

Immunologia transfuzjologiczna krwinek czerwonych. Obowiązujący zakres badań wykonywanych u krwiodawców, chorych i kobiet ciężarnych

Immunology of red blood cells in transfusion practice. Mandatory testing of blood donors, patients and pregnant women

Bogumiła Michalewska, Halina Seyfried,
Grażyna Kuśnierz-Alejska, Magdalena Łętowska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Wprowadzenie

Dział immunologii transfuzjologicznej krwinek czerwonych ma obowiązek wypełniać następujące zadania:

1. Wykonywanie badań w zakresie serologii grup krwi u krwiodawców, u chorych i kobiet ciężarnych.
2. Pozyskiwanie dawców z przeciwciałami anti-RhD do oddawania osocza przeznaczonego do produkcji immunoglobuliny anti-D, stosowanego w profilaktyce konfliktu Rh.
3. Pełnienie fachowego nadzoru nad badaniami wykonywanymi we wszystkich pracowniach podległych Centrum Krwiodawstwa poprzez:
 - a) przeprowadzanie szkoleń fachowego personelu w laboratorium oraz wydawanie zaświadczeń upoważniających osoby do wykonywania badań,
 - b) przeprowadzanie zewnętrznej oceny jakości badań oraz dokonywanie merytorycznej inspekcji w poszczególnych laboratoriach. Oba zadania powinny być dokonywane nie rzadziej niż 1 raz w roku,
 - c) udzielanie całodobowych konsultacji dotyczących badań z zakresu immunologii trans-

fuzjologicznej dla wszystkich szpitali na nadzorowanym terenie.

W jego strukturach powinny znaleźć się następujące pracownie:

1. pracownia grup krwi dawców;
2. pracownia konsultacyjna immunologii krwinek czerwonych, wykonująca badania u chorych i u kobiet ciężarnych;
3. pracownia dawców uodpornianych z przeciwciałami anti-D (może występować w strukturach Pracowni grup krwi dawców).

Kierownikiem działu immunologii transfuzjologicznej musi być osoba z uprawnieniami diagnosty laboratoryjnego, z co najmniej 3-letnim stażem w badaniach serologicznych grup krwi i po indywidualnym szkoleniu w Zakładzie Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie (IHiT). Zaleca się ponadto, aby osoba ta posiadała specjalizację w zakresie medycznej transfuzjologii laboratoryjnej.

Kierownikiem pracowni musi być osoba z uprawnieniami diagnosty laboratoryjnego, upoważniona do samodzielnego wykonywania badań serologicznych grup krwi.

Do obowiązków kierownika należy zaopatrzenie pracowni w odpowiedni sprzęt, aparaturę, od-

Adres do korespondencji: dr Bogumiła Michalewska, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5
00–957 Warszawa, e-mail: bmichalewska@ihit.waw.pl

czynniki, prawidłowe druki i książki do protokolowania badań, organizacja pracy personelu, nadzór nad badaniami i ich dokumentacją, szkolenia pracowników, w tym również terenowych pracowni serologii transfuzjologicznej.

Fachowy nadzór nad badaniami z zakresu immunologii transfuzjologicznej w Centrach Krwiodawstwa pełni IHiT. Centra Krwiodawstwa sprawują nadzór fachowy nad badaniami wykonywanymi we wszystkich podległych im pracowniach serologii transfuzjologicznej.

Jeżeli Centrum Krwiodawstwa zawarło ze szpitalem, w którym mieści się Oddział Terenowy, kontrakt na wykonywanie badań z zakresu serologii grup krwi u krwiodawców, kierownik działu immunologii transfuzjologicznej lub upoważniona przez niego osoba zobowiązany jest do dokonywania przynajmniej dwa razy w roku merytorycznej inspekcji szpitalnego laboratorium.

Centrum Krwiodawstwa ustala wymagania dotyczące zestawu wszystkich odczynników (w tym również krwinek wzorcowych) do wykonywania badań w szpitalnych pracowniach serologii transfuzjologicznej.

Dyrektor Centrum Krwiodawstwa jest zobowiązany do zapewnienia całodobowych konsultacji dotyczących badań z zakresu immunologii transfuzjologicznej dla wszystkich szpitali na nadzorowanym terenie. Konsultacji takich powinien udzielać diagnosta laboratoryjny posiadający duże doświadczenie praktyczne i przygotowanie teoretyczne (Art. 27 pkt. 8 i 10 ustawy o publicznej służbie krwi).

Podczas wykonywania badań obowiązuje zasada, że wszystkie oznaczenia wykonywane w próbce krwi przeprowadza jedna osoba.

1. Zakres badań u krwiodawców

1. Określanie grup krwi układu ABO przy użyciu dwóch zestawów odczynników monoklonalnych anty-A i anty-B, pochodzących z różnych klonów oraz krwinek wzorcowych grupy O, A₁ i B. Dopuszcza się stosowanie dwóch serii tego samego klonu.
2. Określanie antygeny D z układu Rh za pomocą 2 odczynników monoklonalnych anty-D, pochodzących z różnych klonów i umożliwiających wykrycie słabej odmiany antygeny D (D^w) i jego kategorii.
3. Określanie antygeny K z układu Kell u wszystkich wielokrotnych dawców i fenotypu Rh u wszystkich wielokrotnych dawców grupy O oraz w miarę możliwości u dawców innych grup krwi.

4. Określanie antygeny k u dawców K dodatnich.
5. Określanie klinicznie ważnych antygenów innych układów grupowych u wielokrotnych dawców, szczególnie grupy O.
6. Wykrywanie i identyfikacja przeciwciał odpornościowych:
 - a) u wszystkich dawców pierwszorazowych,
 - b) u wszystkich dawców wielokrotnych, którzy byli leczeni krwią w okresie między poprzednią a obecną donacją oraz u kobiet z ciążą w wywiadzie.

UWAGI:

- A. W oznaczeniach grup krwi układu ABO w dwóch próbkach krwi dawcy przy zastosowaniu 2 zestawów odczynników monoklonalnych i posługiwaniu się krwinkami z próbek macierzystych (nieprzemysłowych), dopuszcza się zbadanie jednej próbki jednym zestawem odczynników, a drugiej próbki drugim zestawem.
- B. W oznaczeniach grup krwi układu ABO wykonywanych w systemach zautomatyzowanych zapewniających jednoznaczny identyfikację badanej próbki, dopuszcza się stosowanie jednego zestawu odczynników monoklonalnych anty-A i anty-B pod warunkiem, że w każdej próbce krwi dawcy oznacza się przeciwciała anty-A i anty-B. Szczegółowe zasady opisano w pkt. 5.15.
- C. Pełne badanie grup krwi układu ABO i antygeny D z układu Rh, jak również wszystkich innych antygenów wykonuje się 2-krotnie; z próbek krwi pobranych w różnym czasie.
- D. Dla systemów automatycznych dopuszcza się stosowanie do oznaczania alloaglutynin zestawu krwinek A₁ i B z pominięciem krwinek grupy O.
- E. Wpisywanie grup krwi ABO i Rh w systemie komputerowym lub w kartotece dawcy musi opierać się na wynikach badań dwóch próbek krwi: próbki pobranej w laboratorium i próbki pobranej bezpośrednio po oddaniu krwi w dziale pobierania.
- F. Dyrektor Centrum Krwiodawstwa w porozumieniu z kierownikiem działu immunologii transfuzjologicznej ustala, w których Oddziałach Terenowych możliwe jest wykonywanie badań o poszerzonym zakresie, wymienionych w podpunktach 3–5 powyżej; pozostałe Oddziały Terenowe, nieposiadające odpowiednich warunków, mogą być z tych obowiązków zwolnione.
- G. Swoistość przeciwciał odpornościowych, wykrytych w terenowych pracowniach serologicznych musi być ustalona lub potwierdzona w pracowni badań dawców Centrum Krwiodawstwa.

H. Identyfikacja przeciwciał typu zimnego dotyczy tylko przypadków, w których są one wykrywane podczas określania grup krwi układu ABO i reagują w poszerzonej amplitudzie cieplnej (30–37°C).

W badaniach grup krwi układu ABO, Rh, Kell, Duffy i Kidd stosuje się odczynniki diagnostyczne, w tym również krwinki czerwone oznakowane znakiem zgodności CE. Do oznaczania antygenów z innych układów grupowych można stosować odczynniki diagnostyczne, w tym także krwinki czerwone nieoznakowane znakiem CE.

Do wykrywania nieregularnych przeciwciał stosuje się krwinki wzorcowe oznakowane znakiem zgodności CE. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 3 listopada 2004 r. w sprawie wymagań zasadniczych dla wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (Dziennik Ustaw, nr 251, poz. 2515), identyfikację wykrytych przeciwciał można przeprowadzać za pomocą krwinek wzorcowych nieoznakowanych znakiem CE.

Wszystkie rutynowe metody ręczne można zastępować mikrometodami kolumnowymi i automatycznymi, według zasad opisanych w pkt. 5.15 oraz innymi metodami sprawdzonymi i zatwierdzonymi przez IHiT.

2. Badania konsultacyjne dla biorców

Badania takie są wykonywane w pracowni konsultacyjnej Centrum Krwiodawstwa we wszystkich przypadkach, w których terenowe pracownie serologiczne (szpitalne i poza szpitalne) natrafiają na trudności. Do pracowni należy przekazać badaną i świeżo pobraną próbkę krwi wraz z dokumentacją dotychczas przeprowadzonych badań (wzór 1, *patrz* Załącznik) oraz dane kliniczne chorego (wiek, rozpoznanie, informacje dotyczące leczenia krwią i przebytych ciąży). W pracowni próbkę krwi opatruje się kolejnym numerem odnotowanym w książce badań. W pilnych przypadkach należy odnotować godzinę przyjęcia próbki i godzinę wydania wyniku. Przy nazwisku chorego należy zamieścić dane kliniczne zawarte w skierowaniu do badania. Czytelne protokoły badań powinny być zakończone sformulowaniem wyniku zrozumiałym dla odbiorcy, w brzmieniu identycznym z wydanym wynikiem. W książce badań i na wydanym wyniku powinien być umieszczony podpis osoby wykonującej badania i osoby je nadzorującej (kierownik pracowni albo osoba upoważniona).

Dopuszcza się stosowanie formularzy zawierających odpowiednie rubryki dotyczące protokołów w zakresie najczęściej wykonywanych badań, z pozostawieniem miejsca na protokoły badań, których

nie można przewidzieć. Dane dotyczące chorych i wyników badań należy wprowadzać do komputera.

Dopuszcza się równoległe prowadzenie dokumentacji w skorowidzu w porządku alfabetycznym.

W godzinach pracy pozaregulaminowej pracownicy pełniący dyżury powinni prowadzić w odrębnej książce (książka raportów) rejestr wykonanych czynności wraz z zaznaczeniem godziny przyjęcia próbki i godziny wydania wyniku. Informacje te powinny być codziennie rano sprawdzane przez kierownika pracowni lub osobę upoważnioną.

2.1. Zakres badań

W pracowni konsultacyjnej obowiązuje przedstawiony poniżej zakres badań.

1. Ustalanie grupy krwi układu ABO.
2. Diagnostyka antygeny D z układu Rh, obejmująca jego słabe odmiany i kategorie.
3. Identyfikacja nieregularnych przeciwciał.
4. Diagnostyka niedokrwistości autoimmunohemolitycznych (NAIH).
5. Dobieranie krwi dla chorych w przypadkach obecności auto-i alloprzeciwciał oraz przy każdej zgłoszonej niezgodności w próbie krzyżowej.
6. Serologiczna analiza powikłań poprzetoczeniowych.
7. Określanie fenotypu Rh, antygeny K lub innych antygenów u osób uodpornionych oraz w celu zapobiegania alloimmunizacji u chorych wymagających długotrwałego leczenia krwią (np. w NAIH).
8. Diagnostyka konfliktu serologicznego pomiędzy matką a płodem, choroby hemolitycznej płodu i noworodka (ChHPN) oraz dobieranie krwi do transfuzji dopłodowej, wymiennej i uzupełniającej.
9. Wykonywanie badań rodzinnych w przypadkach stwierdzenia rzadko występujących fenotypów i alloprzeciwciał skierowanych do antygenów powszechnych.
10. Badania biorców i dawców allogenicznym przeszczepów, w szczególności komórek macierzystych układu krwiotwórczego.

3. Podstawowe wyposażenie w aparaturę, sprzęt laboratoryjny i odczynniki

3.1. Aparatura

Wymagane jest następujące wyposażenie:

- automaty do badań grup krwi,
- aparatura do testów mikrokolumnowych lub innych sprawdzonych i zatwierdzonych przez IHiT,
- cieplarka, powietrzny blok grzewczy z regulacją temperatury,
- łaźnia wodna z regulacją temperatury do 100°C,

- wirówka laboratoryjna z wirnikiem horyzontalnym o przyspieszeniu $3850 \times g$ i z regulacją czasu wirowania,
- wirówka hematokrytowa,
- lodówka o temperaturze 2–6°C,
- zamrażarka o temperaturze od –20°C do –80°C do przechowywania surowic diagnostycznych i pochodzących od chorych, u których wykryto alloprzeciwciała oraz zapasów krwinek wzorcowych i innych z fenotypami o niskiej częstości występowania.

UWAGA: Każda lodówka, zamrażarka i ciepłarka powinny być wyposażone w dwa niezależne mierniki temperatury. Obowiązuje trzykrotna kontrola temperatury w ciągu doby i prowadzenie jej dokumentacji lub podłączenie do centralnego monitoringu temperatury.

3.1.1. Kalibracja wirówek do testów serologicznych

Każda wirówka musi być skalibrowana w celu ustalenia optymalnych obrotów i czasu wirowania, aby zapewnić maksymalne nasilenie aglutynacji, nie powodując reakcji fałszywie dodatnich. Badania kalibracyjne wykonuje się, stosując obroty wirówki 2000/min i 2500/min.

3.1.1.1. Kalibracja wirówki dla testu bezpośredniej aglutynacji (test w NaCl)

1. Przygotować 2–5-procentową zawiesinę krwinek grupy A i B w roztworze NaCl.
2. Wykonać badanie miana surowicy anty-B i wybrać rozcieńczenie, w którym aglutynacja krwinek B wynosi 1+.
3. Do 5 probówek dodać po kropli krwinek A (kontrola ujemna) i do 5 probówek dodać po kropli krwinek B (kontrola dodatnia).
4. Do wszystkich probówek dodać po kropli wybranego rozcieńczenia anty-B.
5. W wirówce umieścić dwie probówki zawierające kontrolę ujemną i dodatnią.
6. Odwirować (np. przez 10 s) i odczytać nasilenie aglutynacji.
7. Podobnie postępować z kolejnymi parami probówek, wirując je w różnym czasie, na przykład przez 15, 20, 30 i 45 s.

Interpretacja wyników

Optymalnymi obrotami i czasem wirowania są parametry, w których zostały spełnione następujące warunki:

- guziczek krwinek jest wyraźnie widoczny i nie jest rozlany,
- płyn nad krwinkami jest przejrzysty,
- guziczek krwinek daje się łatwo rozprowadzić,

- aglutynacja w kontroli dodatniej wynosi 1+,
- brak aglutynacji w kontroli ujemnej.

3.1.1.2. Kalibrowanie wirówki do testów antyglobulinowych

1. Należy rozcieńczyć surowicę anty-D (niekompletne przeciwciała) w roztworze NaCl tak, aby otrzymać w PTA reakcję 1+.
2. Przygotować:
 - a) 3-procentową zawiesinę krwinek RhD dodatnich w roztworze LISS — kontrola dodatnia,
 - b) 3-procentową zawiesinę krwinek RhD ujemnych w roztworze LISS — kontrola ujemna.
3. Opisać 5 probówek dla kontroli dodatniej i 5 probówek dla kontroli ujemnej.
4. Do każdej probówki dodać po 2 krople rozcieńczonej surowicy anty-D.
5. Dodać odpowiednio do probówek po 2 krople krwinek RhD dodatnich do kontroli dodatniej i po 2 krople krwinek Rh ujemnych do kontroli ujemnej.
6. Inkubować wszystkie probówki w 37°C przez 20 minut.
7. Napełnić probówki roztworem NaCl i odwirować probówki w parach (kontrola dodatnia i kontrola ujemna) przy obrotach wirówki 2500 obr./min w różnym czasie (np. 90 s, 120 s, 180 s).
8. Po odwirowaniu usunąć nadsącz.
9. Krwinki przemywać 4-krotnie.

UWAGA: Optymalny czas odwirowania krwinek podczas ich przemywania to taki, przy którym zostają spełnione następujące warunki:

- po odwirowaniu nadsącz jest przejrzysty, niezabarwiony krwinkami,
 - po usunięciu nadsączu krwinki tworzą na dnie ścisły guziczek, nierozlany po brzegach,
 - guziczek krwinek daje się łatwo rozprowadzać w pozostałym płynie.
10. W wybranych probówkach, do osadu krwinek po ostatnim przemyciu dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego.
 11. Odwirować przez na przykład 20 s i odczytać wyniki.

UWAGA: Optymalny czas odwirowania krwinek z odczynnikiem antyglobulinowym to taki, przy którym zostają spełnione następujące warunki:

- guziczek krwinek jest wyraźnie widoczny i nie jest rozlany,
- płyn nad krwinkami jest przejrzysty,
- guziczek krwinek daje się łatwo rozprowadzić,
- aglutynacja w kontroli dodatniej wynosi 1+
- brak aglutynacji w kontroli ujemnej.

Jeśli nie zostały spełnione powyższe warunki, badanie krwinek z odczynnikiem antyglobulinowym

należy powtórzyć, stosując odpowiednio krótszy lub dłuższy czas wirowania.

3.2. Sprzęt laboratoryjny

Pracownia powinna być wyposażona w przedstawiony poniżej sprzęt laboratoryjny.

1. Probówki wyłącznie do jednorazowego użytku:
 - a) do pobierania krwi: sucha (na skrzep) i z EDTA,
 - b) do wykonywania badań szklane lub plastikowe, o wymiarach około 70 mm × 10 mm.
2. Szkiełka podstawowe.
3. Płyty jednorazowe ze sztucznego tworzywa z płaskimi wgłębieniami lub szklane.
4. Pipety pasteurowskie — w miarę możliwości jednorazowe.
5. Pipety automatyczne z jednorazowymi końcówkami.
6. Zlewki lub pojemniki z tworzywa sztucznego.
7. Pojemniki na szkło i zużyty sprzęt jednorazowy.
8. Kasety plastikowe do umieszczania szkiełek lub płyt (wysłane gąbką ze sztucznego tworzywa).
9. Statywy do probówek dwu- lub wielorzędowe (metalowe lub ze sztucznego tworzywa).
10. Nalepki samoprzylepne.
11. Pisaki wodoodporne.
12. Kolby miarowe o pojemności 1–2 l.

3.3. Odczynniki*

Przed użyciem odczynników należy codziennie sprawdzać ich wygląd zewnętrzny. Zmętnienie i widoczne strąty dyskwalifikują dany odczynnik.

3.3.1. 0,15 mol/l roztwór NaCl o pH 6,6–7,6

UWAGA: Jeśli używa się roztwór bez dodatku buforu fosforanowego, kontrolę pH wykonuje się codziennie. Stosując roztwór buforowany, należy kontrolować każdą nową serię odczynnika przed udostępnieniem jej do badań.

3.3.2. Roztwór NaCl o niskiej sile jonowej — 0,03 mol/l (LISS, low ionic strength solution)

UWAGI:

- A. Należy sprawdzić pH każdej serii, które winno się mieścić w granicach 6,5–7,0. Jego optymalną wartością jest 6,7.
- B. Kontrola jakości roztworu LISS polega na wykonaniu testu antyglobulinowego z krwinkami Rh+ i Rh–, zawieszonymi w tym roztworze i uczulonymi Standardem anty-D według przepisu w pkt. 5.4.1.4.

3.3.3. Odczynnik papainowy

UWAGA: Dla stwierdzenia wymaganej aktywności odczynnika papainowego należy porównać miano i natężenie aglutynacji wyrażone w *score* (pkt 4.3) surowicy ludzkiej anty-D z krwinkami RhD+ w teście koloidowym i papainowym. Miano surowicy z zastosowaniem środowiska papainy, przewyższające, co najmniej dwa rozcieńczenia i 2-krotnie wyższa wartość *score* niż w środowisku koloidowym, wskazuje na prawidłową aktywność odczynnika.

3.3.4. Roztwór trombiny o stężeniu 50 j./ml.

3.3.5. Roztwór polibrenu

Bezpośrednio przed badaniem przygotować 1-procentowy roztwór polibrenu w 0,15 mol/l NaCl o pH 7,0.

UWAGA: Polibren w substancji należy przechowywać w szczelnie zamkniętym pojemniku ze względu na jego silne właściwości higroskopijne.

3.3.6. Odczynnik MEP do rozkładu autoprzeciwciał na krwinkach przed ich użyciem do autoabsorpcji

3.3.7. Roztwory do różnicowania przeciwciał IgG i IgM

3.3.7.1. Roztwór dwumerkaptetanolu (2ME)

3.3.7.2. Roztwór dwutiotrytolu (DTT)

3.3.8. Roztwór fosforanu chlorochiny

3.3.9. Roztwór kwaśnej glicyny i EDTA

3.3.10. Standard anty-D do kontroli PTA i testów enzymatycznych

Dostępny krajowy Standard anty-D zawiera 0,1 jednostki międzynarodowej (0,02 µg) IgG anty-D w 1 ml został opracowany w oparciu o Standard Międzynarodowy.

3.3.11. Roztwory wzbogacające do przechowywania krwinek czerwonych

3.3.11.1. Roztwór z dodatkiem ludzkiej surowicy

3.3.11.2. Roztwór wzbogacający (SAGM, ADSOL)

*Szczegóły zawarte są w Medycznych zasadach pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi (rozdział 7).

Tabela 1. Przykład zestawu krwinek wzorcowych do wykrywania nieregularnych alloprzeciwciał**Table 1.** Example of red cells phenotypes for irregular alloantibodies detection

Rh	Rh						Kell		MNs				P	Lewis		Duffy		Kidd	
	D	C	c	E	e	C ^w	K	k	M	N	S	s	P ₁	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b
DCC ^w ee	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0
DccEE	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
ddccee	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+

3.3.12. Roztwory do przechowywania krwinek w stanie zamrożenia

3.3.13. Roztwory do rozmrażania krwinek

3.3.14. Środki bakteriobójcze stosowane do konserwacji próbek surowic

3.4. Podstawowy zestaw odczynników diagnostycznych

Podstawowy zestaw odczynników diagnostycznych stosowanych w Centrach Krwiodawstwa przedstawiono poniżej. Natomiast zestaw dla szpitalnych pracowni serologicznych ustala Centrum Krwiodawstwa.

3.4.1. Odczynniki monoklonalne i poliklonalne

Układ ABO: odczynniki monoklonalne anty-A i anty-B; lektyna anty-A₁,
Układ Rh: anty-D, anty-C, anty-C^w, anty-c, anty-E, anty-e

Układ Kell: anty-K, anty-k, anty-Kp^a, anty-Kp^b

Układ Duffy: anty-Fy^a, anty-Fy^b

Układ Kidd: anty-Jk^a, anty-Jk^b

Układ MNS: anty-M, anty-N, anty-S, anty-s

Układ P: anty-P₁,

Układ Lewis: anty-Le^a, anty-Le^b

Odczynnik antyglobulinowy wieloswoisty: anty-IgG + anty-C3.

Odczynniki antyglobulinowe monoswoiste: anty-IgG, anty-IgM, anty-IgA, anty-C3d.

Większość wymienionych odczynników zawiera przeciwciała monoklonalne.

Surowice grupy AB do wykrywania poliaglutynacji.

Wyselekcjonowane ludzkie surowice z układu ABO i anty-D z układu Rh do badań specjalistycznych.

3.4.2. Krwinki wzorcowe oznakowane znakiem CE:

- do badania układu ABO: krwinki A₁, B i O,

- do sprawdzania aktywności i swoistości odczynnika anty-D z układu Rh: krwinki O RhD+ i O RhD-,
- do sprawdzania aktywności i swoistości odczynnika anty-K z układu Kell, krwinki K+ i K-,
- do wykrywania odpornościowych przeciwciał (tab. 1).

3.4.3. Krwinki wzorcowe do identyfikacji przeciwciał (tab. 2)

3.4.4. Podstawowy zestaw lektyn

Dolichos biflorus anty-A₁ (zawiera także anty-Tn i anty-Cad)

Ulex europaeus anty-H

Arachis hypogea anty-T

Salvia sclarea anty-Tn

Salvia horminum anty-Tn + anty-Cad

Vicia graminea anty-N.

4. Zasady pobierania, przechowywania i przygotowania krwi do badań

4.1. Pobieranie krwi do badań serologicznych

- Pobrać 5–10 ml krwi żyłnej do próbki jednorazowego użytku zaopatrzonej w trwałą etykietę:
 - do badań metodą automatyczną — próbka z EDTA,
 - do badań metodą ręczną — sucha próbka lub próbka z EDTA.
- Bezpośrednio po pobraniu na etykiecie wpisać drukowanymi literami: nazwisko, imię, nr PESEL lub datę urodzenia, a u dawców — nr donacji (w przypadku stosowania systemu kodów kreskowych, okleić próbkę stosownym kodem).
- Te same dane wpisać na załączniku towarzyszącym próbce (wzór 1, pkt 2, patrz Załącznik) wraz z adnotacją, jakie badania mają być wykonane.
- Jeśli badania:
 - mają być rozpoczęte w dniu pobrania próbki, próbkę z krwią umieścić w tempera-

Tabela 2. Przykład zestawu krwinek wzorcowych do identyfikacji alloprzeciwciał**Table 2.** Example of red cells phenotypes for alloantibody identification

Rh	Rh						Kell		MNS				P	Lewis		Duffy		Kidd	
	D	C	c	E	e	C ^w	K	k	M	N	S	s	P ₁	Le ^a	Le ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b
DCCee	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+
DCC ^w ee	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0
DccEE	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	+	0	+
DccEE	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+
Dccee	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0
DCcEe	+	+	+	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0
ddCcee	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+
ddccEe	0	0	+	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+
ddccee	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+
ddccee	0	0	+	0	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0
ddccee	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+

turze 37°C na około 10–15 min, a następnie wirować przy 600 × g przez 5 min,

- b) mają być przeprowadzane następnego dnia, oddzielić krew od ścianek próbówki i umieścić w chłodni o temperaturze 2–6°C, a następnego dnia odwirować,
 - c) muszą być wykonane natychmiast po pobraniu krwi albo jeśli próbka krwi pochodzi od osoby z zaburzeniami układu krzepnięcia, dodać do krwi roztwór trombiny (pkt 3.3.4).
5. Po odwirowaniu oddzielić surowicę i przenieść ją do oddzielnej próbówki, a z krwinek sporządzić zawiesinę w odpowiednim stężeniu i środowisku.

UWAGA: Od noworodków, niemowląt, małych dzieci pobiera się mniejsze objętości krwi.

4.2. Pobieranie krwi do badań genetycznych

Przed pobraniem należy określić liczbę krwinek białych we krwi obwodowej.

1. Pobrać około 1,5 ml krwi do próbówki jednorazowej z tworzywa sztucznego zawierającej EDTA (takiej jak do badań morfologii krwi).
2. Pobraną krew przekazać do pracowni biologii molekularnej IHiT w terminie nieprzekraczającym 36 godzin od pobrania.
3. Jeżeli krew będzie przekazana w terminie późniejszym, należy ją przechować w stanie zamrożenia w temperaturze od –20°C do –80°C.

UWAGA: Jeżeli stwierdzono, że liczba leukocytów znajduje się poniżej dolnej granicy wartości prawidłowej, należy pobrać krew do co najmniej dwóch próbówek.

4.3. Ogólne zasady dokumentacji i wykonywania badań

1. Zarejestrować próbkę krwi w odpowiedniej książce badań (wzór 3, patrz Załącznik), pod kolejnym numerem.
2. Jeśli próbka krwi pochodziła od krwiodawcy, wpisać numer donacji lub wkleić etykietkę z tym samym numerem donacji.
3. Opatrzeć próbówkę z krwią numerem, pod którym została zarejestrowana i sprawdzić zgodność numeracji z zapisem w książce.
4. Tym samym numerem opatrywać całe szkło laboratoryjne (próbówki, płyty, szkiełka podstawowe).
5. Prowadzić dokładne protokoły wszystkich wykonanych badań.
6. Wszystkie wyniki badań grupowych krwi i prób zgodności należy odczytywać i wpisywać do książki z udziałem dwóch osób. Osoby: wykonująca badanie i sprawdzająca powinny złożyć podpis w książce. Wydawane wyniki powinny być podpisane przez kierownika pracowni lub upoważnioną przez niego osobę (wzór 4, patrz Załącznik).
7. W przypadku stosowania systemów automatycznych z jednoznaczną identyfikacją dawcy/pacjenta i automatycznym odczytem (szczegółowe zasady opisane w pkt. 5.15), dopuszcza się walidację i zapis wyniku przez jedną osobę. Nie obowiązuje prowadzenie zapisów w książkach.
8. Poleca się prowadzenie oddzielnej książki do zapisu badań kontrolnych odczynników diagnostycznych i krwinek wzorcowych (wzór 5, patrz Załącznik), używanych w danym dniu we

wszystkich pracowniach.

UWAGA: Nie dopuszcza się numeracji dodatkowej, tak zwanej roboczej.

Badania serologiczne należy wykonywać na płytach z tworzywa sztucznego lub szklanych, szkiełkach podstawowych oraz w probówkach jednorazowego użytku. Powinno się stosować pipety jednorazowego użytku lub automatyczne. Dopuszczalne jest wielokrotne stosowanie zwykłych pipet pasteurowskich, które przed każdą zmianą zawartości muszą być dokładnie, kilkakrotnie przemyte roztworem NaCl. W badaniach serologicznych podstawową jednostką miary jest kropla wolno spadająca z pipety, nachylonej zawsze pod tym samym kątem. We wszystkich badaniach wykonywanych na płytach lub szkiełkach, do jednej kropli odczynnika lub badanej surowicy, dodaje się jedną kroplę zawiesiny krwinek. Chociaż kolejność nie odgrywa roli, praktyczniej jest jednak umieszczać najpierw odczynniki diagnostyczne i badane surowice. Stosując odwrotną kolejność, zwłaszcza podczas badania krwi kilku osób, trudno jest zauważyć, czy wszędzie do krwinek dodano odczynnik lub surowicę. Zawartość miesza się czystą bagietką. Badania wykonywane na płytach z tworzywa sztucznego z wgłębieniami nie wymagają mieszania reagentów za pomocą bagietki. Z wyjątkiem badań z zastosowaniem odczynników monoklonalnych, które są odczytywane po kilku minutach, szkiełka podstawowe umieszcza się w wilgotnych komorach chroniących przed wysychaniem kropli. Wyniki odczytuje się, biorąc do ręki płytę lub szkiełko i poruszając nimi ruchem okrężnym. Wyniki badań wykonywanych w probówkach odczytuje się po odwirowaniu i wstrząśnięciu osadu krwinek przez delikatne uderzenie palcem w probówkę. Ocenę obecności aglutynatów ułatwia odpowiednie oświetlenie naturalne lub sztuczne i zastosowanie białego tła. Właściwe badanie uzupełnia się zawsze badaniami kontrolnymi. Obejmują one sprawdzenie swoistości i aktywności odczynników wzorcowych oraz zachowanie się krwinek w roztworze, w którym zostały zawieszane. Podstawowym warunkiem prawidłowego wykonania badań jest czystość płyt, probówek i odczynników. Jest ona szczególnie istotna podczas przeprowadzania testu antyglobulinowego, do wykonania, którego wymaga się jednorazowych probówek. Ślady ludzkiej surowicy w niedokładnie umyтым szkłe lub roztworze NaCl służącym do przemywania krwinek i płukania pipety, powodują zubożenie odczynnika antyglobulinowego. W celu uniknięcia zanieczysz-

czenia odczynników diagnostycznych, każdy z nich pobiera się osobną pipetą.

Z każdego przeprowadzonego badania sporządza się protokół, oznaczając w nim znakiem „+” reakcję aglutynacji, znakiem „-” brak aglutynacji. Celowe jest odnotowywanie nasilenia aglutynacji przy zastosowaniu następujących symboli:

4+: aglutynacja kompletna, w postaci jednego zlepu krwinek,

3+: kilka dużych zlepow krwinek,

2+: średniej wielkości zlepy, mikroskopowo widać wolne krwinki,

+ drobne aglutynaty, mikroskopowo widać liczne niezlepione krwinki.

Nasilenie aglutynacji krwinek pod wpływem surowicy i jej rozcieńczeń można wyrazić liczbowo w *score*, stosując następujące wartości:

4+ = 12

3+ = 10

2+ = 8

1+ = 5

śląd = 2.

Próbki krwi do badań, krwinki wzorcowe i odczynniki monoklonalne należy przechowywać w lodówce, w temperaturze 2–6°C, zaś surowice diagnostyczne, w zamrażarce. Wyjmować je można tylko na okres badania.

5. Techniki badań serologicznych

5.1. Zawiesiny krwinek czerwonych

5.1.1. Zawiesina krwinek w roztworze NaCl

1. Z próbki krwi po jej całkowitym skrzepnięciu (jeśli została pobrana do suchej probówki) pobrać z dna kilka kropli krwinek i przenieść do oddzielnej probówki.
2. Napełnić probówkę roztworem NaCl i dokładnie wymieszać zawartość.
3. Poczekać chwilę, aby opadły na dno małe skrzepy.
4. Zawiesinę krwinek bez skrzepów przenieść do oddzielnej probówki.
5. Wirować przez 3 min, przy 340 × g.
6. Usunąć całkowicie płyn znad osadu krwinek.
7. Z osadu krwinek sporządzić zawiesinę w roztworze NaCl:
 - a) 3–4% do techniki probówkowej lub zgodnie z zaleceniem producenta odczynników,
 - b) 5–10% do techniki szkiełkowej lub zgodnie z zaleceniem producenta odczynników.

5.1.2. Zawiesina krwinek papainowanych

Każda seria odczynnika papainowego (pkt 3.3.3) musi mieć ustalony optymalny czas papainowania krwinek czerwonych.

5.1.2.1. Przygotowanie krwinek papainowanych

1. Rozcieńczyć jedną objętość odczynnika papainowego 9 objętościami roztworu NaCl.
2. Cztery krople rozcieńzonego odczynnika zmieszać z jedną kroplą przemytych, gęstych krwinek.
3. Inkubować w temperaturze 37°C przez okres czasu ustalony dla danej serii odczynnika.
4. Przemyć krwinki 3-krotnie **dużą** objętością roztworu NaCl i sporządzić 3-5-procentową zawiesinę w tym roztworze.

UWAGA: Jeżeli w zestawie krwinek wybranych do papainowania nie ma krwinek RhD dodatnich, należy je dołączyć, gdyż podczas właściwego badania będą służyły jako kontrola dodatnia.

5.2. Testy enzymatyczne

5.2.1. Test enzymatyczny w niskiej sile jonowej (LEN)

Test ten jest szczególnie przydatny do wykrywania przeciwciał z układu Rh. Charakteryzuje się dużą czułością i pozwala na przeprowadzenie badań w krótszym czasie, niż test z zastosowaniem krwinek papainowanych.

1. Przemyć 2-krotnie krwinki roztworem NaCl i raz roztworem LISS.
2. Sporządzić 3–4-procentową zawiesinę krwinek w roztworze LISS.
3. Rozcieńczyć odczynnik papainowy roztworem LISS w stosunku: jedna kropla odczynnika na 2 krople roztworu LISS.
4. Do 2 kropli zawiesiny krwinek dodać kroplę rozcieńzonego odczynnika papainowego.
5. Probówkę z tą zawartością umieścić na 10 min w bloku grzewczym lub w łaźni wodnej o temperaturze 37°C.
6. Dodać 2 krople badanej surowicy i po dokładnym wymieszaniu pozostawić na 3 min w temperaturze 37°C.
7. Wirować przez 30–60 s, przy 150–340 g.
8. Odczytać wynik, bardzo delikatnie wstrząsając probówką.

UWAGA: Konieczne jest jednoczesne wykonanie badań kontrolnych:

- a) krwinki RhD dodatnie i RhD ujemne + Standard anty-D,
- b) krwinki użyte do badań + surowica grupy AB.

5.2.2. Test próbówkowy z krwinkami papainowanymi (dwustopniowy test papainowy)

Test służy przede wszystkim do wykrywania przeciwciał z układu Rh. W badaniach stosuje się 3-5-procentową zawiesinę krwinek papainowanych w roztworze NaCl, przygotowanych zgodnie z przepisem podanym w pkt. 5.1.2.1.

1. Do 2 kropli surowicy badanej dodać 1 kroplę krwinek.
2. Mieszaninę inkubować przez 30 minut w temperaturze 37°C.
3. Wirować przez 30–60 s, przy 150–340 × g.
4. Wynik odczytać makroskopowo.

UWAGA: Konieczne jest jednoczesne wykonanie badania kontrolnego.

- a) kontrola dodatnia: papainowane krwinki RhD dodatnie + Standard anty-D,
- b) kontrola ujemna: każdy rodzaj papainowanych krwinek + surowica niezawierająca przeciwciał.

5.3. Test polibrenowy

Jest to bardzo czuła technika, służąca do wykrywania przeciwciał klasy IgG, z wyjątkiem przeciwciał z układu Kell. Wymaga ona dużej precyzji i uwagi oraz doświadczenia w interpretacji wyników.

5.3.1. Odczynniki do testu polibrenowego

5.3.1.1. Roztwór o niskiej sile jonowej (LIM, low ionic medium)

5.3.1.2. 10-procentowy polibren w buforowanym roztworze NaCl

5.3.1.3. Roztwór do zawieszania krwinek (RS, resuspending solution)

5.3.2. Wykonanie badania

1. Umieścić w probówce 2 krople badanej surowicy, jedną kroplę 3-procentowej zawiesiny krwinek w roztworze NaCl, 0,6 ml odczynnika LIM i wymieszać.
2. Pozostawić na minutę w temperaturze pokojowej.
3. Dodać 2 krople roboczego roztworu polibrenu.
4. Wirować przez 30–60 s, przy 150 × g.
5. Usunąć nadsącz.
6. Dodać 2 krople odczynnika RS.
7. Delikatnie wymieszać, trzymając probówkę/statyw z probówkami pod kątem 45°. Po 10 s znikną agregaty, a pozostaną aglutynaty.
8. Odczytać wynik.

9. Jeżeli nie wystąpiła aglutynacja, przemyć krwinki 3-krotnie.
10. W celu wykrycia przeciwciał z układu Kell dodać odczynnik antyglobulinowy.

UWAGA: Konieczne jest jednoczesne wykonanie badań kontrolnych:

- a) krwinki RhD dodatnie i RhD ujemne + Standard anty-D,
- b) krwinki stosowane w badaniu + surowica grupy AB.

5.4. Testy antyglobulinowe

Test antyglobulinowy pozwala na wykrycie przeciwciał niekompletnych oraz składników dopełniacza związanych z krwinkami czerwonymi. W tym celu stosuje się surowicę antyglobulinową, uzyskaną od zwierząt doświadczalnych uodpornionych ludzką globuliną albo przeciwciała monoklonalne. W następstwie reakcji przeciwciał, zawartych w odczynniku antyglobulinowym z globulinami zaabsorbowanymi na powierzchni krwinek czerwonych, dochodzi do ich aglutynacji. W rutynowych badaniach stosuje się tak zwany wieloswoisty (poliwalentny) odczynnik antyglobulinowy, który zawiera przeciwciała przeciw immunoglobulinom klasy G i przeciw składnikom dopełniacza.

W badaniach specjalnych używa się odczynników o pojedynczej swoistości, skierowanych do poszczególnych klas immunoglobulin i do niektórych składników dopełniacza.

5.4.1. Testy antyglobulinowe próbowkowe

Szczególnie istotne jest prawidłowe postępowanie podczas odczytywania wyniku każdego testu antyglobulinowego. Energiczne wstrząsanie zawartością próbówki jest niedopuszczalne, gdyż często prowadzi do rozbicia aglutynatów i uzyskania fałszywie ujemnego wyniku. Podczas odczytywania wyników należy stosować jedną z dwóch technik:

- próbówkę trzyma się prawie poziomo i powoli obraca do momentu uwolnienia osadu krwinek od dna na odległość nie większą niż 1 cm; można teraz delikatnie postukać palcem w ściankę próbówki;
- próbówkę trzyma się prawie pionowo i kołysząc wprawia ją w drgania, stukając delikatnie palcem w jej ściankę.

Rozróżnia się dwa rodzaje testu antyglobulinowego: bezpośredni (BTA) i pośredni (PTA).

5.4.1.1. Kontrola aktywności odczynnika antyglobulinowego

Przed wykonaniem bezpośredniego testu antyglobulinowego i jednocześnie z pośrednim testem

antyglobulinowym przeprowadza się kontrolę aktywności odczynnika antyglobulinowego.

5.4.1.1.1. Uczulanie krwinek

1. Przygotować 3–4-procentową zawiesinę krwinek RhD dodatnich i RhD ujemnych w roztworze NaCl.
2. W dwóch próbowkach umieścić po 2 krople tych zawiesin.
3. Dodać po 5 kropli Standardu anty-D i wymieszać, wstrząsając próbówki.
4. Przenieść próbówki na 60 min do bloku grzewczego o temperaturze 37°C.

5.4.1.1.2. Przemywanie krwinek

1. Po inkubacji przemyć krwinki 4 razy dużą objętością roztworu NaCl.
2. Po ostatnim przemyciu i odwirowaniu wylać nadsącz jednym energicznym ruchem i, nie zmieniając położenia próbówki, odsączyć jego resztki za pomocą bibuły lub ligniny położonej na stole laboratoryjnym.

5.4.1.1.3. Badanie z odczynnikiem antyglobulinowym

1. Przygotować odczynnik antyglobulinowy według załączonych przepisów.
2. Do osadu krwinek dodać po dwie krople odczynnika antyglobulinowego i delikatnie wymieszać.
3. Wirować przez 45–60 s, przy 150–340 g.
4. Rozprowadzić osad krwinek przez kołysanie próbówką albo delikatne uderzanie w nią palcem.
5. Odczytać wyniki. Aglutynacja w próbówce zawierającej Rh dodatnie krwinki i brak aglutynacji w próbówce z krwinkami Rh ujemnymi wskazują na aktywność i prawidłowe działanie odczynnika antyglobulinowego oraz świadczą o poprawnym wykonaniu badania.

5.4.1.2. Kontrola jakości wirówki do przemywania krwinek techniką automatyczną.

Kontrolę należy przeprowadzać, co najmniej raz w tygodniu.

1. Dwie objętości Standardu anty-D inkubować przez 45 min z jedną objętością 3-procentowej zawiesiny przemytych krwinek Rh dodatnich w roztworze NaCl. Jeśli kontrola wirówki wykonywana jest w PTA-LISS, należy stosować jedną objętość Standardu.
2. Do próbowek (nie mniej niż 9) dodać jedną objętość uczulonych krwinek.
3. Do reszty próbowek dodać jedną objętość tych samych krwinek nieuczulonych.
4. Do wszystkich próbowek dodać dwie objętości surowicy bez przeciwciał.

5. Włączyć program przemywania.
6. Do wszystkich próbek dodać dwie objętości surowicy antyglobulinowej.
7. Odwirować i odczytać wyniki.
8. Zwrócić uwagę, czy we wszystkich próbkach zawierających uczulone krwinki nasilenie aglutynacji jest takie samo. Jeśli wystąpiły różnice, należy skontaktować się z serwisem.

5.4.1.3. Bezpośredni test antyglobulinowy (BTA)

Bezpośredni test antyglobulinowy służy do wykrywania przeciwciał, związanych z krwinkami czerwonymi *in vivo*. Wykonuje się go:

- u noworodków z podejrzeniem choroby hemolitycznej (ChHN),
- u chorych z podejrzeniem niedokrwistości autoimmunohemolitycznej (NAIH),
- u biorców krwi w badaniach powikłań poprzeczeniowych.

5.4.1.3.1. Wykonanie badania testem próbkowym

1. Kroplę gęstych krwinek przemyć 4-krotnie dużą objętością roztworu NaCl o temperaturze 4–8°C i sporządzić 3–4% zawiesinę w tym roztworze albo w roztworze LISS.
2. Przenieść 2 krople zawiesiny do oddzielnej próbki.
3. Odwirować i usunąć dokładnie nadsącz.
4. Dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego.
5. Wirować przez 30–60 s, przy 150–340 × g.
6. Rozprowadzić osad krwinek przez bardzo delikatne kołysanie probówką i obserwować obecność aglutynatów.

Należy wykonać następujące kontrole:

- dwie krople zawiesiny badanych krwinek i 2 krople roztworu NaCl, odwirować; jeśli wystąpiła aglutynacja, dodatni wynik BTA jest niemiarodajny;
- do osadu krwinek RhD dodatnich i RhD ujemnych, uprzednio inkubowanych ze standardem anty-D i 4-krotnie przemytych, dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego; dodatni wynik z krwinkami Rh dodatnimi i ujemny z krwinkami RhD ujemnymi wskazuje na prawidłową swoistość i aktywność odczynnika antyglobulinowego.

UWAGA: W przypadku chorych z autoprzeciwciałami typu zimnego, krwinki przemywa się roztworem NaCl o temperaturze 37°C.

5.4.1.4. Pośredni test antyglobulinowy (PTA)

Pośredni test antyglobulinowy stosuje się do:

- wykrywania alloprzeciwciał odpornościowych w surowicy krwi dawców i biorców,

- dobierania krwi do przetoczeń,
- wykrywania alloprzeciwciał odpornościowych u kobiet ciężarnych,
- badania antygeny D z układu Rh wyłącznie u dawców,
- oznaczania antygenów na krwinkach za pomocą odczynników aktywnych w tym teście.

We wszystkich rodzajach pośredniego testu antyglobulinowego można pominąć autokontrolę w badaniach przeglądowych przeciwciał odpornościowych i w próbie zgodności. Natomiast wykonanie autokontroli obowiązuje:

- podczas identyfikacji wykrytych przeciwciał,
- jeżeli w teście przeglądowym uzyskuje się wyniki dodatnie z całym zestawem krwinek.

Włączenie autokontroli pozwala na różnicowanie allo- i autoprzeciwciał.

5.4.1.4.1. Klasyczny pośredni test antyglobulinowy (PTA-NaCl)

1. Przygotować 3–4-procentową zawiesinę krwinek w roztworze NaCl (włączając krwinki RhD dodatnie i RhD ujemne jako kontrolę oraz jeśli potrzeba krwinki autologiczne jako autokontrolę).
2. Do 2 kropli zawiesiny krwinek, w tym także autologicznych, dodać 5 kropli odpowiedniej surowicy i wymieszać.
3. Do krwinek RhD dodatnich i RhD ujemnych dodać po 5 kropli Standardu anty-D i wymieszać.
4. Inkubować przez 60 min, w 37°C.
5. Po inkubacji i delikatnym wstrząśnięciu osadu sprawdzić, czy zawiesina jest jednorodna.
6. Czterokrotnie przemyć zawiesiny dużą objętością roztworu NaCl.
7. Po ostatnim przemyciu dokładnie usunąć pozostały płyn.
8. Do osadu krwinek dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego.
9. Wirować przez 30–60 s, przy 150–340 × g.
10. Rozprowadzić osad krwinek przez bardzo delikatne kołysanie probówką i obserwować obecność aglutynatów.

UWAGA: Jeżeli po inkubacji stwierdza się obecność aglutynatów, które świadczą o obecności kompletnych alloprzeciwciał w surowicy, odstępuje się od wykonania testu z tą zawiesiną krwinek.

Uwaga ta dotyczy wszystkich modyfikacji pośredniego testu antyglobulinowego.

5.4.1.4.2. Pośredni test antyglobulinowy z zastosowaniem roztworu o niskiej sile jonowej (PTA-LISS)

Test ten zastępuje klasyczną technikę pośredniego testu antyglobulinowego. Ze względu na jego

znaczłą czułość i krótszy czas wykonywania, jest on szczególnie polecany w próbie zgodności.

5.4.1.4.2.1. Przygotowanie krwinek

1. Przemyć krwinki 2-krotnie roztworem NaCl i raz roztworem LISS.
2. W ten sam sposób przygotować krwinki RhD dodatnie i RhD ujemne, służące jako kontrola.
3. Z osadu krwinek sporządzić 3–4-procentową zawiesinę w roztworze LISS.

5.4.1.4.2.2. Wykonanie testu PTA-LISS

1. Do 2 kropli zawiesiny krwinek dodać 2 krople badanej surowicy, a do krwinek kontrolnych po 2 krople Standardu anty-D.
2. Mieszanki inkubować przez 20 min w 37°C.
3. Sprawdzić, czy zawiesiny krwinek pozostały jednorodne.
4. Jednorodne zawiesiny przemyć 4-krotnie roztworem NaCl.
5. Po dokładnym usunięciu nadsącza dodać do osadu krwinek po 2 krople odczynnika antyglobulinowego i dokładnie wymieszać.
6. Wirować przez 30–60 s, przy 150–340 × g.
7. Resuspendować osad krwinek przez bardzo delikatne kołysanie probówką i obserwować obecność aglutynatów.

5.4.1.4.3. Dwustopniowy test antyglobulinowy z zastosowaniem techniki LISS

Jest to czuła metoda, służąca do wykrywania alloprzeciwciał wiążących dopełniacz (np. z układu Kidd i Lewis). Poleca się ją szczególnie w badaniu surowic dłużej przechowywanych oraz pochodzących od chorych z osłabieniem lub utratą aktywności składników dopełniacza.

1. Do badanej surowicy dodać 5% roztworu EDTA w stosunku: 1 kropla roztworu na 9 kropli surowicy.
2. Do 2 kropli 3–4-procentowej zawiesiny krwinek w roztworze LISS dodać 2 krople surowicy i inkubować przez 20 min, w temperaturze 37°C.
3. Sprawdzić, czy zawiesiny krwinek pozostały jednorodne.
4. Czterokrotnie przemyć zawiesiny roztworem NaCl.
5. Do osadu przemytych krwinek dodać jako źródło komplementu 4 krople surowicy niezawierającej nieregularnych przeciwciał, oddzielonej ze świeżo pobranej próbki krwi od dawcy.
6. Mieszankę inkubować przez 20 min, w temperaturze 37°C.
7. Przemyć krwinki 4-krotnie roztworem NaCl.

8. Po dokładnym usunięciu nadsącza, do osadu krwinek dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego poliwalentnego lub anty-C3.
9. Wirować przez 30–60 s, przy 150–340 × g.
10. Resuspendować osad krwinek przez bardzo delikatne kołysanie probówką i obserwować obecność aglutynatów.

UWAGA: Jednocześnie z właściwym badaniem wykonać badania kontrolne. Jako kontrolę dodatnią stosować krwinki Le(a+) lub Jk(a+), jako kontrolę ujemną krwinki Le(a-) lub Jk(a-) i inkubować je z surowicą anty-Le^a lub anty-Jk^a

5.4.1.4.4. Pośredni test antyglobulinowy z zastosowaniem glikolu polietylenowego (PTA-PEG)

5.4.1.4.4.1. Odczynniki

1. Buforowany roztwór 0,15 M NaCl o pH 7,2 (PBS).
2. 20-procentowy roztwór PEG o ciężarze cząsteczkowym 3500–4000 w PBS, przechowywany w temperaturze 4°C.
3. Odczynnik antyglobulinowy anty-IgG.
Przed wykonaniem badań potrzebną porcję roztworu PEG doprowadzić do temperatury pokojowej.

5.4.1.4.4.2. Wykonanie badania

1. Przygotować 4-procentową zawiesinę krwinek w PBS.
2. Dodać do 2 kropli surowicy jedną kroplę zawiesiny krwinek i 4 krople roztworu PEG.
3. Inkubować w temperaturze 37°C przez 15 min.
4. Sprawdzić czy zawiesina jest jednorodna.
5. Jednorodną zawiesinę przemyć 4-krotnie dużą objętością roztworu NaCl.
6. Po dokładnym usunięciu nadsącza dodać do osadu krwinek 2 krople odczynnika anty-IgG i wymieszać.
7. Wirować przez 20 s, przy 340 × g.
8. Odczytać wynik, delikatnie kołyszając probówką.

UWAGA: Jednocześnie z właściwym badaniem wykonać badania kontrolne z krwinkami RhD dodatnimi i RhD ujemnymi, uczulonymi Standardem anty-D.

5.4.1.5. Kontrola ujemnych wyników testu antyglobulinowego

Stosowanie w testach antyglobulinowych kontroli dodatniej, w postaci krwinek uczulonych standardem anty-D, nie w pełni zabezpiecza przed wynikami fałszywie ujemnymi, które są następstwem niedokładnego przemywania krwinek. Z tego powodu, w większości laboratoriów na świecie, wprowadzono metodykę, która ma na celu sprawdzenie wiarygodności każdego ujemnego wyniku testu antyglobulinowego. Zaleca się jej wdrożenie w Centrum i stopniowe wdrażanie w szpitalnych pracowniach serologii

transfuzjologicznej. Wprowadzenie tego postępowania wymaga dokładnego przeszkolenia personelu.

5.4.1.5.1. Zasada metody

Polega ona na wykazaniu, że ujemny wynik testu antyglobulinowego jest prawdziwy, ponieważ w mieszaninie z krwinkami pozostał nieużyty odczynnik antyglobulinowy. Jego obecność ujawnia się poprzez dodatnią reakcję z krwinkami słabo uczulonymi przeciwciałami.

5.4.1.5.2. Przygotowanie odpowiednio uczulonych krwinek

1. Sporządzić w roztworze NaCl szereg rozcieńczeń surowicy, zawierającej niekompletne przeciwciała anty-D.
2. Stosując krwinki RhD dodatnie o heterozygotycznej ekspresji (np. DC_{cee}), zbadać każde rozcieńczenie w teście antyglobulinowym.
3. Do dalszych badań wybrać te krwinki, które po uczuleniu przeciwciałami dały z odczynnikiem antyglobulinowym aglutynację o nasileniu pomiędzy 2+ a 3+.
4. Przygotować 5-procentową zawiesinę 3-krotnie przemytych, nieuczulonych krwinek w roztworze NaCl i przenieść po jednej objętości do dwóch probówek.
5. Do obu probówek dodać po dwie objętości odczynnika antyglobulinowego, wymieszać i odwirować.
6. Do jednej probówki dodać jedną objętość surowicy (bez nieregularnych przeciwciał aglutynujących) rozcieńczonej 1:1000 roztworem NaCl, do drugiej jedną objętość roztworu NaCl.
7. Do obu probówek dodać jedną objętość 3–4% słabo uczulonych krwinek kontrolnych w roztworze NaCl i odwirować.

5.4.1.5.3. Interpretacja wyniku

Brak aglutynacji w probówce zawierającej rozcieńzoną 1:1000 surowicę i aglutynacja (dwie populacje krwinek) w probówce zawierającej roztwór NaCl świadczy o prawidłowym dobraniu rozcieńczenia surowicy anty-D do uczulenia krwinek. Natomiast aglutynacja również w probówce, do której dodano rozcieńzoną surowicę wskazuje na zbyt mocne uczulenie krwinek. W takiej sytuacji należy całą procedurę powtórzyć, wybierając do uczulania wyższe rozcieńczenie surowicy anty-D.

UWAGA: Po ustaleniu rozcieńczenia surowicy anty-D, które optymalnie opłaszczą krwinki, należy przygotowywać każdego dnia większą porcję uczulonych, przemytych krwinek.

5.4.1.5.4. Kontrola wiarygodności ujemnego wyniku testu antyglobulinowego

Po odczytaniu wyników testu antyglobulinowego, do każdej probówki, w której wypadł on ujemnie, dodać jedną objętość słabo uczulonych krwinek, wymieszać, odwirować i odczytać wynik.

Obecność aglutynacji (dwie populacje krwinek) we wszystkich probówkach, w których test antyglobulinowy oceniono jako ujemny, świadczy o prawidłowym jego wykonaniu. Brak aglutynacji wskazuje na błędy natury technicznej i wymaga powtórzenia testu antyglobulinowego. Wynik kontroli zapisuje się w dokumentacji badania.

UWAGA: Przedstawioną kontrolę testu antyglobulinowego stosuje się do wszystkich metod PTA i do BTA wykonanych techniką probówkową.

5.4.1.6. Źródła błędów w teście antyglobulinowym

5.4.1.6.1. Najczęstsze przyczyny wyników fałszywie dodatnich

1. Zbyt szybkie lub zbyt długie wirowanie krwinek z odczynnikiem antyglobulinowym.
2. Niezwrócenie uwagi na obecność w surowicy kompletnych przeciwciał aktywnych w 37°C.
3. Zanieczyszczenie bakteryjne krwinek lub surowic, źle lub nieodpowiednio umyte probówki. Do badań należy stosować wyłącznie probówki jednorazowego użytku!
4. Zanieczyszczenie roztworu NaCl jonami metali ciężkich.

W technice LISS (oprócz podanych powyżej najczęstszych źródeł błędów), odczynniki antyglobulinowe o dużej aktywności w stosunku do składników komplementu mogą wykrywać te składniki związane przez autoprzeciwciała typu zimnego na krwinkach, zwłaszcza przechowywanych w postaci skrzepu. W takich przypadkach reakcję o identycznym nasileniu uzyskuje się w badaniu z krwinkami autologicznymi (autokontrola). Test należy powtórzyć, stosując klasyczny PTA albo monowalentny odczynnik antyglobulinowy anty-IgG.

5.4.1.6.2. Najczęstsze przyczyny wyników fałszywie ujemnych

1. Zbyt wolne lub za krótkie wirowanie krwinek z odczynnikiem antyglobulinowym.
2. Zubożenie odczynnika antyglobulinowego śladami ludzkiej surowicy z powodu niedokładnego przemycia krwinek i używania wielorazowych probówek.
3. Zastosowanie do inkubacji nieodpowiedniej proporcji surowicy i krwinek. Odnosi się to

zwłaszcza do techniki LISS, w której nadmiar surowicy inkubowanej z krwinkami podwyższa siłę jonową środowiska i osłabia efekt reakcji zachodzącej w ciągu 20 minut.

4. Zbyt krótki lub nadmiernie długi czas inkubacji.
5. Przerwy w toku wykonywania czynności we wszystkich etapach testu antyglobulinowego po fazie inkubacji krwinek z surowicą, a zwłaszcza przerwy w czasie przemywania krwinek, które mogą prowadzić do elucji przeciwciał związanych z krwinkami.

5.5. Określenie miana przeciwciał w surowicy

Miano przeciwciał, jest to największe rozcieńczenie surowicy, w którym stwierdza się jeszcze reakcję serologiczną z odpowiednim antygenem. Wynik miana określa się liczbą będącą odwrotnością rozcieńczenia surowicy. Na przykład, gdy najwyższe reagujące rozcieńczenie wynosi 1:32, miano określa się liczbą 32.

5.5.1. Zasada badania

1. Obliczyć właściwą objętość surowicy potrzebną do wykonania badań, uwzględniając liczbę stosowanych zawiesin krwinek, środowisko i zakres temperatury.
2. W szeregu próbek (z wyjątkiem pierwszej) umieścić jednakowe objętości płynu, służącego do rozcieńczania badanej surowicy (np. roztwór NaCl, surowica grupy AB).
3. Do pierwszej i drugiej próbki dodać badaną surowicę w objętości równej objętości nanieśionego płynu.
4. Po wymieszaniu pipetą przenieść z drugiej próbki połowę uzyskanej objętości do trzeciej próbki.
5. Te same czynności powtarzać do końca szeregu.

UWAGA: Podane czynności najlepiej jest wykonywać pipetami automatycznymi. Jeśli posługuje się pipetami pasteurowskimi i jednostką miary jest wolno spadająca kropla, pipetę należy trzymać zawsze w tej samej pozycji.

5.5.2. Metoda próbkowa

1. Przygotować odpowiednią liczbę szeregów próbek. Liczba próbek w szeregu ma być równa liczbie w szeregu macierzystych rozcieńczeń.
2. Z każdej próbki macierzystego szeregu rozcieńczeń, począwszy od ostatniej, przenieść po dwie krople.
3. Dodać do całego szeregu po kropli odpowiedniej, 3–4-procentowej zawiesiny krwinek.

4. Inkubować w odpowiedniej temperaturze przez określony czas; temperatura i czas inkubacji zależą od swoistości przeciwciał.
5. Odczytać wyniki po odwirowaniu.

UWAGA: W celu określenia miana przeciwciał w surowicy za pomocą PTA należy stosować takie proporcje surowicy i zawiesiny krwinek, jak podano w pkt. 5.4.

5.5.3. Metoda mikrokolumnowa

Metodę tę poleca się do określania miana przeciwciał anty-A i anty-B klasy IgM i IgG w surowicy biorcy lub/i dawcy krwiotwórczych komórek macierzystych.

Określenie miana przeciwciał klasy IgM na karcie obojętnej:

1. Wykonać szereg rozcieńczeń surowicy badanej w roztworze NaCl w postępie geometrycznym.
2. Opisać karty kolejnymi numerami rozcieńczeń surowicy (2, 4, 8, 16, 32, 64 itd.).
3. Do wszystkich mikrokolumn dodać odpowiednią ilość 0,8-procentowej zawiesiny krwinek grupy A (lub B) w roztworze LISS, a następnie odpowiednią ilość rozcieńczonej surowicy (zgodnie z metodyką badania zaleconą przez producenta odczynników).
4. Karty z mieszaniną krwinek i rozcieńczeń surowicy inkubować 15 min w temperaturze pokojowej (18–22°C).
5. Po odwirowaniu kart zaprotokołować wyniki reakcji.

Określenie miana przeciwciał klasy IgG na karcie do PTA — badanie wykonuje się z surowicą uprzednio poddaną działaniu odczynników niszczących przeciwciała IgM (2 ME lub DTT).

1. Wykonać szereg rozcieńczeń surowicy po działaniu DTT lub 2 ME w roztworze NaCl w postępie geometrycznym.
2. Opisać kartę do PTA kolejnymi numerami rozcieńczeń surowicy (2, 4, 8, 16, 32, 64 itd.).
3. Do wszystkich mikrokolumn dodać odpowiednią ilość 0,8-procentowej zawiesiny krwinek grupy A (lub B) w roztworze LISS, a następnie odpowiednią ilość rozcieńczonej surowicy (zgodnie z metodyką badania zaleconą przez producenta odczynników).
4. Inkubować 15 min w 37°C.
5. Po odwirowaniu kart zaprotokołować wyniki reakcji.

5.6. Wykrywanie substancji ABH w ślinie

Badanie to przeprowadza się w celu identyfikacji odmian antygenów układu ABO.

Tabela 3. Ocena wydzielania substancji grupowej A w ślinie**Table 3.** Estimation of antigen A secretion in saliva

	Surowica anty-A + Rozcieńczenia śliny				Surowica anty-A i roztwór NaCl	Stan wydzielania
	1:5	1:20	1:80	1:320		
Krwinki	++	++	++	++	++	Niewydzielacz
A ₂	-	-	-	+	++	Wydzielacz normalny
	-	-	+	++	++	Wydzielacz słaby

5.6.1. Przygotowanie śliny do badań

1. Zebrać kilka mililitrów śliny do suchej probówki (w przypadku niemowląt nasączyć śliną bibułę filtracyjną lub gazę) i umieścić w probówce zawierającej kilka kropli roztworu NaCl.
2. Odwirować i przenieść nadsącz do oddzielnej probówki.
3. Probówkę umieścić w naczyniu z wrzącą wodą i gotować przez 10 min.
Jeśli badania nie są przeprowadzane w dniu pobrania śliny, należy ją przechowywać w zamrożeniu.

5.6.2. Wykonanie badania

1. Ustalić rozcieńczenie surowicy, odczynnika monoklonalnego lub lektyny, które będą stosowane w badaniu (powinny one być tak rozcieńczone roztworem NaCl, aby nasilenie aglutynacji wzorcowych krwinek wynosiło 2+). Ustalając rozcieńczenie surowicy anty-A, należy stosować krwinki A₂, surowicy anty-B: krwinki A₁B, zaś lektyny H: krwinki grupy O.
2. Przygotować rozcieńczenia badanej śliny oraz śliny wydzielacza i **niewydzielacza** w roztworze NaCl (w proporcji 1:5, 1:20, 1:80 oraz 1:320) i umieścić po 2 krople w szeregu probówek.
3. Do szeregów rozcieńczeń dodać jednakową objętość odczynnika anty-A lub anty-B albo lektyny anty-H, w uprzednio ustalonym rozcieńczeniu.
4. W dodatkowej probówce umieścić rozcieńczony odczynnik i dodać jednakową objętość roztworu NaCl.
5. Pozostawić probówki na 30 min w temperaturze pokojowej.
6. Do wszystkich probówek dodać po 2 krople 3-procentowej zawiesiny krwinek (tych samych, które służyły do określenia rozcieńczenia odczynnika).
7. Mieszanie pozostawić na 15 min w temperaturze pokojowej.
8. Wyniki odczytywać mikroskopowo.

UWAGA: Interpretację wyników podano w tabeli 3.

5.7. Oddzielanie dwóch populacji krwinek czerwonych

Rozpoznanie dwóch populacji krwinek czerwonych, różniących się w antygenach, polega na wykryciu obecności aglutynatów na tle jednorodnej zawiesiny krwinek po kontakcie z odpowiednimi przeciwciałami.

5.7.1. Przykład dwóch populacji krwinek grupy AB i A

Anty-A anty-B anty-A, B4+. Duże aglutynaty na tle jednorodnej zawiesiny 4+.

W takim przypadku, do rozdzielenia 2 populacji stosuje się odczynnik anty-B.

5.7.2. Postępowanie

1. Przygotować 25-procentową zawiesinę krwinek w roztworze NaCl.
2. W probówce o wymiarach 100 × 15 mm umieścić 0,5 ml zawiesiny krwinek.
3. Dodać do niej 4 objętości odczynnika diagnostycznego, który w reakcji z tymi krwinkami powodował ich częściową aglutynację.
4. Delikatnie wirować przez kilka s, stosując bardzo niskie obroty wirówki.
5. Zebrać górną warstwę krwinek (aglutynaty opadły na dno) i przenieść do oddzielnej probówki.
6. Wypełnić probówkę roztworem NaCl.
7. Powtarzać czynności wymienione w punktach 4–6 do chwili uzyskania jednorodnej zawiesiny krwinek (bez aglutynatów).
8. Do kropli jednorodnej zawiesiny dodać kroplę odczynnika zastosowanego do rozdzielania krwinek, odwirować i odczytać wynik. Brak aglutynacji świadczy o prawidłowym oddzieleniu dwóch populacji.

UWAGA: Obecność aglutynatów wskazuje na konieczność powtórzenia całej procedury.

5.7.3. Uwolnienie krwinek z aglutynatów uzyskanych podczas rozdziału dwóch populacji

W tej technice przeciwciała uwolnione mechanicznie z aglutynatów wiążą się z odpowiadającym im antygenem, zawartym w substancji grupowej lub ślinie, a krwinki przechodzą do zawiesiny.

1. Dokładnie wyizolowane aglutynaty przemyć roztworem NaCl.
2. Do jednej objętości aglutynatów dodać 4 objętości śliny odpowiedniego wydzielacza, rozcieńczonej 1:2 surowicą grupy AB.
3. Zawartość probówki energicznie wytrząsać przez około 30 min.
4. Krwinki uwolnione od przeciwciał przemyć 3-krotnie roztworem NaCl i skontrolować mikroskopowo jednorodność zawiesiny.
5. Wykonać badania fenotypowe, porównując wyniki z wynikami badań niezaglutynowanej populacji krwinek.

UWAGA: Oddzielenia dwóch populacji krwinek można dokonać za pomocą odczynników diagnostycznych z innych układów grupowych poza AB0, zawierających kompletne przeciwciała, na przykład anty-M, anty-P₁.

5.8. Metoda oddzielania krwinek przetoczonych od autologicznych

Metoda ta nadaje się do stosowania tylko w przypadkach, gdy od ostatniego przetoczenia upłynęło ponad 3 dni.

5.8.1. Postępowanie

1. Pobrać od chorego krew na EDTA.
2. Krwinki przemyć 3-krotnie roztworem NaCl. Podczas ostatniego przemywania zastosować wyższe obroty wirówki, w celu maksymalnego zagęszczenia krwinek.
3. Dokładnie usunąć nadsącz, nie uszkadzając białawego kożuszka leukocytarno-platekowego.
4. Usunąć kożuszek, a górną warstwę krwinek przenieść do oddzielnej probówki i dokładnie wymieszać.
5. Wypełnić krwinkami 10 kapilar, pozostawiając wolne odcinki o długości 2 cm i zatopić kapilary nad palnikiem lub uszczelnić plasteliną.
6. Umieścić kapilary w wirówce hematokrytovej i wirować przez 15 min.
7. Górne części kapilar, zawierające krwinki chorego, odciąć na wysokości 3–5 mm poniżej szczytu odwirowanej kolumny krwinek i przenieść je do oddzielnej probówki wypełnionej roztworem NaCl.

8. Za pomocą pipety pasteurowskiej uwolnić krwinki zawarte w odciętych fragmentach kapilar i zawiesiny przenieść do oddzielnej probówki.
9. Krwinki przemyć 3-krotnie roztworem NaCl.
10. W ten sam sposób wyizolować z dolnych części kapilar mieszaninę krwinek przetoczonych i krwinek chorego.
11. Przeprowadzić jednoczesne badania fenotypowe krwinek z warstwy górnej oraz dolnej kapilar i porównać wyniki.

UWAGA: Metoda ta nie jest efektywna w przypadku zahamowania odnowy krwinek u chorego (aplazja szpiku).

5.9. Adsorpcja/elucja przeciwciał

Adsorpcję i elucję wykonuje się w celu:

- identyfikacji obecnych w surowicy alloprzeciwciał wieloswoistych; w tych przypadkach próbkę surowicy adsorbują się kilkoma rodzajami krwinek o odpowiednio dobranych antygenach, a uzyskane eluaty bada się z zestawem krwinek wzorcowych;
- potwierdzenia rozpoznania odmian antygenów, przede wszystkim A, B i D; w tych przypadkach odczynniki diagnostyczne adsorbują się badanymi krwinkami, a eluaty bada się za pomocą wzorcowych krwinek zawierających odpowiedni antygen. Elucję przeciwciał wykonuje się również w celu ustalenia swoistości przeciwciał związanych z krwinkami *in vivo*, a mianowicie:
 - a) w hemolitycznych odczynach poprzetoczeniowych,
 - b) u chorych z niedokrwistością autoimmunohemolityczną,
 - c) u noworodków z chorobą hemolityczną.

W przypadkach b i c, eluat może służyć do dobrania krwi do przetoczenia.

UWAGA: Stosując w metodach adsorpcji/elucji przeciwciał roztwór kwaśnej glicyny i EDTA, można posługiwać się odczynnikami komercyjnymi i postępować zgodnie z zaleceniem producenta.

5.9.1. Adsorpcja przeciwciał

Zasady wykonywania adsorpcji:

1. Krwinki 4-krotnie przemyć roztworem NaCl.
2. Do osadu krwinek dodać badaną surowicę lub odczynnik zawierający przeciwciała (w stosunku: jedna objętość krwinek na dwie objętości surowicy lub odczynnika).
3. Mieszaninę inkubować przez 1–2 godziny, w temperaturze optymalnej dla reakcji obecnych przeciwciał, od czasu do czasu wstrząsając zawartością probówki.

4. Odwirować w tej samej temperaturze.
5. Odciągnąć surowicę do oddzielnej probówki, w celu wykonania badań porównawczych nad zawartością przeciwciał przed i po adsorpcji krwinkami.
6. Z krwinek użytych do adsorpcji sporządzić eluat i zbadać jego swoistość.

UWAGA: Jeżeli przeciwciała zawarte w surowicy są słabo aktywne, należy zwiększyć objętość surowicy w stosunku do krwinek użytych do adsorpcji (np. 4 objętości surowicy i jedna objętość krwinek).

5.9.2. Techniki elucji przeciwciał

Zasady ogólne

Krwinki uczulone przeciwciałami przemyć, co najmniej 4-krotnie dużą objętością roztworu NaCl. Do krwinek uczulonych przeciwciałami typu zimnego stosuje się roztwór NaCl oziębiony do temperatury 0°C. Krwinki uczulone przeciwciałami typu ciepłego przemywa się roztworem NaCl o temperaturze pokojowej. Tulejki wirownicze wypełnia się wodą o tej samej temperaturze, co roztwór NaCl. Jeżeli elucję poprzedza adsorpcja przeciwciał, konieczne jest zachowanie nadsącza po ostatnim przemyciu krwinek i badanie go jednocześnie z eluatem. Stanowi to kontrolę prawidłowego przemycia krwinek. Eluaty, niezależnie od metody ich przygotowania, należy badać natychmiast po sporządzeniu albo przechowywać w stanie zamrożenia do chwili badania.

5.9.2.1. Metoda cieplna

Metodę tę stosuje się głównie do elucji przeciwciał klasy IgM układu ABO.

1. Rozdzielić osad przemytych krwinek do kilku probówek, w ilościach nieprzekraczających 10 kropli.
2. Dodać jednakową objętość roztworu NaCl, a w przypadku przeciwciał niekompletnych surowicę grupy AB.
3. Umieścić probówki w łaźni wodnej o temperaturze 56°C, na 10–15 min (nie dłużej), stale delikatnie wstrząsając ich zawartość.
4. Wirować w płaszczu wodnym o temperaturze 56°C, przez 1–3 min.
5. Natychmiast oddzielić płyn od osadu krwinek.

UWAGI:

- A. Jeżeli krwinki były uczulone słabo aktywnymi przeciwciałami można dodać mniejszą objętość roztworu NaCl lub surowicy grupy AB (np. ½ objętości).
- B. Uzyskany eluat ma czerwone zabarwienie w związku z nieuniknioną hemolizą, co utrudnia badanie go mikrometodą kolumnową.

5.9.2.2. Metoda eterowo-ciepłna

Metodę tę stosuje się głównie do elucji przeciwciał klasy IgG. Dzięki niej uzyskuje się eluat wzbogacony w przeciwciała uwalniające się ze zrębów krwinkowych.

1. Do osadu przemytych krwinek dodać jedną objętość roztworu NaCl i 1,5 objętości eteru etylowego. Probówkę szczelnie zakorkować.
2. Energicznie wytrząsać zawartość probówki przez 2–5 min.
3. Wirować przez 10 min, przy 610 × g, uzyskując podział na 3 warstwy.
4. Po odwirowaniu odrzucić warstwę górną, eterową.
5. Probówkę, zawierającą warstwę środkową ze zrębami krwinkowymi i warstwę dolną zawierającą przeciwciała, umieścić na około 5 min w łaźni wodnej o temperaturze 56°C w celu odparowania eteru, stale mieszając bagietką i uważając, aby resztki eteru nie spowodowały wylania zawartości probówki.
6. Po odparowaniu eteru wirować w płaszczu wodnym o temperaturze 56°C przez 5 min, przy 610 × g, po czym natychmiast oddzielić płyn od osadu, uważając, aby nie wciągnąć do pipety zrębów krwinkowych.

5.9.2.3. Metoda z zastosowaniem kwaśnej glicyny i EDTA

Metodę tę stosuje się do elucji przeciwciał klasy IgG. Jej zaletą jest uzyskiwanie bezbarwnego eluatu, który nadaje się również do badań mikrometodą kolumnową.

1. Krwinki uczulone przeciwciałami przemyć 6-krotnie roztworem NaCl.
2. Do 10 kropli osadu krwinek dodać przygotowane uprzednio odczynniki: 20 kropli buforu 0,1 mol/l glicyny i 5 kropli 10% EDTA-Na₂.
3. Po dokładnym wymieszaniu pozostawić w temperaturze pokojowej na 2 min.
4. Dodać 3 krople 1 mol/l TRIS-NaCl, wymieszać i wirować przez 1 min przy 600 × g.
5. Klarowny nadsącz/eluat przenieść do oddzielnej probówki.
6. Stosując papierek lakmusowy, sprawdzić pH eluatu i doprowadzić za pomocą TRIS-NaCl do 7,0–7,4.

5.10. Rozkład autoprzeciwciał w celu uwolnienia determinant antygenowych na krwinkach czerwonych

Usunięcie autoprzeciwciał w celu określenia fenotypu krwinek czerwonych jest konieczne, gdy w badaniach stosuje się surowice ludzkie. Natomiast

stosując odczynniki monoklonalne, można określić fenotyp bez usuwania autoprzeciwciał. Wyjątek stanowią bardzo rzadko spotykane autoprzeciwciała o określonej swoistości. Wówczas uwolnienie krwinek od autoprzeciwciał staje się konieczne.

5.10.1. Metoda z zastosowaniem fosforanu chlorochiny

Chlorochina usuwa całkowicie z powierzchni krwinek przeciwciała klasy IgG, pozostawiając składniki C3 komplementu, zaabsorbowanego *in vivo*. Odczynnik ten nie niszczy antygenów z układu ABO, MNS, li, Kell, Duffy, Kidd, Gerbich oraz LW, natomiast osłabia ekspresję antygenów z układu Rh. Pod wpływem chlorochiny ulegają zniszczeniu antygeny z układu Lewis.

1. Z krwi pobranej na EDTA przygotować osad krwinek przemytych uprzednio 4 razy roztworem NaCl.
2. Do 4 objętości roztworu fosforanu chlorochiny (pkt 3.3.8) dodać jedną objętość osadu krwinek.
3. Mieszaninę inkubować w temperaturze 37°C przez 30–60 min, wstrząsając kilkakrotnie zawartość probówki.
4. Krwinki 4-krotnie przemyć roztworem NaCl.
5. Sprawdzić skuteczność działania chlorochiny za pomocą BTA.

UWAGA: Ujemny wynik BTA upoważnia do wykonania badań fenotypowych.

5.10.2. Metoda z zastosowaniem kwaśnej glicyny i EDTA

Zastosowanie kwaśnego środowiska powoduje całkowite oderwanie cząsteczek IgG z powierzchni krwinek. Jest to metoda szybka, bardzo wygodna i z powodzeniem zastępuje wcześniej stosowaną technikę z użyciem odczynnika MEP. Metoda ta nie wpływa na zmianę ekspresji antygenów różnych układów grupowych, z wyjątkiem antygenów układu Kell, których ekspresja ulega znacznemu osłabieniu. Antygeny tego układu można jednak wykryć, stosując mikrometodę kolumnową w żelu.

1. Jedną kroplę gęstych krwinek 3-krotnie przemyć roztworem NaCl.
2. Do 20 kropli roztworu kwaśnej glicyny dodać 5 kropli EDTA.
3. Dwadzieścia pięć kropli tej mieszaniny dodać do osadu krwinek i pozostawić w temperaturze pokojowej na 1–2 min.
4. Dodać 3 krople 1 mol/l TRIS-NaCl i odwirować.
5. Sprawdzić pH nadsącza papierkiem lakmusowym i doprowadzić do 7,0–7,4 za pomocą, TRIS-NaCl, przy czym, po dodaniu każdej kropli, wymieszać zawartość probówki, odwirować i sprawdzić pH.

6. Usunąć nadsącz i 4-krotnie przemyć krwinki roztworem NaCl.
7. Wykonać BTA.

UWAGA: Ujemny wynik BTA świadczy o całkowitym uwolnieniu krwinek z przeciwciał i wskazuje, że nadają się one do badań fenotypowych. Jeśli wynik BTA jest dodatni, krwinki należy potraktować jeszcze raz mieszaniną kwaśnej glicyny oraz EDTA i powtórzyć całą procedurę.

5.11. Adsorpcja autoprzeciwciał z surowicy

Adsorpcję autoprzeciwciał wykonuje się u chorych z NAIH w celu stwierdzenia, czy w surowicy oprócz autoprzeciwciał są obecne również alloprzeciwciała odpornościowe, których wykrycie jest bardzo istotne podczas dobierania krwi do przetoczenia. Do adsorbowania autoprzeciwciał można zastosować krwinki autologiczne (autoadsorpcja) lub odpowiednio dobrane krwinki allogeniczne (alloadsorpcja, nazywana również adsorpcją różnicową). Zastosowanie autoadsorpcji lub alloadsorpcji zależy od tego, czy choremu przetaczano krew w okresie 3 miesięcy poprzedzających aktualne badanie. Jeśli choremu przetaczano krew w tym okresie, autoadsorpcja może być zawodna, ponieważ krwinki chorego są wówczas mieszaniną własnych krwinek oraz krwinek przetoczonych, które *in vitro* mogą adsorbować alloprzeciwciała. Do wyadsorbowania autoprzeciwciał należy wówczas zastosować alloadsorpcję.

5.11.1. Autoadsorpcja

Autoadsorpcję przeprowadza się najczęściej za pomocą autologicznych krwinek uwolnionych z opłaszczających je autoprzeciwciał. Jeżeli autoprzeciwciała reagują mocniej w teście enzymatycznym niż antyglobulinowym, do autoadsorpcji stosuje się krwinki traktowane kwaśną glicyną i EDTA, a następnie odczynnikiem papainowym lub krwinki traktowane odczynnikiem MEP. Jeśli autoprzeciwciała reagują mocniej w teście antyglobulinowym niż enzymatycznym, autoadsorpcję wykonuje się krwinkami traktowanymi roztworem fosforanu chlorochiny lub krwinkami w środowisku PEG.

5.11.1.1. Metoda autoadsorpcji z zastosowaniem krwinek traktowanych kwaśną glicyną, EDTA i odczynnikiem papainowym

5.11.1.1.1. Przygotowanie krwinek do autoadsorpcji

1. Krwinki 3-krotnie przemyć roztworem NaCl.
2. W dwóch probówkach umieścić po 10 kropli osadu krwinek.
3. Do 40 kropli roztworu kwaśnej glicyny dodać 10 kropli EDTA.

4. Do obu probówek dodać po 25 kropli przygotowanego odczynnika.
5. Probówki pozostawić w temperaturze pokojowej na 1 min (nie dłużej niż na 1,5 min).
6. Dodać po 3 krople TRIS-NaCl, w celu zobojętnienia mieszaniny.
7. Probówki odwirować i sprawdzić pH nadsącu, doprowadzając go do pH 7,4 za pomocą dodatkowych kropli TRIS-NaCl.
8. Krwinki 3-krotnie przemyć roztworem NaCl.
9. Odczynnik papainowy rozcieńczyć w stosunku: jedna objętość odczynnika na 9 objętości roztworu NaCl.
10. Do osadów przemytych krwinek dodać po 20 kropli rozcieńzonego odczynnika papainowego.
11. Inkubować przez 10–15 min w temperaturze 37°C.
12. Krwinki 4-krotnie przemyć roztworem NaCl.

UWAGA: Osad krwinek w jednej probówce służy do wykonania jednej autoadsorpcji. Drugą probówkę należy przechować w lodówce (temp. 2–6°C) i wykorzystać krwinki do kontroli surowicy po autoadsorpcji, a w przypadku gdyby jednorazowa autoadsorpcja okazała się nieskuteczna, do wykonania następnej adsorpcji.

5.11.1.1.2. Wykonanie autoadsorpcji

1. Do osadu krwinek dodać 10 kropli badanej surowicy i wymieszać.
2. Probówkę z zawartością umieścić na 30 min w temperaturze 37°C, od czasu do czasu wstrząsając w celu ułatwienia kontaktu autoprzeciwciał z determinantami antygenowymi na krwinkach.
3. Odwirować i przenieść nadsącz do oddzielnej probówki.

5.11.1.1.3. Kontrola autoadsorpcji

Surowicę poddaną autoadsorpcji skontrolować z krwinkami pobranymi z osadu krwinek pozostawionych w drugiej probówce techniką bezpośredniej aglutynacji w roztworze NaCl lub mikrometodą kolumnową. Brak aglutynacji świadczy o udanej autoadsorpcji. Obecność aglutynacji wskazuje na konieczność przeprowadzenia ponownej autoadsorpcji.

UWAGA: Jeżeli trzeba usunąć z surowicy autoprzeciwciała do antygenów niszczonych przez odczynnik papainowy, należy pominąć etap papainowania krwinek przygotowywanych do autoadsorpcji. Można wówczas przedłużyć czas inkubacji surowicy z krwinkami.

5.11.1.2. Metoda autoadsorpcji z zastosowaniem krwinek traktowanych odczynnikami MEP

1. Przygotować około 2 ml gęstych krwinek chorego.

2. Dodać 2 objętości odczynnika MEP (pkt 3.3.6) i inkubować w temperaturze 37°C, przez 20 min.
3. Krwinki przemyć 4 razy dużą objętością roztworu NaCl.
4. Sprawdzić testem antyglobulinowym, czy autoprzeciwciała zostały usunięte.
5. Jeśli otrzymano dodatni wynik testu antyglobulinowego, przeprowadzić jeszcze raz inkubację krwinek z odczynnikiem MEP.
6. Do części osadu krwinek pozbawionych autoprzeciwciał (np. do 20 kropli) dodać taką samą objętość autologicznej surowicy i inkubować przez 60 min w temperaturze 37°C.
7. Odwirować i przenieść surowicę z osadu krwinek do oddzielnej probówki.
8. Skontrolować wynik autoadsorpcji testem antyglobulinowym, dodając do adsorbowanej surowicy krwinki autologiczne, uprzednio traktowane odczynnikami MEP.

UWAGI:

- A. Ujemny wynik testu antyglobulinowego z autologicznymi krwinkami pozbawionymi autoprzeciwciał wskazuje, że surowica nadaje się do poszukiwania w niej alloprzeciwciał.
- B. Dodatni wynik testu antyglobulinowego świadczy o konieczności wykonania ponownej autoadsorpcji.
- C. Odczynnik MEP niszczy determinanty antygenów układu Kell, MNS i Gerbich, osłabia ekspresję antygenów LW i Duffy, wzmacnia ekspresję antygenów układu Rh, Kidd, P, Ii oraz Lewis.

5.11.1.3. Metoda autoadsorpcji w środowisku 20% PEG

Oprócz wymienionych metod, można stosować adsorbowanie autoprzeciwciał krwinkami natywnymi (niepoddawanymi elucji autoprzeciwciał i działaniu enzymów) z dodatkiem 20% PEG, który wzmacnia reakcję przeciwciała — antygen. Jest to metoda polecana szczególnie w przypadkach, w których aktywność autoprzeciwciał w surowicy jest wyższa w testach antyglobulinowych niż w testach enzymatycznych.

5.11.1.3.1. Wykonanie adsorpcji

1. Przygotować około 2 ml gęstych, uprzednio 3-krotnie przemytych krwinek chorego.
2. Zmieszać równe objętości (np. po 25 kropli): krwinek, surowicy i PEG.
3. Mieszaninę inkubować przez 15 min w temperaturze 37°C.
4. Odwirować i przenieść nadsącz zawierający surowicę oraz PEG do oddzielnej probówki.

5.11.1.3.2. Kontrola skuteczności autoadsorpcji

W tym celu należy użyć krwinek chorego, z których usunięto autoprzeciwciała przy zastosowaniu metody z użyciem kwaśnej glicyny (pkt 5.10.2). Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym, stosując następujące proporcje: 4 krople surowicy (zawierającej PEG) i 1 kropla 3–5% krwinek autologicznych z usuniętymi autoprzeciwciałami.

1. Inkubować 15 min w temperaturze 37°C.
2. Przemyć krwinki 4-krotnie.
3. Zbadać z surowicą antyglobulinową anti-IgG.

Wynik ujemny wskazuje, że autoprzeciwciała zostały wyadsorbowane. Wynik dodatni wskazuje na konieczność przeprowadzenia ponownej autoadsorpcji. Kolejną autoadsorpcję wykonuje się, mieszając jednakową objętość surowicy z nową porcją autologicznych krwinek, nie dodając już PEG. Wolną od autoprzeciwciał surowicę bada się z krwinkami wzorcowymi w celu wykrycia alloprzeciwciał. Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym: 4 krople surowicy (zawierającej PEG) i 1 kropla 3–5-procentowej zawiesiny krwinek wzorcowych. Następne etapy jak powyżej, poczynając od punktu 1.

5.11.2. Alloadsorpcja

Do wykonania tego typu adsorpcji należy dobrać krwinki wzorcowe tak, aby były zróżnicowane między sobą określonymi fenotypami. Pomocna jest w tym znajomość fenotypu krwinek chorego w układzie Rh, Kidd, antygenów K, M i S oraz, jeśli to możliwe, również antygenów Duffy oraz s, ponieważ pozwala to na wybranie mniejszej liczby rodzajów krwinek wzorcowych do adsorbowania. Najczęściej alloadsorpcję wykonuje się z 2–3 rodzajami krwinek homozygotycznych w każdym wymienionym układzie. Adsorpcję wykonuje się oddzielnie z każdym rodzajem krwinek. Przykład dobrania zestawu krwinek do adsorpcji dla chorego o fenotypie DCCee K–:

1. DCCee kk MM ss Jk(a–b+) Fy(a+b–),
2. DCCee kk NN SS Jk(a+b–) Fy(a–b+).

Jeżeli aktywność autoprzeciwciał jest wyższa w teście enzymatycznym niż w teście antyglobulinowym, alloadsorpcję wykonuje się z krwinkami traktowanymi papainą. Natomiast, jeżeli autoprzeciwciała wykazują wyższą aktywność w teście antyglobulinowym niż w enzymatycznym, alloadsorpcję wykonuje się w środowisku PEG.

5.11.2.1. Alloadsorpcja autoprzeciwciał w środowisku 20% PEG

5.11.2.1.1. Wykonanie alloadsorpcji

1. Przygotować po około 2 ml gęstych krwinek przeznaczonych do adsorpcji, uprzednio przemytych w roztworze NaCl.
2. W oddzielnych probówkach zmieszać jednakową objętość: surowicy, gęstych krwinek jednego rodzaju oraz 20% PEG.
3. Mieszanicę inkubować przez 15 min w temperaturze 37°C.
4. Odwirować i przenieść nadsącze zawierające surowicę oraz PEG do oddzielnych probówek.

5.11.2.1.2. Kontrola skuteczności alloadsorpcji

W tym celu należy użyć krwinek chorego, z których usunięto autoprzeciwciała za pomocą kwaśnej glicyny (pkt 5.10.2). Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym, stosując następujące proporcje: 4 krople surowicy (PEG dodano już uprzednio) i 1 kropla 3–5-procentowej zawiesiny krwinek autologicznych z usuniętymi autoprzeciwciałami.

1. Inkubować przez 15 min w temperaturze 37°C.
2. Przemyć krwinki 4-krotnie.
3. Zbadać z surowicą antyglobulinową anti-IgG.

Wynik ujemny wskazuje, że autoprzeciwciała zostały wyadsorbowane. Wynik dodatni wskazuje na konieczność przeprowadzenia ponownej alloadsorpcji. Kolejną alloadsorpcję wykonuje się, mieszając jednakową objętość surowicy oraz nową porcję krwinek (każdego rodzaju oddzielnie), nie dodając już PEG. Wolną od autoprzeciwciał surowicę bada się z krwinkami wzorcowymi w celu wykrycia alloprzeciwciał. Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym: 4 krople surowicy (zawierającej PEG) i 1 kropla 3–5-procentowej zawiesiny krwinek wzorcowych w NaCl. Następne etapy jak powyżej, w punktach 1–3.

5.11.2.2. Alloadsorpcja autoprzeciwciał krwinkami papainowanymi

5.11.2.2.1. Wykonanie alloadsorpcji

1. Przygotować około 2 ml gęstych krwinek przeznaczonych do adsorpcji, uprzednio przemytych w roztworze NaCl.
2. Krwinki wypapainować (zgodnie z pkt. 5.1.3.1).
3. W oddzielnych probówkach zmieszać jednakową objętość surowicy i gęstych, papainowanych krwinek jednego rodzaju.
4. Mieszanicę inkubować przez 30 min w temperaturze 37°C.
5. Odwirować i przenieść surowicę do oddzielnych probówek.

5.11.2.2.2. Kontrola skuteczności alloadsorpcji

W tym celu należy użyć krwinek chorego, z których usunięto autoprzeciwciała za pomocą

kwaśnej glicyny (pkt 5.10.2), raz przemytych roztworem LISS. Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym LISS: 2 krople surowicy i 2 krople 2–3-procentowej zawiesiny krwinek autologicznych w roztworze LISS.

1. Inkubować przez 20 min w temperaturze 37°C.
2. Przemyć 4-krotnie.
3. Zbadać z wieloswoistym odczynnikiem antyglobulinowym.

Wynik ujemny wskazuje, że autoprzeciwciała zostały wyadsorbowane. Wynik dodatni wskazuje na konieczność przeprowadzenia ponownej alloadsorpcji. Kolejną alloadsorpcję wykonuje się, mieszając jednakową objętość surowicy oraz nową porcję krwinek papainowanych (każdego rodzaju oddzielnie). Wolną od autoprzeciwciał surowicę bada się z krwinkami wzorcowymi w PTA-LISS, w celu wykrycia alloprzeciwciał.

UWAGA: Bardzo ważna jest wnikliwa analiza wyników reakcji surowicy po alloadsorpcji z krwinkami wzorcowymi. Należy mieć świadomość, że allogeniczne krwinki adsorbują nie tylko autoprzeciwciała z surowicy chorego, ale mogą również adsorbować alloprzeciwciała. Dlatego też reakcje surowicy po adsorpcji jednym rodzajem krwinek mogą być inne niż reakcje surowicy adsorbowanej krwinkami o innym fenotypie.

5.12. Różnicowanie przeciwciał IgG i IgM

Metoda stosowana jest w przypadku konieczności ustalenia, czy w badanej surowicy oprócz aglutynin IgM są obecne również niekompletne przeciwciała IgG o tej samej swoistości.

Traktowanie surowicy 2ME i DTT powoduje rozkład i utratę aktywności serologicznej przeciwciał klasy IgM.

5.12.1. Traktowanie surowicy 2 ME

1. Dodać do badanej surowicy jednakową objętość 0,1 mol/l 2ME w buforze fosforanowym o pH 7,4.
2. Mieszanicę umieścić na 2 godziny w temperaturze 37°C.
3. Wykonać badania z krwinkami wzorcowymi w testach, w których wykrywano przeciwciała.

Wynik dodatni świadczy o obecności przeciwciał IgG, ujemny wskazuje na obecność przeciwciał IgM.

5.12.2. Traktowanie surowicy DTT

Wykonanie badania:

1. Do próbki dodać jednakową objętość (np. 1 ml) surowicy badanej i 0,01 M DTT.
2. Mieszanicę inkubować w 37°C przez 2 godziny.
3. Wykonać badania surowicy traktowanej DTT z krwinkami wzorcowymi w testach, w których

wykrywano przeciwciała, czyli w teście NaCl oraz PTA.

Interpretacja wyników reakcji surowicy traktowanej DTT z krwinkami wzorcowymi:

1. Wyniki ujemne w teście NaCl i w PTA świadczą, że w surowicy są wykrywane tylko przeciwciała klasy IgM.
2. Wynik ujemny w teście NaCl, a dodatni w PTA świadczy, że oprócz aglutynin klasy IgM występują również przeciwciała klasy IgG.
3. Wynik dodatni surowicy traktowanej DTT w teście NaCl świadczy o nieskutecznym działaniu odczynnika DTT w niszczeniu przeciwciał IgM. Niszczenie IgM należy przeprowadzić ze świeżo przygotowanym roztworem DTT lub zastosować w tym celu inną metodę.

5.13. Wykrywanie defektu w błonie krwinek czerwonych za pomocą polibrenu

Metoda ta umożliwia wykrywanie defektu związanego z niedoborem kwasu sjałowego, przekraczającym 5–7-procentowej prawidłowej wartości. Normalne krwinki czerwone, które są naładowane ujemnie, ulegają agregacji w środowisku naładowanego dodatnio wysokocząsteczkowego polimeru. Zawieszony w tym środowisku krwinki o znacznie zmniejszonym ładunku ujemnym (z powodu niedoboru kwasu sjałowego), odpychają się wzajemnie i pozostają niezlepione.

5.13.1. Przygotowanie krwinek

1. Wypapainować prawidłowe krwinki kontrolne, stosując czas kontaktu z enzymem dłuższy o około 5 min, w porównaniu z czasem stosowanym w przygotowaniu krwinek do badania przeciwciał.
2. Przygotować 25-procentową zawiesinę krwinek kontrolnych zwykłych i papainowanych oraz badanych w roztworze NaCl zbuforowanym do pH 7,0.

5.13.2. Wykonanie badania

1. Do 3 próbek dodać po 1 ml 1-procentowego roztworu polibrenu i do każdej z nich po 5 kropli odpowiedniej zawiesiny krwinek, dokładnie wymieszać.
2. Natychmiast przenieść zawartość próbek do 3 pipet o pojemności 1 ml albo do rurek Westergrena i ustawić je w pozycji pionowej.
3. Po 5 min odczytać wynik po raz pierwszy, a po 20 min po raz drugi.

5.13.3. Interpretacja wyników

Porównuje się zachowanie krwinek badanych i kontrolnych. Jeśli krwinki badane zachowują się

tak, jak zwykle kontrolne (to znaczy opadają), nie ma dowodu na deficyt kwasu **sjałowego** przekraczający 5–7%. Na deficyt kwasu sjałowego wskazuje pozostawianie krwinek badanych w zawiesinie, podobnie jak kontrolnych krwinek papainowanych.

5.14. Mikrometody kolumnowe

Zalety testów kolumnowych:

- zastępują testy wykonywane technikami szkiełkowymi i probówkowymi,
- są proste i wygodne w stosowaniu,
- przyczyniają się do oszczędności odczynników diagnostycznych,
- umożliwiają szybkie wykonanie wielu badań w małej objętości krwi,
- są bardzo czule i pozwalają na wykrycie nawet bardzo słabo reagujących przeciwciał,
- eliminują wiele reakcji nieswoistych, jak na przykład rulonizację,
- w teście antyglobulinowym nie wymagają etapu przemywania krwinek, co zapobiega najczęściej spotykanym błędom.

UWAGI:

- A. Zastosowane żele lub kuleczki szklane wypełniające mikroprobówki, posiadają zdolność dokładnego izolowania krwinek z otaczającego je środowiska. Zatrzymują one surowicę wraz z nadmiarem niewykorzystanych w reakcji przeciwciał i innych globulin, co ma szczególne znaczenie w teście antyglobulinowym.
- B. Zastosowanie testów kolumnowych do badań przed przetoczeniem krwi przyspiesza znacznie jej dobranie dla chorego i zwiększa bezpieczeństwo transfuzji.
- C. Duża czułość testów powoduje równocześnie zwiększoną wykrywalność przeciwciał typu zimnego, nieistotnych klinicznie. W takich przypadkach w przebiegu całego badania należy stosować temperaturę 37°C.

5.15. Automatyzacja w badaniach serologicznych

Linie automatyczne służą do rutynowego badania grup krwi, określania fenotypów krwinek czerwonych i wykrywania alloprzeciwciał odpornościowych. Powinny one znaleźć zastosowanie we wszystkich Centrach Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w szczególności do badań krwiodawców. Dzięki odpowiednim zabezpieczeniom i funkcjonalnym rozwiązaniom aparaty te wykluczają zamianę próbek krwi i ograniczają możliwość popełnienia błędów. Reakcje serologiczne można bezpośrednio odczytywać i porównać z danymi na monitorze lub wydruku. Wydruki wykonanych badań wraz z ich wynika-

mi winny być przechowywane w segregatorach. Zbytne są, zatem książki serologiczne, zawierające ręczne protokoły badań. Aparatura umożliwia ponadto archiwizowanie wszystkich protokołów reakcji serologicznych i wyników wraz z numerami płytek lub kart oraz nazwami stosowanych technik, dzięki czemu wyniki można łatwo ponownie odtworzyć. Dodatkową ich zaletą jest bardzo oszczędne zużycie odczynników diagnostycznych.

Producent linii automatycznych i półautomatycznych powinien zapewnić możliwość bezpośredniej transmisji wyników badań dawców do ogólnego programu komputerowego.

W badaniach grup krwi biorców nie można zrezygnować z wizualnej kontroli, jeśli automatyczny czytnik nie rejestruje i nie interpretuje dwóch populacji krwinek.

5.15.1. Automaty

Automat przeprowadza samodzielnie całą procedurę badania od pobrania materiału z badanej próbki do wydania wyniku. Linia automatyczna wykonuje następujące zadania:

- identyfikację badanej próbki,
- identyfikację odczynników oraz utrzymanie odczynników w stanie gotowości do użycia,
- przygotowanie odpowiednich zawiesin krwinek czerwonych,
- naniesienie badanego materiału oraz odczynników na mikropłytki lub do mikroprobówek itp.,
- przeprowadzenie badania zgodnie z ustalonym algorytmem wraz z monitorowaniem głównych etapów procesu, takich jak dozowanie badanych próbek i odczynników, czas i temperatura inkubacji, czas i szybkość wirowania, odczyt wyniku i jego interpretacja, zagwarantowanie ciągłości procesu.

5.15.2. Półautomaty

Półautomat jest systemem, w którym operator wykonuje niektóre czynności, na przykład:

- przygotowuje odczynniki, krwinki wzorcowe oraz mikropłytki lub karty z mikroprobówkami i rejestruje ich dane (rodzaje i numery serii, fenotyp itp.),
- monitoruje etapy procesu, na przykład czas i temperaturę inkubacji,
- czuwa nad ciągłością procesu.

5.15.3. Walidacja linii automatycznych

Przed dopuszczeniem do użytku automaty i półautomaty muszą zostać zwalidowane. Procedura ta polega na równoległym przeprowadzaniu badań metodą ręczną i automatyczną lub wykonywa-

nych za pomocą dotychczas stosowanej metody automatycznej przez okres czasu, wystarczający do oceny prawidłowości działania aparatu. Walidację aparatury należy przeprowadzić po każdej awarii i po każdej kontroli technicznej.

Raz w tygodniu należy dokonywać kalibracji czytnika automatycznego, postępując zgodnie z instrukcją producenta.

5.15.4. Walidacja odczynników stosowanych w badaniach automatycznych

Każdą nową serię odczynników diagnostycznych i rozcieńczalników (dilentów) należy walidować, wykonując jednocześnie badania, co najmniej 5 próbek krwi z nową i poprzednio używaną serią odczynników.

5.15.5. Codzienna kontrola badań automatycznych

Kontrola polega na sprawdzeniu aktywności i swoistości odczynników stosowanych w danym dniu. Najczęściej do kontroli grup krwi ABO i antygeny D stosuje się krwinki grupy AB RhD+ i O RhD-. Jeśli odczynniki są utrwalone na mikroplastykach, badania kontrolne dotyczą każdej nowej serii. W kontroli wiarygodności testu antyglobulinowego podczas badania przeciwciał odpornościowych należy stosować Standard anty-D. Nasilenie reakcji ze Standardem anty-D nie powinno być wyższe niż ++. Jeśli jest wyższe, Standard należy odpowiednio rozcieńczyć.

Wydruk wyników badań kontrolnych powinien być opatrzony adnotacją (stemplem):

„Zestaw skontrolowany w dniu, nadaje się do badań” oraz podpisem i pieczętką osoby wykonującej badanie.

5.15.6. Archiwizacja danych operacyjnych

Archiwizacja dotyczy następujących danych:

- data badania,
- dane zlecającego badania (nie dotyczy krwiodawców),
- dane obsługującego aparaturę,
- dane osoby odpowiedzialnej za ostateczny wynik,
- odczynników: rodzaje i numery serii,
- wyników badań reaktywności każdego odczynnika,
- uwag na temat ewentualnej manualnej korekty wyników,
- ostatecznych wyników badania,
- postępowania w razie alarmu w stosowanym systemie automatycznym.

UWAGA: W badaniach automatycznych można zaniechać wykonania testu enzymatycznego w badaniu przeglądowym przeciwciał odpornościowych u chorych i u kobiet ciężarnych.

6. Badania antygenów i przeciwciał układów grupowych krwinek czerwonych u krwiodawców i u chorych

Przed przystąpieniem do badań należy doprowadzić do temperatury pokojowej odczynniki i krwinki wzorcowe.

6.1. Badanie grup krwi układu ABO

Grupę krwi ABO określa się na podstawie obecności lub braku aglutynacji krwinek badanych z odczynnikami diagnostycznymi oraz obecności lub braku aglutynacji krwinek wzorcowych A₁ i B pod wpływem badanej surowicy. Krwinki wzorcowe grupy O stanowią kontrolę, a ich aglutynacja po kontakcie z badaną surowicą świadczy o obecności nieregularnych przeciwciał. W przypadku braku reaktywności krwinek badanych z odczynnikami diagnostycznymi, stwierdzenie w surowicy przeciwciał anti-H za pomocą krwinek grupy O, ułatwia rozpoznanie fenotypu Bombay.

6.1.1. Zestaw odczynników diagnostycznych i krwinek wzorcowych

6.1.1.1. Odczynniki

Stosuje się dwa zestawy monoklonalnych odczynników diagnostycznych:

- zestaw 1: anty-A i anty-B,
- zestaw 2: anty-A i anty-B z innych klonów niż w zestawie 1.

Dopuszcza się stosowanie zestawów, zawierających odczynniki z dwóch różnych serii tego samego klonu.

Odczynniki należy stosować zgodnie z zaleceniami producenta.

6.1.1.2. Krwinki wzorcowe

Krwinki wzorcowe stanowią zawiesiny krwinek grupy krwi O, A₁ i B. Stosuje się zgodnie z zaleceniem producenta.

UWAGI:

- A. Krwinki A₁ wybiera się spośród krwi grupy A za pomocą badania z lektyną anty-A₁.
- B. Wszystkie składniki zestawu diagnostycznego powinny znajdować się w zamkniętych pojemnikach, zaopatrzonych w kroplomierze.
- C. W przypadku stosowania metod automatycznych (z zachowaniem zasad opisanych w pkt 5.15.), dopuszcza się stosowanie jednego zestawu odczynników monoklonalnych anty-A i anty-B, pod warunkiem, że w każdej próbce krwi dawcy/biorcy oznacza się przeciwciała anty-A i anty-B.

Tabela 4. Schemat wyników oznaczeń grup krwi układu ABO

Table 4. Results in blood group determination

Badane próbki krwi	Odczynniki monoklonalne		Krwinki wzorcowe			Wyniki grup krwi
	anty-A	anty-B	O	A ₁	B	
Nr 1	-	-	-	+	+	O
Nr 2	+	-	-	-	+	A
Nr 3	-	+	-	+	-	B
Nr 4	+	+	-	-	-	AB

D. Przy oznaczaniu alloprzeciwciał układu ABO w systemach automatycznych można pominąć krwinki grupy O.

6.1.1.3. Kontrola zestawu odczynników i krwinek wzorcowych

Kontrolę makroskopową odczynników diagnostycznych i krwinek wzorcowych należy wykonywać codziennie. Zmętnienie, strąty lub hemoliza widoczna w nadsączu dyskwalifikują składniki zestawu.

Obowiązuje codzienna kontrola swoistości i aktywności odczynników diagnostycznych w takich testach, w jakich wykonywane są badania. Kontrola krwinek wzorcowych obowiązuje po każdym ich przygotowaniu.

1. Zestaw diagnostyczny nadaje się do użytku, jeżeli uzyskane wyniki odpowiadają schematowi w tabeli 4. Należy wyeliminować z zestawu te składniki, które wykazują reakcje nieswoiste, jak również te, których aktywność nie odpowiada kryteriom zalecanym przez producenta.
2. Numery serii oraz symbole odczynników i krwinek zakwalifikowanych do zestawu diagnostycznego zapisuje się w książce badań grup krwi (wzór 5, *patrz* Załącznik, pkt 4.3) albo w odrębnej książce wraz z protokołem i adnotacją: „Zestaw skontrolowany w dniu, nadaje się do badań” oraz z podpisem osoby wykonującej badania kontrolne.

6.1.2. Właściwe badanie grup krwi ABO

Badanie wykonuje się metodą ręczną lub automatyczną zgodnie z zaleceniami producenta odczynników diagnostycznych. W przypadku wątpliwych wyników w metodzie mikrokolumnowej lub automatycznej, oznaczenie grupy krwi w układzie ABO przeprowadza się metodą ręczną techniką próbówkową.

UWAGI:

- A. Wyniki badań grup krwi muszą odczytywać na przemian 2 osoby: jedna podaje uzyskane re-

akcje, a druga protokołuje je w książce badań za pomocą symboli + (aglutynacja) i – lub O (brak aglutynacji). Po zapisaniu wyników, druga osoba powinna odczytać reakcje na płycie, a ta, która je odczytywała poprzednio, sprawdzić ich zgodność z zapisem w książce.

- B. Jeżeli wyniki obserwowanych reakcji są niezgodne ze schematem podanym w tabeli 2 lub, jeżeli z odczynnikami wystąpiła aglutynacja o słabym nasileniu, zapis całego badania musi uwzględniać nasilenie aglutynacji w poszczególnych mieszaninach reagujących.
- C. W przypadku stosowania metod automatycznych (według zasad opisanych w pkt. 5.15), wynik badania może być odczytywany i walidowany przez jedną osobę.

Po odczytaniu i zapisaniu wyników należy przeprowadzić badanie kontrolne, polegające na ponownym określeniu antygenów na krwinkach, za pomocą odczynników diagnostycznych z drugiego zestawu. Do tego badania stosuje się krwinki z wyjściowej próbki krwi. Nie wolno posługiwać się przygotowanymi uprzednio zawiesinami krwinek, które były używane do zasadniczego badania.

Uzyskanie jednoznacznych wyników, zgodnych z poprzednimi (musi to być też zaprotokołowane), upoważnia do wpisania ostatecznego wyniku w rubryce: „Wynik”.

6.1.3. Oznaczanie antygeny A₁ na krwinkach przeznaczonych do badania układu ABO

Badanie wykonuje się za pomocą lektyny anty-A₁, zgodnie z zaleceniami producenta.

Wyraźna aglutynacja (3+ do 4+) wskazuje na odmianę A₁.

UWAGA: Może się zdarzyć, że reakcja z lektyną jest słabo wyrażona (1+). Takie krwinki określa się jako A pośrednie (A_{int}) i nie nadają się one jako wzorcowe do badań układu ABO.

Tabela 5. Zestawienie najbardziej typowych reakcji rzadkich odmian antygenów układu ABO

Table 5. List of most typical reactions of rare variants in blood group ABO

Fenotyp	Reakcje krwinek z odczynnikami diagnostycznymi				Reakcje surowicy z krwinkami wzorcowymi				Ślina wydzielaczy zawiera
	anty-A	anty-B	anty-A+B*	anty-H	A ₁	A ₂	B	O	
A ₃	Aglutynacja mieszana	0	Aglutynacja mieszana	3+	±	0	3+	0	A i H
A _m	0/±	0	0/±	4+	0	0	4+	0	A i H
A _x	0/±	0	1+/2+	4+	1+	0	4+	0	H
A _{el}	0	0	0	4+	2+	0	4+	0	H
A _{end}	+ sł.	0	+ sł.	4+	0	0	3+	0	H
B ₃	0	Aglutynacja mieszana	Aglutynacja mieszana	4+	4+	4+	0	0	B i H
B _m	0	0	0/±	4+	4+	3+	0	0	B i H
B _x	0	0/±	0/2+	4+	4+	3+	0	0	H
B _{częśc.}	0	±	±	+ sł	3+	2+	±	0	B i H
B _{end}	0	+ sł.	+ sł.	4+	3+	3+	0	0	H
„Bombay” O _h ^A , O _h ^B , O _h ^{AB}	0	0	0	0	+	+	+	+	Brak

*ludzka surowica

6.1.4. Przyczyny odchyień od klasycznego schematu oceny wyniku badań grup krwi w układzie ABO

6.1.4.1. Błędy natury technicznej

Można spotkać się z następującymi błędami natury technicznej:

- zanieczyszczone płyty lub pipety,
- niewłaściwa proporcja krwinki/odczynnik,
- niedokładne zmieszanie krwinek z odczynnikiem,
- opóźnione odczytanie wyniku (wysychanie mieszanki).
- zanieczyszczenie odczynników lub badanych krwinek i surowicy,
- nie dodanie odczynnika diagnostycznego lub badanej surowicy,
- nie sprawdzenie krwinek wzorcowych po ich przygotowaniu,
- błąd w identyfikacji badanych zawiesin krwinek lub surowic (zamiana próbek).

6.1.4.2. Nietypowe właściwości badanych krwinek lub surowic

Można zaobserwować następujące nietypowe własności badanych krwinek/surowic:

- bardzo słabo reagujące regularne aglutyniny w badanej surowicy,
- obecność hemolizyn,
- obecność autoaglutynin,

- obecność drobnych skrzepów imitujących aglutynację,
- obecność nieregularnych przeciwciał w surowicy badanej,
- poliaglutynacja krwinek badanych wykrywana ludzkimi surowicami diagnostycznymi,
- obecność słabej odmiany antygeny A lub B,
- obecność 2 populacji krwinek (chimeryzm naturalny, potransfuzyjny i przeszczepowy).

W przypadkach zaobserwowanych odchyień od klasycznego schematu wyników badania grup krwi w układzie ABO należy:

- powtórnie oznaczyć grupę krwi, stosując do badań surowicę i zawiesinę krwinek, przygotowaną na nowo z próbki macierzystej,
- zbadać krwinki z surowicą grupy AB i z surowicą autologiczną w środowisku NaCl i w temperaturze pokojowej.

Pozwoli to na wykluczenie błędów natury technicznej oraz rozpoznanie poliaglutynacji i autoaglutynacji.

6.1.5. Słabe odmiany antygenów układu ABO

Słabe odmiany antygenów układu ABO przedstawiono w tabeli 5. Za obecnością słabych odmian antygenów A lub B przemawia:

1. Znaczne osłabienie lub brak aglutynacji badanych krwinek z odczynnikiem diagnostycznym

anty-A lub anty-B przy często obserwowanym braku oczekiwanych aglutynin.

2. Obraz 2 populacji badanych krwinek z odczynnikami (surowicami) diagnostycznymi.

UWAGA: Odczynniki monoklonalne często nie różnicują słabych odmian, szczególnie Ax i A3.

Dla potwierdzenia i identyfikacji odmiany układu ABO postępowanie jest następujące:

1. Zbadanie krwinek z wyselekcjonowanymi surowicami anty-A lub anty-B oraz z lektyną anty-H.
2. Zastosowanie czulszych metod (metoda kolumnowa).
3. Zbadanie surowicy z większą liczbą krwinek A lub B metodą probówkową.
4. Sprawdzenie obecności słabego antygeny na krwinkach metodą adsorpcji/elucji przeciwciał.
5. Zbadanie śliny na obecność substancji ABH.
6. Przeprowadzenie badań rodzinnych.

6.1.6. Obecność dwóch populacji krwinek czerwonych

Obecność dwóch populacji krwinek charakteryzuje się tym, że pod wpływem odczynników diagnostycznych tylko część krwinek badanych ulega aglutynacji, natomiast pozostałe tworzą jednorodną zawiesinę (aglutynaty na tle wolnych krwinek). Zjawisko to może być obserwowane w następujących przypadkach:

- obecność słabej odmiany A₃ lub B₃ (w badaniach z surowicami ludzkimi),
- depresja antygeny A lub B w części populacji krwinek czerwonych w przebiegu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego,
- po przetoczeniu krwinek innej grupy krwi (np. osobie grupy AB krwinek A, B lub O) — zjawisko przemijające,
- po przeszczepieniu allogenicznych hemopoetycznych komórek macierzystych od dawcy o innej grupie ABO — zjawisko przemijające,
- chimeryzm u bliźniąt dwujajowych — zjawisko trwałe,
- zaburzenia procesu zapłodnienia — dispermia (zjawisko trwałe).

UWAGI:

- A. W przypadku zaobserwowania 2 populacji krwinek należy podjąć próbę ich rozdzielenia, zgodnie z pkt. 5.7. Jeżeli się nie powiedzie, należy podejrzewać obecność słabej odmiany antygeny.
- B. W razie konieczności przetoczenia krwi przed uzyskaniem ostatecznego wyniku badania grup krwi, należy dobierać KKCz grupy O.

6.1.7. Poliaglutynacja

Zjawisko poliaglutynacji jest spowodowane zmianami w błonie komórkowej krwinek czerwo-

nych pod wpływem enzymów bakteryjnych lub innych nieznanymi czynników, które prowadzą do odsłonięcia niedostępnych w warunkach prawidłowych determinantów T, Tn oraz innych. Surowice większości osób dorosłych, w tym surowice diagnostyczne pochodzenia ludzkiego, charakteryzują się obecnością naturalnych przeciwciał, skierowanych przeciw tym determinantom, co sprawia, że aglutynują one takie krwinki. Mianem poliaglutynacji określa się zjawisko, zachodzące w następstwie odsłonięcia ukrytych determinantów *in vivo*, najczęściej w przebiegu zakażenia. To samo zjawisko spowodowane zakażeniem pobranej próbki krwi nosi nazwę panaglutynacji.

Podczas badania grupy krwi układu ABO za pomocą ludzkich surowic obserwuje się reakcje aglutynacji niezgodne ze schematem. Reakcje takich nie wykazują odczynniki monoklonalne. Włączenie do badania kilku próbek surowicy grupy AB i uzyskanie aglutynacji badanych krwinek potwierdza przypuszczenie odsłonięcia ukrytych determinantów. W celu ustalenia, która z determinant antygenowych została odsłonięta należy podjąć badania z zestawem lektyn, wyciągiem z gruczołu białkowego *Helix pomatia* i z polibrenem (tab. 6).

UWAGI:

- A. Odsłonięcie antygeny T i pokrewnych determinantów antygenowych (Tk) powodują drobnoustroje chorobotwórcze, produkujące neuraminidazę (enzym powodujący rozkład kwasu sialowego). Jest to zjawisko przejściowe i zanika po ustąpieniu zakażenia.
- B. Czynniki odsłaniający antygen Tn nie jest znany. Działa jednocześnie na krwinki czerwone, płytki krwi i granulocyty, co prowadzi do niedokrwistości, małopłytkowości i granulocytopenii. Poliaglutynacja ma z reguły charakter trwały.
- C. Poliaglutynację Tn należy różnicować z obecnością na krwinkach antygeny Cad, który jest uwarunkowany genetycznie.
- D. Koncentraty składników komórkowych krwi przeznaczone dla biorców, których krwinki wykazują poliaglutynację (szczególnie dla noworodków i niemowląt) powinny być maksymalnie pozbawione osocza. Takim biorcom nie należy przetaczać osocza.

6.1.8. Obecność allohemolizyn

W badaniach grup krwi ABO ze świeżo pobranej próbki krwi, zamiast spodziewanej aglutynacji z krwinkami wzorcowymi, może pojawić się hemoliza, która jest równoważnikiem aglutynacji. Dla uniknięcia błędnej interpretacji (przeoczenie hemolizy) należy:

Tabela 6. Różnicowanie przyczyn poliaglutynacji**Table 6.** Differentiation of the reasons of polyagglutination

Odślonięcie antygenów	Czynnik działający	Reakcja krwinek z lektyną					Polibren
		<i>Arachis hypogea</i>	<i>Dolichos biflorus</i>	<i>Helix pomatia</i>	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Salvia horminum</i>	
T	Neuraminidaza	+	-	-	-	-	Brak agregacji
T _k	Endo-galaktozydaza	+	-	-	-	-	Agregacja
T _n	Nieznany	-	+	+	+	+	Brak agregacji
VA	α-fukozydaza	-	-	+	+	+	Agregacja
Cad	Genetycznie uwarunkowany	-	-	+	-	-	Agregacja
HEMPAS	Genetycznie uwarunkowany	-	-	+	-	-	Brak agregacji
NOR	Genetycznie uwarunkowany	-	-	-	-	-	Agregacja

1. Rozcieńczyć surowicę badaną roztworem NaCl w stosunku 1:9.
2. Powtórzyć badanie z krwinkami wzorcowymi (zamiast hemolizy powinna pojawić się aglutynacja).
3. Przy braku wyraźnej aglutynacji zastosować metodę próbówkową.

6.1.9. Znaczne obniżenie poziomu alloaglutynin ABO lub ich brak

Po wyłączeniu obecności allohemolizyn, brak oczekiwanej reakcji badanej surowicy z odpowiednimi krwinkami wzorcowymi może wskazywać na niski poziom alloaglutynin lub ich nieobecność. W stanach fizjologicznych obserwuje się to zjawisko u noworodków i niemowląt; zaś w przypadkach chorobowych w hipo- lub agammaglobulinemii.

6.1.9.1. Postępowanie w przypadku znacznego obniżenia poziomu alloaglutynin ABO lub ich braku

Reakcję surowicy badanej z krwinkami wzorcowymi należy sprawdzić metodą próbówkową w następujący sposób:

1. Przygotować 3 próbówki, oznakowane symbolami O, A₁, B.
2. W każdej próbówce umieścić po 2 krople badanej surowicy.
3. Dodać po 2 krople 3–4-procentowej zawiesiny krwinek zgodnie z symbolami na próbówkach.
4. Probówki pozostawić w temperaturze pokojowej przez kilka minut.
5. Zawartość probówek wirować przez 30–60 s.
6. Odczytać wyniki makroskopowo, delikatnie potrząsając próbówką.

Nie wykrycie alloaglutynin metodą próbówkową (brak aglutynacji krwinek z odpowiednim odczynni-

kiem), zobowiązuje do badań w kierunku słabej odmiany antygeny A lub B metodą absorpcji/elucji.

6.1.10. Rulonizacja krwinek

Jeżeli podczas badania surowicy obserwuje się zlepianie krwinek wzorcowych wszystkich grup krwi, należy brać pod uwagę zjawisko rulonizacji, które:

- nie występuje u osób zdrowych,
- może pojawić się u chorych z zaburzeniami w białkach osocza (makroglobulinemia, choroby nowotworowe, oparzenia),
- jest obserwowane po przetoczeniu wysoko cząsteczkowego dekstranu lub po dożylnym stosowaniu preparatu cieniującego do badań rentgenologicznych,
- w badaniu makroskopowym nie różni się od aglutynacji.

6.1.10.1. Postępowanie w przypadku podejrzenia rulonizacji

1. Przenieść kroplę zlepionych krwinek na szkiełko podstawowe i obejrzyć pod mikroskopem.
2. Zwrócić uwagę na charakterystyczny obraz układania się krwinek w rulony.
3. Przy znacznym nasileniu właściwości rulonizujących surowicy i trudności w rozróżnieniu rulonizacji od aglutynacji, rozcieńczyć badaną surowicę roztworem NaCl (1:2, lub w miarę potrzeby więcej) i powtórzyć badanie z krwinkami wzorcowymi.

6.1.11. Obecność nieoczekiwanych alloprzeciwciał

6.1.11.1. Obecność przeciwciał anty-A₁

Ujawnia się ona nieoczekiwaną reakcją surowicy badanej z krwinkami wzorcowymi A₁. W takim przypadku należy:

- sprawdzić za pomocą lektyny anty- A_1 , czy krwinki badane należą do A_2 lub innej słabej odmiany,
- zbadać surowicę z zawiesinami krwinek wzorcowych A_1 (z innej próbki) i A_2 ,
- w celu ostatecznej identyfikacji przeciwciał, zastosować większą liczbę krwinek A_1 i A_2 .

6.1.11.2. Obecność innych alloprzeciwciał

Po wykluczeniu obecności autoaglutynin na podstawie badania surowicy z krwinkami autologicznymi, obserwowana aglutynacja z krwinkami wzorcowymi wskazuje na obecność alloaglutynin. Poza anty- A_1 mogą to być inne „naturalne” przeciwciała, reagujące w temperaturze pokojowej, jak anty- P_1 , anty-M, anty-N, anty-H, anty- Le^a , anty- Le^b oraz spotykane znacznie rzadziej kompletne przeciwciała odpornościowe (np. z układu Rh).

Do określenia ich swoistości służy odpowiednio przygotowany zestaw krwinek wzorcowych, na przykład:

O NNSs P_1 $Le(a-b+)$; O MMSS P_1 $Le(a+b-)$
O MNss P_1 $Le(a-b+)$; O MNss P_2 $Le(a-b-)$

Lu(a+)

O MMSs P_2 $Le(a-b+)$; krwinki jednoimienne w ABO.

Surowicę należy badać z zawiesinami krwinek w roztworze NaCl i/lub w roztworze LISS w następujący sposób:

1. W opisanych próbkach umieścić po 2 krople badanej surowicy.
2. Dodać po 1 lub 2 krople 3–4-procentowej zawiesiny odpowiednich krwinek.
3. Pozostawić na 15 min w temperaturze pokojowej.
4. Wirować przez 1 min, przy $340 \times g$.
5. Odczytać wyniki, protokołując nasilenie aglutynacji.

UWAGI:

- A. U osób grupy A_1 i A_1B , reakcja surowicy z krwinkami grupy O nasuwa podejrzenie obecności przeciwciał anty-H. Dla ustalenia swoistości tych przeciwciał należy zbadać surowicę w ten sam sposób z kilkoma zawiesinami krwinek grupy O, A_2 i A_1 . Aglutynacja krwinek grupy O i A_2 , przy braku reakcji z krwinkami A_1 oraz zahamowanie aktywności przy pomocy śliny wydzielacza grupy O, stanowią potwierdzenie swoistości przeciwciał anty-H.
- B. Aglutynacja o zbliżonym nasileniu z całym zestawem krwinek wzorcowych (z wyjątkiem krwinek autologicznych), może wskazywać na obecność bardzo rzadko spotykanych alloprzeciwciał anty-I.
- C. Jeżeli reakcje otrzymane z poszczególnymi rodzajami krwinek pozwalają na ustalenie swo-

istości i badanych przeciwciał, należy potwierdzić prawidłowość identyfikacji, określając fenotyp krwinek badanych w układzie grupowym, do którego zostały zaliczone wykryte przeciwciała.

- D. Po ustaleniu swoistości alloprzeciwciał należy sprawdzić w PTA, czy nie mają one charakteru przeciwciał odpornościowych, co jest obserwowane najczęściej w przypadkach anty-M, anty-S, anty- Le^a , anty- P_1 .

6.1.12. Autoaglutynacja

Jeżeli surowica aglutynuje wzorcowe krwinki wszystkich grup krwi, należy wykonać badanie kontrolne z zawiesiną krwinek autologicznych (autokontrola). Wystąpienie aglutynacji świadczy o obecności autoprzeciwciał typu zimnego. W rzadkich przypadkach, u chorych z zespołem zimnych aglutynin, zauważa się aglutynację już podczas przygotowywania zawiesiny krwinek. Utrudnia ona oznaczanie grup krwi układu ABO.

6.1.12.1. Postępowanie

1. Powtórnie, z żyły zgięcia łokciowego ogrzane go uprzednio termoforem, pobrać krew „na ciepło”, czyli za pomocą zestawu ogrzanego do temperatury $37^\circ C$.
2. Część pobranej krwi przenieść do suchej próbki, część do próbki zawierającej antykoagulant ($EDTA-Na_2$), umieszczonej w naczyniu z wodą o temperaturze $37^\circ C$.
3. Po kilkakrotnym przemyciu krwinek roztworem NaCl ogrzanym do temperatury $37^\circ C$, przygotować ich zawiesinę.
4. Oddzielić od skrzepu surowicę i doprowadzić do temperatury $37^\circ C$.
5. Badania grup krwi ABO przeprowadzić w temperaturze $37^\circ C$.
6. Odczytać wyniki po 10–15-minutowej inkubacji, natychmiast po wyjęciu z termostatu.
7. Badaniu grupy krwi powinna towarzyszyć kontrola aktywności odczynników wzorcowych w tej temperaturze.

6.2. Oznaczanie grup krwi ABO u noworodków i niemowląt

Prawidłową ekspresję antygenów A i B na krwinkach czerwonych obserwuje się przeważnie od 2. roku życia dziecka. W związku z tym, w badaniach krwinek w okresie wcześniejszym, mogą wystąpić słabsze i opóźnione reakcje z odczynnikami diagnostycznymi anty-A i anty-B, w porównaniu z krwinkami dorosłych. Z drugiej strony, wytwarzanie naturalnych przeciwciał układu ABO rozpoczyna

się najczęściej w 3. miesiącu życia, co sprawia, że mogą one nie być wykrywane. Należy, więc w tych badaniach stosować metody próbówkowe.

6.2.1. Postępowanie

1. W dwóch oznakowanych próbkach umieścić po 2 krople odpowiedniego odczynnika anti-A i anti-B.
2. W dodatkowej próbce umieścić 2 krople surowicy ludzkiej grupy AB (sprawdzonej na nieobecność przeciwciał do antygenów krwinek czerwonych).
3. Do wszystkich próbek dodać po 2 krople 3–4-procentowej zawiesiny krwinek badanych w roztworze NaCl i wymieszać.
4. Zawartość próbek wirować przez 1 min przy $150\text{--}340 \times g$ lub zgodnie z zaleceniami producenta.
5. Odczytać wyniki makroskopowo, wstrząsając lekko próbkami.
6. Wykonać w ten sam sposób badanie kontrolne z zastosowaniem odczynników diagnostycznych, pochodzących z innych klonów lub serii.

UWAGI:

- A. Podany sposób postępowania nie uwzględnia badania obecności przeciwciał anti-A i/lub anti-B w surowicy noworodka, ponieważ nie są one jeszcze produkowane w wykrywalnych ilościach, a te, które można znaleźć, pochodzą od matki.
- B. Do 2. roku życia dziecka słabej ekspresji antygeny A czy B na krwinkach nie traktuje się jako słabej odmiany antygeny, lecz zaleca się powtórzenie badań w okresie późniejszym. Nie wykorzystuje się również tych wyników dla potrzeb trwałej ewidencji.
- C. Wykonanie badania kontrolnego z surowicą grupy AB ma na celu ewentualne wykrycie poliaglutynacji w przebiegu infekcji bakteryjnych. Surowicę taką można uzyskać ze zbadanych próbek krwi osób grupy AB, po wykluczeniu w niej obecności innych nieregularnych przeciwciał. Próbkę tych surowic należy przechowywać w zamrożeniu.
- D. W badaniach grup krwi noworodków i niemowląt, bardzo przydatną i czułą metodą jest mikrometoda kolumnowa.
- E. Oznaczanie grup krwi u wszystkich noworodków nie jest celowe.

6.3. Badanie antygeny D

6.3.1. Określenie antygeny D u krwiodawców

Obecność lub nieobecność antygeny D na krwinkach czerwonych decyduje o zakwalifikowaniu

ich do grupy RhD+ albo RhD-. Określenie antygeny D przeprowadza się za pomocą dwóch odczynników anti-D. U każdego pierwszorazowego dawcy badanie to wykonuje się 2-krotnie, to znaczy w dwóch próbkach pobranych w różnym czasie, za każdym razem przy użyciu dwóch różnych odczynników anti-D:

- odczynnika monoklonalnego anti-D IgM,
- odczynnika monoklonalnego anti-D IgM pochodzącego z innego klonu lub odczynnika anti-D IgM+ IgG (Blend).

W badaniach ręcznych dawców nie stosuje się testu szkiełkowego ze względu na jego mniejszą czułość, a tym samym mniejszą wykrywalność słabych odmian antygeny D.

Odczynniki anti-D IgM+ IgG można stosować u krwiodawców również w pośrednim teście antyglobulinowym.

Technika oznaczania antygeny D za pomocą odczynników monoklonalnych musi być zgodna z zaleceniami producenta. Jednocześnie z każdą serią badań należy wykonać kontrolę odczynnika anti-D z krwinkami RhD+ i RhD-.

UWAGA: Stosowane odczynniki anti-D powinny wykrywać większość przypadków o słabej ekspresji antygeny D (dawne mianownictwo D^u) oraz większość kategorii antygeny D, w tym D VI, na przykład jeśli jeden z odczynników anti-D nie rozpoznaje antygeny D VI (klon RUM-1), drugi z nich musi wykrywać tę kategorię.

6.3.1.1. Interpretacja wyników badań

Aglutynacja odczynnika anti-D z krwinkami badanymi świadczy o obecności antygeny D (wynik RhD+); brak aglutynacji wskazuje, że badane krwinki są RhD-.

6.3.1.2. Trudności w interpretacji wyników badań antygeny D

6.3.1.2.1. Słaba aglutynacja krwinek badanych z odczynnikami anti-D

Wystąpienie słabej reaktywności krwinek badanych może wskazywać na słabą ekspresję antygeny D, tak zwany D słaby (D^u) lub wskazywać na antygen D częściowy, należący do jednej z kategorii, na przykład D VI. U krwiodawców w takich przypadkach należy:

1. Wykonać badania w PTA z różnymi odczynnikami anti-D zawierającymi przeciwciała klasy IgG monoklonalne lub poliklonalne;
2. W wyjątkowych przypadkach bardzo słabej ekspresji antygeny D, potwierdzić jego obecność badaniami eluatu, po inkubacji krwinek z przeciwciałami poliklonalnymi IgG anti-D.

3. Wykrycie słabego antygeny D u dawcy nakazuje zaliczenie go do grupy RhD dodatniej. Wydany wynik powinien mieć brzmienie: RhD dodatni (słaba ekspresja antygeny D) Jako biorca RhD ujemny.

UWAGA: Przyczyny słabej ekspresji antygeny D:

- mutacja genu *D* prowadząca do zastąpienia w białku Rh w regionie śródbłonowym lub cytoplazmatycznym zazwyczaj tylko jednego aminokwasu innym i powstania fenotypu D słaby; w rzadkich przypadkach osoby z fenotypem D słaby mogą wytwarzać przeciwciała anti-D,
- mutacja genu *D* prowadząca do braku części epitopów D w regionie zewnątrzłonowym i powstania D częściowego; słabą ekspresją antygeny *D* charakteryzuje się kategoria D VI,
- wpływ genu *C* w pozycji trans.

6.3.1.2.2. Kategorie antygeny D (D częściowy)

Kategorie antygeny D charakteryzują się brakiem na krwinkach jednego lub kilku epitopów, wchodzących w jego skład. Badania w tym kierunku wykonuje się w przypadkach:

1. Obecności alloprzeciwciała anti-D u osób RhD+.
2. Rozbieżności w wynikach uzyskanych z zestawem odczynników anti-D. W takich sytuacjach, dysponując specjalnym zestawem monoklonalnych przeciwciała anti-D i wykonując badania biologią molekularną można ustalić kategorię tego antygeny. Badania te wykonuje Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT.

UWAGI:

- A. Odmiany antygeny D zaliczane do poszczególnych kategorii zdarzają się bardzo rzadko. Spośród nich najczęściej rozpoznawaną jest kategoria D VI.
- B. W praktyce rozpoznanie kategorii antygeny D dotyczy najczęściej osób Rh dodatnich, u których wykryto alloprzeciwciała anti-D; swoistość tych przeciwciała jest skierowana do epitopów antygeny D, których brak na autologicznych krwinkach.
- C. Krwiodawcy każdej rozpoznanej kategorii antygeny D zaliczani są do grupy dawców RhD dodatnich.
- D. Jakkolwiek dotychczas nie udowodniono immunogenności częściowego antygeny D kategorii D VI, wynik badania dawcy powinien mieć brzmienie: RhD dodatni (kategoria D VI) jako biorca RhD ujemny.

6.3.2. Określenie antygeny D u biorców krwi i u osób płci żeńskiej do okresu menopauzy

Każda próbka powinna być badana przy użyciu dwóch odczynników monoklonalnych anti-D:

- odczynnika monoklonalnego anti-D IgM,
- odczynnika monoklonalnego anti-D IgM pochodzącego z innego klonu lub odczynnika anti-D IgM+ IgG (Blend).

Odczynniki monoklonalne anti-D powinny być tak dobrane, aby przynajmniej jeden z nich nie wykrywał antygeny D kategorii VI.

Odczynniki anti-D IgM stosowane są do badań w teście szkiełkowym lub probówkowym w środowisku NaCl.

Nie wolno oznaczać antygeny D pośrednim testem antyglobulinowym ze względu na możliwość uzyskania fałszywie dodatniego wyniku.

Technika oznaczania antygeny D za pomocą odczynników monoklonalnych musi być zgodna z zaleceniami producenta. Jednocześnie z każdą serią badań wykonuje się kontrolę odczynnika anti-D z krwinkami RhD+ i RhD-.

UWAGI:

- A. Odczynniki nie powinny zawierać dodatkowych składników, które mogą powodować fałszywie dodatnie reakcje, jeśli krwinki chorego są opłaszczane *in vivo* przeciwciałami IgG. Jeśli producent zaleca stosowanie kontrolnego odczynnika, taka kontrola powinna być włączona jako część badania. Dodatni wynik z odczynnikiem kontrolnym (nawet słaba reakcja), uniemożliwia wydanie RhD dodatniego wyniku badanych krwinek.
- B. Odczynnik kontrolny zalecany przez producenta powinien być zawsze użyty jako część badania w przypadkach silnej autoaglutynacji krwinek spowodowanej zimnymi autoprzeciwciałami. W takich przypadkach, przed badaniem z odczynnikami anti-D, pomocne jest przemywanie krwinek roztworem NaCl ogrzanym do temperatury 37°C.

6.3.2.1. Interpretacja wyników badań

Po uwzględnieniu zamieszczonych powyżej UWAG (A i B), aglutynacja odczynnika anti-D z krwinkami badanymi świadczy o obecności antygeny D (wynik RhD+); brak aglutynacji wskazuje, że badane krwinki są RhD-.

6.3.2.2. Trudności w interpretacji wyników badań antygeny D

6.3.2.2.1. Dodatni wynik reakcji z jednym z odczynników anti-D, ujemny wynik z drugim odczynnikiem anti-D lub słaba aglutynacja krwinek badanych z obydwojoma odczynnikami

Przyczyną rozbieżności wyników może być wykrycie słabej ekspresji antygeny, tak zwany D słaby (D^w) lub antygeny D częściowego, na przykład D kategorii VI. W obu przypadkach: biorca krwi i osoba płci żeńskiej przed okresem menopauzy, powinni być traktowani jako RhD ujemni, a wydany wynik powinien mieć brzmienie: RhD ujemny (słaba ekspresja antygeny D).

W celu szczegółowego ustalenia słabej ekspresji antygeny D, świeżo pobraną próbkę krwi należy przekazać do pracowni konsultacyjnej RCKiK lub IHiT, która dysponuje odpowiednimi odczynnikami do różnicowania kategorii D i antygeny D słaby.

Osoby, u których wykryto kategorię D VI antygeny D lub antygen D słaby są zaliczane do grupy RhD ujemnej i do przetoczenia dobiera się im krew RhD ujemną, a kobiety są objęte profilaktyką konfliktu RhD.

6.3.3. Dwie populacje krwinek w następstwie niedawnej transfuzji

U chorych, którym przetoczono krew niezgodną pod względem antygeny D (np. osobie RhD+, krew RhD-), można zaobserwować dwie populacje (duże aglutynaty na tle wolnych krwinek) po kontakcie krwinek badanych z odczynnikiem anty-D. Należy wówczas:

1. Sprawdzić, jaką krew i kiedy otrzymywał chory oraz jego wcześniejsze wyniki badań.
2. Ustalić Rh po oddzieleniu krwinek chorego od przetoczonych według metody 5.8. lub powtórzyć badanie po upływie trzech miesięcy od ostatniego przetoczenia.

6.4. Określanie antygenów krwinek czerwonych różnych układów grupowych i ich dokumentacja

Badania fenotypów poszczególnych układów grupowych wykonuje się u wszystkich wielokrotnych dawców grupy O i w miarę możliwości innych grup krwi. Celem tych badań jest:

1. Wydzielenie dawców homozygot w poszczególnych układach grupowych i rezerwowanie pobranych od nich jednostek krwi dla chorych — wielokrotnych biorców, którzy wytworzyli alloprzeciwciała odpornościowe.
2. Utworzenie zestawów krwinek wzorcowych do badań diagnostycznych poprzez wybranie osób, u których skład antygenowy krwinek jest przydatny do identyfikacji przeciwciał. Należą do nich:
 - a) krwinki homozygot w 2 lub kilku układach grupowych: DCCee, DccEE, dccee, MM, SS, ss, Fy(a-b+), Fy(a+b-), Jk(a-b+), Jk(a+b-),

b) krwinki niezawierające antygenów powszechnych, na przykład: KK, Kp(a+b-), Lan-, Ge-, Rhnull, Bombay, Vel-, Yt(a-), Yk(a-), LW(a-), Co(a-),

c) krwinki posiadające antygeny o niskiej lub bardzo niskiej częstości występowania, na przykład: C^w, Kp^a, Lu^a, Wr^a, Di^a, Jn^a, KREP.

Badania fenotypowe wykonuje się również u chorych w przypadkach:

1. Obecności alloprzeciwciał odpornościowych. Określa się wówczas fenotyp układu grupowego, w którym występują wykryte alloprzeciwciała oraz fenotyp Rh i antygen K.
2. Niedokrwistości autoimmunohemolitycznej typu ciepłego. Określa się fenotyp Rh i antygen K.
3. W badaniach związanych z przeszczepianiem macierzystych komórek układu krwiotwórczego (oznaczenia fenotypu u dawcy i u biorcy).

Badania fenotypów krwinek czerwonych u krwiodawców należy wykonać 2-krotnie, posługując się dwoma próbkami krwi z różnych pobrań. Uzyskanie zgodnych wyników z dwóch niezależnie pobranych próbek, upoważnia do ich wpisania w kartotekę dawcy. Fenotypy krwinek czerwonych u chorych można określać w jednej próbce krwi.

Obecnie do badań fenotypowych stosuje się odczynniki monoklonalne komercyjne. Określenie niektórych antygenów wymaga jednak zastosowania odczynników pochodzenia ludzkiego. Metodyka badań winna być zgodna z zaleceniem producenta. Odczynniki sprawdzone przez pracownię kontroli jakości są przekazywane do pracowni wykonujących te badania wraz z polską wersją metodyki badania.

6.4.1. Określanie fenotypu Rh

Badania fenotypu układu Rh wykonuje się przede wszystkim metodą próbówkową w środowisku NaCl, za pomocą odczynników monoklonalnych: anty-D, anty-C, anty-c, anty-E, anty-e, i w miarę możliwości anty-C^w. Każda seria badań wymaga równoległego stosowania, dla każdego odczynnika, kontroli dodatniej z krwinkami o pojedynczej dawce antygeny i kontroli ujemnej z krwinkami nieposiadającymi danego antygeny. Fenotyp Rh można określać również metodą kolumnową i w automatach.

UWAGI:

- A. Jakkolwiek wiadomo obecnie, że gen d nie istnieje, symbol ten jest dotychczas pozostawiony i wskazuje na brak genu i antygeny D (np. dccee). Nie ma potrzeby pisać tego symbolu podwójnie.
- B. Ustalenie fenotypu Rh nie zawsze pozwala na wyciąganie pewnych wniosków odnośnie geno-

Tabela 7. Częściej spotykane fenotypy osób RhD+ i ich najbardziej prawdopodobne genotypy**Table 7.** More frequent phenotypes in RhD positive persons and their most probable genotypes

Fenotyp Rh	Najbardziej prawdopodobny genotyp
DCcee	DcE/ce
DCCee	DcE/DcE
DCcEe	DcE/DcE
DccEe	DcE/ce
DccEE	DcE/DcE
Dccee	Dce/ce
DCCEe	DCE/DcE
DCcEE	DCE/DcE

typu, gdyż wymaga to badań rodzinnych lub genetycznych. W oparciu o wiedzę na temat częstości występowania poszczególnych kombinacji antygenów, na podstawie fenotypu można jedynie przewidywać najbardziej prawdopodobny genotyp (tab. 7).

6.4.2. Określanie fenotypów w innych układach grupowych

Podobnie jak w badaniach antygenów Rh, do określania większości antygenów innych układów grupowych stosowane są najczęściej odczynniki monoklonalne. Najbardziej polecaną metodą jest metoda próbkiowa, umożliwiająca bardzo szybkie uzyskanie czytelnych i jednoznacznych wyników. Ze względu na stosowane środowisko NaCl, badania takie mogą być wykonywane również na krwinkach opłaszczonych autoprzeciwciałami typu ciepłego (chorzy z NAIH). Do określania niektórych antygenów, na przykład antygenów układu Duffy konieczne jest stosowanie testu antyglobulinowego.

Wszystkie wyniki badań fenotypowych wykonywanych metodami klasycznymi (ręcznymi) należy dokumentować zgodnie z poniżej podanym przykładem.

Tabela 8. Przykład dokumentacji badań fenotypów krwinek czerwonych**Table 8.** The example of red blood cell phenotypes documentation

Data	Nazwisko, imię	Odczynniki diagnostyczne anty:							
		-D	-C	-C ^w	-c	-E	-e	-K	-k
	Kontrola +	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
	Kontrola -	0	0	0	0	0	0	0	0
	Próbka nr:	4+	4+	0	4+	0	4+	0	4+

Do kontroli dodatkowo służą krwinki o pojedynczej dawce danego antygeny.

Przykład dokumentacji badań fenotypów krwinek czerwonych podano w tabeli 8.

6.4.3. Populacja dawców z oznaczonymi antygenami krwinek czerwonych dla potrzeb krwiolecznictwa

Centrum powinno dysponować KKCz od wyselekcjonowanych dawców — homozygot w zakresie różnych układów grupowych, gdyż taka krew jest niezbędna dla chorych uodpornionych antygenami krwinek czerwonych. Krew ta pochodzi głównie od dawców grupy O, ponieważ ich krwinki można przetoczyć również biorcom innych grup krwi.

W immunizacji poprzetoczeniowej największe znaczenie kliniczne, poza antygenem D, ma antygen K z układu Kell oraz u biorców D dodatnich antygeny E, i C z układu Rh. Rzadziej, za uodpornienie odpowiedzialne są antygeny: Jk^a z układu Kidd; S, s z układu MNS; Fy^a z układu Duffy; e z układu Rh. Niezbędne jest, więc dysponowanie krwią dawców grupy O oraz innych grup ABO o następujących fenotypach:

1. Z układu Rh: DCCee, DCcee, DccEE, dccee.
2. Z układu Kell: K-.
3. Z układu Kidd: Jk(a-b+), Jk(a+b-).
4. Z układu Duffy: Fy(a-b+), Fy(a+b-).
5. Z układu MNS: SS, ss, NN.

Biorąc pod uwagę, że uodpornienie może mieć charakter wieloswoisty, na przykład biorca wytworzy przeciwciała anti-c i anti-Jk^a, albo anti-e, anti-K i anti-S, istotne jest dysponowanie KKCz dawców z odpowiednimi fenotypami występującymi jednocześnie w kilku układach grupowych, na przykład:

- DCCee K- Jk(a-b+) SS,
- DccEE K- Fy(a-b+) ss.

Biorcy, którzy wytworzyli jakiegokolwiek alloprzeciwciała odpornościowe do antygenów krwinek czerwonych, powinni otrzymywać krew nieposiadającą odpowiedniego antygeny oraz zgodną fenotypowo w układzie Rh i Kell. Postępowanie takie podyktowane jest znanym spostrzeżeniem, że biorca

zdolny do odpowiedzi immunologicznej na jeden antygen krwinek czerwonych, uodparnia się niejednokrotnie innym antygenem; najczęściej spośród tych, które są bardziej immunogenne.

KKCz wszystkich dawców, których krwinki nie zawierają antygenów występujących z dużą lub bardzo dużą częstością (ponad 95%) powinny być przechowywane w stanie zamrożenia jako zabezpieczenie dla chorych z obecnymi przeciwciałami do antygeny powszechnego. Przykłady takich fenotypów to: Bombay (Oh), dccEE, Rhnull, KK, Kp(b-), p, Lu(b-), Lan-, Co(a-), Ge-2, -3.

Spośród swoistości przeciwciał występujących przeważnie jako naturalne, w niektórych przypadkach wykrywana jest ich aktywność również w 37°C. Należą do nich: anty-Le^a, anty-M, a wyjątkowo rzadko anty-P₁ i anty-A₁. Dla takich biorców powinna być dostępna krew o fenotypach: Le(a-b-), P₂, i NN. Dobranie krwi dla biorcy z przeciwciałami anty-A₁ aktywnymi w temperaturze 37°C musi być poprzedzone wyszukaniem krwi A₂ za pomocą lektyny anty-A₁.

Dane o krwiodawcach z rzadko spotykanymi fenotypami krwinek czerwonych powinny się znaleźć w krajowym rejestrze.

6.5. Wykrywanie przeciwciał odpornościowych

6.5.1. Wykrywanie przeciwciał u biorców krwi, kobiet ciężarnych oraz dawców i biorców krwiotwórczych komórek macierzystych

W badaniach stosuje się zestaw krwinek umożliwiający wykrycie przeciwciał z układu Rh, przeciwciał anty-K oraz innych skierowanych do antygenów o dużej immunogenności. W zestawie powinny znajdować się krwinki zawierające antygeny w podwójnej dawce, co umożliwia wykrycie słabo reagujących przeciwciał (tab. 1). Badanie wykonuje się za pomocą dwóch testów: PTA, który wykrywa przeciwciała odpornościowe ze wszystkich układów grupowych i LEN, który jest najczulszy w wykrywaniu przeciwciał z układu Rh. Najprostszym zestawem powinien składać się z dwóch rodzajów krwinek RhD dodatnich, zawierających antygen C^w (np. DC^wCee) oraz antygen E w podwójnej dawce (DccEE) oraz z krwinek RhD ujemnych K dodatnich. Krwinki wzorcowe należy tak dopasować, aby znajdowały się w nich następujące fenotypy: Fy (a+b-), Fy(a-b+), Jk(a+b-), Jk(a-b+), MMss, NNSS, Le(a+b-), Le(a-b+), P₁. Wykrycie przeciwciał w jednym lub obydwu testach zobowiązuje do ustalenia ich swoistości.

UWAGA: W badaniu automatycznym można pominąć test enzymatyczny.

6.5.2. Wykrywanie przeciwciał u dawców krwi

U krwiodawców nie wykrycie słabo aktywnych przeciwciał nie jest istotne, gdyż nie zagraża bezpieczeństwu biorcy. Dlatego można posłużyć się jednym rodzajem krwinek zawierającym wszystkie klinicznie istotne antygeny w pojedynczej dawce. Dopuszcza się również stosowanie 2 rodzajów krwinek pochodzących od dwóch dawców i spulowanych w równych objętościach. W poszukiwaniu alloprzeciwciał odpornościowych u krwiodawców stosuje się wyłącznie pośredni test antyglobulinowy.

UWAGA: Stosowanie spulowanych krwinek w poszukiwaniu alloprzeciwciał odpornościowych u innych osób poza krwiodawcami jest niedopuszczalne.

6.6. Określanie swoistości przeciwciał

Przykład zestawu krwinek czerwonych do identyfikacji najczęściej spotykanych przeciwciał odpornościowych przedstawiono w tabeli 2.

Fenotypy z poszczególnych układów grupowych nie muszą być ze sobą skojarzone. Natomiast konieczne jest dysponowanie krwinkami, które są Rh ujemne (dccee) K dodatnie i Rh ujemne K ujemne.

Określając swoistość alloprzeciwciał, należy do zestawu krwinek wzorcowych grupy O włączyć krwinki autologiczne oraz jednoimienne w układzie ABO. Krwinki autologiczne stanowią kontrolę dla autoprzeciwciał, natomiast krwinki jednoimienne ułatwiają diagnostykę tych, które są skierowane jednocześnie do kompleksu dwóch antygenów, w tym antygeny H. Takim przykładem są alloprzeciwciała anty-Le^bH, reagujące tylko z krwinkami zawierającymi antygen Le^b i H.

Ustalenie swoistości alloprzeciwciał powinno opierać się na wynikach dodatnich, z co najmniej dwoma rodzajami krwinek wzorcowych zawierających dany antygen/y i z co najmniej dwoma niezawierającymi danego antygeny/ów. Od zasady tej można odstąpić tylko wtedy, jeśli wykryje się przeciwciała do antygeny występującego albo powszechnie, albo bardzo rzadko w populacji.

W przypadkach, gdy badania sugerują obecność w surowicy przeciwciał o kilku swoistościach, ich identyfikacja często wymaga stosowania adsorpcji przez wybrane krwinki oraz badań wykonanych z nich eluatów.

Każdą ustaloną swoistość alloprzeciwciał należy potwierdzić wykazaniem nieobecności danego antygeny na krwinkach osoby badanej.

6.7. Przeznaczenie krwi dawców, u których wykryto przeciwciała odpornościowe

Obecność przeciwciał odpornościowych dyskwalifikuje krew pełną i wszystkie jej składniki do przetoczenia noworodkom, niezależnie od wysokości miana przeciwciał.

Innym grupom wiekowym można przetaczać krew pełną i wszystkie jej składniki tylko wówczas, jeśli miano przeciwciał odpornościowych jest mniejsze od 10. Wyjątek stanowi KKCz w roztworze wzbogacającym (np. SAGM, ADSOL). Ten składnik można przetaczać, jeśli miano przeciwciał odpornościowych jest mniejsze niż 50.

UWAGA: Decyzję o zakwalifikowaniu krwi i jej składników do przetoczenia należy podejmować po wykonaniu badania miana przeciwciał odpornościowych w każdej donacji.

6.7.1. Kwalifikacja osocza z przeciwciałami do produkcji produktów krwiopochodnych

Do produkcji produktów krwiopochodnych można zakwalifikować osocze z przeciwciałami odpornościowymi o mianie nie wyższym niż 4. Od zasady tej można odstąpić, jeśli frakcjonator ma inne wymagania.

Osocze z przeciwciałami odpornościowymi można wykorzystywać, sporządzając z niego próbki do badań kontroli jakości w pracowniach serologicznych zakładów opieki zdrowotnej i do celów szkoleniowych w Centrum Krwiodawstwa.

Mężczyźni — krwiodawcy, u których wykryto przeciwciała anty-D powinni być werbowani do przeprowadzenia dalszej planowanej immunizacji, w celu uzyskania odpowiedniego miana przeciwciał do produkcji immunoglobuliny anty-RhD.

7. Próba serologicznej zgodności biorcy i dawcy przed przetoczeniem krwi

Bezpieczna i efektywna transfuzja wymaga od pracowników laboratorium spełnienia następujących warunków:

- stałego zwracania uwagi na stosowanie sprawdzonych odczynników diagnostycznych i na prawidłowe wykonywanie obowiązujących badań, eliminacji błędów „ludzkich”,
- zapoznania się z serologiczną przeszłością chorego (przetoczenia krwi, ciąży, informacje o przeciwciałach wykrywanych w przeszłości). Dane na ten temat zawarte są w takich dokumentach, jak: wpisy w dokumentach osobistych, karty informacyjne ze szpitali, dokumentacja w książeczce usług medycznych, wyniki badań będące w posiadaniu pacjenta.

7.1. Zasady stanowiące serologiczną podstawę krwiolecznictwa

1. Przetacza się krew zgodną w zakresie antygenów układu ABO i antygeny D z układu Rh.
2. Przetaczana krew nie może zawierać antygeny reagującego z przeciwciałami biorcy lub antygeny, który był odpowiedzialny za stwierdzoną alloimmunizację w przeszłości.
3. W celu zapobiegania dalszej immunizacji, chorym, którzy kiedykolwiek wytworzyli alloprzeciwciała odpornościowe i chorym, u których stwierdza się autoprzeciwciała aktywne w temperaturze 37°C, należy dobierać krew zgodną fenotypowo w układzie Rh i zgodną w antygenie K z układu Kell.
4. Osobom płci żeńskiej do okresu menopauzy należy w miarę możliwości oznaczać antygen K i jeżeli jest on nieobecny, dobierać krew K ujemną.
5. Próbę zgodności należy wykonywać również w przypadkach zaleconego przetoczenia KKP i koncentratu granulocytów z domieszką krwinek czerwonych (> 5 ml), na którą wskazuje czerwonawe zabarwienie tych składników.

7.2. Odstępstwa od zasad

7.2.1. Dobieranie do przetoczenia KKCz grupy O chorym innej grupy

Dobieranie do przetoczenia KKCz grupy O chorym innej grupy jest dopuszczalne w następujących okolicznościach:

- stany zagrażające życiu, gdy brak krwi jednoimiennej,
- obecność alloprzeciwciał odpornościowych, przy braku zgodnej krwi jednoimiennej,
- bardzo słaba ekspresja antygeny A lub B, albo trudności w określeniu grupy ABO,
- brak krwi RhD ujemnej jednoimiennej w układzie ABO.

7.2.2. Dobieranie do przetoczenia KKCz grupy A lub B chorym grupy AB

Dobieranie do przetoczenia KKCz grupy A lub B chorym grupy AB jest dopuszczalne, gdy brak jest krwi jednoimiennej.

7.2.3. Dobieranie krwi do masywnych przetoczeń

Masywnym przetoczeniem określa się objętość krwi przetoczonej w ciągu 24 godzin, równą objętości krwi krążącej u chorego. Dobranie krwi polega na sprawdzeniu zgodności w układzie ABO biorcy i dawców, natomiast próby zgodności nie wykonuje się.

7.3. Właściwa próba zgodności

Właściwą próbę zgodności (reakcja surowicy biorcy z krwinkami dawcy) uzupełnia się następującymi badaniami:

1. Badanie przeglądowe surowicy biorcy w teście LEN i PTA, w kierunku alloprzeciwciał odpornościowych.
2. Kontrola antygenów A i B u dawcy i biorcy za pomocą odczynników monoklonalnych anti-A i anti-B.
3. Kontrola antygeny D u biorcy za pomocą odczynnika monoklonalnego anti-D niewykrywającego antygeny D kategorii VI, a gdy biorca jest RhD ujemny; również kontrola antygeny D u dawcy za pomocą antygeny D wykrywającego antygen D kategorii VI.

UWAGA: Wyżej wymienione badania można wykonywać jednocześnie z próbą zgodności.

7.3.1. Krew biorcy

Próbę zgodności i wszystkie towarzyszące jej badania wykonuje się z próbki krwi chorego, oddzielnie w tym celu pobranej. Nie należy wykonywać próby zgodności z tej samej próbki, która służyła do oznaczenia grup krwi chorego. Od zasady tej można odstąpić tylko w wyjątkowych, umotywowanych okolicznościach.

Pobrana w szpitalu próbka krwi biorcy powinna być przekazana do laboratorium wraz ze skierowaniem na próbę zgodności (wzór 6, *patrz* Załącznik). Po sprawdzeniu danych na etykiecie próbki i danych na skierowaniu, próbkę krwi należy oznaczyć numerem rejestracyjnym i wpisać do książki prób zgodności (wzór 7, *patrz* Załącznik). Druga rubryka książki jest przeznaczona dla kolejnych numerów biorców. W przypadku badań kilku pojemników krwi, w rubryce drugiej wpisuje się tylko raz numer biorcy, który należy nanieść na próbkę z jego krwią. Nie należy oznakowywać poszczególnych donacji dodatkowym numerem.

7.3.2. Krew dawcy

Do próby zgodności służy próbka krwi z segmentu drenu, odciętego od pojemnika z krwią pełną konserwowaną lub z koncentratem krwinek czerwonych.

Przed odcięciem segmentu drenu należy sprawdzić zgodność numeru donacji i grupy krwi na etykiecie segmentu i pojemnika oraz wpisać w książce prób zgodności dane dotyczące dawcy (grupa krwi, numer donacji).

W przypadkach, w których przygotowuje się dla chorych przemywany KKCz oraz inne składniki komórkowe zanieczyszczone krwinkami czerwonymi

(> 5 ml), na co wskazuje czerwone zabarwienie koncentratu, próbę zgodności należy wykonać przed sporządzeniem tych koncentratów.

Próbki krwi dawców należy odwirować i wyeliminować te z nich, których wygląd wskazuje na silną hemolizę lub proces bakteryjny (czerwone zabarwienie osocza, fioletowe zabarwienie krwinek). Jeżeli hemolizę udaje się usunąć po jednym przemyciu, nadają się one do próby zgodności.

Jeżeli w badaniu przeglądowym u biorcy nie wykryto przeciwciał odpornościowych oraz jeśli brak jest informacji o uodpornieniu w przeszłości, jak również, jeśli u biorcy nie stwierdza się auto-przeciwciał typu ciepłego; do przetoczenia dobiera się krew od tak zwanego przypadkowego dawcy zgodnego w układzie ABO i w antygenie D z biorcą.

Krew od dawcy wyselekcjonowanego dobiera się:

1. Biorcom, u których wykryto (obecnie lub w przeszłości) alloprzeciwciała odpornościowe. W tych przypadkach dobiera się krew bez antygeny odpowiadającego przeciwciałom, zgodną fenotypowo w układzie Rh i antygenie K. Nie ma obowiązku wykonywania kontroli antygenów w dobieranej krwi, jeśli w systemie komputerowym Centrum Krwiodawstwa znajdują się protokoły oznaczeń tych antygenów, wykonanych u dawcy 2-krotnie.

Jeżeli w danej chwili nie jest dostępna krew o wymaganym fenotypie, należy w próbkach krwi przypadkowych dawców określić odpowiednie antygeny i wybrać do próby zgodności tylko taką krew, która ich nie zawiera. Czynności te wykonuje Centrum Krwiodawstwa.

2. Biorcom, u których wykryto autoprzeciwciała typu ciepłego (BTA dodatni) dobiera się krew zgodną fenotypowo w układzie Rh i antygenie K.
3. Biorcom płci żeńskiej K ujemnym do okresu menopauzy dobiera się krew K ujemną.

7.3.3. Postępowanie w przypadku rozbieżności w wyniku badania grupy krwi biorcy z danymi na skierowaniu

1. Zawiadomić odpowiedni oddział szpitalny i zlecić ponowne pobranie próbki od chorego.
2. Wykonać w tej próbce pełne badanie grup układu ABO i antygeny D.
3. Przeprowadzić działanie wyjaśniające, w jaki sposób doszło do pomyłki.

Jeżeli w danym przypadku został wydany fałszywy wynik należy:

1. Anulować wpis fałszywego wyniku we wszystkich dokumentach i zastąpić prawdziwym wynikiem.
2. Zobowiązać oddział szpitalny do zlecenia pilnego wykonania kontrolnego badania grup krwi

u wszystkich chorych, którym pobrano w tym dniu krew do oznaczeń grupowych.

3. Skonfrontować otrzymane wyniki z wynikami uzyskanymi uprzednio i anulować we wszystkich dokumentach fałszywe wyniki, zastępując je wynikami prawdziwymi.

7.3.4. Postępowanie w przypadku rozbieżności między wynikiem grupy krwi w próbce z segmentu drewna i danymi na etykiecie pojemnika

1. Nie dobierać do przetoczenia tej krwi.
2. Zgłosić rozbieżność w wynikach oznaczeń do banku krwi, który ma obowiązek przekazania jednostki krwi oraz wyników badań do centrum skąd pochodziła krew.

Postępowanie w centrum:

1. Wykonać pełne badanie grup krwi z próbki pobranej z pojemnika i z próbki pobranej ponownie od dawcy.
2. Skontrolować grupy krwi we wszystkich segmentach przy pojemnikach pobranych w tym samym dniu, a w przypadku wykrycia rozbieżności wycofać taką krew i składniki z niej sporządzone oraz przeprowadzić badania kontrolne u dawców.

7.3.5. Wykonanie próby zgodności w metodzie ręcznej techniką próbówkową

1. Przygotować zaplanowaną liczbę odpowiednio oznakowanych próbek (nr biorcy, nr donacji).
2. Po odwirowaniu próbki krwi biorcy przenieść surowicę/osocze do oddzielnej próbki.
3. Krwinki dawcy z segmentu drewna umieścić w próbce i przemyć roztworem NaCl, a następnie roztworem LISS i sporządzić 3–4-procentowej zawiesiny w tym roztworze.
4. Surowicę biorcy badać z krwinkami dawców w teście PTA LISS, zgodnie z metodyką przedstawioną w pkt. 5.4.1.4.2.

UWAGI:

- A. Wykonanie próby zgodności można zastąpić testami mikrokolumnowymi lub innymi, zatwierdzonymi przez IHiT.
- B. Jeżeli badanie w kierunku obecności przeciwciał odpornościowych w surowicy biorcy odbywa się jednocześnie z wykonaniem właściwej próby zgodności, badania wymienione w pkt. 4. należy uzupełnić badaniami surowicy biorcy z zestawem krwinek wzorcowych.
- C. Optymalnym zabezpieczeniem biorcy przed ryzykiem powikłania hemolitycznego jest wykonywanie badań w kierunku przeciwciał odpornościowych w dniu dobierania krwi. W przypad-

kach wyjątkowo pilnego jej dobrania, wynik tego badania, wykonanego nie później niż przed 48 godzinami, można uznać za miarodajny, o ile w tym czasie nie była przetaczana krew.

- D. Jeżeli u chorego wykryto autoprzeciwciała typu zimnego reagujące w temperaturze pokojowej, to podczas wykonywania próby zgodności musi być ściśle przestrzegana temperatura 37°C (krwinki przemywa się roztworem NaCl i LISS o temp. 37°C).

7.3.6. Odczytywanie i interpretacja wyników próby zgodności

Wyniki odczytuje się makroskopowo. Próbę należy ocenić jako zgodną, jeśli otrzymano ujemny wynik z krwinkami dawcy, a z krwinkami wzorcowymi nie wykryto alloprzeciwciał lub wykluczono obecność dodatkowych alloprzeciwciał oprócz dotychczas zidentyfikowanych.

Stwierdzenie aglutynacji z krwinkami dawcy i wzorcowymi, lub tylko z jednymi z nich, wskazuje na obecność alloprzeciwciał. Należy ustalić ich swoistość i dobrać choremu krew niezawierającą odpowiadającego im antygeny. Jeśli brak czasu nie pozwala na przeprowadzenie szybkiej identyfikacji przeciwciał, należy próbę zgodności przeprowadzić z większą liczbą próbek krwi dawców. Przed rozpoczęciem przetoczenia dobranej, serologicznie zgodnej krwi, należy zlecić pobranie od chorego 5–10 ml krwi do suchej próbki w celu określenia swoistości alloprzeciwciał.

Wykrycie w surowicy biorcy alloprzeciwciał reagujących tylko z krwinkami wzorcowymi, a nie reagujących z krwinkami dawcy, nie upoważnia do wniosku, że taką krew można przetoczyć; decyzję tę można podjąć dopiero po zidentyfikowaniu przeciwciał i po stwierdzeniu, że krwinki dawcy nie zawierają antygeny, na który uodpornił się biorca.

W wyjątkowych przypadkach, gdy odstępianie od przetoczenia zagraża życiu chorego, lekarz kierujący na próbę zgodności może zdecydować o przetoczeniu krwi przed zidentyfikowaniem przeciwciał.

Jeżeli surowica biorcy reaguje z całym zestawem krwinek użytych do wykrywania alloprzeciwciał oraz z próbkami dobieranych krwinek, należy badania uzupełnić autokontrolą. Dodatni wynik autokontroli wskazuje na obecność autoprzeciwciał i należy wówczas wykonać u biorcy BTA. Jeżeli BTA jest dodatni należy zlecić wykonanie badań diagnostycznych w kierunku niedokrwistości autoimmunohemolitycznej i w dobraniu krwi należy stosować się do zasad obowiązujących dla tej grupy chorych.

Ujemny wynik autokontroli może świadczyć o obecności wieloswoistych przeciwciał albo prze-

ciwiał do powszechnego antygenu. W przypadku niektórych chorych, za słabo dodatnie reakcje surowicy biorcy ze wszystkimi krwinkami, może być odpowiedzialny dopełniacz, zaadsorbowany *in vitro*. Wówczas próbę zgodności należy powtórzyć w klasycznym PTA lub zastosować odczynnik antyglobulinowy anty-IgG.

Jeżeli u biorcy nie wykryto przeciwciał odpornościowych, a w próbie zgodności PTA był dodatni z jedną spośród dobieranych próbek krwi dawców, należy rozważyć dwie możliwości:

- obecność u biorcy alloprzeciwciał do rzadko występującego antygenu obecnego u dawcy i nieobecnego w zestawie krwinek wzorcowych,
- dodatni BTA u dawcy.

Różnicowanie należy przeprowadzić na podstawie wyniku BTA u dawcy. Częstość wykrywania dodatniego BTA ocenia się na 1/10 000–1/14 000 zdrowych krwiodawców. Krew dawcy z dodatnim BTA nie może służyć do przetoczenia, ponieważ próby krzyżowe zawsze będą niezgodne. BTA u dawcy należy kontrolować przez rok, gdyż może stać się on ujemny. Dawca może oddawać osocze metodą aferezy.

UWAGI:

- A. U biorców systematycznie leczonych krwią oraz u tych, którym przetaczano krew w ciągu ostatnich 3 miesięcy, należy bezwzględnie przestrzegać okresu ważności próby zgodności, który wynosi do 48 godzin od momentu pobrania próbki krwi od chorego. Te same zasady odnoszą się do okresu ważności testu przeglądowego na obecność przeciwciał odpornościowych. Jeżeli krew nie została w tym okresie przetoczona, obowiązuje powtórzenie próby zgodności ze świeżo pobraną próbką krwi.
- B. Nie ma różnic w technice dobierania krwi dla biorców, u których zamierza się przeprowadzić zabieg operacyjny w hipotermii, w szczególności nie należy poszukiwać u nich przeciwciał aktywnych w temperaturze poniżej 37°C. Nie ma, bowiem żadnych dowodów, aby niszczyły one przetoczone krwinki.
- C. Wystąpienie reakcji dodatniej w próbie zgodności wykonywanej u kobiety ciężarnej lub położnicy, świadczącej o obecności alloprzeciwciał, nakazuje przeprowadzenie badań u matki i ewentualnie u dziecka w kierunku konfliktu serologicznego.

Próbki krwi dawców i biorców (krew pełną i oddzieloną surowicę), należy zabezpieczyć po zakończonej próbie zgodności i przechowywać w lodówce przez 5 dni, w temperaturze 2–6°C, w celu umożliwienia badań serologicznych w razie wystąpienia powikłań poprzetoczeniowych.

7.3.7. Formułowanie wyników próby zgodności

Wynik próby zgodności wypisuje się na specjalnym formularzu (wzór 8, *patrz* Załącznik). Po jego wypełnieniu dwie osoby mają obowiązek skontrolowania zgodności wszystkich danych z protokołem w książce oraz z etykietami na próbówce z krwią biorcy i segmentach drenów. Wynik próby zgodności musi być podpisany przez 2 osoby, a mianowicie przez osobę badającą oraz osobę kontrolującą i interpretującą wyniki badania. Musi być on określony jednoznacznie:

- krew dawcy nr zgodna,
 - krew dawcy nr niezgodna,
 - krew dawcy nr serologicznie niezgodna (autoprzeciwciała), fenotypowo zgodna.
- Krew można przetoczyć choremu.

W formularzu trzeba uzupełnić wynik rezultatem kontrolnego badania grupy ABO i Rh chorego oraz dawcy, a także informacją o obecności lub niewykryciu przeciwciał odpornościowych.

UWAGA: Do badań w godzinach pozaregularnych dopuszcza się jedną osobę — diagnostę laboratoryjnego mającego aktualne zaświadczenie upoważniające do wykonywania badań.

7.3.8. Dobieranie krwi do pilnej transfuzji w nagłych przypadkach

W przypadkach uzasadnionego wskazania do natychmiastowego przetoczenia krwi, na pisemne zlecenie lekarza prowadzącego lub lekarza odpowiedzialnego za gospodarkę krwią (wzór 9, *patrz* Załącznik), można przed wykonaniem próby zgodności wydać zamówioną krew. Należy wówczas wykonać następujące czynności:

1. Zarejestrować próbki krwi biorcy i dawców w książce prób zgodności.
2. Określić za pomocą odczynników monoklonalnych antygeny ABO i D u biorcy i dawców.
3. Udokumentować wyniki badań w książce prób zgodności.
4. Wydać wyniki badań wraz z pojemnikami z krwią.
5. Niezwłocznie przystąpić do wykonania próby zgodności.

UWAGI:

- A. Nie należy przyjmować zleceń telefonicznych.
- B. Jeżeli wynik próby zgodności wskazuje na niezgodność; natychmiast powiadomić lekarza.

W wyjątkowo nagłych przypadkach lekarz może zdecydować o przetoczeniu KKCz grupy O bez badania grup krwi u biorcy i kontroli u dawcy. Decyzja taka powinna zostać odnotowana na zapotrzebowaniu na krew do pilnej transfuzji. Jeżeli pilna transfuzja dotyczy kobiet, to do okresu menopauzy

należy wydać KKCz grupy O RhD– (minus). Po wydaniu pojemników z krwią należy natychmiast przystąpić do badań wymienionych powyżej.

7.4. Badania wykonywane przed przetoczeniem krwi u noworodków i niemowląt w ciągu pierwszych 4 miesięcy życia

Przed przetoczeniem krwi w ciągu pierwszych 4 miesięcy życia należy:

1. Określić grupę krwi w układzie ABO i antygen D z układu Rh u matki i u dziecka.
2. Wykonać badania w kierunku obecności alloprzeciwciał odpornościowych w surowicy matki.
3. U dziecka wykonać BTA.

Jeżeli w surowicy matki nie wykrywa się odpornościowych alloprzeciwciał, a u dziecka BTA jest ujemny, należy wydać do przetoczenia krew zgodną z krwinkami dziecka w układzie ABO i antygenie D bez próby zgodności; pod warunkiem sprawdzenia we krwi przeznaczonej do przetoczenia grupy ABO i antygeny D. Wyniki tych badań należy udokumentować w książce prób zgodności. Zasady te można stosować nawet przy wielokrotnych transfuzjach (wzór 10, *patrz* Załącznik).

Jeżeli u matki wykryto przeciwciała odpornościowe, należy dziecku dobierać krew bez odpowiadającego im antygeny i przed każdym przetoczeniem wykonywać próbę zgodności z surowicą matki.

W takich przypadkach należy pobrać od matki około 10 ml krwi, a odciągniętą surowicę podzielić na małe porcje i przechować w zamrożeniu. Będą one służyły do kolejnych prób zgodności. Jeżeli krew matki jest niedostępna, należy sprawdzić obecność odpornościowych przeciwciał w surowicy dziecka oraz przed pierwszą transfuzją wykonać próbę zgodności. Ujemne wyniki w obu badaniach upoważniają do nie wykonywania prób zgodności przed następnymi transfuzjami. Natomiast wykrycie odpornościowych przeciwciał w surowicy dziecka zobowiązuje do określenia ich swoistości i przeprowadzenia prób zgodności przed każdą transfuzją.

Dzieciom grupy A lub B urodzonym przez matki grupy O należy przetaczać krwinki grupy O. W tych przypadkach krew grupy jednoimiennej z dzieckiem można przetaczać po przeprowadzeniu badań surowicy matki, które wykazały nieobecność przeciwciał anti-A lub anti-B klasy IgG lub po wykonaniu próby zgodności z surowicą dziecka za pomocą PTA.

UWAGA: Badania u noworodka można wykonywać z krwi pępowinowej.

7.5. Badania wykonywane przed autotransfuzją

U chorych przed pobraniem krwi do autotransfuzji należy wykonać:

- badania przeglądowe w kierunku markerów wirusów: HBsAg, anty-HCV i anty-HIV 1,2 oraz w kierunku kiły,
- oznaczenie grupy krwi układu ABO i antygeny D z układu Rh, zgodnie z technikami stosowanymi u krwiodawców,
- badanie w kierunku obecności przeciwciał odpornościowych, skierowanych do krwinek czerwonych.

Przed autotransfuzją należy wykonać:

- kontrolę grupy ABO z próbki krwi pobranej z segmentu drenu i skonfrontować ją z wynikiem grupy krwi chorego,
- próbę zgodności.

UWAGI:

- A. Dodatni wynik w którymkolwiek z testów wykrywających zakażenie przenoszone drogą krwi stanowi przeciwwskazanie do pobrania tej krwi w celu autotransfuzji.
- B. Wykrycie alloprzeciwciał odpornościowych nie stanowi przeciwwskazania do pobrania krwi w celu autotransfuzji.
- C. Niewykorzystaną krew i jej składniki należy zniszczyć. Nie wolno przetaczać jej innemu choremu. Wyjątek stanowią koncentraty krwinek czerwonych niezawierające któregoś z powszechnych antygenów, które należy przechować w zamrożeniu.

8. Immunologiczna analiza hemolitycznych odczynów poprzetoczeniowych

Celem przeprowadzanych badań jest ustalenie przyczyny odczynu oraz określenie, jaką krew chory może otrzymywać.

8.1. Odczyn wczesny

Jako odczyn wczesny przyjmuje się objawy występujące u chorego w czasie transfuzji lub do 24 godzin po przetoczeniu.

W analizie odczynu poprzetoczeniowego bardzo ważne znaczenie ma próbka krwi chorego, pobrana przed przetoczeniem.

Wytyczne dotyczące postępowania w przypadku wystąpienia odczynu poprzetoczeniowego, w tym pobierania próbek krwi, są zawarte w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 19 września 2005 roku.

Wczesne rozpoznanie serologicznej przyczyny odczynu poprzetoczeniowego umożliwia szybką interwencję i pozwala na uniknięcie najcięższych powikłań spowodowanych przede wszystkim niezgodnością w układzie ABO i w antygenie D z układu Rh. Często objawy kliniczne nie są jednoznaczne i przyczynę powikłania należy różnicować z zakażeniem bakteryjnym. Wówczas przed przystąpieniem do serologicznych badań krwi dawcy, zawartej w pojemnikach, należy sprawdzić, czy zostały pobrane z nich próbki do badań bakteriologicznych.

Badania krwi biorcy i dawcy przeprowadza się według ogólnie przyjętego schematu:

1. Sprawdzić grupę układu ABO i Rh w próbkach krwi biorcy, pobranych przed i po przetoczeniu oraz krwi dawców zawartej w pojemnikach i w segmentach drenów, które pozostały w laboratorium po wykonaniu próby zgodności.
2. Powtórzyć próbę zgodności.
3. Wykonać BTA z krwinkami biorcy, pochodzącymi z krwi pobranej po przetoczeniu. Uzyskanie dodatniego wyniku wymaga sporządzenia eluatu i zbadania swoistości zawartych w nim przeciwciał.
4. Przeprowadzić poszukiwanie przeciwciał odpornościowych we wszystkich dostępnych próbkach surowicy biorcy, z zastosowaniem dodatkowych czułych technik (np. test mikrokolumnowy lub inny sprawdzony i zatwierdzony przez IHiT). W badaniach należy posługiwać się poza krwinkami przetoczonymi, krwinkami wzorcowymi zawierającymi antygeny w podwójnej dawce.

Wynik badań należy sporządzić w 2 egzemplarzach: jeden dla szpitala, a drugi dla chorego. Zaleca się wykonanie kontrolnego badania przeciwciał po upływie około 3 miesięcy.

UWAGI:

- A. W przypadkach, w których w surowicy biorcy nie wykrywa się przeciwciał odpornościowych, należy ich poszukiwanie przeprowadzić w ciągu kolejnych kilku dni po przetoczeniu.
- B. Uzyskanie ujemnych wyników, przemawiających przeciwko serologicznej niezgodności w zakresie krwinek czerwonych, wskazuje na celowość kontroli surowicy biorcy w kierunku przeciwciał anti-HLA i przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom występującym tylko na krwinkach płytkowych lub na granulocytach.

8.2. Odczyn opóźniony

U osób uczulonych poprzednimi przetoczeniami krwi lub ciążami może dojść do opóźnionego odczynu hemolitycznego, który najczęściej wystę-

puje między 3 a 21 dniem po transfuzji krwi zgodnej serologicznie. W związku z tym ważna jest długotrwała kliniczna obserwacja chorych po każdym przetoczeniu. Z chwilą pojawienia się objawów hemolizy (nieuzasadniony wzrost ciepłoty ciała, niedokrwistość, bilirubinemia, zażółcenie powłok skórnych), należy w krwi biorcy przeprowadzić następujące badania:

- BTA (uzyskanie dodatniego wyniku obliguje do ustalenia swoistości przeciwciał w eluacie),
- poszukiwanie i ustalenie swoistości alloprzeciwciał w surowicy.

UWAGA: Jeżeli od ostatniego przetoczenia upłynęło więcej niż 3 dni, wskazane jest rozdzielanie krwinek chorego od przetoczonych i wykonanie badań populacji krwinek dawcy (pkt 5.8).

Rozpoznanie opóźnionego odczynu poprzetoczeniowego i ustalenie swoistości przeciwciał odpowiedzialnych za ten odczyn ma wielkie znaczenie dla zapobiegania w przyszłości wystąpieniu ciężkich powikłań poprzetoczeniowych.

9. Badania immunohematologiczne w diagnostyce choroby hemolitycznej płodu i noworodka ChHPN

Badania immunohematologiczne należy rozpocząć wcześniej w okresie prenatalnym, ażeby wyodrębnić ciążę z ryzykiem ChHPN do diagnostyki wewnątrzmacicznej, umożliwiającej rozpoczęcie leczenia oraz rozwiązanie ciąży w optymalnym dla dziecka czasie. Zakres badań przedstawiono na rycinie 1.

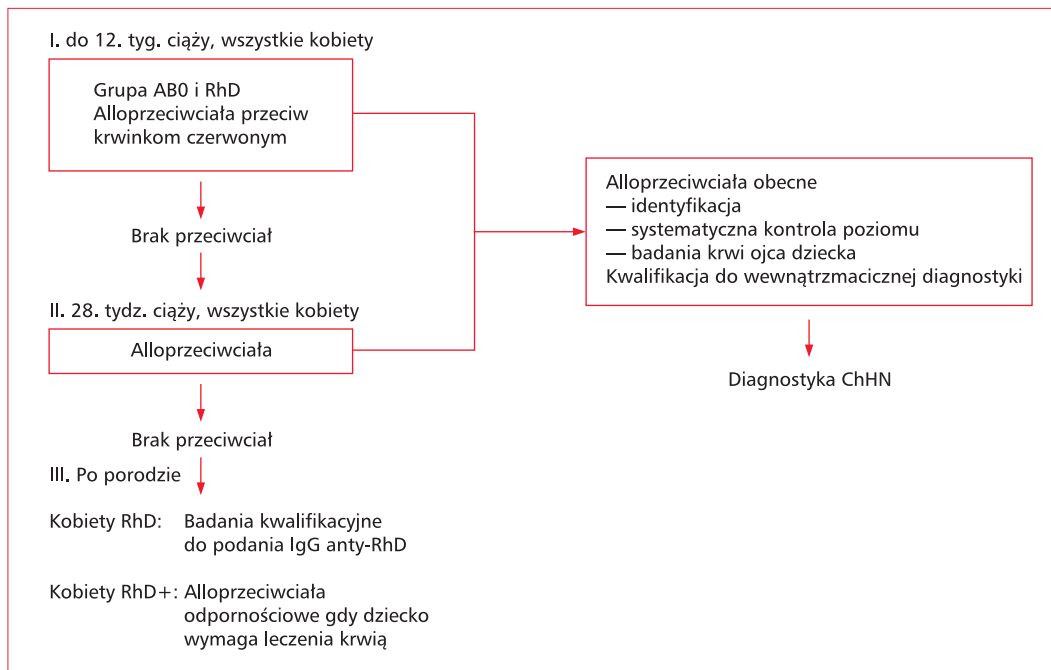
9.1. Badania w czasie ciąży

Do wykonywania podstawowych badań diagnostycznych zobowiązane są wyznaczone pracownice serologii transfuzjologicznej, do których kobiety, zarówno RhD dodatnie, jak i RhD ujemne, powinny być kierowane przez ginekologa w czasie ciąży 2-krotnie:

- w okresie do 12. tygodnia ciąży,
- w 28. tygodniu ciąży.

Celem tych badań jest wczesne wykrycie alloprzeciwciał odpornościowych do antygenów krwinek czerwonych. Kobiety, u których wykryto alloprzeciwciała, powinny być niezwłocznie skierowane wraz z mężem do pracowni konfliktu serologicznego, pracowni konsultacyjnej Centrum Krwiodawstwa lub do Instytutu Hematologii i Transfuzjologii. Skierowanie to powinno zawierać:

- wynik grupy krwi ABO i RhD,
- informację o wykrytych przeciwciałach następującej treści: „W surowicy wykryto alloprzeciwciała reagujące z krwinkami: w testach



Rycina 1. Badania immunohematologiczne w diagnostyce choroby hemolitycznej płodu i noworodka (ChHPN)

Figure 1. Immunohaematological testing in diagnosis of haemolytic disease of foetus/newborn (HDF/N)

..... . Konieczna kontrola w pracowni wykonującej diagnostykę konfliktu serologicznego, adres.....”.

Obowiązuje następujący zakres badań:

- ustalenie swoistości przeciwiata,
- miano przeciwiata,
- badania krwi ojca dziecka.

Uzyskane wyniki pozwalają na dokonanie oceny ryzyka wystąpienia ChHPN.

W czasie ciąży nie bada się przeciwiata odpornościowych z układu ABO, ponieważ diagnostyczna wartość wyników tych badań jest bardzo niska. Matczyne przeciwiata anty-A/anty-B nie stanowią zagrożenia dla dziecka w okresie życia płodowego. Dzieci rodzą się w stanie dobrym, bez niedokrwistości lub z niedokrwistością łagodną, rzadko umiarkowaną. Badania diagnostyczne należy wykonać, gdy u noworodka pojawią się kliniczne objawy choroby hemolitycznej.

9.1.1. Wykrywanie przeciwiata z układu Rh oraz z innych układów grupowych

1. Do wykrywania przeciwiata polecane są dwa testy: PTA-LISS i LEN.
2. W badaniach stosuje się taki sam zestaw krwinek wzorcowych, jak przy wykrywaniu przeciwiata u biorców krwi (pkt 6.5.1).
3. Jeżeli wyniki grup krwi ABO na to pozwalają, należy dołączyć do badań krwinki ojca.

UWAGI:

- A. Badanie z krwinkami ojca jest niezbędne w każdym przypadku, gdy w poprzedniej ciąży miały miejsce objawy ChHPN lub zgon płodu z niewyjaśnionych przyczyn, a za pomocą krwinek wzorcowych nie stwierdza się u matki przeciwiata odpornościowych. Jeżeli przeciwiata anty-A lub anty-B uniemożliwiają takie badanie, należy je wyadsorbować odpowiednimi krwinkami przypadkowego dawcy (dwie adsorpcje przy proporcji 1:1; jedna przez 60 min w temp. pokojowej i druga przez 30 min w temp. 37°C).
- B. Wykrycie w surowicy matki alloprzeciwiata reagujących wyłącznie z krwinkami ojca dziecka potwierdza rzadko występujący konflikt serologiczny w rodzinie. W takiej sytuacji ustalenie swoistości alloprzeciwiata wymaga szerszych badań z zastosowaniem zestawu krwinek, zawierających antygeny o niskiej częstości występowania.

9.1.2. Identyfikacja alloprzeciwiata

Określenie swoistości przeciwiata wykrytych w surowicy matki jest konieczne dla:

1. Oceny klinicznego znaczenia przeciwiata w patogenezie ChHPN.
2. Przeprowadzenia odpowiednich badań krwi ojca dziecka, pozwalających niejednokrotnie przewidzieć obecność lub brak na krwinkach

plodu antygeny, do którego matka wytwarza przeciwciała.

3. Wcześniejszego przygotowania odpowiedniej krwi do przetoczenia, zarówno dla matki, jak i dla dziecka; jeżeli takie leczenie będzie konieczne w czasie ciąży lub po porodzie.

Zasady identyfikacji przeciwciał zostały podane w pkt. 6.6.

Swoistość alloprzeciwciał należy kontrolować w przebiegu ciąży, ponieważ może wystąpić dodatkowe uodpornienie matki innymi antygenami krwinek płodu, a w przypadku przetoczeń wewnątrzmacicznych, również antygenami dawców. Do poszukiwania dodatkowych przeciwciał należy przygotować zestaw krwinek nieposiadających antygeny, który już spowodował uodpornienie matki. Wskazane jest, aby krwinki pochodziły od dawców homozygot w poszczególnych układach grupowych (szczególnie w układzie Kidd i Duffy).

U kobiet w ciąży częściej wykrywane są przeciwciała „naturalne” (klasy IgM) jak anti-Le^a, anti-H (-IH), anti-P₁, których obecność nie jest związana z uodpornieniem antygenami krwinek czerwonych i które nie mają znaczenia w immunopatologii ciąży. Jeżeli utrudniają poszukiwanie przeciwciał odpornościowych (IgG), należy usunąć ich aktywność za pomocą 2ME.

9.1.3. Oznaczanie miana przeciwciał

W przypadku wykrycia alloprzeciwciał IgG, które mogą być odpowiedzialne za ChHPN, należy określić ich miano w PTA-NaCl:

- w pierwszej próbce, w której zostały wykryte,
- w próbkach pobieranych w miesięcznych odstępach,
- od 24. tygodnia ciąży w próbkach pobieranych nawet w dwutygodniowych odstępach, w zależności od dynamiki wzrostu poziomu przeciwciał.

Pozostałą surowicę z badanej próbki należy przechowywać w stanie zamrożenia, do następnego badania. Kolejne badania powinny być wykonane równolegle: w surowicy ze świeżo pobranej próbki oraz z próbki z poprzedniego badania za pomocą krwinek heterozygotycznych — tego samego dawcy, co w poprzednim badaniu, lub innego o takim samym fenotypie. Takie postępowanie umożliwi właściwą ocenę narastania poziomu przeciwciał u matki.

9.1.3.1. Interpretacja wyników badań

Miano przeciwciał anti-D z układu Rh powyżej 16 w PTA świadczy o ich wysokim poziomie i, oprócz wywiadu położniczego i wyników badań USG, jest jednym ze wskazań do diagnostyki wewnątrzmacicznej.

Dla przeciwciał o innej swoistości, graniczna wartość miana nie jest ustalona.

9.1.4. Badania krwi ojca dziecka

1. Określić grupę krwi ABO i Rh.
2. Jeżeli u matki wykryto tylko przeciwciała anti-RhD, a ojciec jest RhD ujemny, nie trzeba prowadzić dalszych badań, ponieważ dziecko musi być też RhD ujemne.
3. Jeżeli ojciec jest RhD dodatni, należy określić jego fenotyp RhD za pomocą dodatkowych odczynników: anti-C, anti-c, anti-E i anti-e. Po ustaleniu prawdopodobnego genotypu (tab. 5), sformułować wynik w następujący sposób, na przykład: "RhD+ (DCCee). Prawdopodobny genotyp: DCe/DCe". Obecnie istnieje możliwość określenia genotypu ojca i genu *D* płodu metodami biologii molekularnej. Badania te wykonywane są w IHiT.
4. Jeżeli u matki wykryto przeciwciała z układu Rh, na przykład anti-c, anti-C^w, anti-E lub przeciwciała z innych układów grupowych, na przykład anti-K z układu Kell, należy sprawdzić za pomocą odczynników diagnostycznych, czy na krwinkach ojca występuje odpowiadający im antygen w pojedynczej lub podwójnej dawce. Pozwoli to w wielu przypadkach na trafne przewidywanie obecności lub braku odpowiedzialnego za konflikt antygeny na krwinkach płodu.

UWAGA: Badania wymienione w punkcie 3 i 4 można zastąpić/uzupełnić określeniem genotypu (pkt 4.2).

9.1.5. Serologiczne badania krwinek płodu

W ciąży z wysokim ryzykiem ChHPN stosuje się nakłucie naczyń pępowiny (kordocenteza), w celu bezpośredniej oceny nasilenia choroby hemolitycznej płodu. Zakres badań immunohemolitycznych przedstawiono poniżej.

1. Oznaczenie grupy krwi układu ABO i antygeny D z układu Rh. W przypadku stwierdzenia u płodu identycznej grupy krwi ABO i RhD z matką, konieczne jest wykluczenie błędu w pobraniu badanej próbki (krew matki). Najprostszą metodą jest równoległe zbadanie tych krwinek oraz krwinek matki za pomocą surowicy anti-I, która nie reaguje z krwinkami płodowymi.
2. W zależności od swoistości przeciwciał wykrytych w surowicy matki, oznaczenie innych antygenów odpowiedzialnych za jej uodpornienie.
3. Wykonanie BTA.

UWAGA: Gen *D* płodu oraz geny *C*, *c* i *E* można obecnie oznaczyć metodą nieinwazyjną (w osoczu matki), zaś geny odpowiedzialne za dziedzicze-

nie przez płód innych antygenów bada się w płynie owodniowym lub w kosmkach łożyskowych. W celu wykonania wymienionych badań należy przesłać materiał do Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT w Warszawie. Wykonywanie badań molekularnych pozwala na znaczne ograniczenie potrzeby wykonywania kordocentezy.

9.2. Badania po porodzie

9.2.1. Krew matki

Kobiety przyjęte na oddział położniczy powinny posiadać wyniki badań grup krwi ABO i RhD oraz przeciwciał odpornościowych. Jeżeli badania te nie były wykonywane podczas ciąży, należy je niezwłocznie przeprowadzić. Wykrycie alloprzeciwciał odpornościowych u matki zasygnalizuje możliwość choroby hemolitycznej u dziecka. Należy wówczas przekazać próbkę krwi matki do pracowni konsultacyjnej Centrum Krwiodawstwa w celu:

- potwierdzenia i identyfikacji przeciwciał,
- określenia ich znaczenia w immunopatologii ciąży,
- dobrania krwi do ewentualnego przetoczenia matce lub dziecku.

UWAGA: U dziecka urodzonego przez matkę posiadającą przeciwciała odpornościowe należy natychmiast wykonać badania z zakresu diagnostyki ChHPN.

9.2.2. Krew noworodka

1. Wskazane jest pobieranie próbki krwi pępowinowej od każdego noworodka.
2. Próbkę należy opisać nazwiskiem matki z zaznaczeniem „krew pępowinowa” i przechowywać w lodówce przez 3–5 dni, w temperaturze 2–6°C, do ewentualnego wykorzystania, gdyby okazało się konieczne przeprowadzenie badań immunohematologicznych.

UWAGI:

- A. Badanie grup krwi i BTA należy wykonywać u wszystkich noworodków, urodzonych przez kobiety RhD– (kwalifikacja do podania immunoglobuliny anty-D). Jeżeli matce podano podczas ciąży immunoglobulinę anty-D, BTA u noworodka nie wykonuje się.
- B. U pozostałych noworodków, urodzonych przez matki RhD+ nieuodpornione antygenami krwinek czerwonych, nie wykonuje się serologicznych badań krwi.

9.2.3. Diagnostyka ChHPN

Badania diagnostyczne obowiązują w każdym przypadku wykrycia przeciwciał odpornościowych

u matki podczas ciąży lub w okresie okołoporodowym. W próbce krwi pępowinowej należy wykonać:

- określenie grupy krwi ABO i RhD,
- określenie antygenów z innych układów grupowych, odpowiednio do swoistości alloprzeciwciał matki,
- BTA,
- w niektórych przypadkach, gdy u dziecka stwierdza się dodatni BTA, a u matki w badaniu przeglądowym nie wykrywa się przeciwciał lub wykrywa się przeciwciała wieloswoiste, wskazane jest wykonanie elucji przeciwciał z krwinek noworodka. U noworodków oznaczenie grup krwi układu ABO (pkt 6.2) i antygeny D z układu Rh przeprowadza się wyłącznie za pomocą odczynników monoklonalnych, metodą probówkową lub inną sprawdzoną i zatwierdzoną przez IHiT. Gdy krwinki noworodka są mocno opłaszczane przeciwciałami IgG, zastosowanie ludzkich surowic diagnostycznych do oznaczenia antygenów za pomocą PTA może prowadzić do błędnej interpretacji wyników. W takich przypadkach, gdy brak jest odpowiednich odczynników monoklonalnych IgM (np. anty-Fy^a, anty-s), należy przed wykonaniem badania usunąć przeciwciała z krwinek czerwonych, na przykład za pomocą kwaśnej glicyny i EDTA (pkt 5.10.2).

Bezpośredni test antyglobulinowy należy wykonać metodą probówkową lub czulszymi metodami kolumnowymi. Dodatni wynik BTA potwierdza ChHPN i świadczy o przejściu przez łożysko przeciwciał matki i opłaszczeniu krwinek dziecka.

U dzieci z konfliktu RhD, leczonych wewnątrzmacicznie krwią, wyniki oznaczenia grup krwi ABO i RhD oraz BTA mogą być fałszywie ujemne z powodu obecności w krążeniu noworodka przetoczonych krwinek RhD ujemnych. Stanowią one populację przeważającą, często powyżej 99%. Dla uniknięcia błędnych wyników, na skierowaniu krwi do badań serologicznych oraz w karcie informacyjnej szpitala, należy umieścić adnotację „Leczony w życiu płodowym krwią RhD–”.

UWAGI:

- A. Diagnostykę w kierunku ChHPN należy przeprowadzić także w każdym przypadku nieoczekiwanego wystąpienia u noworodka klinicznych objawów choroby hemolitycznej (patologiczna żółtaczka, niedokrwistość). Nieoczekiwana ChHPN zdarza się głównie wtedy, gdy u kobiet zaniedbano wykonania badań przeciwciał odpornościowych w czasie ciąży. Należy wówczas przeprowadzić badania zarówno krwi noworodka, jak i matki.

B. Jeżeli w badaniach z zestawem krwinek wzorcowych nie wykryje się przeciwciał w surowicy matki, za ChHPN mogą być odpowiedzialne przeciwciała z układu ABO (konflikt ABO) lub przeciwciała do rzadko występującego antygeny.

9.2.4. Diagnostyka ChHPN w konflikcie ABO

9.2.4.1. Poszukiwanie przeciwciał IgG anty-A/anty-B w surowicy matki

Po termicznej inaktywacji przeciwciał naturalnych IgM w surowicy matki należy przeprowadzić poszukiwanie przeciwciał IgG anty-A/anty-B:

- rozcieńczyć surowicę równą objętością roztworu NaCl,
- po dokładnym wymieszaniu umieścić na 20 min w łaźni wodnej o temperaturze 70°C,
- po oziębieniu do temperatury pokojowej, wykonać PTA z krwinkami dziecka oraz dawcy o zgodnej z dzieckiem grupie krwi ABO.

Wystąpienie aglutynacji z krwinkami dawcy świadczy o obecności przeciwciał odpornościowych u matki. Aglutynacja krwinek dziecka świadczy o dojrzałości antygeny ABO do reakcji immunologicznej.

Nie wykrycie przeciwciał IgG u matki bezpośrednio po porodzie nie wyklucza ChHPN, ponieważ w okresie okołoporodowym może nastąpić spadek ich stężenia do ilości niewykrywalnych w rutynowo stosowanych testach serologicznych. Wstępne rozpoznanie ChHPN musi być oparte na objawach klinicznych i stwierdzonej niezgodności grup krwi ABO u matki i dziecka. Powtórzenie badań po 3–5 dniach po porodzie umożliwia zwykle wykrycie przeciwciał.

9.2.4.2. Badania u noworodka

U noworodka obowiązuje:

- określenie grupy krwi ABO i RhD,
- wykonanie BTA,
- jeżeli została zachowana krew pępowinowa, wykonanie badań przeciwciał w surowicy (bez inaktywacji) oraz w eluacie z krwinek czerwonych.

UWAGI:

- A. Wyniki badań krwi pępowinowej lepiej potwierdzają kliniczne rozpoznanie ChHPN niż badania krwi matki.
- B. Zaleca się metodę elucji przeciwciał według Landsteinerja lub podaną niżej metodę Lui.

9.2.4.3. Elucja przeciwciał metodą Lui

1. Sześciokrotnie przemyć krwinki roztworem NaCl, pozostawiając nadsącz z ostatniego przemycia (kontrola eluatu).

2. W co najmniej probówkach umieścić po 0,5 ml przemytych gęstych krwinek.
3. Dodać po 3 krople roztworu NaCl i dokładnie wymieszać.
4. Probówki zakorkować i obracać tak, aby krwinki powlekły ich wewnętrzną powierzchnię.
5. Umieścić probówki poziomo na 10 min w temperaturze od –20°C do –70°C.
6. Po wyjęciu probówek szybko rozmrozić krwinki pod strumieniem gorącej wody i wirować przez 2 min z przyspieszeniem 1000 × g.
7. Przenieść nadsącz (eluat) do czystej probówki i badać w PTA metodą probówkową (nie kolumnową), równolegle z nadsączem kontrolnym, z krwinkami A lub B.

9.2.5. Diagnostyka ChHPN w rzadko występującym konflikcie serologicznym

Konflikt ten dotyczy przeciwciał skierowanych do antygenów o niskiej lub bardzo niskiej częstości występowania lub też do antygenów spotykanych powszechnie.

9.2.5.1. Przeciwciała do antygenów występujących z niską częstością

Przykłady takich przeciwciał to anty-C^w z układu Rh (częstość antygeny C^w: 2%), anty-Kp^a z układu Kell (1%) czy anty-Di^a z układu Diego (0,46%). Obecność tego typu przeciwciał można wykryć w badaniach surowicy matki z krwinkami dziecka lub jego ojca. Przy niezgodności ABO, należy najpierw usunąć aktywność przeciwciał grupowych poprzez ich adsorpcję za pomocą krwinek przypadkowego dawcy o odpowiedniej grupie krwi. Można też posłużyć się eluatem z krwinek noworodka, badając eluat z krwinkami ojca w PTA-LISS i w teście enzymatycznym.

W przypadku przeciwciał do rzadko występującego antygeny krwinek czerwonych nie ma problemu ze znalezieniem krwi zgodnej dla matki i dziecka. Identyfikację przeciwciał odpowiedzialnych za ChHPN można, więc prowadzić w ciągu kilku następnym dni i nie opóźniać z tego powodu leczenia krwią. Diagnostyka ta jest bardzo czasochłonna i wymaga zastosowania specjalnego zestawu krwinek wzorcowych.

9.2.5.2. Przeciwciała do antygenów występujących powszechnie

Przykłady takich przeciwciał to anty-k i anty-Kp^b z układu Kell, anty-Di^b z układu Diego, anty-Co^a z układu Colton lub anty-Lan. Częstość występowania antygenów, do których są one skierowane przekracza w populacji 99%. W badaniach immuno-

hematologicznych charakteryzują się one aktywnością w stosunku do wszystkich krwinek wzorcowych i przypadkowych; z wyjątkiem autologicznych.

Jeżeli przeciwciała występują w klasie IgG, konieczna jest ich szybka identyfikacja. W przypadku trudności w ustaleniu swoistości przeciwciał należy przekazać próbki krwi ciężarnej, jej rodziny i męża do IHiT. Takie przeciwciała powinny być wykryte w początkowym okresie ciąży, ze względu na bardzo skomplikowaną ich identyfikację i ogromne trudności w znalezieniu zgodnego dawcy krwi. W celu zabezpieczenia matki i dziecka w zgodną krew, w takich przypadkach należy rozważyć pobranie krwi od ciężarnej i przechowanie jej w stanie zamrożenia. Diagnostyka rozpoczęta dopiero po porodzie może uniemożliwić konieczne leczenie krwią zarówno matki, jak i dziecka.

9.3. Zasady dobierania krwi do transfuzji dopłodowej i wymiennej

9.3.1. Dobieranie krwi do transfuzji dopłodowej

1. Należy dobierać krew grupy O niezawierającą antygenów, do których skierowane są przeciwciała wykryte u matki.
2. Wobec zdarzających się przypadków uodpornienia ciężarnej antygenami zawartymi w krwi użytej do transfuzji dopłodowej, należy u ciężarnej oznaczyć antygeny z układu Kell (K i k), Kidd (Jk^a i Jk^b), Duffy (Fy^a i Fy^b), MNS (S i s) i dobierać do przetoczenia krew zgodną w tych antygenach z krwią matki.
3. Gdy grupa krwi układu ABO płodu jest zgodna serologicznie z grupą krwi matki (np. matka i płód grupy A lub matka grupy AB, a płód grupy A), można dobierać krwinki jednoimienne w układzie ABO.
4. W konflikcie RhD należy dobierać krew RhD ujemną, zgodnie z zasadami zawartymi w punkcie 1, 2 i 3 powyżej.

9.3.2. Dobieranie krwi do transfuzji wymiennej

1. W konflikcie RhD należy dobierać krew RhD ujemną:
 - a) jeśli zachodzi zgodność serologiczna w układzie ABO między matką i dzieckiem (np. matka i noworodek grupy A lub matka grupy AB, a noworodek grupy A), należy dobierać krew zgodną z grupą krwi dziecka;
 - b) dla noworodków grupy A lub B matek grupy O, przygotowuje się krew pełną rekonstruowaną do transfuzji wymiennej (KPR, dawniej KU ABO);

- c) jeśli przeciwciała układu ABO matki uniemożliwiają wykonanie próby zgodności z surowicą matki (np. matka grupy A, a dziecko grupy B lub matka grupy B, a dziecko grupy AB), przygotowuje się krew pełną rekonstruowaną do transfuzji wymiennej (KPR, dawniej KU ABO).
2. Przy konflikcie w układzie ABO należy dobierać krew pełną rekonstruowaną (KPR, dawniej KU ABO). Jest to koncentrat krwinek czerwonych od dawcy grupy O o RhD zgodnym z krwią dziecka, zawieszony w osoczu od dawcy grupy AB lub zgodnym z grupą ABO dziecka.
 3. W konflikcie serologicznym w zakresie innych antygenów (np. anty-K, anty-E, anty-Fy^a) krew do przetoczenia nie może zawierać antygeny odpowiedzialnego za uodpornienie matki.
 4. W osoczu przeznaczonym do KPR miano aglutynin anty-A lub anty-B nie może przekraczać 16. Zamiast oznaczenia miana aglutynin można wykonać PTA w rozcieńczeniu osocza 1:50, którego wynik musi być ujemny.

UWAGA: W okresie pierwszych 4 miesięcy życia, do następnych przetoczeń stosuje się krew tej samej grupy ABO i RhD, jak do pierwszej transfuzji.

9.3.3. Próba serologicznej zgodności

Wykonuje się ją zgodnie z metodyką podaną w pkt. 7, przestrzegając dodatkowo wymienionych poniżej zasad.

1. Jako surowicę biorcy należy stosować surowicę matki.
2. Gdy przeciwciała układu ABO matki nie pozwalają na dobieranie krwi zgodnej grupowo z krwią dziecka, należy dobierać krwinki grupy O.
3. Wykonując próbę zgodności z koncentratem krwinek czerwonych, zawieszonych w osoczu innej grupy układu ABO, należy pamiętać, aby w badaniach kontrolnych dawcy sprawdzić również miano przeciwciał anty-A lub anty-B w osoczu.
4. Jeżeli surowica matki jest nieosiągalna, należy użyć surowicy noworodka, a w przypadku dodatniego BTA, również eluat z jego krwinek.
UWAGA: Jeżeli dziecko uodpornionej matki przenoszone jest do innego szpitala, razem z nim należy przekazać:
 - wyniki dotyczące grup krwi matki i dziecka oraz przeciwciał odpornościowych wykrywanych u matki,
 - próbkę krwi matki (20 ml krwi, z której surowica podzielona na kilka porcji może być przechowywana w stanie zamrożonym przez okres

leczenia dziecka i wykorzystywana w kolejnych próbach zgodności).

9.4. Badania laboratoryjne związane z profilaktyką konfliktu w antygenie D z układu Rh

Przed podaniem immunoglobuliny anti-RhD po porodzie należy wykonać następujące badania kwalifikacyjne:

- w krwi matki:
 - oznaczenie antygeny D z układu Rh,
 - badanie przeciwciał anti-D za pomocą PTA,
- w krwi pępowinowej:
 - oznaczenie antygeny D z układu Rh,
 - bezpośredni test antyglobulinowy.

Do podania immunoglobuliny anti-RhD kwalifikuje się kobietę RhD ujemną, u której nie wykryto przeciwciał anti-D i której dziecko jest RhD dodatnie z ujemnym BTA.

Przed podaniem immunoglobuliny anti-RhD podczas ciąży i po poronieniu należy u kobiety wykonać następujące badania kwalifikacyjne:

- oznaczenie antygeny D z układu Rh,
- badanie przeciwciał anti-D za pomocą PTA.

Do podania immunoglobuliny anti-RhD kwalifikuje się kobietę RhD ujemną, u której nie wykryto przeciwciał anti-D.

UWAGI:

- A. Jeżeli wykonano badanie partnera i stwierdzono, że jest on Rh ujemny, kobieta nie kwalifikuje się do podania immunoglobuliny anti-RhD podczas ciąży.
- B. Kobieta, która otrzymała immunoglobulinę anti-RhD podczas ciąży powinna otrzymać odpowiednią dawkę preparatu po urodzeniu RhD dodatniego dziecka. Badania kwalifikacyjne ograniczają się wówczas do oznaczenia antygeny D z układu Rh u matki i dziecka. U matki nie wykonuje się badania przeciwciał anti-D, ponieważ mogą być one obecne jako nabyte biernie; z tych samych przyczyn nie wykonuje się BTA u noworodka.
- C. Informacja o rozpoczętej profilaktyce podczas ciąży powinna być umieszczona w dokumentacji pacjentki i przekazana pracowni serologii transfuzjologicznej.
- D. Powszechne wprowadzenie badania genu *D* płodu w osoczu matki znacznie ograniczy zużycie immunoglobuliny anti-RhD w profilaktyce konfliktu podczas ciąży, ponieważ nie będzie ona stosowana u kobiet, u których nie wykryto płodowego genu *D*.

9.4.1. Wykrywanie krwinek płodu w krążeniu matki: test kwaśnej elucji zmodyfikowaną metodą Kleihauera-Betke

W przypadku podejrzenia dużego krwawienia płodu, na przykład znacznej niedokrwistości noworodka bezpośrednio po urodzeniu, należy ocenić objętość krwi płodu w krążeniu matki. Po jej ustaleniu należy obliczyć dawkę immunoglobuliny anti-RhD, którą trzeba podać matce. Zakłada się, że na każdy mililitr krwi płodu potrzeba 10 mikrogramów przeciwciał anti-D.

9.4.1.1. Odczynniki

1. Bufor McIlvine'a, pH 3,3–3,4: do każdego badania przygotować świeży bufor przez zmieszanie 74 ml roztworu macierzystego A i 26 ml roztworu macierzystego B; po zmieszaniu sprawdzić pH.
 - a) roztwór macierzysty A (0,1 mol/l kwas cytrynowy): 21,0 g $C_6H_8O_7$ H_2O rozcieńczyć wodą destylowaną do 1 l; przechowywać w lodówce w temperaturze 2–6°C,
 - b) roztwór macierzysty B (0,2 mol/l fosforan sodowy): 71,63 g Na_2HPO_4 12 H_2O rozcieńczyć wodą destylowaną do 1 l, przechowywać w lodówce w temperaturze 2–6°C.
2. Barwniki
 - a) 0,5-procentowy wodny roztwór erytrozyny B,
 - b) kwaśna hematoksylina (Harrisa).
3. 80-procentowy alkohol etylowy.
4. Kontrola dodatnia: mieszanina krwi osoby dorosłej (10 części) i krwi pępowinowej (jedna część).
5. Kontrola ujemna: krew osoby dorosłej.

9.4.1.2. Wykonanie badania

1. Przygotować cienkie rozmazy krwi.
2. Suszyć w powietrzu przez 10 min.
3. Utrwalać rozmazy przez 5 min 80-procentowym alkoholem etylowym.
4. Przebrać wodą destylowaną.
5. Doprowadzić bufor Mc Ilvine'a do temperatury 37°C i zanurzyć szkiełka z rozmazami na 5 min.
6. Przebrać wodą destylowaną.
7. Zanurzyć szkiełka z rozmazami w hematoksylinie na 5 min.
8. Przebrać dokładnie przez minutę bieżącą wodą.
9. Zanurzyć szkiełka z rozmazami w erytrozynie na 5 min.
10. Przebrać bieżącą wodą.
11. Policzyć pod mikroskopem 2000 krwinek czerwonych i odnotować liczbę krwinek płodowych.

12. Obliczyć odsetek krwinek płodowych w ogólnej liczbie policzonych krwinek czerwonych.

9.4.1.3. Interpretacja wyniku

- Krwinki płodowe zawierające hemoglobinę F widoczne są jako różowe komórki załamujące światło.
- Krwinki osób dorosłych, zawierające hemoglobinę A są odbarwione, widoczne jako blade cienie komórkowe.
- Jądra krwinek białych są intensywnie niebiesko zabarwione, a cytoplazma jest szaro-niebieska.
- Objętość krwawienia płodowo-matczynego w ml pełnej krwi = procent krwinek płodowych $\times 50$.

9.4.2. Inne metody wykrywania krwinek płodu w krążeniu matki

Spośród innych metod najczęściej stosowaną jest cytometria przepływowa.

10. Badania wykonywane w niedokrwiistości autoimmunohemolitycznej (NAIH)

10.1. NAIH z autoprzeciwciałami typu ciepłego

Do badań należy pobrać do suchej probówki około 5 ml krwi oraz 4 ml krwi na EDTA, po czym wykonać wymienione poniżej badania.

1. BTA z odczynnikami poliwalentnym.
2. BTA z odczynnikami monoswoistymi (jeśli z odczynnikami poliwalentnym uzyskano wynik dodatni).
3. Eluat z krwinek chorego (zgodnie z metodami w pkt. 5.9.2) i badanie aktywności eluatu z zestawem krwinek wzorcowych.
4. Badania surowicy z zestawem krwinek wzorcowych i z krwinkami autologicznymi. W przypadku uzyskania wyników dodatnich, przeprowadzić adsorpcję autoprzeciwciał z surowicy (zgodnie z metodami w pkt. 5.9.1).
5. Wykrywanie alloprzeciwciał w surowicy po adsorpcji autoprzeciwciał w PTA.
6. Określenie fenotypu Rh i w miarę potrzeby innych antygenów krwinek czerwonych (przy użyciu odczynników monoklonalnych). Jeśli używane są ludzkie surowice diagnostyczne, należy najpierw usunąć z krwinek autoprzeciwciała (metoda 5.10).
7. Dobranie do przetoczenia krwi zgodnej fenotypowo w układzie Rh i antygenie K. W przypadku jednoczesnej obecności alloprzeciwciał należy również uwzględnić zgodny fenotyp w odpowiednim układzie grupowym.

10.2. NAIH z autoprzeciwciałami typu zimnego

Krew do badań powinna być pobrana do probówki umieszczonej w zlewce z wodą o temperaturze 37°C i natychmiast przeniesiona do termostatu o tej samej temperaturze. Po wykrzepieniu krwi należy oddzielić surowicę, a krwinki przemyć 3 razy roztworem NaCl o temperaturze 37°C. Należy wykonać następujące badania:

- określenie grupy krwi ABO i antygeny D za pomocą odczynników monoklonalnych,
- BTA,
- określenie amplitudy cieplnej zimnych autoprzeciwciał (aglutynin).

10.2.1. Różnicowanie autoprzeciwciał typu zimnego z układu I naturalnych i istotnych klinicznie

Autoprzeciwciała typu zimnego, wykrywane podczas oznaczania grup krwi układu ABO, mają najczęściej swoistość z układu I. Jakkolwiek ich optymalna aktywność wyraża się w niskich temperaturach, to jednak u niektórych osób manifestują się także w temperaturze pokojowej. Ich obecność może być związana z przebytą infekcją. Mogą one również towarzyszyć chorobom rozrostowym układu krwiotwórczego lub występować w pierwotnym typie NAIH typu zimnego, nazywanej chorobą zimnych aglutynin. Autoprzeciwciała typu zimnego o znaczeniu patologicznym wiążą dopełniacz, mają wysokie miano i szeroką amplitudę cieplną. Dla potwierdzenia ich obecności należy przeprowadzić badania równoległe w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C.

10.2.1.1. Postępowanie

1. Przygotować 3-procentową zawiesinę krwinek autologicznych i krwinek wzorcowych grupy O w roztworze NaCl.
2. Przygotować trzy rzędy probówek (w każdym po 4 probówki) dla badań w trzech temperaturach.
3. W pierwszej i w drugiej probówce każdego rzędu umieścić po 2 krople badanej surowicy.
4. W trzeciej i w czwartej probówce każdego rzędu umieścić po jednej kropli badanej surowicy i po jednej kropli 30-procentowego roztworu albuminy w NaCl.
5. Dwa rzędy probówek przenieść do termostatów (bloków grzewczych) o odpowiednich temperaturach (30°C, 37°C). Trzeci rząd pozostawić w temperaturze pokojowej; obok probówek z surowicą w wymienionych temperaturach umieścić zawiesiny przygotowanych krwinek.

6. Po upływie 10 minut do pierwszej i trzeciej próbki surowicy w każdym rzędzie, dodać po kropli 3-procentowej zawiesiny krwinek autologicznych, natomiast do drugiej i czwartej po kropli 3-procentowej zawiesiny krwinek wzorcowych grupy O.
7. Po zmieszaniu, zawartość próbek inkubować przez 2 godziny w odpowiednich temperaturach.
8. Odczytywać wyniki makroskopowo, delikatnie wstrząsając każdą próbką i protokołować nasilenie aglutynacji.
9. Na podstawie wyników badań w poszczególnych temperaturach ustalić amplitudę cieplną reakcji przeciwciał.

Jako klinicznie ważne uznaje się autoprzeciwciała reagujące w zakresie temperatur 30–37°C. W tych przypadkach dobiera się do przetoczenia krew zgodną fenotypowo w układzie Rh oraz w antygenie K z układu Kell (po wykluczeniu obecności innych odpornościowych alloprzeciwciał).

Autoprzeciwciała, które są aktywne tylko w niskich temperaturach (poniżej 30°C), nie mają znaczenia klinicznego.

W przypadku stwierdzenia, że wykryte auto-przeciwciała mają charakter patologiczny, wskazane jest wykonanie następującego badania:

- przygotować dwa szeregi rozcieńczeń badanej surowicy w roztworze NaCl,
- do pierwszego szeregu dodać taką samą objętość 3–4% krwinek jednoimiennych zawieszonych w roztworze NaCl, a do drugiego krwinek grupy O,
- badanie pozostawić na godzinę w temperaturze pokojowej i po godzinie odczytać wyniki.

Znacznie wyższe miano z krwinkami jednoimiennymi (powyżej dwóch rozcieńczeń) niż z krwinkami grupy O upoważnia do zalecenia przetaczania KKCz grupy O.

10.3. Napadowa zimna hemoglobinuria (NZH)

Napadowa zimna hemoglobinuria charakteryzuje się obecnością w surowicy dwufazowych hemolizyn. Pierwotna NZH zdarza się bardzo rzadko. Natomiast hemolizyny o charakterze przemijającym występują dość często u dzieci w przebiegu chorób wirusowych i bakteryjnych (np. odra, ospa wietrzna, świnka, grypa, mononukleozę zakaźną). Dwufazowe hemolizyny mają najczęściej swoistość skierowaną do powszechnego antygeny P.

Test ten powinno się wykonać wówczas, gdy u chorego stwierdza się objawy hemolizy (hemoglobinuria, hemoglobinemia), natomiast w surowicy nie wykrywa się autoprzeciwciał typu zimnego, a na

krwinkach jest obecny tylko C3 (eluat z krwinek jest ujemny).

10.3.1. Przygotowanie materiału do badań

1. Krew chorego pobrać do suchej próbki i przenieść do cieplarki o temperaturze 37°C. Po zakończeniu procesu krzepnięcia odwirować także w tej temperaturze i surowicę przenieść do oddzielnej próbki.
2. Ze świeżo pobranej próbki krwi od dawcy oddzielić surowicę, która stanowi źródło dopełniacza.
3. Sporządzić 50-procentową zawiesinę krwinek grupy O w roztworze NaCl.

10.3.2. Wykonanie badania

1. W 3 rzędach stelaża umieścić po 3 próbki i oznakować, na przykład A1, A2, A3 (pierwszy rząd), B1, B2, B3 (drugi rząd), C1, C2, C3 (trzeci rząd).
2. Dodać do pierwszej i drugiej próbki w każdym rzędzie po 10 kropli surowicy chorego.
3. Dodać do drugiej i trzeciej próbki w każdym rzędzie po 10 kropli surowicy dawcy.
4. Do wszystkich próbek dodać po kropli zawiesiny krwinek i wymieszać.
5. Przenieść 3 próbki z pierwszego i 3 próbki z drugiego rzędu do pojemnika z topniejącym lodem (0°C).
6. Trzy próbki z trzeciego rzędu umieścić w cieplarce o temperaturze 37°C.
7. Po 30 min przenieść 3 próbki oznaczone literą A z pojemnika z lodem do cieplarki o temperaturze 37°C.
8. Po następnej godzinie odwirować wszystkie próbki i odczytać wyniki, obserwując zabarwienie nadsączu.

10.3.3. Interpretacja wyników

Hemoliza w próbkach zawierających surowicę chorego, inkubowaną najpierw w temperaturze 0°C, a następnie w temperaturze 37°C, wskazuje na obecność dwufazowych hemolizyn. Hemoliza w próbkach zawierających surowicę chorego inkubowaną tylko w temperaturze 0°C albo tylko w temperaturze 37°C, wskazuje na obecność jednofazowych hemolizyn, odpowiednio typu zimnego lub typu ciepłego. W próbkach zawierających tylko surowicę dawcy i krwinki nie powinna wystąpić hemoliza.

UWAGA: Wobec często występującego obniżenia aktywności dopełniacza w surowicy chorego z NZH, hemoliza w próbce z dodatkiem świeżej surowicy dawcy może być znacznie bardziej nasiloną, niż w próbce zawierającej tylko surowicę chorego.

11. Badania immunohematologiczne związane z przeszczepianiem krwiotwórczych komórek macierzystych

U wszystkich biorców i dawców należy przed tym zabiegiem:

1. Określić grupę krwi w układzie ABO i antygenie D z układu Rh oraz fenotyp krwinek czerwonych w zakresie antygenów z układu Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS oraz antygeny P₁.
2. Wykonać badanie przeglądowe przeciwciał przeciw krwinkom czerwonym, a w przypadku ich wykrycia, określić ich swoistość.
3. Uzyskać od lekarza prowadzącego dokładne dane dotyczące leczenia krwią w przeszłości, a w przypadku kobiet także informacje o przebytych ciążach.
4. Przed przeszczepieniem dobierać krew zgodną w fenotypie RhD i antygenie K.
5. Jeżeli biorca i dawca przeszczepu różnią się w antygenie D, to znaczy biorca jest RhD dodatni, dawca RhD ujemny albo biorca RhD ujemny, a dawca RhD dodatni; we wczesnym okresie po przeszczepieniu dobierać krew RhD ujemną.

11.1. Postępowanie w przypadkach niezgodności w układzie ABO między biorcą i dawcą

Rozróżnia się dużą i małą niezgodność w układzie ABO (tab. 9).

11.1.1. Duża niezgodność w układzie ABO

Duża niezgodność w układzie ABO polega na obecności u biorcy przeciwciał anti-A i/lub anti-B, skierowanych przeciw antygenom na krwinkach czerwonych dawcy. Przed przeszczepieniem, poza badaniami wymienionymi powyżej, należy określić

miano przeciwciał z układu ABO, odpowiedzialnych za dużą niezgodność:

- w roztworze NaCl w temperaturze pokojowej,
- w PTA, po zniszczeniu przeciwciał IgM za pomocą 2ME lub DTT.

UWAGA: Uzyskane wyniki są niezbędne dla transplantologa w celu podjęcia ewentualnych procedur zmierzających do ograniczenia niszczącego działania przeciwciał na krwinki czerwone dawcy zawarte w materiale przeszczepowym.

W przypadku dużej niezgodności, po dokonaniu przeszczepienia, dobiera się do przetoczenia KKCz jednoimienny w układzie ABO z biorcą do czasu, gdy na krwinkach nie wykrywa się antygeny biorcy, BTA jest ujemny, a w eluacie z krwinek i w surowicy nie stwierdza się przeciwciał skierowanych do antygenów na krwinkach dawcy. Częstość tych badań określa lekarz prowadzący.

Przetaczane osocze i KKP muszą być zgodne w ABO z dawcą.

11.1.2. Mała niezgodność w układzie ABO

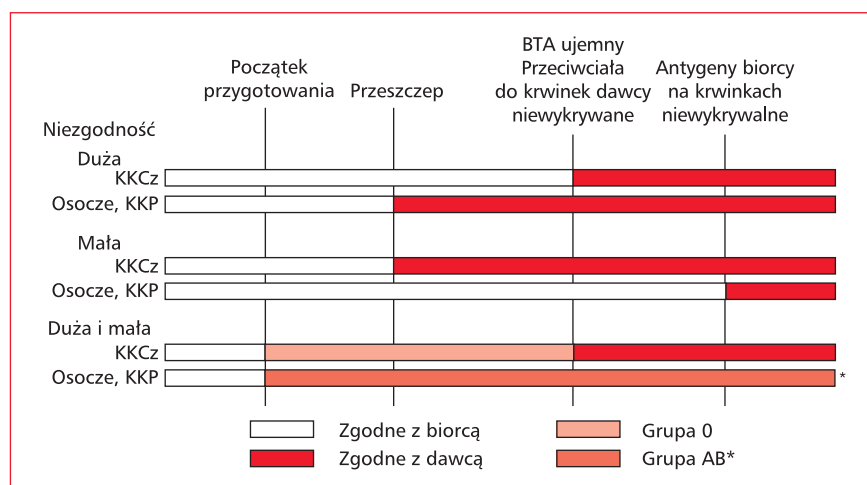
Jako małą niezgodność określa się obecność w surowicy dawcy przeciwciał anti-A i/lub anti-B, skierowanych przeciwko antygenom na krwinkach biorcy. Przed przeszczepieniem, na zlecenie lekarza prowadzącego, określa się poziom przeciwciał z układu ABO u dawcy przeszczepu. Stosuje się w tym celu techniki omówione przy dużej niezgodności.

Do przetoczenia dobiera się KKCz jednoimienny w układzie ABO z dawcą; przy czym do czasu, gdy już nie wykrywa się na krwinkach antygenów biorcy, przetaczane krwinki czerwone powinny być maksymalnie pozbawione osocza. Przetaczane osocze i KKP winny pochodzić z krwi jednoimiennej z biorcą. Przetaczanie tych składników zgodnych w układzie ABO z dawcą można rozpocząć dopiero

Tabela 9. Niezgodność w układzie ABO między biorcą i dawcą macierzystych komórek homopoetycznych

Table 9. ABO blood group incompatibility between recipient and donor of haematopoietic stem cells

Grupa krwi		Rodzaj niezgodności	Przetoczenia we wczesnym okresie	
Biorca	Dawca		KKCz	Osocze i KKP
O	A, B, AB	Duża	Jednoimienny z biorcą	Jednoimienne z dawcą
A	AB			
B	AB			
AB	O, A, B	Mała	Jednoimienny z dawcą	Jednoimienne z biorcą
A	O			
B	O			
A	B	Duża i mała	Grupa O	Grupa AB
B	A			



Rycina 2. Transfuzje składników krwi u biorcy przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych niezgodnych w układzie ABO

Figure 2. Transfusion of blood components in recipients of haemopoietic stem cells incompatible in ABO blood group

wówczas, gdy na krwinkach chorego nie stwierdza się jego pierwotnych antygenów.

Poszukiwanie antygenów biorcy na krwinkach wykonuje się metodą bezpośredniej aglutynacji, za pomocą przeciwciał monoklonalnych, techniką probówkową lub mikrokolumnową.

11.1.3. Jednoczesna duża i mała niezgodność w układzie ABO

Występuje ona wówczas, gdy u biorcy są przeciwiła skierowane do antygeny na krwinkach dawcy, a u dawcy przeciwiła do antygeny na krwinkach biorcy. W tych przypadkach przed wykonaniem przeszczepu zaleca się wykonanie wszystkich badań omówionych przy dużej i małej niezgodności. Do przetoczeń należy dobierać KKCz grupy O. Przetaczane osocze i KKP powinny pochodzić od dawców grupy AB. Zaleca się również, aby takie postępowanie wdrożyć z chwilą przygotowywania biorcy do przeszczepienia komórek macierzystych (ryc. 2).

11.2. Odczyny hemolityczne u chorych z przeszczepionymi komórkami macierzystymi

Hemoliza podczas infuzji preparatu komórek macierzystych jest zjawiskiem wyjątkowym i może się zdarzyć wówczas, gdy nie podjęto odpowiedniego postępowania ograniczającego działanie przeciwciał układu ABO na krwinki czerwone dawcy. Uważa się, że ryzyko hemolizy nie istnieje, jeśli miano przeciwciał nie przekracza 16. Mała niezgodność nie prowadzi do hemolizy podczas zabiegu przeszczepiania.

11.2.1. Odczyn hemolityczny w dużej niezgodności

Kliniczne objawy odczynu hemolitycznego, który jest zjawiskiem rzadkim, mogą pojawiać się najczęściej między 37. a 105. dniem po przeszczepieniu. Odczyn ten obserwuje się przez 10–94 dni. Jest on następstwem przetrwania w ustroju limfocytów produkujących przeciwiła układu ABO. Należy wówczas wykonać następujące badania:

- BTA,
- poszukiwanie przeciwciał anti-A lub/i anti-B w surowicy i w eluacie z krwinek.

Uzyskane dodatnie wyniki potwierdzają klinicznie wyrażony odczyn hemolityczny. Do czasu jego ustąpienia należy dobierać KKCz grupy O.

11.2.2. Odczyn hemolityczny w małej niezgodności

Odczyn ten występuje stosunkowo często u chorych leczonych cyklosporyną, którzy jednocześnie nie otrzymują metotreksatu. Każdy chory z tej grupy jest obarczony ryzykiem odczynu hemolitycznego, który najczęściej pojawia się po kilku lub kilkunastu dniach od zabiegu przeszczepienia.

Konieczne jest, zatem wykonywanie okresowych badań kontrolnych w kierunku obecności przeciwciał układu ABO, produkowanych przez przeniesione limfocyty (*passenger lymphocytes*) dawcy, które powodują lizę krwinek biorcy. Badania te obejmują:

- poszukiwanie przeciwciał układu ABO w surowicy,

- wykonanie BTA oraz poszukiwanie przeciwciał układu ABO w eluacie z krwinek.

Pierwsze badanie kontrolne powinno być wykonane 5. dnia po przeszczepieniu. Badania należy powtarzać przez kilka tygodni, co kilka dni. Dodatkowo wyniki mogą wyprzedzać kliniczne objawy hemolizy. Należy wówczas dobierać KKCz grupy O; do czasu aż krwinki chorego zostaną zastąpione krwinkami dawcy.

Należy podkreślić, że w rzadkich przypadkach mogą w krążeniu chorego pojawić się odpornościowe przeciwciała z układów grupowych innych niż ABO. Są one produkowane albo przez przetrwałe limfocyty B biorcy, albo przez przeniesione z przeszczepem limfocyty dawcy. Wyniki badań genotypowych biorcy i dawcy przed przeszczepieniem mogą ułatwić ich identyfikację. W takich przypadkach należy dobierać KKCz, który nie zawiera antygeny odpowiadającego wykrytym przeciwciałom.

U biorców narządów litych występują często odczyny hemolityczne w następstwie małej niezgodności i przeniesienia immunokompetentnych limfocytów dawcy, produkujących alloprzeciwciała skierowane do antygenów występujących na krwinkach czerwonych biorcy. Odczyny te występują najczęściej po przeszczepieniu płuc, wątroby, a rzadziej nerki. Występująca niekiedy NAIH jest także następstwem przeniesienia limfocytów dawcy. Odczyn w następstwie dużej niezgodności należy do wyjątków, ponieważ w zasadzie przeszczepia się narządy zgodne w układzie ABO.

11.2.3. Niedokrwistość autoimmunohemolityczna

Zespół ten manifestuje się po kilku, a nawet po kilkunastu miesiącach od dokonania przeszczepu. Występuje jako NAIH z autoprzeciwciałami typu zimnego klasy IgM albo ciepłego klasy IgG. Zasady badania są takie same jak opisano powyżej.

11.2.4. Wykrywanie dwóch populacji krwinek czerwonych

Wykazanie, że krwinki czerwone chorego mają fenotyp identyczny z fenotypem dawcy jest dowodem wskazującym na przyjęcie się przeszczepu. Jest to tak zwany chimeryzm całkowity. Obecność dwóch populacji krwinek czerwonych różniących się w antygenach i wykrywanych w reakcji z odpowiednim odczynnikiem diagnostycznym w postaci aglutynatów na tle jednorodnej zawiesiny świadczy o częściowym chimeryzmie.

12. Zasady trwałej dokumentacji wyniku badania grup krwi (wpis do dokumentów tożsamości i książeczek rejestru usług medycznych)

Celem trwałej ewidencji wyników badań grup krwi jest ułatwienie leczenia krwią; zwłaszcza w przypadkach nagłych, dotyczących zarówno pojedynczych osób, jak i dużych grup ludności podczas masowych katastrof, klęsk żywiołowych itp. W związku z powyższym trwały zapis powinien być wiarygodny i oparty na wynikach badań, obowiązujących u biorców krwi. Zakres tych badań jest następujący:

- oznaczenie grupy krwi układu ABO,
- oznaczenie antygeny D z układu Rh,
- badanie przeglądowe w kierunku obecności przeciwciał odpornościowych,
- ustalenie swoistości wykrytych przeciwciał odpornościowych oraz „naturalnych” o charakterze odpornościowym.

Wpis określonych grup krwi do wymienionych dokumentów może być dokonany tylko na podstawie identycznych wyników, uzyskanych z badania dwóch niezależnie pobranych próbek. Dwie próbki krwi mogą być otrzymane tego samego dnia pod warunkiem, że każde z ich pobrań odbywa się w oddzielnym pomieszczeniu i jest dokonywane przez inne zespoły pobierające i dokumentujące pobrane próbki. W tych przypadkach badania przeglądowe w kierunku przeciwciał odpornościowych wykonuje się w jednej próbce krwi. Jeżeli wykryje się w niej przeciwciała, należy potwierdzić ich obecność w drugiej próbce, a następnie ustalić ich swoistość.

Nadzór nad tymi badaniami jak również nad dokonaniem ich wpisu mogą sprawować tylko diagnosty laboratoryjni, którzy odbyli szkolenie w Centrum Krwiodawstwa i posiadają zaświadczenia uprawniające do wpisywania wyników do dokumentów tożsamości (wzór 11, *patrz* Załącznik), wydane przez dyrektora Centrum Krwiodawstwa. RCKiK zobowiązane jest do prowadzenia rejestru osób uprawnionych.

Wpisu grup krwi można dokonać:

- na podstawie dwóch wyników z pracowni, w której dokonuje się wpisu (obowiązuje wpisanie dwóch numerów i dat badań),
- na podstawie dwóch oryginalnych wyników z różnych pracowni (obowiązuje wpisanie dwóch numerów i dat badań, z zaznaczeniem w książce trwałej ewidencji, z jakiej pracowni pochodzą wyniki badań).

W razie wykrycia przeciwciał odpornościowych, należy obowiązkowo wpisać ich swoistość w rubryce „Uwagi”. Jeżeli wyniki badań dotyczą próbek pobranych w różnym czasie, może się zdarzyć, że przeciwciała wykryto tylko w jednej z nich. W takim przypadku wpisu swoistych przeciwciał odpornościowych dokonuje się na podstawie wyniku badania tej próbki krwi, w której zostały one wykryte.

UWAGI:

- A. Centra Krwiodawstwa mogą wydawać karty grup krwi na podstawie dokumentacji zgodnej z zasadami trwałej ewidencji.
- B. Wszelkie udokumentowane informacje o obecności przeciwciał odpornościowych w przeszłości, pomimo nie wykrywania ich podczas badań, stanowiących podstawę do dokonywanego wpisu, powinny być również wpisane do dokumentu tożsamości lub do Książeczki Rejestru Usług Medycznych.
- C. Takie same zasady wpisu obowiązują także w przypadku wykrycia przeciwciał „naturalnych” o charakterze odpornościowym.

12.1. Sposób prowadzenia trwałej dokumentacji grup krwi

1. Wpisać do księgi ewidencyjnej (wzór 11, *patrz* Załącznik) wszystkie dane zgodnie z wyszczególnionymi rubrykami.
2. Na określonej stronie dokumentu umieścić stempel o ustalonych wymiarach według wzoru 12 (*patrz* Załącznik).
3. W rubryce „Grupa krwi” umieścić odpowiedniej wielkości stempel, na przykład O RhD+ (plus) lub O RhD+ (dodatni) AB RhD– (minus) lub AB RhD– (ujemny).
4. W rubryce „Uwagi” wpisać swoistość przeciwciał odpornościowych (jeśli zostały wykryte).
5. W następnej rubryce wpisać dwa numery badań, łamane przez daty ich wykonania na przykład: 148/02.07.2001, 395/19.03.2003.
6. Z lewej strony ostatniej rubryki podać numer wpisu z księgi ewidencyjnej, natomiast z prawej strony tej rubryki umieścić wąską i czytelną pieczętkę oraz podpis osoby odpowiedzialnej za wpis.

UWAGI:

- A. W przypadkach stwierdzenia rzadko występującej odmiany antygeny układu ABO lub Rh, należy dokonać wpisu, stosując ogólnie przyjęte symbole. W rubryce „Uwagi” zamieszcza się wówczas adnotację „Nietypowy jako biorca krwi”.
- B. Osobom, u których wykryto rzadko występującą odmianę grupy krwi lub przeciwciała odpornościowe, wydaje się dodatkowo szczegó-

łowy wynik badania. Należy w nim scharakteryzować odmianę antygeny grupowego, wykryte przeciwciała odpornościowe wraz z podaniem fenotypu krwinek czerwonych z układu grupowego, do którego zostały one zakwalifikowane. Należy również podać informację, jaką krew trzeba dobierać do przetoczenia. Osoba taka powinna być pouczona o obowiązku przechowywania wyniku łącznie z dokumentem trwałej ewidencji grup krwi.

- C. Wynik badania grup krwi może być przepisany z dokumentu do dokumentu wyłącznie przez osobę posiadającą uprawnienie, o którym mowa powyżej. Jeżeli stwierdzi się nieprawidłowości w zapisie (np. brak jednego z numerów badań), należy pobrać próbkę krwi i wykonać badania kontrolne.
- D. Dla krwiodawców komputerowa baza danych może zastąpić księgę ewidencyjną (wzór 13, *patrz* Załącznik).

12.2. Karty grup krwi

W nowych dowodach osobistych nie ma miejsca na wpisanie grup krwi. W związku z tym zostały opracowane wzory kart grup krwi (wzór 14, *patrz* Załącznik).

Awers karty powinien zawierać dane osobowe (imiona, nazwisko, data i miejsce urodzenia, PESEL, imiona rodziców). Na rewersie karty powinna się znaleźć prostokątna pieczęć z poziomymi rubrykami, o przepisowych wymiarach, zgodnie z podanym wzorem (wzór 13, *patrz* Załącznik). Karta wielkości nowego dowodu osobistego powinna być usztywniona i zafoliowana lub wykonana z tworzywa sztucznego z możliwością dokonywania niezmywalnych wpisów.

Karty grupy krwi mogą wydawać tylko pracownicy i osoby upoważnione przez dyrektora Centrum Krwiodawstwa, w porozumieniu z kierownikiem działu immunologii transfuzjologicznej. Wzór takiej karty musi być zatwierdzony przez Instytut Hematologii i Transfuzjologii (wzór 14, *patrz* Załącznik).

Zgodnie z zasadami trwałej dokumentacji, wiarygodna karta informująca o grupie krwi musi opierać się na badaniach dwóch próbek krwi pobranych w różnym czasie (dwa wkłucia), o czym świadczą wpisane dwa numery badań łamane przez daty ich wykonania. Niezbędna jest także wyraźna pieczęć pracownika oraz osoby odpowiedzialnej za prawidłowość dokonanego wpisu, a także złożony przez nią podpis.

UWAGI:

- A. Osoby upoważnione mogą wydawać karty grup krwi na podstawie prawidłowo dokonanych wpisów w anulowanych dowodach osobistych.

- B. Karty, których wzór nie został zatwierdzony przez IHiT, nie mogą być honorowane przez zakłady opieki zdrowotnej.

13. Serologiczna kontrola jakości odczynników, pobranej krwi i jej składników

Badania te wykonuje się w pracowni kontroli serologicznej, która wchodzi w skład działu kontroli jakości. Wszystkie wykonywane badania powinny być odpowiednio udokumentowane i zaprotokołowane.

13.1. Kontrola odczynników diagnostycznych do badań grup krwi

Zaleca się, aby przed podjęciem decyzji o zakupie odczynników diagnostycznych do badania grup krwi, zażądać od producenta próbek, wykonać badania swoistości i aktywności odczynników oraz sprawdzić, czy dane dotyczące walidacji przedstawione przez producenta są zgodne z wynikami własnych badań i czy odpowiadają normom podanym w pkt. 13.1.2 i 13.1.3.

Pracownia zobowiązana jest do prowadzenia książki badań odczynników diagnostycznych, która powinna zawierać dokumentację i protokoły badań oraz ostateczną ocenę odczynnika. Każda seria odczynnika diagnostycznego musi podlegać następującej ocenie:

- wygląd zewnętrzny: brak zmętnienia, osadu,
- aktywność i swoistość przeciwciał: wyraźne reakcje (dodatnie i ujemne) z odpowiednio dobranymi krwinkami czerwonymi.

UWAGA: Opisana powyżej kontrola jakości dotyczy metod ręcznych. Jeśli odczynniki przeznaczone są do badań techniką mikrokolumnową lub w automacie, wymagania dotyczące kontroli jakości ustala producent.

13.1.2. Kontrola odczynników do badań układu ABO

Aktywność i swoistość: brak rulonizacji i zjawiska prozony; wyraźne reakcje z antygenami o osłabionej ekspresji (np. A₂), brak fałszywych reakcji (kontrola z krwinkami grupy O).

Moc: odczynniki monoklonalne: zawiesinę krwinek sporządzić według zaleceń producenta; aglutynacja powinna pojawić się po 10 sach i po 3 min osiągnąć nasilenie od 3+ do 4+.

Minimalne miano:

Odczynniki monoklonalne anty-A		
Krwinki wzorcowe	A ₁	A ₂
Test szkiełkowy	32	16
Test probówkowy	128	64

Odczynniki monoklonalne anty-B

Krwinki wzorcowe B A₂B

Test szkiełkowy 32 16

Test probówkowy 128 64

UWAGA: W badaniach miana anty-B można stosować, zamiast „starych” (10-dniowych) krwinek B, krwinki A₂B, ponieważ ekspresja B jest w nich słabsza.

13.1.3. Kontrola odczynników do badania antygeny D z układu Rh

Badanie reaktywności i swoistości: analogicznie do badań odczynników dla układu ABO.

Moc: w każdej ze stosowanych metod, po ustalonym dla nich czasie reakcji, aglutynacja z krwinkami heterozygot powinna osiągnąć nasilenie od 3+ do 4+.

Miano odczynników monoklonalnych IgM

Test szkiełkowy: 32

Test probówkowy: 64

UWAGA: Miano należy badać wobec krwinek z heterozygotyczną ekspresją antygenów.

13.1.4. Kontrola odczynników do badania innych antygenów z układu Rh

Swoistość, reaktywność i moc bada się tak samo jak w przypadku odczynników anty-D.

Miano: w teście szkiełkowym i probówkowym nie niższe niż 16.

13.1.5. Kontrola odczynników diagnostycznych do badania antygenów z innych układów grupowych

Odczynniki powinny podlegać badaniom przy użyciu metod zalecanych przez producenta.

Obowiązuje badanie swoistości oraz reaktywności i mocy wobec krwinek heterozygot.

Jeśli producent określił miano odczynnika, należy je sprawdzić.

13.1.6. Kontrola poliwalentnego odczynnika antyglobulinowego (anty-IgG + anty-C3d)

Swoistość: brak aglutynacji i hemolizy krwinek wszystkich grup układu ABO w teście antyglobulinowym klasycznym i PTA-LISS po inkubacji z surowicą niezawierającą przeciwciał odpornościowych.

Reaktywność:

- a) aglutynacja oceniana na nie więcej niż 2+ z krwinkami uczulonymi Standardem anty-D,
- b) nasilenie aglutynacji krwinek uczulonych przeciwciałami wiążącymi dopełniacz (np. anty-Jk^a) w dwustopniowym teście antyglobulinowym jest większe niż w klasycznym teście antyglobulinowym i w PTA-LISS.

13.1.7. Postępowanie po dokonaniu oceny firmowych odczynników diagnostycznych

1. Pochodzące z importu odczynniki każdej sprawdzonej serii należy zaopatrzyć w przepisy użycia w języku polskim.
2. Jeżeli w trakcie stosowania odczynnika zgłoszono jakieś zastrzeżenia, a jego termin ważności nie został przekroczony, należy odczynnik ponownie skontrolować i ewentualnie zgłosić reklamację u producenta.

13.2. Kontrola roztworów stosowanych w badaniach

13.2.1. Roztwór NaCl

Roztwór zawiera 9 g NaCl w litrze wody destylowanej lub dejonizowanej; pH roztworu powinno wynosić 6,6–7,6. Jeśli pH nie mieści się w tych granicach, należy doprowadzić je do odpowiedniej wartości za pomocą buforu fosforanowego.

13.2.2. Roztwór LISS

Optymalne pH roztworu wynosi 6,7 (dopuszczalne granice 6,5–7,0). Jeśli pH nie mieści się w tych granicach, należy doprowadzić je do odpowiedniej wartości za pomocą HCl lub NaOH.

13.2.3. Odczynnik papainowy

Reaktywność:

- dodanie odczynnika nie powinno powodować aglutynacji ani hemolizy zawiesiny krwinek w roztworze NaCl,
- dodanie odczynnika do zawiesiny krwinek w roztworze NaCl, do której dodano równą objętość surowicy niezawierającej przeciwciał nie powinno powodować aglutynacji ani hemolizy,
- dodanie odczynnika do zawiesiny krwinek w roztworze NaCl, do której dodano równą objętość Standardu anty-D powinno powodować ich aglutynację.

13.3. Kontrola serologiczna pobranej krwi

Zaleca się, aby kontrolę serologiczną wszystkich składników krwi, w tym również osocza, KKP oraz koncentratu granulocytarnego pobranych metodą aferezy, wykonywać metodą automatyczną z próbki krwi pobranej w tym celu do próbówki z EDTA oznakowanej kodem donacji. Próbkę krwi należy wówczas pobrać w tym samym czasie, w którym pobierana jest próbka do diagnostyki czynników zakaźnych. Badanie przeprowadza się z odczynnikami anty-A, anty-B i anty-D. Do kontrolowania osocza nie stosuje się odczynnika anty-D. Jeśli kon-

trołę serologiczną przeprowadza się metodą manualną, wtedy badania można wykonywać z segmentu drenu lub z próbówki. Kontrolę serologiczną powinien wykonywać dwuosobowy zespół pracowników o pełnych kwalifikacjach, wyznaczony przez kierownika działu immunologii transfuzjologicznej. Jeżeli wyniki badania kontrolnego są natychmiast wprowadzane do komputera, który ma system blokujący błędny wynik, badania kontrolne może wykonywać i odczytywać jedna osoba. Podczas kontroli należy ściśle przestrzegać przyjętej kolejności postępowania, co zmniejsza do minimum możliwość błędów technicznych i omyłek, zwłaszcza spowodowanych monotonią pracy i odwróceniem uwagi osoby wykonującej badanie. Do kontroli należy stosować odczynniki monoklonalne anty-A, anty-B i anty-D. Zaleca się następującą kolejność czynności:

1. Do książki kontroli serologicznej przepisać numer donacji z etykiety pojemnika zawierającego pobraną krew. Zaleca się wklejanie etykiet samoprzylepnych z numerem donacji.
2. Zapisać w górnej części płyty symbole odczynników (anty-A, anty-B, anty-D), a z lewej strony numer donacji.
3. Umieścić na płycie po kropli odpowiednich odczynników (zgodnie z wypisanymi ich symbolami).
4. Przenieść z drenu lub z próbówki na płytę po kropli badanej krwi.
5. Po zmieszaniu reagentów i upływie trzech minut odczytać wyniki i zaprotokołować je w książce.
6. Po sprawdzeniu zgodności wyników oraz całej dokumentacji, nakleić wypełnione etykiety kontroli serologicznej (wzór 14, *patrz Załącznik*) na pojemnik z krwią i na wszystkie puste pojemniki satelitarne. Na etykietach umieścić podpis lub numer kodowy osoby kontrolującej.
7. Wszystkie segmenty drenu oznakować numerem donacji oraz wynikiem grupy krwi ABO i Rh zgodnie z etykietą główną.

Jeśli kontrolę serologiczną osocza pobieranego metodą plazmaferezy oraz KKP z aferezy wykonuje się z segmentów drenów, wówczas badania przeprowadza się z krwinkami wzorcowymi O, A₁, B.

Koncentrat granulocytarny powinien być sprawdzany z odczynnikami anty-A, anty-B i anty-D, ponieważ zawiera znaczną domieszkę krwinek czerwonych.

Osocze otrzymane z krwi pełnej w systemie zamkniętym nie podlega powyższej kontroli. Obowiązuje dokładne sprawdzenie zgodności zapisu na etykiecie głównej i na etykiecie pojemnika z osoczem przed jego odłączeniem od pojemnika macierzystego.

UWAGI:

- A. Jeżeli protokolowane badania i uzyskane wyniki są bezpośrednio rejestrowane w komputerze, można nie prowadzić książki kontroli serologicznej.
- B. W przypadku dawcy pierwszorazowego, etykieta główna powinna być przyklejona na pojemnik dopiero po wykonaniu badań dwóch próbek krwi dawcy w pracowni serologicznej.
- C. Jeżeli kontrola wykonywana jest z KKCz, pojemnik z osoczem można oddzielić dopiero po oznakowaniu go etykietą kontroli serologicznej.
- D. Jeżeli kontrolę serologiczną wykonuje się metodą automatyczną, należy postępować zgodnie z zaleceniami producenta.
- E. Kontrolę serologiczną przeprowadza się bezpośrednio po pobraniu krwi albo w późniejszym czasie (np. w przypadku krwi pobieranej na ekipach wyjazdowych lub w Oddziałach Terenowych).
- F. Jeżeli kontrolę serologiczną wykonuje się metodą automatyczną, zgodnie ze Standardem znakowania ISBT 128, można odstąpić od naklejania etykiet kontroli serologicznej na pojemniki z krwią i na puste pojemniki satelitarne.

13.4. Kontrola jakości w pracowni immunologii transfuzjologicznej

Procedury kontroli jakości dzielą się na kontrolę wyposażenia, odczynników i wykonywanych badań. Klasyfikacja ta jest czytelna, mimo że niektóre czynności kontrolne zachodzą na siebie. Dotyczy to szczególnie kontroli odczynników i techniki badania.

13.4.1. Kontrola jakości wyposażenia

Regularna kontrola dotyczy w szczególności wirówek, aparatury do automatycznego przemywania krwinek, łaźni wodnych, lodówek i zamrażarek. Automaty do badania grup krwi podlegają systematycznej kontroli zgodnie z instrukcją producenta.

13.4.2. Kontrola jakości odczynników

Zalecane procedury dotyczą odczynników stosowanych głównie w badaniach ręcznych. Odczynniki stosowane w innych technikach, w tym w automatach, podlegają specjalnej, bardziej szczegółowej kontroli jakości, której zakres zazwyczaj przekazuje producent wyposażenia.

13.4.3. Kontrola jakości techniki badań

Jeżeli jakość wyposażenia i odczynników spełnia wymagania, fałszywe wyniki są następstwem

wadliwej techniki w związku z zastosowaniem nieodpowiedniej metody albo, co zdarza się częściej, w związku z „błędem operacyjnym”, który polega na niedokładnym przeprowadzeniu badania albo na nieprawidłowej ocenie wyniku.

13.4.4. Kontrola jakości pracy

Kontrola jakości pracy obejmuje:

- kontrolę wewnętrzną, dotyczącą pracowników Centrum Krwiodawstwa,
- kontrolę zewnętrzną, dotyczącą laboratoriów szpitalnych i innych wykonujących badania z zakresu serologii transfuzjologicznej.

13.4.4.1. Kontrola wewnętrzna

Każdy pracownik wykonujący badania i zatrudniony w pracowniach Działu Immunologii Transfuzjologicznej oraz każdy pracownik wykonujący badania w pracowni serologii transfuzjologicznej podlega okresowej kontroli, nie rzadziej niż 2 razy w roku, dokonywanej przez kierownika pracowni. Kierownik pracowni przygotowuje próbki krwi do badań i ocenia uzyskane wyniki.

13.4.4.2. Kontrola zewnętrzna

Kontroli zewnętrznej są poddawane wszystkie laboratoria wykonujące badania z zakresu serologii transfuzjologicznej.

13.4.4.3. Przygotowanie materiału kontrolnego

1. Jako materiał kontrolny, przygotować odpowiednio objętości osocza lub surowic ze słabo reagującymi przeciwciałami (o mianie 4 lub niższym).
2. Jedną z próbek kontrolnych powinna być surowica lub osocze niezawierające przeciwciał.
3. Poszczególne odczynniki kontrolne rozlać do ampulek (po ok. 2 ml), oznaczonych numerami kodowymi i przechowywać w temperaturze -20°C .
4. Materiał kontrolny musi być wystandaryzowany przed wysłaniem.
5. Do wysyłanych próbek kontrolnych dołączyć formularze z protokołami badań oraz pismo przewodnie z dokładną instrukcją postępowania i dokumentowania wyników oraz terminem przekazania ich do Centrum Krwiodawstwa.

UWAGI:

- A. Materiałem kontrolnym może być osocze dawców, u których wykryto przeciwciała lub też odpowiednio rozcieńczone osocze osób uodpornionych. Do rozcieńczania należy stosować odpowiednią surowicę lub osocze.
- B. Próbkę kontrolną może też stanowić osocze zawierające przeciwciała o wyższym mianie (np. 32). W takim przypadku należy zlecić wy-

konanie miana przeciwciał z dokładną dokumentacją wyników.

13.4.4.4. Zadania dla kontrolowanej pracowni

Kierownik pracowni wyznacza osobę (osoby), której zleca wykonanie badań materiału kontrolnego.

W skład tych badań wchodzi:

- wykrywanie przeciwciał we wszystkich testach stosowanych rutynowo w pracowni (test enzymatyczny LEN, PTA-LISS, PTA klasyczny, NaCl, testy kolumnowe), z zastosowaniem używanego zestawu krwinek wzorcowych,
- wykonanie miana przeciwciał w odpowiednich testach,
- dokładne protokołowanie wykonanych badań z uwzględnieniem nasilenia aglutynacji (od +słaby do 4+).

Protokół badania powinien zawierać następujące dane:

- a) nazwa pracowni kontrolowanej,
- b) datę badania,
- c) datę otrzymania próbki kontrolnej,
- d) numer kodowy próbki,
- e) numery krwinek stosowanych do badań oraz serii odczynników.

13.4.4.5. Zadania dla Centrum przeprowadzającego kontrolę

Po otrzymaniu wszystkich protokołów badań należy dokonać analizy wyników oraz sporządzić zestawienie wszystkich pracowni, które wzięły udział w przeprowadzanej kontroli. Na tej podstawie Centrum Krwiodawstwa decyduje o konieczności dodatkowego przeszkolenia pracowników lub podejmuje kroki zmierzające do zawieszenia działalności danej pracowni.

14. Zasady uodparniania krwiodawców

Zamierzone uodparnianie krwiodawców przeprowadza się w celu uzyskania osocza do produkcji immunoglobuliny anty-D, stosowanego w profilaktyce konfliktu Rh oraz do produkcji immunoglobuliny anty-HBs, stosowanego w profilaktyce zakażenia HBV.

14.1. Wytyczne w sprawie orzeczeń lekarskich o dopuszczalności do uodparnienia w celu uzyskania leczniczych produktów krwiopochodnych

Powyższe wytyczne zawarte są w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 19 września 2005 roku, Dz.U., nr 191, poz. 1607.

Centrum Krwiodawstwa zobowiązane jest do przechowywania przez 30 lat dokumentacji związanej z uodparnieniem.

Odpłatność dla dawców krwinek służących do uodparnienia i osób poddających się zabiegom uodparnienia, a następnie zakwalifikowanych do oddania krwi albo osocza do produkcji leczniczych produktów krwiopochodnych, regulowana jest według stawek określanych przez Ministerstwo Zdrowia.

14.2. Zasady pobierania i kwalifikowania krwi służącej do uodparniania

Podczas zabiegów uodparniania należy kierować się następującymi zasadami:

- zabiegi uodparniania i pobieranie próbek krwi powinny być wykonywane w oddzielnym pomieszczeniu, w którym musi znajdować się zestaw do reanimacji.
- krwiodawcy w trakcie uodparniania krwinkami czerwonymi nie mogą oddawać krwi do celów leczniczych.
- z chwilą pojawienia się w ich surowicy przeciwciał odpornościowych, należy ten fakt odnotować w zaświadczeniu (wzór 15, patrz Załącznik).

Krew do uodparniania pobiera się od stałych dawców grupy O Rh+. Krwiodawca przed każdym oddaniem krwi do uodparniania podlega badaniom lekarskim i laboratoryjnym, w takim samym zakresie jak dawca oddający krew dla celów leczniczych. Konieczne jest wykonanie u niego badań w kierunku RNA HCV, DNA HBV, DNA HIV oraz materiału genetycznego parwowirusa B19.

Jeśli nie ma możliwości wykonania tych badań, należy przesłać próbkę krwi do Pracowni Biologii Molekularnej IHiT.

Krew pobrana do uodparniania podlega 4-miesięcznej karencji (w stanie zamrożenia). Pod koniec okresu karencji należy skontrolować u dawcy znaczniki zakażeń wirusowych testami immunoenzymatycznymi oraz metodami biologii molekularnej.

14.3. Zamierzone uodparnianie w celu uzyskania przeciwciał anty-D

Uodparnianie nowych dawców-ochotników jest konieczne, ze względu na brak innych źródeł przeciwciał anty-D, służących do produkcji immunoglobuliny anty-D. Dotychczas nie udało się uzyskać monoklonalnych przeciwciał anty-D, które można byłoby zastosować w profilaktyce konfliktu Rh.

Uodparnia się wybranych dawców RhD– (dccee), niezależnie od ich grupy układu ABO.

Do wywołania i stymulacji odpowiedzi immunologicznej, której efektem są przeciwciała anty-D,

najbardziej przydatne są krwinki o fenotypie DccEE, ze względu na znaczną immunogenność antygeny D takich krwinek. Można też stosować krwinki RhD dodatnie o innym fenotypie.

Krwinki służące do uodparniania powinny być zgodne z krwinkami dawcy uodparnianego w zakresie antygenów innych układów grupowych, znanych ze swej immunogenności, to znaczy K, Fy^a, Jk^a, S.

Podawanie krwinek powinno odbywać się powoli, poprzez ich dożylny wstrzyknięcie. Po każdym zabiegu dawca musi pozostać w Centrum Krwiodawstwa pod obserwacją personelu pielęgniarskiego na czas około jednej godziny. Dopuszcza się kilka schematów uodparniania, różniących się między sobą ilością podawanych krwinek, liczbą wstrzyknięć i długością przerw między nimi.

14.3.1. Schematy dożylnego uodparniania

Schematy uodparniania zostały oparte na wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia, doświadczeniach Instytutu Hematologii i Transfuzjologii oraz niektórych Centrów Krwiodawstwa.

14.3.1.1. Wywołanie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej

Schemat 1:

- pierwsza dawka: 5 ml krwinek,
- po upływie jednego miesiąca: kontrola przeciwciał,
- po 3 miesiącach od wstrzyknięcia: kontrola przeciwciał i przy ich braku druga dawka — 2 ml krwinek,
- po miesiącu: kontrola przeciwciał i przy ich braku trzy dawki po 2 ml krwinek w odstępach 2-tygodniowych, z kontrolą przeciwciał przed każdym wstrzyknięciem,
- po jednym i po 3 miesiącach od ostatniego wstrzyknięcia: kontrole przeciwciał.

Jeżeli w tym okresie dawca nie wytworzy przeciwciał, rezygnuje się z dalszego uodparniania.

Krwiodawca może od tej chwili oddawać krew dla celów leczniczych, pod warunkiem kontroli obecności przeciwciał przed każdym oddaniem krwi lub osocza w ciągu roku.

Schemat 2:

- pierwsza dawka: 5 ml krwinek,
- po miesiącu: kontrola przeciwciał i przy ich braku druga dawka — 2 ml krwinek,
- po miesiącu: kontrola przeciwciał i przy ich braku trzecia dawka — 2 ml krwinek,
- po miesiącu: kontrola przeciwciał,
- po 3 miesiącach: kontrola przeciwciał i przy ich braku rezygnacja z dalszego uodparniania (*patrz* schemat 1).

Schemat 3:

- pierwsza dawka: 5 ml krwinek,
- po 2 tygodniach: druga dawka — 2 ml krwinek,
- po 2 tygodniach: kontrola przeciwciał i przy ich braku trzecia dawka — 2 ml krwinek,
- po 2 tygodniach: kontrola przeciwciał i przy ich braku czwarta dawka — 2 ml krwinek,
- kontrola przeciwciał po 2 i 4 tygodniach oraz po 3 miesiącach od ostatniego wstrzyknięcia. Jeżeli dawca w tym okresie nie wytworzy przeciwciał, należy zrezygnować z dalszego uodparniania (*patrz* schemat 1).

Schemat 4:

- pierwsza dawka: 10 ml krwinek,
- po 2 tygodniach: kontrola przeciwciał i przy ich braku druga dawka — 5 ml krwinek,
- po 2 tygodniach: kontrola przeciwciał i przy ich braku trzecia dawka — 2 ml krwinek,
- po 2 i 4 tygodniach oraz po 3 miesiącach: kontrola przeciwciał.

Jeżeli dawca w tym okresie nie wytworzy przeciwciał, rezygnacja z dalszego uodparniania (*patrz* schemat 1).

Wszystkie badania kontrolne w kierunku obecności przeciwciał anti-D w pierwszym cyklu uodparniania należy wykonywać najczulszymi metodami (test z krwinkami papainowanymi, test enzymatyczny LEN, enzymatyczny test kolumnowy).

UWAGI:

- A. Zgodnie z doświadczeniami wielu ośrodków, po zastosowaniu krwinek przechowywanych w zamrożeniu, uodparnianie według schematu ustalonego dla krwinek świeżych nie spełnia oczekiwań dotyczących wywołania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej.
- B. Wiadomo, że krwinki w trakcie rozmrażania ulegają częściowemu mechanicznemu uszkodzeniu, co skraca ich czas przeżycia w krążeniu biorcy, a tym samym okres stymulacji antygenowej i jej nasilenie.
- C. Wymienione wyżej fakty skłaniają do modyfikacji schematu pierwszego cyklu uodparniania, polegającej na skróceniu przerw między poszczególnymi dawkami lub zwiększeniu początkowych dawek.
- D. Wskazane jest rozpoczęcie uodparniania możliwie dużej grupy dawców-ochotników, ze względu na prawdopodobieństwo uzyskania zamierzonego efektu jedynie u 50–60% z nich.

14.3.1.2. Stymulacja wtórnej odpowiedzi immunologicznej

Jeżeli w trakcie pierwszego cyklu uodparniania, w którymkolwiek badaniu kontrolnym, zosta-

nie ujawniona obecność przeciwciał anty-D, należy odstąpić od schematu wywołania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej i po 2 tygodniach od ostatniej dawki podać 2 ml krwinek (stymulacja wtórnej odpowiedzi immunologicznej). Po przeprowadzeniu kontroli, u większości osób uodparnianych, już po 2 tygodniach od tego wstrzyknięcia można przeprowadzić pierwszą plazmaferezę.

Dalsze postępowanie w przypadkach uodparnianych osób przedstawiono poniżej.

1. Pobierane osocze należy systematycznie kontrolować (półilościowe badanie przeciwciał w mianie).
2. Przydatność osocza do produkcji immunoglobuliny anty-D oceniać na podstawie miana przeciwciał anty-D w teście antyglobulinowym, wykonanym metodą probówkową. Nie powinno być ono niższe niż 256, chyba, że producent ma inne wymagania.
3. Gdy miano przeciwciał ulega obniżeniu, stosować dalszą stymulację dawkami po 1 ml krwinek.

Odstępy pomiędzy wstrzyknięciami powinny wynosić nie mniej niż 3 miesiące.

UWAGI:

- A. Na etykiecie pobranego osocza powinna znaleźć się informacja o treści: „Dawca immunizowany. Przeciwciała anty-D miano...”.
- B. Dawcy systematycznie poddawani stymulacji antygenowej krwinkami czerwonymi powinni być raz w roku kontrolowani w kierunku obecności dodatkowych przeciwciał za pomocą odpowiednio dobranego zestawu krwinek Rh ujemnych, pochodzących od homozygot w zakresie różnych układów grupowych.

14.3.2. Dokumentacja uodparniania dawców

Każdy dawca uodparniany powinien mieć oddzielnie prowadzoną dokumentację, na przykład teczkę/skoroszyt. Powinna ona zawierać:

- dane personalne,
- oświadczenie podpisane przez dawcę,
- kwalifikację lekarską dawcy do uodparniania,
- protokoły wstępnych badań serologicznych, kwalifikujących dawcę do uodparniania odpowiednimi krwinkami,
- wyniki badań kontrolnych w kierunku zakażeń wirusowych,
- protokoły zabiegów z datą, rodzajem, ilością wstrzykniętej krwi (imię i nazwisko osoby, od której pochodzi krew),
- uwagi na temat samopoczucia dawcy po zabiegach,
- protokoły kontrolnych badań serologicznych i terminy dalszych wstrzyknięć krwi.

Odpowiednie adnotacje dotyczące uodparniania muszą też być zamieszczone w głównej kartotece krwiodawcy. Powinny się tam znaleźć takie informacje, jak: data rozpoczęcia uodparniania, data zakwalifikowania do plazmaferezy, data rezygnacji z dalszego uodparniania, obowiązujący okres badań kontrolnych.

Piśmiennictwo

Przepisy dotyczące badań u krwiodawców, chorych i kobiet w ciąży

1. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 14th edition. Council of Europe Publishing 2008.
2. Murphy M.F, Allard S., Newland A.C. Modernizing hospital transfusion laboratory services. *Transfusion Med.* 2009; 19: 153–155.
3. Guidelines for the Estimation of Fetomaternal Haemorrhage. British Committee for Standards in Haematology Transfusion Taskforce. Working Party: Austin E., Bates S., de Silva M. i wsp. 2009. www.bcsghguidelines.com; 8.12.2009.
4. Gooch A., Parker J., Wray J., Qureshi H. Guideline for blood grouping and antibody testing in pregnancy. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. *Transf. Med.* 2007; 17: 252–262.
5. Routine antenatal anti-D prophylaxis for women who are rhesus D negative. National Institute for Health and Clinical Excellence. 2008. www.nice.org.uk; 8.12.2009.
6. Guidelines on the management of massive blood loss. British Committee for Standards in Haematology: Writing Group: Stainsby D., MacLennan S., Thomas D., Isaac J., Hamilton P.J. *Brit. J. Haematol.* 2006; 135: 634–641.
7. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the UK (Red Book). Chapter 12. Reagent manufacture. 7th edition. Published by London TSO (The Stationery Office) 2005.
8. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the UK (Red Book). Chapter 13. Donation testing (red cell immunohaematology). 7th edition. Published by London TSO (The Stationery Office) 2005.
9. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the UK (Red Book). Chapter 14. Patient testing (red cell immunohaematology). 7th edition. Published by London TSO (The Stationery Office) 2005.
10. Guidelines for pretransfusion procedures in blood transfusion laboratory. Working party for British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. *Transfusion Medicine* 2004; 14: 59–73.
11. Transfusion guidelines for neonates and older children. British Committee for Standards in Haematology. *Br. J. Haematol.* 2004; 124: 433–453.
12. Practice guidelines for prenatal and perinatal immunohematology, revisited. Judd J.W. for the scientific Section Coordinating Committee of the AABB. *Transfusion* 2001; 41: 1445–1452.
13. Lapiere V., Kuentz M., Tiperghien P. Allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation: guidelines for red blood cell immunohematological assessment and transfusion practice. *Bone Marrow Transplantation* 2000; 25: 507–512.

Akty prawne obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi dotyczące pracy w laboratoriach wykonujących badania w zakresie immunologii transfuzjologicznej

1. Ustawa z dnia 27 lipca 2001 roku o diagnostyce laboratoryjnej (Dziennik Ustaw, nr 100, poz. 1083).
2. Ustawa z dnia 28 sierpnia 2003 roku o zmianie ustawy o diagnostyce laboratoryjnej oraz zmianie innych ustaw (Dziennik Ustaw, nr 171, poz. 1663).
3. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 kwietnia 2004 roku w sprawie trybu przeprowadzania kontroli w niektórych jednostkach publicznej służby krwi (Dziennik Ustaw, nr 84, poz. 794).
4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 listopada 2004 roku w sprawie wymagań zasadniczych dla wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro* (Dziennik Ustaw, nr 251, poz. 2515).
5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 4 listopada 2004 roku w sprawie określenia kwalifikacji wymaganych od osób zatrudnionych w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi (Dziennik Ustaw, nr 247, poz. 2482).
6. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2004 roku w sprawie określania rzadkich grup krwi, rodzajów osocza i surowic diagnostycznych wymagających przed pobraniem krwi zabiegu uodpornienia dawcy lub innych zabiegów oraz wysokości ekwiwalentu pieniężnego za pobraną krew i związane z tym zabiegi (Dziennik Ustaw, nr 263, poz. 2625).
7. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 19 września 2005 roku w sprawie określania sposobu i organizacji leczenia krwią w zakładach opieki zdrowotnej, w których przebywają pacjenci ze wskazaniami do leczenia krwią i jej składnikami (Dziennik Ustaw, nr 191, poz. 1607).
8. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 23 marca 2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych mikrobiologicznych (Dziennik Ustaw, nr 61, poz. 435).
9. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 listopada 2007 roku zmieniające rozporządzenie w sprawie określania rzadkich grup krwi, rodzajów osocza i surowic diagnostycznych wymagających przed pobraniem krwi zabiegu uodpornienia dawcy lub innych zabiegów oraz wysokości ekwiwalentu pieniężnego za pobraną krew i związane z tym zabiegi (Dziennik Ustaw, nr 214, poz. 1582).
10. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 21 stycznia 2009 roku zmieniające rozporządzenie w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych mikrobiologicznych (Dziennik Ustaw, nr 22, poz. 128).

Podręczniki i publikacje

1. Daniels G. Human Blood Groups. 2nd edition. Blackwell Science Ltd, Oxford. 2002
2. Dzierżkowska-Borodej W., Seyfried H., Lisowska E. Serological classification of anti-I sera. Vox Sang 1975; 28: 110–121.
3. Fabijańska-Mitek J. Immunologia krwinek czerwonych. Grupy krwi. Oinpharma, Warszawa. 2006.
4. Fabijańska Mitek J. Immunologia krwinek czerwonych. Niedokrwistości Immunohemolityczne. Oinpharma, Warszawa 2008.
5. Gajewski J.L., Johnson V.V., Sandler S.G., Sayegh A., Klumpp T.R. A review of transfusion practice before, during, and hematopoietic progenitor cell transplantation. Blood 2008; 112: 3036–3047.
6. Issitt P.D., Combs M.R., Bredehoeft S.J. i wsp. Lack of clinical significance of 'enzyme-only' red cell antibodies. Transfusion 1993; 33: 284–293.
7. Issitt P.D., Anstee D.J. Applied Blood Group Serology. 4th edition. Montgomery Scientific Publications, Durham 1998.
8. Klein H., Anstee D. Mollison's blood transfusion in clinical medicine. 11th edition. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
9. Knowles S.M., Milkins C.E., Chapman J.F., Scott M. The United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (blood transfusion laboratory practice): trends in proficiency and practice between 1985 and 2000. Transfusion Medicine 2002; 12: 11–23.
10. Korsak J., Łętowska M. Transfuzjologia kliniczna. α -media press, Kraków 2009.
11. Kuśnierz-Alejska G. Antygen D z układu Rh, jego słabe odmiany i kategorie. Acta Hemat. Pol. 2000; 3: 11–16.
12. Kuśnierz-Alejska G. Częstość występowania poszczególnych fenotypów i antygenów z układu grupowego MNS w populacji polskiej. Acta Hemat. Pol. 2000; 31: 273–278.
13. Kuśnierz-Alejska G. Antygeny krwinek czerwonych i ich klasyfikacja. Acta Hemat. Pol. 2001; 32: 147–154.
14. Michalewska B., Fabijańska-Mitek J., Żupańska B. Wykrywanie alloprzeciwciał u chorych z autoprzeciwciałami typu ciepłego przy użyciu glikolu polietylenowego (PEG). Acta Hemat. Pol. 2002; 33: 203–220.
15. Michalewska B. Czy autokontrola jest potrzebna w badaniach przedtransfuzyjnych? Acta Haematologia Pol. 2003; 34: 211–218.
16. Michalewska B., Żupańska B., Pelc-Kłopotowska M. i wsp. Alloimmunizacja u chorych na niedokrwistość autoimmunohemolityczną oraz genotypowanie krwinek czerwonych w celu udoskonalenia doboru krwi do przetoczeń. Journal of Transfusion Medicine 2009; 2: 14–19.
17. Mollison P.L., Engelfriet C.P., Contreras M. Blood Transfusion in Clinical Medicine 10th edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.
18. Pelc-Kłopotowska M., Orzińska A., Michalewska A. i wsp. Badanie obecności fragmentów genu RHD u dawców RhD ujemnych z zastosowaniem manipulowania i technologii real-time PCR. Journal of Transfusion Medicine 2008; 1: 36–39.
19. Petz L.D., Garratty G. Immune Hemolytic Anemias. 2nd edition. Churchill Livingstone, Philadelphia 2004.
20. Rowley S.D. Haematopoietic stem cell transplantation between red cell incompatible donor-recipient pairs. Bone Marrow Transplantation 2001; 28: 315–321.
21. Seyfried H., Walewska I. Immune hemolytic transfusion reactions. World Journal of Surgery. 1988; 11: 25–29.
22. Seyfried H., Walewska I., Werblińska B. Unusual inheritance of ABO group in a family with weak B antigens. Vox Sang 1964; 9: 268–277.
23. Voak D., Downie D.M., Moore B.P.L., Ford D.S., Engelfriet C.P., Case J. Replicate tests for the detection and correction of errors in anti-human globulin (AHG) tests: optimum conditions and quality control. Haematologia 1988; 21: 3–16.

Załącznik

SKIEROWANIE NA KONSULTACYJNE BADANIA SEROLOGICZNE	
(pieczęć placówki kierującej)	Data
	Do Pracowni Konsultacyjnej Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w
Proszę o wykonanie badania	
.....	
Nazwisko i imię chorego	
Data urodzenia lub PESEL	
Rozpoznanie	
Wywiad (ciążę — daty, przetoczenia krwi — daty)	
Wyniki badań serologicznych:	
Grupa krwi	
Przeciwciała odpornościowe	
Wynik próby zgodności	
Inne	
Dane hematologiczne: Krwinki czerwone Hb Ht	
Bilirubina Inne	
.....	
(czytelny podpis i pieczęć osoby kierującej)	

Wzór 1. Skierowanie na konsultacyjne badania serologiczne

Pattern 1. Order for serologic consultation testing

Oddział/Klinika (pieczęćka)	Data
SKIEROWANIE NA BADANIE GRUPY KRWI	
Nazwisko i imię	
Data urodzenia lub PESEL	
Rozpoznanie	
.....	
Poprzednie wyniki badań (grupa krwi, przeciwciała odpornościowe)	
.....	
.....	
Czytelny podpis osoby pobierającej krew	Pieczęćka i podpis lekarza kierującego

Wzór 2. Skierowanie na badanie grupy krwi

Pattern 2. Order for blood group testing

KSIĄŻKA BADAŃ GRUP KRWI (dla chorych i kobiet w ciąży)

Strona 1

Lp.	Data	Nazwisko i imię Data urodzenia lub PESEL	Oddział	Wynik badania			Dawcy
				Grupa krwi		Nieregularne przeciwciała	
				ABO	RhD		

Strona 2

Układ ABO					RhD		Przeciwciała						Podpis
Odczynniki monoklonalne		Krwinki			Odczynniki monoklonalne	Test enzymatyczny			PTA			Autokontrola (jeśli dodatnie wyniki skriningu)	
						Krwinki wzorcowe							
anty-		O	A ₁	B	anty-		I	II	III	I	II	III	
A	B				D	D							

Wzór 3. Książka badań grup krwi

Pattern 3. Book for recording of blood group testing

(Pieczęć placówki kierującej)	Data
	Nr badania
	Oddział
WYNIK	
badania grupy krwi	
Nazwisko i imię	
Data urodzenia lub PESEL	
Rozpoznanie	
Grupa krwi	
Przeciwciała odpornościowe	
Uwagi	
.....	
..... Wykonał (czytelny podpis) Sprawdził (pieczęć i podpis)

Wzór 4. Wynik grupy krwi

Pattern 4. Form of blood group result

Data:

Kontrola zestawu odczynników diagnostycznych do oznaczeń grupy krwi ABO i Rh*

Swoistość odczynnika	Producent, nr serii, nazwa klonu	Data ważności	Reakcje z krwinkami wzorcowymi (kontrolnymi)** Producent, nr serii		
			O RhD	A ₁ RhD	B RhD
Anty-A					
Anty-A					
Anty-B					
Anty-B					
Anty-D					

Krwinki wzorcowe do wykrywania przeciwciał Producent, nr serii	Fenotyp***
Krwinki I	
Krwinki II	
Krwinki III	

*analogiczny protokół można sporządzić do kontrolowania odczynników diagnostycznych każdej swoistości

**wśród krwinek grupy O, A₁, B muszą być krwinki Rh+ i Rh-

***można wklejać wydruki przesłane przez producenta krwinek wzorcowych

Kontrola krwinek wzorcowych do wykrywania przeciwciał odpornościowych

Numer krwinek wzorcowych	Testy próbówkowe****	Standard anty-D Producent, nr serii	Surowica AB Nr donacji (nr próbki)
Krwinki I	PTA-LISS		
	LEN		
Krwinki II	PTA-LISS		
	LEN		
Krwinki III	PTA-LISS		
	LEN		

****jeżeli badania wykonywane są w testach innych niż próbki należy wpisać nazwę używanego systemu i odpowiednio nazwy testów

Wzór 5. Protokół codziennych badań kontrolnych

Pattern 5. Protocol of daily control recording

(Pieczęć placówki kierującej)	Data
SKIEROWANIE NA PRÓBĘ ZGODNOŚCI KRWI	
CHORY:	
Nazwisko i imię	Data urodzenia..... lub PESEL
Rozpoznanie	
Grupa krwi	
Przeciwciała odpornościowe	
Biorca: pierwszorazowy, wielokrotny, ciężce	
(właściwe podkreślić)	
Data ostatniego przetoczenia	
Czy przewidziane są dalsze przetoczenia?.....	
(w ciągu następnych 5 dni)	
Podpis i pieczęć lekarza kierującego	(czytelny)
Data i godzina pobrania próbki krwi	
Czytelny podpis osoby pobierającej	
Składniki krwi wydawane przez bank krwi	
Grupa krwi/numery pojemników	
.....	
.....	
Podpis pracownika banku krwi	

Wzór 6. Skierowanie na próbę zgodności krwi

Pattern 6. Order for compatibility testing

Strona 1

Data	Numer kolejny biorcy	Oddział	Nazwisko i imię Data urodzenia lub PESEL	Grupa krwi na skierowaniu				Numer donacji	Kontrola grupy krwi										
				Biorcy		Dawcy			Biorcy			Dawcy							
				ABO	RhD	ABO	RhD		-A	-B	-D	-A	-B	-D					

Strona 2

Kontrola antygenów u dawcy	Badanie przeglądowe przeciwciał						Surowica biorcy + krwinki dawcy		Auto-kontrola (jeśli potrzeba)	Wynik	Uwagi	Podpis
	Test enzymatyczny			PTA			Test enzymatyczny (jeśli wykonany)	PTA				
	Krwinki wzorcowe											
	I	II	III	I	II	III						

Wzór 7. Książka prób zgodności

Pattern 7. Book for compatibility testing records

Pieczęć pracowni	Data
	Oddział
WYNIK PRÓBY ZGODNOŚCI	
Nazwisko i imię biorcy	
Data urodzenia lub PESEL	
Kontrolne badanie grupy krwi	
Przeciwciała odpornościowe	
Krew dawcy grupy Nr donacji:	
.....	
Wynik	
Uwagi	
.....	
.....	
.....	
..... Wykonał (czytelny podpis) Sprawdził (czytelny podpis)

Wzór 8. Wynik próby zgodności

Pattern 8. Form of compatibility testing results

Zakład Kierujący Oddział/Klinika (pieczęć)	Data
SKIEROWANIE NA KREW DO PILNEJ TRANSFUZJI	
Proszę o wydanie krwi do pilnej transfuzji przed wykonaniem próby zgodności	
dla chorego	
data urodzenia (PESEL)	
grupa krwi (ABO i Rh) chorego	
Pieczętka i czytelny podpis lekarza	

Wzór 9. Skierowanie na krew do pilnej transfuzji

Pattern 9. Order for red blood cells for urgent transfusion

Pieczęć Centrum krwiodawstwa	
ZAŚWIADCZENIE	
Zaświadczam, że Pan/i	
(imię i nazwisko, tytuł naukowy)	
..... zatrudniony	
.....	
w charakterze jest uprawniony do wykonywania i wpisywania do dowodów osobistych i innych dokumentów tożsamości oznaczeń grup krwi do celów trwałej ewidencji.	
Pieczęć i podpis dyrektora stacji krwiodawstwa	

Wzór 10. Zaświadczenie uprawniające do wpisywania wyników grup krwi do dokumentów tożsamości

Pattern 10. Authorization for entering blood group results to personal identity documents

