط محیطی مشابه با لوله‌های تست مورد آزمایش قرار گیرد. پاسخ مثبت در لوله‌ی اتوکنترل ممکن است بیانگر حضور آتوآنتی‌بادی باشد. واکنش میکسد فیلد در لوله اتوکنترل در فاز کومب ممکن است ناشی از ساخته شدن آلوآنتی‌بادی به علت تزریق خون اخیر به بیمار باشد.

چنانچه واکنش سرم با تمام ویال‌های اسکرین منفی باشد و با چک سل (Check cell) کارآمدی آنتی هیومن گلوبولین کنترل شده باشد، نتیجه اسکرین آنتی‌بادی منفی گزارش می‌شود ولی در صورت واکنش مثبت با توجه به فاز حرارتی واکنش

و اثرات دوزاژ و اتوکنترل، دیدگاه‌های تازه‌ای از حضور آنتی‌کرها در سرم به دست می‌دهد؛ برای مثال چنانچه واکنش‌ها تنها در فاز حرارت اتاق صورت گرفته باشد ایده‌های زیر را مطرح می‌کند:

۱. واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی مربوط به آنتی‌کرهای سرد و از گروه IgM است که قابلیت عبور از جفت را ندارند.
۲. آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های خانواده‌ی LIPMAN در گروه فاز حرارتی RT قرار می‌گیرند. حروف LIPMAN به ترتیب اشاره به آنتی‌ژن‌های سیستم گروه خونی لوئیس، لوتران a, i, P1, M, ABO و N دارد، البته آنتی‌بادی‌های سیستم ABO با سلول‌های اسکرین واکنش نمی‌دهند.
۳. چنانچه در سرم آنتی‌اچ وجود داشته باشد با تمام سلول‌های اسکرین در فاز حرارتی RT واکنش می‌دهد. آنتی‌اچ با طبیعت خطرناک در گروه‌های بمبئی و پارابمبئی و به‌صورت بی‌خطر در مواردی نادر از گروه‌های A<sub>1</sub> و A<sub>1</sub>B گزارش گردیده است.

## Cold Antibodies (IgM)

- Anti-Le<sup>a</sup>
- Anti-Le<sup>b</sup>
- Anti-I
- Anti-P1
- Anti-M
- Anti-A, -B, -H
- Anti-N



**LIPMA<sub>BH</sub>N**

*Naturally Occurring*

آنتی‌بادی‌های سرد حائز اهمیت بالینی نیستند زیرا اغلب از گروه IgM بوده و توانایی عبور از جفت را ندارند. برای به‌خاطر سپردن آنتی‌بادی‌های سرد از لغت لیپمن (لب مرد) استفاده می‌شود. هرکدام از حروف لیپمن به مفهوم یک سیستم گروه خونی است

چنانچه واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی پس از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه صورت گرفته باشد امکان حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های D یا E یا K را مطرح می‌سازد. واکنش در فازهای مختلف حرارتی و با هر دو تا سه ویال اسکرین بیانگر

حضور چند آلوآنتی‌بادی و واکنش با یک ویال از سلول اسکرین بیانگر یک آنتی‌بادی است. واکنش در فاز کومبز بیانگر حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سیستم اره‌اش، کل، کید، دافی، SS، لوتران b و... را مطرح می‌کند که همگی حائز اهمیت بالینی هستند. واکنش منفی در لوله‌ی اتوکنترل و واکنش مثبت با سلول‌های اسکرین بیانگر حضور آلوآنتی‌بادی در سرم است. آلوآنتی‌بادی با روبه‌رو شدن بدن با آنتی‌ژن‌های بیگانه شکل می‌گیرد. واکنش مثبت در لوله اتوکنترل و نیز سلول‌های اسکرین بیانگر حضور اتوآنتی‌بادی و یا آلوآنتی‌بادی در بیماری که سابقه اخیر تزریق خون داشته است، می‌باشد.

## Warm antibodies (IgG)

- Rh antibodies
- Kell
- Duffy
- Kidd
- S,s



آنتی‌بادی‌های گرم از جنس IgG و علیه آنتی‌ژن‌های سیستم اره‌اش، کل، دافی، کید و اس هستند. حضور هر کدام از این آنتی‌بادی‌ها در سرم مادر حائز اهمیت بالینی است چون جنین به شرط به ارث بردن آنتی‌ژن مربوطه مبتلا به کم‌خوری شدید همولیتیک می‌گردد

به واکنش‌های مختلف سرم بیماران با سلول‌های معرف اسکرین برای به دست آوردن ایده اولیه از نظر وجود آنتی‌بادی توجه کنید. با مشاهده واکنش سرم با سلول‌های معرف اسکرین ۱ و ۲ (SCI, SCII) در حرارت اتاق و ۳۷ درجه و فاز کومبز می‌توان به اطلاعات اولیه از قبیل حضور آنتی‌کرهای سرد یا گرم، حضور تک آنتی‌بادی یا چند آنتی‌بادی پی برد. لوله اتوکنترل برای جداسازی اتوآنتی‌بادی از آلوآنتی‌بادی به کار می‌رود. اتوکنترل مخلوط سرم بیمار و گلبول‌های قرمز بیمار است که در شرایطی شبیه به سلول‌های اسکرین مورد آزمایش قرار می‌گیرد.

تفسیر مقدماتی

واکنش سرم با ویال های اسکریین

cell	IS	37°	AGT	1. Multiple antibodies
SC I	neg	1+	3+	2. Single antibody (dosage)
SC II	neg	neg	1+	3. Probable IgG
auto	neg	neg	neg	
cell	IS	37°	AGT	1. Single or multiple antibodies
SC I	1+	neg	neg	2. Probably IgM antibodies
SC II	2+	neg	neg	
auto	neg	neg	neg	
cell	IS	37°	AGT	1. Multiple antibodies, warm and cold
SC I	2+	neg	1+	
SC II	3+	1+	2+	2. Potent cold antibody binding complement in AGT
auto	neg	neg	neg	
cell	IS	37°	AGT	1. Single warm antibody, antigen present on both cells
SC I	neg	neg	1+	2. Antibody to high-frequency antigen
SC II	neg	neg	1+	3. Complement binding by a cold antibody not detected at IS
auto	neg	neg	neg	
cell	IS	37°	AGT	1. Warm antibodies
SC I	neg	neg	3+	2. Transfusion reaction
SC II	neg	neg	3+	3. Probable IgG antibody
auto	neg	neg	3+	4. Warm autoantibody



## تشخیص هویت آنتی‌بادی‌ها

با مثبت شدن آزمایش اسکرین آنتی‌بادی‌ها باید اقدام به شناسایی آنتی‌بادی کرد و در صورتی که حائز اهمیت بالینی و از گروه IgG باشد بایستی هویت آن را تشخیص داد.

برای تشخیص هویت آنتی‌بادی از سلول‌های معرف پانل (Panel Cell) استفاده می‌شود. سلول‌های پانل در ۸ تا ۱۲ ویال از گروه خونی O انتخاب می‌شوند و در واقع حاوی تمام آنتی‌ژن‌های سلول‌های معرف اسکرین ولی به صورت پراکنده‌تر می‌باشند. در تهیه‌ی سلول‌های پانل سعی می‌شود که واکنش آنتی‌بادی‌های با اثر دوزاژ رعایت گردد. مجاورت سرم با گلبول‌های پانل در فازهای حرارتی اتاق، ۳۷ درجه و کومبیز انجام می‌شود و الگوهای واکنش و قدرت واکنش مورد مشاهده قرار می‌گیرند. با حذف لیست آنتی‌ژنی ویال‌هایی که واکنش منفی داده‌اند از مجموعه‌ی کل آنتی‌ژنی سلول‌های پانل، یک آنتی‌بادی تک یا چند آنتی‌بادی باقی می‌ماند. برای گزارش آنتی‌بادی قانون ۳ بایستی صادق باشد؛ بدین مفهوم که اگر برای مثال آنتی D در سرم کشف شود، سرم بایستی حداقل با ۳ ویال سلول‌های پانل که از نظر آنتی‌ژن D مثبت هستند واکنش مثبت و با ۳ ویال که از نظر آنتی‌ژن D منفی باشند واکنش منفی دهد. در این حالت احتمال حضور آنتی D در سرم ۹۵ درصد می‌باشد. واکنش منفی برای آنتی‌بادی‌هایی که خاصیت دوزاژ دارند هنگامی قابل قبول است که با آنتی‌ژن‌های هموزیگوت واکنش منفی دهند. یادآوری می‌شود که آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های سرپه‌م‌های کید، کل، اره‌اش، دافی و MNSS دارای اثرات دوزاژ هستند؛ برای مثال هنگامی می‌توان گفت که سرم دارای آنتی M نیست که با سلول‌های ویال  $M^+ N^-$  که آنتی‌ژن M به صورت هموزیگوت دارد واکنش منفی دهد و یا برای مثال زمانی می‌توان گفت که سرم دارای آنتی کید ( $jka^-$ ) نیست که سرم با سلول‌های هموزیگوت  $jkb^- jka^+$  واکنش منفی دهد.



Donor	Cell number	D	C	c	E	e	C <sup>w</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	IS	37	AHG	CC
R <sub>1</sub> r	1	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	2+	
R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	2	+	+	0	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0	0	0	3+
R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	3	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	3+	
R <sub>0</sub> r	4	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	0	0	3+	
r <sub>1</sub> r	5	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	3+	
r <sub>1</sub> r	6	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	2+		
rrK	7	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	2+		
rr	8	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	0	3+	
r <sub>1</sub> r <sup>n</sup>	9	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	0	0	3+	
rr	10	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	3+		
R <sub>1</sub> r	11	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	2+		
	Patient Cells																											0	0	0	3+

سلول‌های معرف پانل از ۸ تا ۱۲ ویال مختلف گروه خونی O تهیه می‌گردد که دارای ترکیب آنتی‌ژنی پراکنده است ولی در مجموع تمام آنتی‌ژن‌های مرحله اسکرین را دارا می‌باشد. با حذف لیست آنتی‌ژنی ویال‌هایی که با سرم واکنش نداده‌اند، یک یا چند آنتی‌بادی باقی می‌ماند که بایستی به تفسیر آن‌ها پرداخت. سرم با سلول‌های هر ویال پانل در حرارت اتاق، ۳۷ درجه و فاز کومبیز مجاور می‌شود. حروف CC به مفهوم چک سل است که برای کارآمدی آنتی‌هیومن گلوبولین است. چنانچه واکنش سرم با یک سلول پانل در مرحله کومبیز منفی می‌شود ولی CC مثبت شود به مفهوم آن است که واکنش منفی ارزش دارد. در پانل فوق آنتی‌بادی حائز اهمیت بالینی

### آنتی‌دافی a می‌باشد

گفتنی است که قانون ۳ دیگری برای نمونه‌گیری خون برای تشخیص آنتی‌بادی‌ها وجود دارد؛ بدین مفهوم که چنانچه خانمی در سه ماه گذشته حامله باشد یا فردی طی سه ماه گذشته خون دریافت کرده باشد وضعیت ایمنولوژیک سرم خانم حامله یا فردی که طی سه ماه گذشته تزریق خون داشته است، هر ۳ روز ممکن است تغییر کند و نیاز به نمونه‌گیری مجدد بعد از هر

سه روز است، برای مثال چنانچه برای بیماری که یک ماه پیش (تا سه ماه) خون دریافت کرده است چنانچه یک نمونه امروز گرفته شود فقط تا ۳ روز می‌توان آزمایش اسکرین آنتی‌بادی‌ها یا کراس‌مچ را روی آن انجام داد، روز نمونه‌گیری روز صفر محسوب می‌شود و پس از آن چنانچه نیاز به کراس‌مچ یا تعیین هویت آنتی‌بادی است بایستی نمونه‌ی جدید از بیمار گرفته شود و مثال دیگر اینکه چنانچه چند واحد خون برای بیماری کراس‌مچ شده باشد و به بیمار حتی یک واحد تزریق گردد و سه روز از تزریق بگذرد کعبه‌های از قبل کراس‌مچ‌شده بایستی دوباره با نمونه جدید بیمار که بیانگر وضعیت ایمونولوژیک جاری بیمار است کراس‌مچ شود.