

Rozdział

IMMUNOLOGIA TRANSFUZJOLOGICZNA KRwinek CZERWONYCH

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.
2. Określanie antygenu D z układu Rh za pomocą 2 odczynników monoklonalnych anty-D, pochodzących z różnych klonów i umożliwiających wykrycie słabej odmiany antygenu D (D^u) i jego kategorii.
3. Określanie antygenu 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 antygenu 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 roku poprzedzającego oddanie krwi oraz u kobiet z ciążą w wywiadzie.

UWAGI

A. W badaniach grup krwi układu ABO dwóch próbek krwi dawcy przy zastosowaniu 2 zestawów odczynników monoklonalnych i posługiwaniu się krwinkami z próbek macierzystych (nie przemyszanych), dopuszcza się zbadanie jednej próbki jednym zestawem odczynników a drugiej próbki drugim zestawem pod warunkiem, że w obu próbkach oznacza się przeciwciała anty-A i anty-B.

B. W oznaczeniach grupy krwi układu ABO wykonywanych w systemach zautomatyzowanych zapewniających jednoznaczną 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 rozdziale 5.15. automaty i półautomaty stosowane w badaniach serologicznych.

C. Pełne badanie grup krwi układu ABO i antygenu D z układu Rh, jak również wszystkich innych antygenów wykonuje się dwukrotnie 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 w porozumieniu z kierownikiem działu immunologii transfuzjologicznej ustala, w których terenowych oddziałach możliwe jest wykonywanie badań o poszerzonym zakresie, wymienionych w punktach 3-5; pozostałe oddziały terenowe, nie posiadające odpowiednich warunków, mogą być z tych obowiązków zwolnione.

G. Swoistość przeciwciał odpornościowych, wykrytych w terenowych pracowniach serologicznych, jest ustalana lub potwierdzana w centrum w pracowni badań dawców.

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 do 37°C).

Wszystkie rutynowe metody ręczne można zastępować mikrometodami kolumnowymi i automatycznymi, według zasad opisanych w rozdziale 5.15. automaty i półautomaty stosowane w badaniach serologicznych.

2. BADANIA KONSULTACYJNE

Badania takie są wykonywane w pracowni konsultacyjnej centrum we wszystkich przypadkach, w których terenowe pracownie serologiczne (szpitalne i pozaszpitalne) natrafiają na trudności. Do pracowni należy przekazać badaną i świeżo pobraną próbkę krwi wraz z dokumentacją dotychczas przeprowadzonych badań (Wzór 1) oraz dane kliniczne (wiek, rozpoznanie, informacje dotyczące leczenia krwią i przebytych ciąż). 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 sformułowaniem wyniku zrozumiałym dla odbiorcy, w brzmieniu identycznym z wydany wynik. W książce badań i na wydany wynik powinien być umieszczony podpis osoby wykonującej badania i osoby 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 pod warunkiem posiadania odpowiedniego programu. W przypadku braku programu należy prowadzić dokumentację w skorowidzu w porządku alfabetycznym.

W godzinach pracy pozaregulinowej technicy lub 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 co dzień rano sprawdzane przez kierownika pracowni lub osobę upoważnioną.

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.
9. Wykonywanie badań rodzinnych w przypadkach stwierdzenia rzadko występujących fenotypów i alloprzeciwciał skierowanych do antygenów powszechnych.
10. Badania biorców i dawców allogenicznego przeszczepów, w szczególności komórek macierzystych układu krwiotwórczego.

3. PODSTAWOWE WYPOSAŻENIE W APARATURĘ, SPRZĘT LABORATORYJNY I ODCZYNNIKI

3.1. Aparatura

1. Lodówka o temperaturze 2 – 6° C z zamrażalnikiem.
2. 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.
3. Ciepłarka.
4. Powietrzny blok grzewczy z regulacją temperatury.
5. Łaźnia wodna z regulacją temperatury do 100°C.
6. Wirówka laboratoryjna z przyspieszeniem 3850 x g (5000 obr / min) i regulacją czasu wirowania (Ryc.1).
7. Wirówka hematokrytowa.

8. Mikroskop świetlny.
9. Aparatura do testów mikrokolumnowych.
10. Automaty do badań grup krwi.

UWAGA

Każda lodówka i zamrażarka powinna być wyposażona w dwa niezależne mierniki temperatury. Obowiązuje trzykrotna w ciągu dnia kontrola temperatury i prowadzenie jej dokumentacji lub podłączenie do centralnego monitoringu temperatury.

3.2. SPRZĘT LABORATORYJNY

1. Probówki wyłącznie do jednorazowego użytku
 - a/ do pobierania krwi szklane o wymiarach ok. 100 mm x 15 mm okrągłodenne lub z dnem stożkowym albo specjalne probówki plastikowe,
 - b/ do wykonywania badań szklane lub plastikowe o wymiarach ok. 70 mm x 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 wysłane gąbką ze sztucznego tworzywa do umieszczania szkiełek lub płyt.
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

NaCl rozpuścić w wodzie destylowanej.

Jeżeli pH roztworu nie mieści się w przedziale 6,6-7,6 doprowadzić roztwór do wymaganego pH za pomocą buforu fosforanowego.

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)

Odczynniki: 0,17 mol/l roztwór NaCl - 180 ml

0,15 mol/l bufor fosforanowy o pH 6,7 - 20 ml

0,3 mol/l glicynian sodu o pH 6,7 - 800 ml

Przygotowanie roztworu glicynianu sodu

1. 22,5 g glikokolu rozpuścić w 800 ml wody destylowanej.
2. Za pomocą 1 mol/l NaOH dodawanego kroplami doprowadzić do pH 6,7.
3. Uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1000 ml.

Po przygotowaniu roztworu LISS należy sprawdzić pH, które winno się mieścić w granicach 6,5 - 7,0. Jego optymalną wartością jest 6,7.

*Określenie w tekście "roztwór NaCl" oznacza 0,15 mol/l wodny roztwór NaCl

UWAGI

A. Kontrola jakości roztworu LISS polega na wykonaniu testu antyglobulinowego z krwinkami Rh+ i Rh-, zawieszonymi w tym roztworze i uczulonymi standardem anti-D wg przepisu na str.

B. Sporządzony roztwór LISS sterylizuje się w temp. 105° C przy 0,2 atm w ciągu 30 min. i przechowuje w porcjach (50-100 ml) w stanie zamrożenia lub w temp. 4° C.

3.3.3. Roztwór papainy aktywowanej chlorowodorkiem cysteiny

Składniki:

a/ roztwór papainy:

10 g papainy rozpuścić w 250 ml 0,07 mol buforu fosforanowego o pH 6,2; silnie wstrząsnąć i pozostawić do następnego dnia w lodówce w temp. 4° C.

b/ bufor fosforanowy 0,07 mol, pH 6,2:

KH₂PO₄ - 9,078 g/l wody dest. - 8 objętości

Na₂HPO₄ - 11,188 g/l wody dest. - 2 objętości

c/ roztwór chlorowodorku cysteiny

4,85 g chlorowodorku L-cysteiny rozpuścić w 25 ml buforu fosforanowego o podanym wyżej składzie.

Przygotowanie odczynnika papainowego:

1. Roztwór papainy odwirować i przelać do kolby o obj. 1 l.
2. Dodać przygotowany roztwór chlorowodorku L-cysteiny.
3. Uzupełnić buforem fosforanowym do objętości 1 l.
4. Inkubować przez 1 godzinę w łaźni wodnej lub w cieplarni w temp. 37° C.
5. Przesączyć przez bibułę filtracyjną.
6. Skontrolować aktywność roztworu.
7. Porcjować w małych objętościach (1 - 2ml) w ampulkach lub fiolkach szczelnie zamkniętych.
8. Przechowywać w zamrożeniu.

UWAGI

A. Odczynnik papainowy może być również przechowywany w temp. 4° C w ciągu 3 miesięcy.

B. Odczynnik wyjęty z lodówki lub rozmrożony może służyć do badań tylko w ciągu kilku godzin.

3.3.4. Roztwór papainy aktywowanej chlorowodorkiem cysteiny z dodatkiem cystyny

Odczynnik ten jest mniej wrażliwy na wahania temperatury.

Skład odczynnika:

100 ml buforu fosforanowego 0,07 mol/l o pH 6,7

0,48 g chlorowodorku L-cysteiny

1 g L-cystyny

1 g papainy

Przygotowanie odczynnika:

- a) 1 g papainy rozpuścić w 25 ml buforu i pozostawić przez 30 min. w temp. pokojowej,
- b) 1 g L-cystyny dodać do 72,5 ml buforu i pozostawić przez 30 min. w temp. pokojowej. Obydwa roztwory (a i b) wirować przez 10 min. przy 1366 x g,
- c) 0,48 g chlorowodorku cysteiny rozpuścić w 2,5 ml buforu,
- d) płyn z nad osadu papainy zmieszać z roztworem chlorowodorku cysteiny (a+c) i pozostawić przez 5 min,
- e) płyn z nad osadu L-cystyny zmieszać z roztworem papainy i chlorowodorkiem cysteiny (b+d),
- f) otrzymaną mieszaninę wstawić do łaźni wodnej o temp. 37° C na 1 h i wirować przez 10 min. przy 1366 x g.

Przygotowany roztwór znad osadu, należy rozlać do małych pojemników i zamrozić.

UWAGI

A Odczynnik można przechowywać w stanie zamrożenia przez kilka miesięcy

B. Odczynnik nie traci aktywności po pozostawieniu go przez 8 godzin w temp. pokojowej w czasie pracy i po ponownym zamrożeniu.

Kontrola aktywności odczynników papainowych

1. Na 2 szkiełkach podstawowych umieścić z jednej strony kroplę surowicy anty-D (ludzkiej), a z drugiej kroplę surowicy grupy AB.
2. Do wszystkich kropli dodać po jednej kropli odczynnika papainowego.
3. Do dwóch kropli na jednym szkiełku dodać po kropli 10% zawiesiny krwinek Rh+ w roztworze NaCl, a na drugim po kropli 10% zawiesiny krwinek Rh-.
4. Po wymieszaniu zawartości składników umieścić szkiełko w kasecie z nawilżoną gąbką i pozostawić w temp. pokojowej przez 15 minut.

Wyrażna aglutynacja krwinek Rh+ z surowicą anty-D i brak aglutynacji w pozostałych kroplach świadczy o aktywności odczynnika i braku reakcji nieswoistych.

UWAGA

Dla stwierdzenia wymaganej aktywności odczynnika papainowego należy porównać miano i natężenie aglutynacji wyrażone w score (str.) surowicy diagnostycznej anty-D z krwinkami Rh+ w teście koloidowym i papainowym. Miano surowicy z zastosowaniem środowiska papainy, przewyższające conajmniej dwa rozcieńczenia i dwukrotnie wyższa wartość score niż w środowisku koloidowym, wskazuje na prawidłową aktywność odczynnika.

3.3.5. Roztwór wersenianu sodowego (EDTA-Na₂)

1. 5 g EDTA-Na₂ rozpuścić w 100 ml 0,15 mol/l roztworu NaCl.
2. Krew pobiera się w proporcji: 1 obj. roztworu EDTA-Na₂ i 9 objętości krwi.
3. Natychmiast po pobraniu krwi należy dokładnie wymieszać zawartość próbówki.

UWAGA

Zamiast roztworu EDTA-Na₂ używa się częściej EDTA-K₂; w związku z tym w tekście stosuje się skrót EDTA.

3.3.6. Roztwór trombiny

1. Do macierzystego roztworu trombiny dodać taką ilość roztworu NaCl aby otrzymać roztwór o stężeniu 50j./ml.
2. Przygotowany roztwór trombiny rozlać w małych objętościach (6 - 8 kropli) do probówek lub fiolek i przechowywać w zamrożeniu.

Sposób użycia: do 7 - 10 ml krwi dodaje się 2 krople roztworu trombiny.

3.3.7. Roztwór polibrenu

Bezpośrednio przed badaniem przygotować 1% 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.

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

1. Przygotować 0,1 mol/l roztwór 2-merkaptoetanolu (2ME) w roztworze NaCl o pH 7,3 – 7,4.
2. Do 20 kropli 0,1 mol/l roztworu 2ME dodać 5 kropli odczynnika papainowego i 20 kropli 0,15 M roztworu NaCl. Całą zawartość dokładnie wymieszać.

UWAGA

Odczynnik MEP przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

Sposób użycia: Dwie objętości odczynnika miesza się z jedną objętością osadu krwinek z krwi pobranej na EDTA-Na₂.

3.3.9. Roztwór 2ME do różnicowania przeciwciał IgG i IgM

Przygotować 0,1 mol/l roztwór 2ME w buforze fosforanowym o p 7,3 – 7,4.

Sposób użycia: Do jednej objętości surowicy dodaje się taką samą objętość odczynnika, przygotowanego przed użyciem.

3.3.10. Roztwór fosforanu chlorochiny

Przygotować 20% roztwór fosforanu chlorochiny w 0,15M NaCl i doprowadzić do pH 5,1.

UWAGA

Roztwór należy przechowywać w lodówce

3.3.11. Roztwór kwaśnej glicyny i EDTA

Odczynniki:

1. bufor 0,1 M glicyny-HCl o pH 1,5 (0,75 g glicyny + 100 ml 0,15 M NaCl) - pH ustalić za pomocą stężonego HCl.
2. 10% EDTA.
3. 1 M TRIS-NaCl (12,1 g TRIS + 5,25 g NaCl + 100 ml wody destylowanej).

UWAGA

Powyższe odczynniki można przechowywać w stanie zamrożenia (- 20°C) w objętościach dostosowanych do ich zużycia, a mianowicie: odczynnik 1 po 20 kropli, odczynniki 2 i 3 po 5 kropli.

3.3.12. Standard anty-D

1. Zawiera 0,1 jednostek międzynarodowych (0,02 µg) IgG anty-D w 1 ml.
Dopuszcza się w przejściowym okresie standard zawierający 0,25 jednostek międzynarodowych (0,05 µg) w 1 ml.
2. Wystandaryzowany odczynnik jest dostępny w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Katowicach.
3. Standard można przygotować we własnym zakresie i sprawdzić w Zakładzie Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT.
4. Standard anty-D stosuje się obowiązkowo do kontroli PTA i testu enzymatycznego LEN.
5. Eliminuje błędy techniczne podczas wykonywania badań.

3.3.13. Roztwory do przechowywania krwinek czerwonych

4.3.13.1, Zmodyfikowany roztwór Alsevera

Glukoza 102,5 g

Chlorek sodowy 23,5 g

Cytrynian sodowy ($\text{Na}_2 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 40,0 g

Kwas cytrynowy jednowodny 0,5 g

Inozyna 20,0 g

Chloramfenikol 1,65 g

Siarczan neomycyny 1,0 g

Woda dest. 5.000 ml

Dokładnie wymieszać, najlepiej przy pomocy mieszadła magnetycznego. Sprawdzić pH i doprowadzić do 6,81 – 6,88 za pomocą kwasu cytrynowego albo dwuwęglanu sodu. Przefiltrować i rozlać do sterylnych pojemników.

Do gęstych przemytych krwinek dodaje się 5 objętości roztworu Alsevera.

W tym roztworze krwinki można przechowywać przez 28 dni.

3.3.13.2. Roztwór z dodatkiem ludzkiej surowicy

EDTA 7,44 g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 7,16 g

Glukoza 12,50 g

Surowica ludzka grupy AB 200 ml

Chlorocid (Chloramfenicol,

Detreomycyna, Chloromycetyna) 1,0 g

1. Odważone trzy pierwsze składniki wsypać do kolby miarowej o pojemności 1 l.

2. Dodać 50 - 100 ml wody destylowanej.
3. Lekko podgrzać do całkowitego rozpuszczenia składników.
4. Po ostudzeniu roztworu dodać ludzką surowicę i chlorocid.
5. Doprowadzić roztwór do pH 7,0 - 7,2 za pomocą 1 N NaOH.

Do jednej objętości osadu krwinek czerwonych dodaje się 9 objętości roztworu.

Przed użyciem krwinki przemywa się dwukrotnie roztworem NaCl. Mogą one służyć do badań w ciągu 3 – 4 tygodni

UWAGA

Dopuszcza się przechowywanie krwinek czerwonych w roztworach wzbogacających (SAGM, ADSOL). Okres ważności przechowywanych krwinek wynosi 28 dni. Przedłużenie tego okresu do 35 dni lub dłużej wymaga porównania ekspresji antygenów w pierwszym i ostatnim dniu przechowywania.

3.3.14.1. Przechowywanie krwinek w glicerolu w stanie zamrożenia

Roztwór do zamrażania krwinek

Cytrynian sodowy 2-wodny 30,0 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,1 g

Na_2HPO_4 2,8 g

Woda destylowana 600 ml

1. Po rozpuszczeniu składników sprawdzić pH roztworu, które powinno wynosić 7,0.
2. Dodać 400 ml glicerolu i wymieszać.
3. Krew przeznaczoną do zamrożenia pobrać do roztworu konserwującego (ACD-A1, CPD, CPD-A1) i przechować przez 24 godziny w 4° C.
4. Odciągnąć cały płyn znad osadu krwinek.
5. Dodać powoli stale mieszając jednakową objętość roztworu do zamrażania.
6. Rozlać krwinki do wąskich probówek w porcjach do jednorazowego użytku i umieścić w zamrażarce.

Krwinki przechowywane w –20°C nadają się do użytku w ciągu 3 - 6 miesięcy.

UWAGA

Krwinki przechowywane w –80° C i poniżej nadają się do użytku przez kilka lat.

Roztwory do przemywania rozmrożonych krwinek

Roztwór nr 1

Glicerol 12 ml

Roztwór cytrynianu sodowego 0,19 mol / l 88 ml

Roztwór nr 2

Glicerol 5 ml

Roztwór cytrynianu sodowego 0,19 mol / l 95 ml

Roztwór nr 3

Sporządzić przez zmieszanie jednakowych objętości roztworu nr 2 i roztworu nr 4

Roztwór nr 4

Roztwór NaCl 0,17 mol / l.

Rozmrażanie krwinek

1. Probówkę z zamrożonymi krwinkami przenieść do temperatury pokojowej.
2. Natychmiast po rozmrożeniu dodać jednakową objętość roztworu nr 1 i delikatnie dokładnie wymieszać.
3. Odwirować przez 5 minut przy obrotach 607 x g.
4. Po usunięciu nadsącza dodać roztworu nr 2 w objętości równej objętości osadu krwinek i odwirować.

Tak samo postępować dodając kolejno roztwór nr 3 i nr 4.

5. Sporządzić zawiesinę krwinek w odpowiednim środowisku

UWAGA

Zazwyczaj podczas pierwszego, a czasem i drugiego przemywania występuje częściowa hemoliza, która znika podczas dalszych przemywań. Znaczna hemoliza, utrzymująca się przez cały cykl przemywania, dyskwalifikuje krwinki. Krwinki rozmrożone nie mogą być ponownie zamrażane

3.3.14.2. Przechowywanie krwinek w zamrożeniu przy pomocy odczynników komercyjnych

Doświadczenia własne wskazują, że stosując odczynniki produkowane przez firmę DiaHem możliwy jest całkowity odzysk zamrażanych krwinek. Postępowanie musi być zgodne z załączonym przepisem użycia trzech roztworów:

1. Roztwór do zamrażania krwinek (Einfrierpuffer).
2. Roztwór stabilizujący do krwinek czerwonych (D-Cell Stab).
3. Roztwór do rozmrażania krwinek (Auftaupuffer).

UWAGA

Czas rozmrażania wynosi ok. 15 minut. Stosowanie tych roztworów może zapewnić pracownikom stały dostęp do panelu krwinek wzorcowych, które przechowują się w stanie niezmienionym przynajmniej 2 lata w temperaturze -20°C. Niewykorzystane krwinki można ponownie zamrozić.

3.3.15. Środki bakteriobójcze stosowane do konserwacji próbek surowic

Roztwór tiomersalu

Tiomersal 1,0 g

Boraks bezwodny 1,6 g

(albo boraks 10-wodny 3,0 g)

Woda destylowana do 100 ml

Do 100 objętości surowicy dodać jedną objętość roztworu.

Roztwór azydku sodowego

Azydek sodowy 1,0 g

Woda destylowana do 100 ml

Do 100 objętości surowicy dodać jedną objętość roztworu.

UWAGI

A. *Azydek sodowy jest silną trucizną.*

B. *Środki bakteriobójcze powinny dodawać się do próbek surowic, które zamierza się przechowywać.*

3.4. PODSTAWOWY ZESTAW ODCZYNNIKÓW DIAGNOSTYCZNYCH

Układ ABO – odczynniki monoklonalne anti-A i anti-B;

Lektyna anti-A₁ np. Dolichotest

Układ Rh - anti-D, anti-C, anti-C^w, anti-c, anti-E, anti-e

Układ Kell - anti-K, anti-k, anti-Kp^a, anti-Kp^b

Układ Duffy - anti-Fy^a, anti-Fy^b

Układ Kidd - anti-Jk^a, anti-Jk^b

Układ MNS - anti-M, anti-N, anti-S, anti-s

Układ P - anti-P₁, anti-P+P₁+P^k (anti-Tj^a)

Układ Lewis - anti-Le^a, anti-Le^b

Odczynnik antyglobulinowy wieloswoisty - anti-IgG + anti-C3

Odczynniki antyglobulinowe monoswoiste -anti IgG, anti-IgM, anti-IgA, anti-C3d.

Większość wymienionych odczynników zawiera przeciwciała monoklonalne.

Surowice grupy AB do wykrywania poliaglutynacji.

Krwinki wzorcowe.

1. Do badania układu ABO: krwinki A₁, B i O
2. Do sprawdzania aktywności i swoistości odczynnika anti-D z układu Rh: krwinki O Rh+ i O Rh-

3. Do sprawdzania aktywności i swoistości odczynnika anty-K z układu Kell, krwinki K+ i K-.
4. Do wykrywania i identyfikacji odpornościowych przeciwciał zestawy krwinek (Tab.6 i 7). Uzyskuje się je z pobranej donacji krwi od wyselekcjonowanych krwiodawców grupy O. Jeżeli usuwa się osocze należy dodać roztwór wzbogacający (np. SAGM, ADSOL). Wskazana jest filtracja, ponieważ leukocyty mogą osłabiać ekspresję niektórych antygenów na krwinkach czerwonych. Porcjowanie krwinek dokonuje się w układzie zamkniętym. Zaleca się porcjowanie w objętościach około 1 ml w segmentach drenu zaopatrzonych w etykiety zawierające Nr donacji, datę ważności i fenotyp. Dopuszcza się podawanie skróconego fenotypu (np. O Rh- K+) pod warunkiem sporządzenia listy zawierającej numery donacji i pełne fenotypy. Tak przygotowane krwinki czerwone można używać przez 28 dni. Ekspresję antygenów należy skontrolować w pierwszym i ostatnim dniu zadeklarowanego okresu ważności u dawców, których krwinki wchodzi po raz pierwszy w skład zestawu

3.4.1. Wyciągi z nasion

Wyciągi z niektórych nasion zawierają białka zwane lektynami, które w odpowiednim rozcieńczeniu reagując swoiście z pewnymi antygenami krwinek czerwonych powodują ich aglutynację. Lektyny są stosowane w badaniach grup układu ABO (np. *Dolichos biflorus*, *Ulex europaeus*) i MNS (np. *Vicia graminea*) oraz w ocenie zjawiska poliaglutynacji.

Podstawowy zestaw lektyn

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

Ulex europaeus anty-H

Arachis hypogaea anty-T

Salvia sclarea anty-Tn

Salvia horminum anty-Tn + anty-Cad

Vicia graminea anty-N

Przygotowanie wyciągu z nasion

1. Nasiona sproszkować.
2. Do 1 g sproszkowanych nasion dodać 10 ml roztworu NaCl i dokładnie wytrząsnąć.
3. Mieszaninę pozostawić w temp. pokojowej na kilka - kilkanaście godzin.
4. Wirować przez 10 min. z prędkością 1366 x g
5. Przenieść nadsącz do odrębnej probówki i skontrolować jego aktywność i swoistość z odpowiednimi krwinkami.
6. Jeśli nie ma zastrzeżeń co do aktywności, ale występują wyraźnie słabsze reakcje z krwinkami nie zawierającymi antygeny odpowiadającym lektynie, należy nadsącz odpowiednio rozcieńczyć roztworem NaCl i ponownie skontrolować aktywność i swoistość.
7. Aktywny i swoisty roztwór podzielić na małe porcje i zamrozić.

4. ZASADY POBIERANIA, PRZECHOWYWANIA I PRZYGOTOWANIA KRWI DO BADAŃ

4.1. Pobieranie krwi do badań serologicznych

1. Pobrać 5 - 10 ml krwi żyłnej do probówki jednorazowego użytku; probówki winny być zaopatrzone w trwałą etykietę.
2. Bezpośrednio po pobraniu na etykiecie wpisać drukowanymi literami nazwisko, imię, datę urodzenia (albo Nr PESEL), a u dawców Nr donacji (w przypadku stosowania systemu kodów kreskowych, okleić probówkę stosownym kodem).
3. Te same dane wpisać na załączniku towarzyszącym próbce (wzór 1) wraz z adnotacją jakie badania mają być wykonane
4. a) Jeśli badania mają być rozpoczęte w dniu pobrania próbki, probówkę z krwią umieścić w temp. 37° C na ok. 10-15 min., a następnie wirować przy 342 x g przez 5 - 10 min.

- b) Jeśli badania mają być przeprowadzane następnego dnia, oddzielić krew od ścianek probówki i umieścić w chłodni o temp. 2°C - 6°C ; następnego dnia odwirować.
- c) Jeśli badania muszą być wykonane natychmiast po pobraniu krwi albo jeśli próbka krwi pochodzi od osoby z zaburzeniami układu krzepnięcia, dodać do krwi roztworu trombiny (4.3.6.).
- 5. Po odwirowaniu oddzieloną surowicę przenieść do oddzielnej probówki, a z krwinek sporządzić zawiesinę w odpowiednim stężeniu i środowisku.

UWAGA

Dopuszcza się pobieranie krwi na EDTA, szczególnie od noworodków, niemowląt i małych dzieci, od chorych z NAIH, od których pobiera się mniejsze objętości krwi (postępowanie patrz 4. 3. 5.) oraz od dawców i biorców krwi, jeśli badania wykonywane są metodą automatyczną.

4.2. Pobieranie krwi do badań genetycznych

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

UWAGA

Jeżeli liczba leukocytów jest poniżej dolnej granicy wartości prawidłowej, należy pobrać krew do co najmniej dwóch probówek.

4.3. Ogólne zasady dokumentacji i wykonywania badań

- 1. Zarejestrować próbkę krwi w odpowiedniej książce badań (wzór 2 i 3) pod kolejnym numerem.
- 2. Jeśli próbka krwi pochodziła od krwiodawcy wpisać Nr donacji lub wkleić etykietkę z tym samym numerem donacji.
- 3. Opatrzeć probówkę z krwią numerem pod którym została zarejestrowana lub wkleić etykietę z numerem donacji i sprawdzić zgodność numeracji z zapisem w książce.
- 4. Tym samym numerem opatrywać całe szkło laboratoryjne (probówki, płyty, szkiełka podstawowe).
- 5. Prowadzić dokładne protokołowanie 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 składają podpis w książce. Wydawane wyniki powinny być podpisywane przez kierownika pracowni lub upoważnioną przez niego osobę (wzór 4).
- 7. W przypadku stosowania systemów automatycznych z jednoznaczną identyfikacją dawcy/pacjenta i automatycznym odczytem (szczegółowe zasady opisane w rozdziale automatyzacja badań serologicznych), dopuszcza się walidacje i zapis wyniku z udziałem jednej osoby. Nie prowadzi się zapisów w książkach.
- 7. Poleca się prowadzenie oddzielnej książki do zapisu badań kontrolnych odczynników diagnostycznych i krwinek wzorcowych (wzór Nr 5) używanych w danym dniu we wszystkich pracowniach.

UWAGA

Nie dopuszcza się dodatkowej tzw. roboczej numeracji.

Badania serologiczne wykonuje się 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 tych 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.

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 uderzanie 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 zawieszone.

Podstawowym warunkiem prawidłowego wykonywania badań jest czystość płyt, probówek i odczynników. Jest on szczególnie istotny 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 zanieczyszczenia 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 stosując następujące symbole: 4+ aglutynacja kompletna w postaci jednego zlepu krwinek, 3+ kilka dużych zlepu krwinek, 2+ średniej wielkości zlepy, mikroskopowo widać wolne krwinki, + drobne aglutynaty, mikroskopowo widać liczne nie zlepione krwinki. Nasilenie aglutynacji krwinek pod wpływem surowicy i jej rozcieńczeń można wyrazić liczbowo w score stosując następujące wartości:

$$4+ = 12$$

$$3+ = 10$$

$$2+ = 8$$

$$1+ = 5$$

$$\text{śląd} = 2$$

Próbki krwi do badań, krwinki wzorcowe i odczynniki monoklonalne przechowuje się w lodówce w temp. 4-6°C., surowice diagnostyczne w zamrażarce. Wyjmuje się je tylko na okres badania.

5. TECHNIKI BADAŃ SEROLOGICZNYCH

5.1. ZAWIESINY KRWINEK CZEWONYCH

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 probówki kilka kropli krwinek i przenieść do oddzielnej probówki.
2. Napęlić 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. Odwirować w ciągu 3 min. przy 342 x 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 w surowicy

Krwinki zawiesza się albo w surowicy allogenicznej jednoimiennej (np. krwinki grupy A w surowicy anty-B) lub grupy AB albo w surowicy autologicznej.

Sporządzanie zawiesiny w surowicy allogenicznej

1. Pobrać z dna probówki kilka kropli osadu krwinek.
2. Przemyć dwukrotnie roztworem NaCl.
3. Po usunięciu nadsącza dodać do osadu krwinek co najmniej jednakową objętość surowicy przeznaczonej do sporządzenia zawiesiny.
4. Odwirować i usunąć płyn znad osadu krwinek.
5. Zawiesić krwinki w nowej porcji surowicy w stosunku jedna kropla krwinek i 9 kropli surowicy (10% zawiesina).

Sporządzanie zawiesiny w surowicy autologicznej

1. Pobrać z dna probówki jedną kroplę krwinek.
2. Dodać 9 kropli autologicznej surowicy i wymieszać.

UWAGA

Surowica autologiczna nie nadaje się do sporządzania zawiesiny, jeśli zawiera autoprzeciwciała lub rulonizuje krwinki.

5.1.3. Zawiesina krwinek papainowanych

Dla każdej nowej serii odczynnika papainowego (3.3.3.2.) ustala się optymalny czas papainowania krwinek czerwonych.

1. Rozcieńczyć odczynnik papainowy w stosunku jedna objętość odczynnika i 9 objętości roztworu NaCl.
2. Do 5 kropli przemytych gęstych krwinek Rh dodatnich dodać 20 kropli rozcieńczonego odczynnika papainowego i wymieszać.
3. Mieszaninę rozlać natychmiast do 5 probówek i umieścić je w bloku grzewczym w temp. 37°C.
4. Co 5 minut przenosić kolejną probówkę do temp. pokojowej i natychmiast 3-krotnie przemywać roztworem NaCl; w ten sposób otrzymuje się papainowane krwinki przez 5, 10, 15, 20 i 25 minut.
5. Do każdej próbki krwinek dodać roztworu NaCl, aby otrzymać 5% zawiesinę.
6. Dla każdej próbki papainowanych krwinek przygotować po 2 probówki i w obu umieścić po kropli zawiesiny krwinek.
7. Do jednej probówki dodać kroplę surowicy anty-D i krótko odwirować; nasiloną aglutynacja powinna pojawić się po minucie.
8. Do drugiej probówki dodać kroplę surowicy grupy AB i przenieść na 30 minut do temp. 37°C; jednorodna zawiesina krwinek wskazuje na brak aglutynacji.

UWAGA

Do dalszej kontroli należy użyć te krwinki, które zaglutynowały pod wpływem surowicy anty-D, natomiast nie wykazały aglutynacji po inkubacji z surowicą grupy AB.

9. Przygotować w probówkach tyle szeregów rozcieńczeń surowicy anty-D w roztworze NaCl ile zawiesin papainowanych krwinek wybrano do dalszej kontroli.
10. Do 2 kropli każdego szeregu rozcieńczeń dodać jedną kroplę zawiesiny papainowanych krwinek i po krótkim odwirowaniu odczytać wynik.

UWAGA

Na optymalny czas papainowania wskazuje najwyższe miano surowicy anty-D; na przykład, jeśli najwyższe miano surowicy anty-D uzyskano z krwinkami papainowanymi przez 10 minut, dla danej serii odczynnika papainowego czas papainowania wynosi 10 min.

Przygotowanie papainowanych krwinek

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

UWAGA

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

5.2. TESTY ENZYMATYCZNE

5.2.1 Test papainowy

Wykonanie testu patrz 7.3.1. Test służy przede wszystkim do oznaczania antygenów układu Rh za pomocą ludzkich surowic diagnostycznych.

5.2.2. Test próbówkowy z krwinkami papainowanymi (2 stopniowy test papainowy)

Test służy przede wszystkim do wykrywania przeciwciał z układu Rh. Jego czułość jest porównywalna do testu LEN.

W badaniach stosuje się 3-5% zawiesinę krwinek papainowanych w roztworze NaCl przygotowanych zgodnie z przepisem podanym powyżej.

1. Do 2 kropli surowicy badanej dodać 1 kroplę krwinek.
2. Mieszaninę inkubować 30 minut w temperaturze 37°C.
3. Odwirować w ciągu 30 - 60 s przy 152 – 342 x g.
4. Wynik odczytać makroskopowo.

UWAGA

Konieczne jest jednoczesne wykonanie badania kontrolnego

- a) *Kontrola dodatnia: krwinki Rh dodatnie + Standard anty-D*
- b) *Kontrola ujemna: każdy rodzaj użytych krwinek + surowica nie zawierająca przeciwciał*

5.2.3. 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 dwukrotnie krwinki roztworem NaCl i raz roztworem LISS.
2. Sporządzić 3 - 4 zawiesinę krwinek w roztworze LISS.
3. Rozcieńczyć odczynnik papainowy roztworem LISS w stosunku jedna kropla odczynnika i 2 krople roztworu LISS.
4. Do 2 kropli zawiesiny krwinek dodać kroplę rozcieńczonego odczynnika papainowego.
5. Probówkę z tą zawartością umieścić w bloku grzewczym lub w łaźni wodnej o temp. 37°C na 10 min.
6. Dodać 2 krople badanej surowicy i po dokładnym wymieszaniu pozostawić na 3 min. w temp. 37°C.
7. Odwirować przy 152 – 342 x g w ciągu 30 - 60 s
8. Wynik odczytać wynik bardzo delikatnie wstrząsając probówką

UWAGA

Konieczne jest jednoczesne wykonanie badań kontrolnych:

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

5.3. TEST POLIBRENOWY

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

Odczynniki

1. Roztwór o niskiej sile jonowej - low ionic medium (LIM)

Glukoza 50 g

EDTA 2 g

Uzupełnić wodą destylowaną do 1 l i doprowadzić do pH 6,4 za pomocą 2M NaOH.

2. 10% polibren w buforowanym roztworze NaCl.

Ten macierzysty roztwór przechowuje się w temp. 2-6°C. Przed przystąpieniem do badań przygotowuje się 0,05% roztwór roboczy, rozcieńczając jedną objętość 10% polibrenu 199 objętościami NaCl.

3. Roztwór do zawieszania krwinek - Resuspending solution (RS)

Cytrynian sodowy 3,53 g

Glukoza 2,0 g

Uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml.

Wykonanie badania

1. Umieścić w probówce 2 krople badanej surowicy, jedną kroplę 3% zawiesiny krwinek w roztworze NaCl i 0,6 ml odczynnika LIM, wymieszać.

2. Pozostawić na minutę w temp. pokojowej.

3. Dodać 2 krople roboczego roztworu polibrenu.

4. Odwirować przy 152 x g w ciągu 30 - 60 s.

5. Usunąć nadsącz.

6. Dodać 2 krople odczynnika RS.

7. Delikatnie wymieszać trzymając probówkę / statyw z probówkami pod kątem 45°. Po 10 s znikają agregaty, a pozostają aglutynaty.

8. Odczytać wynik.

9. Jeżeli nie wystąpiła aglutynacja przeemyć trzykrotnie krwinki.

10. Dodać surowicę antyglobulinową w celu wykrycia przeciwciał z układu Kell.

UWAGA

Konieczne jest jednoczesne wykonanie badań kontrolnych:

krwinki Rh dodatnie i Rh ujemne + Standard anti-D,

krwinki stosowane w badaniu + surowica grupy AB.

5.4. TESTY ANTYGLOBULINOWE

Test antyglobulinowy pozwala na wykrycie przeciwciał niekompletnych oraz składników komplementu 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 tzw. wieloswoisty (poliwalentny) odczynnik antyglobulinowy, który zawiera przeciwciała przeciw immunoglobulinom klasy G i przeciw składnikom komplementu. W badaniach specjalnych używa się odczynników o pojedynczej swoistości skierowanych do poszczególnych klas immunoglobulin i do niektórych składników komplementu.

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

- probówkę 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 probówki;

- probówkę trzyma się prawie pionowo i kołysząc wprawia się ją w drgania stukając delikatnie palcem w jej ściankę.

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

Kontrola aktywności odczynnika antyglobulinowego

Przed wykonaniem bezpośredniego testu antyglobulinowego i jednocześnie z pośrednim testem antyglobulinowym przeprowadza się kontrolę aktywności odczynnika antyglobulinowego.

Uczulanie krwinek

1. Przygotować 3 - 4% zawiesiny krwinek Rh dodatnich i Rh ujemnych w roztworze NaCl.
2. W dwóch probówkach umieścić po 2 krople tych zawiesin.
3. Dodać po 5 kropli Standardu anti-D i wymieszać wstrząsając probówkę.
4. Przenieść probówki do bloku grzewczego o temp. 37°C na 60 min.

Przemywanie krwinek

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

Badanie z odczynnikiem antyglobulinowym

1. Przygotować odczynnik antyglobulinowy według załączonych przepisów użycia.
2. Do osadu krwinek dodać po dwie krople odczynnika antyglobulinowego i delikatnie wymieszać.
3. Odwirować przy 152 - 342 g w ciągu 45 - 60 s.
4. Resuspendować osad krwinek przez kołysanie probówką albo delikatne uderzanie w nią palcem.
5. Odczytać wyniki: aglutynacja w probówce zawierającej Rh dodatnie krwinki i brak aglutynacji w probówce z krwinkami Rh ujemnymi wskazują na aktywność i prawidłowe działanie odczynnika antyglobulinowego oraz świadczą o poprawnym wykonaniu badania.

UWAGA

Szybkość i czas wirowania zależą od typu stosowanej wirówki. Ustalenie tych parametrów przeprowadza się przygotowując jednocześnie kilka próbek krwinek Rh dodatnich i Rh ujemnych inkubowanych ze Standardem anti-D w tych samych warunkach i w tym samym czasie. Jako optymalne przyjmuje się taką szybkość i czas wirowania, w których krwinki Rh+ dają najwyraźniejszą reakcję dodatnią z odczynnikiem antyglobulinowym przy jednoczesnej ujemnej, nie budzącej wątpliwości, reakcji z krwinkami Rh-.

Kontrola jakości wirówki do przemywania krwinek techniką automatyczną

1. Dwie objętości Standardu anti-D inkubować przez 45 minut z jedną objętością 3% zawiesiny w roztworze NaCl przemytych krwinek Rh dodatnich (najlepiej Dccee); jeśli kontrolę wirówki wykonuje się w PTA-LISS należy stosować jedną objętość Standardu.
2. Do 9 probówek dodać jedną objętość uczulonych krwinek.
3. Do reszty probówek dodać jedną objętość tych samych krwinek nie uczulonych.
4. Do wszystkich probówek dodać dwie objętości surowicy bez przeciwciał.
5. Włączyć program przemywania.
6. Do wszystkich probówek dodać dwie objętości surowicy antyglobulinowej.
7. Odwirować i odczytać wyniki.
8. Zwrócić uwagę, czy we wszystkich probówkach zawierających uczulone krwinki nasilenie aglutynacji jest takie samo; jeśli wystąpiły różnice, należy skontaktować się z serwisem.

6.4.1. 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 poprzetoczeniowych

Wykonanie badania

1. Kroplę gęstych krwinek przemyć 4-krotnie dużą objętością roztworu NaCl o temp. 4 - 8°C. i sporządzić 3 - 4% zawiesinę w tym roztworze albo w roztworze LISS
2. 2 krople zawiesiny przenieść do oddzielnej probówki
3. Odwirować i usunąć dokładnie nadsącz.
4. Dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego,
5. Odwirować przy 152 – 342 x g w ciągu 30 - 60 s
6. Resuspendować osad krwinek przez bardzo delikatne kołysanie probówką i obserwować obecność aglutynatów

5.4.2. 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 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 autokontrolę można pominąć 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 zróżnicowanie allo- i autoprzeciwciał.

5.4.2.1. Klasyczny pośredni test antyglobulinowy (PTA – NaCl)

1. Przygotować 3 - 4% zawiesiny krwinek w roztworze NaCl włączając . krwinki Rh dodatnie i Rh ujemne jako kontrolę oraz krwinki autologiczne jako autokontrolę.
2. Do 2 kropli zawiesiny krwinek, w tym także autologicznych dodać 5 kropli odpowiedniej surowicy, wymieszać.
3. Do krwinek Rh dodatnich i Rh ujemnych dodać po 5 kropli Standardu anti-D, wymieszać.
4. Inkubować w 37°C przez 60 min.
5. Po inkubacji i delikatnym wstrząśnięciu osadu sprawdzić, czy zawiesina jest jednorodna.
6. Przemyć zawiesiny 4-krotnie dużą objętością roztworu NaCl.
7. Po ostatnim przemyciu dokładnie usunąć pozostały płyn.
8. Do osadu krwinek dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego,
9. Odwirować przy 152 – 342 x g w ciągu 30 - 60 s.
10. Resuspendować 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.

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

Test ten zastępuje klasyczną technikę pośredniego testu antyglobulinowego. Ze względu na jego znaczną czułość i krótszy czas wykonywania jest on szczególnie polecany w próbie zgodności.

Przygotowanie krwinek

1. Przemyć krwinki dwukrotnie roztworem NaCl i raz roztworem LISS.
2. W ten sam sposób przygotować krwinki Rh dodatnie i Rh ujemne służące jako kontrola.
3. Z osadu krwinek sporządzić 3 - 4% zawiesinę w roztworze LISS.

Wykonanie testu PTA-LISS

1. Do 2 kropli zawiesin krwinek dodać 2 krople badanej surowicy, a do krwinek kontrolnych po 2 krople Standardu anty-D
2. Mieszaniny inkubować w 37°C w ciągu 20 min.
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. Odwirować przy 152 – 342 x g w ciągu 30 - 60 s.
7. Resuspendować osad krwinek przez bardzo delikatne kołysanie probówką i obserwować obecność aglutynatów

6.4.2.3. Dwustopniowy test antyglobulinowy z zastosowaniem techniki LISS

Jest to czuła metoda do wykrywania alloprzeciwciał wiążących komplement (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 komplementu

1. Do badanej surowicy dodać 5% roztworu EDTA w stosunku jedna kropla roztworu i 9 kropli surowicy.
2. Do 2 kropli 3 - 4% zawiesiny krwinek w roztworze LISS dodać 2 krople surowicy i inkubować w temp. 37°C przez 20 min.
3. Sprawdzić, czy zawiesiny krwinek pozostały jednorodne.
4. Przemyć zawiesiny 4 - krotnie roztworem NaCl.
5. Do osadu przemytych krwinek dodać jako źródło komplementu 4 krople surowicy oddzielonej ze świeżo pobranej krwi od nie uodpornionego dawcy.
6. Mieszaninę inkubować w temp. 37°C przez 20 min.
7. Przemyć krwinki 4-krotnie.
8. Do osadu krwinek po dokładnym usunięciu nadsącza dodać 2 krople odczynnika antyglobulinowego poliwalentnego lub anty-C3,
9. Odwirować przy 152 – 342 x g w ciągu 30 - 60 sek.
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

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

Odczynniki

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

Wykonanie badania

1. Przygotować 4% zawiesiny krwinek w PBS
2. Dodać do 2 kropli surowicy jedną kroplę zawiesiny krwinek i 4 krople roztworu PEG.
3. Inkubować w temp. 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, wymieszać
7. Wirować przez 20 s. przy 342 x g.
8. Odczytać wynik delikatnie kołyszając probówką.

UWAGA

Jednocześnie z właściwym badaniem wykonać badania kontrolne z krwinkami Rh dodatnimi i Rh ujemnymi uczulonymi Standardem anty-D.

5.4.3. Kontrola ujemnych wyników testu antyglobulinowego

Stosowanie w testach anytglobulinowych 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 w 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.

Zasada metody.

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

Przygotowanie odpowiednio uczulonych krwinek

1. Sporządzić szereg rozcieńczeń w roztworze NaCl surowicy zawierającej niekompletne przeciwciała anty-D.
2. Zbadać każde rozcieńczenie w teście antyglobulinowym stosując krwinki D dodatnie o heterozygotycznej ekspresji (np. DCcee).
3. Do dalszych badań wybrać krwinki, które po uczuleniu przeciwciałami dały z odczynnikiem antyglobulinowym aglutynację o nasileniu pomiędzy 2+ a 3+.
4. Przygotować 5% zawiesinę w roztworze NaCl nie uczulonych krwinek trzykrotnie przemytych 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% w roztworze NaCl przygotowanych uprzednio słabo uczulonych krwinek kontrolnych, odwirować.

Interpretacja wyniku

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

UWAGI

- A.** *Po ustaleniu rozcieńczenia surowicy anty-D, które optymalnie oplaszcza krwinki, należy przygotowywać każdego dnia większą porcję uczulonych, przemytych krwinek.*
- B.** *Uczulone krwinki produkuje RCKiK w Katowicach.*
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

Interpretacja wyniku

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.

UWAGA

Przedstawioną kontrolę testu antyglobulinowego stosuje się do wszystkich metod PTA i do BTA.

5.4.4. Źródła błędów w technice testu antyglobulinowego

Najczęstsze przyczyny wyników fałszywie dodatnich

1. Zbyt szybkie lub zbyt długie wirowanie krwinek z odczynnikiem antyglobulinowym.
2. Nie zwrócenie uwagi na obecność w surowicy kompletnych przeciwciał aktywnych w 37°C.
3. Zanieczyszczenie bakteryjne krwinek lub surowic, źle lub nieodpowiednio umyte probówki.

Do badań muszą być stosowane wyłącznie probówki jednorazowego użytku.

4. Zanieczyszczenie roztworu NaCl jonami metali ciężkich.
5. W technice LISS (oprócz powyżej podanych 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 anti-IgG.

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. O niedokładnym przemyciu krwinek świadczy słabo dodatni, a nawet ujemny wynik z krwinkami Rh dodatnimi uczulonymi Standardem anti-D.
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 przemycania 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.

Zasada badania

1. Obliczyć właściwą objętość surowicy potrzebną do wykonania badań uwzględniając liczbę stosowanych zawieszin krwinek, środowisko i zakres temperatury.
2. W szeregu probówek z wyjątkiem pierwszej umieścić jednakowe objętości płynu służącego do rozcieńczania badanej surowicy (np. roztwór NaCl, surowica grupy AB).

3. Dodać do pierwszej i drugiej próbówki badaną surowicę w objętościach równych objętościom dodanego płynu rozcieńczającego.
4. Po wymieszaniu pipetą przenieść z drugiej próbówki połowę uzyskanej objętości do trzeciej próbówki.
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.

Metoda próbówkowa

1. Przygotować odpowiednią liczbę szeregów próbówek. Liczba próbówek w szeregu jest równa liczbie w szeregu macierzystych rozcieńczeń.
2. Z każdej próbówki macierzystego szeregu rozcieńczeń, począwszy od ostatniej przenieść po dwie krople.
3. Dodać do całego szeregu po kropli odpowiedniej 3 - 4% zawiesiny krwinek.
4. Inkubować w odpowiedniej temperaturze przez określony czas; temperatura i czas inkubacji zależą od swoistości przeciwciał.
5. Odczytać wyniki:
 - a) makroskopowo po delikatnym wstrząśnięciu próbówki, które można poprzedzić krótkotrwałym wirowaniem
 - b) mikroskopowo pod małym powiększeniem; kroplę przenieść na szkiełko podstawowe i sporządzić z niej podłużny rozmaz.

UWAGA

W celu określenia miana przeciwciał w surowicy za pomocą PTA należy stosować takie proporcje surowicy i zawiesiny krwinek, jak podano w rozdziałach dotyczących testu antyglobulinowego.

5.6. WYKRYWANIE SUBSTANCJI ABH W ŚLINIE

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

Przygotowanie śliny do badań

1. Zebrać kilka mililitrów śliny do suchej próbówki; u niemowląt nasączyć śliną bibułę filtracyjną lub gazę i umieścić w próbówce zawierającej kilka kropli roztworu NaCl.
 2. Odwirować i przenieść nadsącz do oddzielnej próbówki.
 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.

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; lektyny H krwinki grupy O.
2. Przygotować rozcieńczenia w roztworze NaCl 1:5, 1:20, 1:80, 1:320 badanej śliny oraz śliny wydzielacza i niewydzielacza i umieścić po 2 krople w szeregu próbówek.
3. Do szeregów rozcieńczeń dodać jednakową objętość odczynnika anty-A lub anty-B albo lektyny anty-H w uprzednio ustalonym rozcieńczeniu.
4. W dodatkowej próbówce umieścić rozcieńczony odczynnik i dodać jednakową objętość roztworu NaCl.
5. Pozostawić próbówki na 30 min. w temperaturze pokojowej.
6. Do wszystkich próbówek dodać po 2 krople 3% zawiesiny krwinek, tych samych, które służyły do określenia rozcieńczenia odczynnika.
7. Mieszanki pozostawić na 15 min. w temperaturze pokojowej.

8. Wyniki odczytywać mikroskopowo.

UWAGA.

Interpretację wyników podano w Tabeli 1.

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.

Przykład dwóch populacji krwinek grupy AB i A

Anty-A	Anty-B	Anty-A+B
4+	duże aglutynaty na tle jednorodnej zawiesiny	4+

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

Postępowanie

1. Przygotować 25% zawiesinę krwinek w roztworze NaCl.
2. W probówce o wymiarach 100 x 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 odwirować przez kilka sekund 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 pkt 4 - 6 do chwili uzyskania jednorodnej zawiesiny krwinek (bez aglutynatów).
8. Do kropli jednorodnej zawiesiny dodać kroplę odczynnika zastosowanego do rozdziału krwinek, odwirować i odczytać wynik; brak aglutynacji świadczy o prawidłowym oddzieleniu dwóch populacji.

UWAGA

Obecność aglutynatów wskazuje na konieczność powtórzenia całej procedury.

Uwolnienie krwinek z aglutynatów uzyskanych podczas rozdziału dwóch populacji W tej technice przeciwciała mechanicznie uwolnione 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 ok. 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 nie zaglutynowanej populacji krwinek.

UWAGA.

Oddzielenia dwóch populacji krwinek można dokonać za pomocą odczynników diagnostycznych z innych układów grupowych poza AB0, zawierających przeciwciała kompletne, np. 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.

Postępowanie

1. Pobrać od chorego krew na EDTA .
2. Przemyć krwinki 3 - krotnie roztworem NaCl: podczas ostatniego przemycia zastosować wyższe obroty wirówki w celu maksymalnego zagęszczenia krwinek.
3. Dokładnie usunąć nadsącz nie uszkadzając białawego kożuszka płytkowo-leukocytarnego.
4. Górną warstwę krwinek przenieść do oddzielnej probówki i dokładnie wymieszać.
5. Wypełnić krwinkami 10 kapilar pozostawiając wolne odcinki długości 2 cm i zatopić je nad palnikiem lub uszczelnić plasteliną.
6. Umieścić kapilary w wirówce hematokrytowej i wirować przez 15 min.
7. Odciać górne części kapilar, które zawierają krwinki chorego, 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. Przemyć krwinki 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 i dolnej kapilar i porównać wyniki

UWAGA.

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

5.9. ADSORBCJA - ELUCJA PRZECIWCIAŁ

Adsorbcję i elucję wykonuje się w celu:

- a) identyfikacji obecnych w surowicy wieloswoistych alloprzeciwciał; w tych przypadkach próbki surowicy adsorbuje się kilkoma rodzajami krwinek o odpowiednio dobranych antygenach, a uzyskane eluaty bada się z zestawem krwinek wzorcowych;
 - b) potwierdzenia rozpoznania odmian antygenów, przede wszystkim A, B i D; w tych przypadkach odczynniki diagnostyczne adsorbuje 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.

5.9.1. Adsorbcja przeciwciał

Zasady wykonywania adsorbcji

1. Przemyć krwinki 4-krotnie 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 w temperaturze optymalnej dla reakcji obecnych przeciwciał przez 1-2 godziny, 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 adsorbcji krwinkami.
6. Z krwinek użytych do adsorbcji 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 absorpcji (np. 4 objętości surowicy i jedna objętość krwinek).

5.9.2. Techniki elucji przeciwciał

Zasady ogólne

Przemyć krwinki uczulone przeciwciałami co najmniej 4-krotnie dużą objętością roztworu NaCl; do krwinek uczulonych przeciwciałami typu zimnego stosuje się roztwór oziębiony do 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 nadsączu 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 nie przekraczających 10 kropli.
2. Dodać jednakową, objętość roztworu NaCl, a w przypadku przeciwciał niekompletnych surowicę grupy AB.
3. Umieścić probówki w łaźni wodnej o temp. 56°C na 10-15 min. (nie dłużej), stale delikatnie wstrząsając ich zawartość.
4. Odwirować w płaszczu wodnym o temp. 56°C w ciągu 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 - cieplna

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 607 x 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 w celu odparowania eteru na ok. 5 min. w łaźni wodnej o temp. 56°C i stale mieszać bagietką, uważając, aby resztki eteru nie spowodowały wylania zawartości probówki.
6. Po odparowaniu eteru odwirować w płaszczu wodnym o temp. 56°C w ciągu 5 min. przy 607 x g. i 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/litr glicyny,
5 kropli 10% EDTA - Na₂.
- 3 Po dokładnym wymieszaniu pozostawić w temperaturze pokojowej na 2 min.
- 4 Dodać 3 krople 1 mol/litr TRIS - NaCl, wymieszać i odwirować przez minutę przy 2500 obr./min.
- 5 Klarowny nadsącz - eluat przenieść do oddzielnej probówki.
- 6 Stosując papierek lakmusowy sprawdzić pH eluatu i doprowadzić przy pomocy 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 przeciwciała klasy IgG z powierzchni krwinek 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 (3.3.10.) dodać jedną objętość osadu krwinek.
3. Mieszaninę inkubować w temp. 37°C przez 30-60 min wstrząsając kilkakrotnie zawartość probówki.
4. Przemyć krwinki 4-krotnie 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. Przemyć jedną kroplę gęstych krwinek 3-krotnie roztworem NaCl.
2. Do 20 kropli roztworu kwaśnej glicyny dodać 5 kropli EDTA .
3. 25 kropli tej mieszaniny dodać do osadu krwinek i pozostawić w temperaturze pokojowej na 1-2 min.
4. Dodać 3 krople 1 mol/litr TRIS - NaCl i odwirować.
5. Sprawdzić pH nadsącza papierkiem lakmusowym i doprowadzić do pH 7,0-7,4 za pomocą TRIS - NaCl, przy czym po dodaniu każdej kropli należy wymieszać zawartość probówki, odwirować i sprawdzić pH.

6. Usunąć nadsącz i przemyć krwinki 4-krotnie 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 i EDTA i powtórzyć całą procedurę.

5.11. ADSORBCJA AUTOPRZECIWCIAŁ Z SUROWICY

Adsorbcję 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 – autoadsorbcja lub odpowiednio dobrane krwinki allogeniczne – alloadsorbcja, nazywana również adsorpcją różnicową. Zastosowanie autoadsorbcji lub alloadsorbcji zależy od tego, czy choremu przetaczano krew w okresie 3 miesięcy poprzedzających aktualne badanie. Jeśli choremu przetaczano krew w tym okresie, autoadsorbcja 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. Autoadsorbcja

Autoadsorbcję przeprowadza się najczęściej za pomocą autologicznych krwinek uwolnionych z opłaszczających je autoprzeciwciał. Jeżeli autoprzeciwciała reagują mocniej w teście enzymatycznym niż antyglobulinowym do autoadsorbcji stosuje się krwinki traktowane kwaśną glicyną i EDTA a następnie odczynnikami papainy lub krwinki traktowane odczynnikami MEP. Jeśli autoprzeciwciała reagują mocniej w teście antyglobulinowym niż enzymatycznym autoadsorbcję wykonuje się krwinkami traktowanymi roztworem fosforanu chlorochiny lub krwinkami w środowisku PEG.

5.11.1.1. Metoda autoadsorbcji z zastosowaniem krwinek traktowanych kwaśną glicyną i EDTA i odczynnikami papainy.

Przygotowanie krwinek do autoadsorbcji

1. Przemyć krwinki 3-krotnie roztworem NaCl.
2. W 2 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 jedną minutę (nie dłużej niż na 1,5 min).
6. Dodać po 3 krople TRIS - NaCl w celu zubożenia mieszaniny.
7. Probówki odwirować i sprawdzić pH nadsączu doprowadzając go do pH 7,4 za pomocą dodatkowych kropli TRIS - NaCl.
8. Krwinki przemyć 3-krotnie roztworem NaCl
9. Odczynnik papainowy rozcieńczyć w stosunku jedna objętość odczynnika i 9 objętości roztworu NaCl.
10. Do osadów przemytych krwinek dodać po 20 kropli rozcieńczonego odczynnika papainowego.
11. Inkubować w temp. 37°C przez 10-15 min.
12. Przemyć krwinki 4-krotnie roztworem NaCl.

UWAGA.

Osad krwinek w jednej probówce służy do wykonania jednej autoadsorbcji. Drugą probówkę należy przechować w lodówce (2 – 6° C) i wykorzystać krwinki do kontroli surowicy po

autoadsorbcji, a w przypadku gdyby jednorazowa autoadsorbcja okazała się nieskuteczna, do wykonania następnej adsorbcji.

Autoadsorbcja

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

Kontrola autoadsorbcji

Surowicę poddaną autoadsorbcji 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 autoadsorbcji.

UWAGA.

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

5.11.1.2. Metoda autoadsorbcji z zastosowaniem krwinek traktowanych odczynnikiem MEP

1. Przygotować około 2 ml gęstych krwinek chorego.
2. Dodać 2 objętości odczynnika MEP (str...) i inkubować w temp. 37°C przez 20 min.
3. Przemyć krwinki 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 temp. 37°C.
7. Odwirować i przenieść surowicę znad osadu krwinek do oddzielnej probówki.
8. Skontrolować wynik autoadsorbcji testem antyglobulinowym dodając do adsorbowanej surowicy krwinki autologiczne uprzednio traktowane odczynnikiem 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 autoadsorbcji.*

C. *Odczynnik MEP niszczy determinanty antygenów układu Kell, MNS i Gerbich, osłabia ekspresję antygenów LW i Duffy, wzmacnia ekspresję antygenów układu Rh, Kidd, P, li oraz Lewis.*

5.11.1.3. Metoda autoadsorbcji w środowisku 20% PEG

Oprócz wymienionych metod, można stosować adsorbowanie autoprzeciwciał krwinkami natywnymi (nie poddawany 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.

Adsorbcja

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

Kontrola skuteczności autoadsorpcji

1. W tym celu należy użyć krwinek chorego z których usunięto autoprzeciwciała przy zastosowaniu metody z użyciem kwaśnej glicyny (**5.10.2**).
2. Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym stosując następujące proporcje: 4 krople surowicy (w której jest już PEG) i 1 kropla 3-5% krwinek autologicznych z usuniętymi autoprzeciwciałami.
3. Inkubować 15 minut w 37°C.
4. Przemyć krwinki 4 krotnie.
5. Zbadać z surowicą antyglobulinową anty-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 (w której jest już PEG) i 1 kropla 3-5% zawiesiny krwinek wzorcowych. Następne etapy jak powyżej od punktu 3

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.

15.11.2.1 Alloadsorpcja autoprzeciwciał w środowisku 20% PEG

Adsorpcja

1. Przygotować po ok. 2ml 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. Mieszaninę inkubować 15 minut w 37°C.
4. Odwirować i przenieść nadsączy zawierające surowicę oraz PEG do oddzielnych probówek.

Kontrola skuteczności alloadsorpcji

1. W tym celu należy użyć krwinek chorego z których usunięto autoprzeciwciała za pomocą kwaśnej glicyny (**5.10.2**).
2. Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym stosując następujące proporcje: 4 krople surowicy (jest już z PEG) i 1 kropla 3-5% zawiesiny krwinek autologicznych z usuniętymi autoprzeciwciałami.
3. Inkubować 15 minut w 37°C.
4. Przemyć krwinki 4 krotnie.

5. Zbadać z surowicą antyglobulinową anti-IgG.

Wynik ujemny wskazuje, że autoprzeciwciała zostały wyadsorbowane.

Wynik dodatni wskazuje na konieczność przeprowadzenia ponownej alloadsorbcji.

Kolejną alloadsorbcję 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 (w której jest już PEG) i 1 kropla 3-5% zawiesiny krwinek wzorcowych w NaCl. Następne etapy jak w punktach 3-5.

15.11.2.2 Alloadsorbcja autoprzeciwciał krwinkami papainowanymi

Adsorbcja

1. Przygotować ok. 2ml gęstych krwinek przeznaczonych do adsorpcji, uprzednio przemytych w roztworze NaCl.
2. Krwinki wypapainować (zgodnie z 5.1.3)
3. W oddzielnych probówkach zmieszać jednakową objętość surowicy i gęstych papainowanych krwinek jednego rodzaju.
4. Mieszaninę inkubować 30 minut w 37° C.
5. Odwirować i przenieść surowicę do oddzielnych probówek.
Kontrola skuteczności autoadsorbcji

1. W tym celu należy użyć krwinek chorego z których usunięto autoprzeciwciała za pomocą kwaśnej glicyny (5.10.2) raz przemytych w roztworze LISS.
2. Badanie należy wykonać w teście antyglobulinowym LISS: 2 krople surowicy i 2 krople 2-3% zawiesiny krwinek autologicznych w roztworze LISS.
3. Inkubować 20 minut w 37°C.
4. Przemyć 4 krotnie.
5. Zbadać z surowicą antyglobulinową wieloswoistą.

Wynik ujemny wskazuje, że autoprzeciwciała zostały wyadsorbowane.

Wynik dodatni wskazuje na konieczność przeprowadzenia ponownej alloadsorbcji. Kolejną alloadsorbcję wykonuje się mieszając jednakową objętość surowicy oraz nową porcją 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 alloadsorbcji 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 adsorbcji jednym rodzajem krwinek mogą być inne niż reakcje surowicy adsorbowanej krwinkami o innym fenotypie.

5.12. RÓŻNICOWANIE PRZECIWCIAŁ IgG I IgM PRZY UŻYCIU

2- MERKAPTOETANOLU (2ME)

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

1. Dodać do badanej surowicy jednakową objętość 0,1 mol/l 2ME w buforze fosforanowym o pH 7,4.
2. Mieszaninę umieścić na 2 godziny w temp. 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.

UWAGA

2ME można zastąpić bezwonnymi preparatami redukującymi: dwutioerytrytolem (DTE) lub dwutiotrytolem (DTT).

5.13. WYKRYWANIE DEFektu W BŁONIE KRWINEK CZERWONYCH PRZY POMOCY POLIBRENU

Metoda ta umożliwia wykrywanie defektu związanego z niedoborem kwasu sjałowego przekraczającym 5-7% prawidłowej wartości. Normalne krwinki czerwone, które są naładowane ujemnie ulegają agregacji w środowisku naładowanego dodatnio wysoko cząsteczkowego polimeru. Krwinki ze znacznie zmniejszonym ładunkiem ujemnym z powodu niedoboru kwasu sjałowego zawieszone w tym środowisku, odpychają się wzajemnie i pozostają niezlepione.

Przygotowanie krwinek

1. Wypapainować prawidłowe krwinki kontrolne stosując czas kontaktu z enzymem dłuższy o ok. 5 min. w porównaniu do czasu stosowanego w przygotowaniu krwinek do badania przeciwciał.
2. Przygotować 25% zawiesiny krwinek kontrolnych zwykłych i papainowanych oraz badanych w roztworze NaCl zbuforowanym do pH 7,0.

Wykonanie badania

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

Interpretacja wyników

Porównuje się zachowanie krwinek badanych i kontrolnych. Jeśli krwinki badane zachowują się tak jak zwykle kontrolne, to znaczy opadają w dół, nie ma dowodu na deficyt kwasu sjałowego powyżej 5-7%. Na deficyt kwasu sjałowego wskazuje pozostawanie krwinek badanych w zawieszynie, podobnie jak krwinek kontrolnych papainowanych.

5.14. MIKROMETODY KOLUMNOWE

Mikrometody kolumnowe znalazły uznanie w pracowniach centrum oraz w pracowniach większych szpitali. Zalety testów kolumnowych:

1. Zastępują prawie wszystkie testy wykonywane technikami szkiełkowymi i probówkowymi.
2. Są proste, bezpieczne i wygodne w stosowaniu.
3. Przyczyniają się do oszczędności odczynników diagnostycznych.
4. Umożliwiają szybkie wykonanie wielu badań z niewielkich próbek krwi.
5. Są bardzo czułe i pozwalają na wykrycie nawet bardzo słabo reagujących przeciwciał.
6. Eliminują wiele reakcji nieswoistych, jak na przykład rulonizację.
7. W teście antyglobulinowym, nie wymagają etapu przemywania krwinek po ich inkubacji z surowicą, co zapobiega najczęściej spotykanym błędom.
8. Wyniki badań można odczytywać po dłuższym czasie.

UWAGI

- A. Zastosowane żele lub kuleczki szklane wypełniające mikroprobówki, posiadają zdolność dokładnego izolowania krwinek z otaczającego je środowiska. Zatrzymują one surowicę wraz z nadmiarem nie wykorzystanych 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, nie istotnych klinicznie. W takich przypadkach w przebiegu całego badania należy stosować temperaturę 37°C.

5.15. AUTOMATY I PÓŁAUTOMATY STOSOWANE W BADANIACH SEROLOGICZNYCH

Urządzenia te znajdują zastosowanie szczególnie w pracowniach centrum, wykonujących badania grup krwi dużej liczby próbek krwiodawców również z oddziałów terenowych. Badania przeprowadza się w mikroprobówkach używanych w testach kolumnowych albo na mikropłytkach. Dzięki odpowiednim zabezpieczeniom i funkcjonalnym rozwiązaniom wykluczają one zamianę próbek krwi i ograniczają możliwość popełnienia błędów. Reakcje serologiczne oraz wyniki badań są uwidaczniane na ekranie monitora. Wydruki wykonanych badań wraz z ich wynikami winny być przechowywane w segregatorach. Zbyteczne są zatem książki serologiczne zawierające ręczne protokoły badań. Reakcje serologiczne zachodzące w mikroprobówkach lub na płytkach można bezpośrednio odczytywać i porównać z danymi na monitorze lub wydruku. Aparatura umożliwia ponadto archiwizowanie wszystkich protokołów reakcji serologicznych i wyników, dzięki czemu można zawsze do nich wrócić i wykonać ponowne wydruki.

Producent sprzętu automatycznego powinien zapewnić bezpośrednią transmisję wyników badań dawców do ogólnego programu komputerowego. Program ten uwidacznia techniki wykonanych badań oraz zawiera informację dotyczącą numeracji płytek na których były umieszczone poszczególne próbki, co ułatwia szybkie ich odszukanie.

Poza rutynowymi badaniami grup krwi urządzenia automatyczne umożliwiają wykrywanie alloprzeciwciał odpornościowych oraz przeprowadzanie badań fenotypowych krwinek czerwonych, w których zużywa się bardzo niewielkie ilości odczynników diagnostycznych.

Automatyzacja i informatyzacja badań serologicznych może zapobiegać wystąpieniu błędów związanych z:

- zarejestrowaniem zlecenia;
- identyfikacją próbki badanej;
- wyborem odczynnika;
- wykonaniem samego badania;
- wpisywaniem danych;
- interpretacją;
- odczytem wyników.

Zagwarantowanie identyfikacji

Aby zagwarantować niezawodną identyfikację wszystkich elementów biorących udział w badaniu serologicznym wykonywanym automatycznie, następujące dane operacyjne muszą być archiwizowane, dostępne i możliwe do sprawdzenia:

- data badania;
- dane osoby zlecającej i odczytującej;
- dane operatora;
- odczynniki: rodzaje, numery serii;
- wyniki badań reaktywności każdego odczynnika;
- uwagi na temat ewentualnej korekty manualnej wyników;
- zinterpretowane wyniki badania;
- postępowanie z alarmami funkcjonowania systemu automatycznego.

Walidacja aparatu do badań automatycznych

Automaty przed ich dopuszczeniem do użytku muszą zostać zwalidowane. Procedura ta polega na równoległym przeprowadzaniu badań metodą ręczną i automatyczną przez pewien okres czasu, wystarczającego do oceny prawidłowości działania automatu. Walidacji aparatu należy dokonywać po każdej jego awarii i po każdej kontroli technicznej.

Raz w tygodniu należy przeprowadzać kalibrację automatycznego czytnika zgodnie z instrukcją producenta.

Walidacja odczynników stosowanych w badaniach automatycznych

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

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 Rh+ i O Rh-. W kontroli wiarygodności testu antyglobulinowego w badaniach przeciwciał odpornościowych należy stosować Standard anty-D. Nasilenie reakcji ze Standardem 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 wraz z pieczęcią osoby wykonującej badanie.

Jeśli metoda nie jest całkowicie zautomatyzowana i wyniki nie są automatycznie przekazywane do centralnego komputera, obowiązuje dwukrotne wizualne sprawdzanie zarówno próbek krwi poddanych badaniom, jak i uzyskanych wyników na płytkach lub kartach. W badaniach grup krwi biorców nie można zrezygnować z wizualnej kontroli, jeśli automatyczny czytnik nie rejestruje i nie interpretuje obecności dwóch populacji krwinek.

6. BADANIA ANTYGENÓW I PRZECIWCIAŁ UKŁADÓW GRUPOWYCH KRWINEK CZERWONYCH

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

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 surowicy badanej. 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

Odczynniki:

W badaniach grup krwi stosowany jest zestaw odczynników diagnostycznych zawierający:

- a) odczynniki monoklonalne anty-A i anty-B,
- b) odczynniki monoklonalne anty-A i anty-B z innych klonów.

Krwinki wzorcowe: Zawiesiny krwinek grupy krwi O, A₁ i B (5 - 10%) w roztworze 0,15M NaCl, przemyte uprzednio w tym roztworze.

UWAGI

- A. Krwinki wzorcowe można sporządzić z krwi badanej poprzedniego dnia lub z krwi specjalnie do tego celu pobranej.*
- B. Krwinki A₁ wybiera się spośród krwi grupy A za pomocą badania z lektyną anty-A₁*

- C.** Wszystkie składniki zestawu diagnostycznego powinny znajdować się w zamkniętych pojemnikach zaopatrzonych w kropłomierze.
- D.** W przypadku stosowania metod automatycznych (z zachowaniem zasad opisanych w rozdziale 5.15. automaty i półautomaty stosowane w badaniach serologicznych) 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.

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.

Zaleca się codzienną kontrolę swoistości i aktywności odczynników diagnostycznych. Kontrola krwinek wzorcowych obowiązuje po każdym ich przygotowaniu

1. Na płycie umieścić w pionowych szeregach po jednej kropli każdego odczynnika w odpowiedniej kolejności.
2. Do pierwszego z trzech poziomych rzędów kropli poszczególnych odczynników dodać po jednej kropli zawiesiny krwinek grupy O, do drugiego - krwinek grupy A₁ a do trzeciego - krwinek grupy B.
3. Poruszając płytą ruchem okrężnym po wymieszaniu reagentów, obserwować czas pojawienia się aglutynacji. Powinna ona wystąpić w ciągu pierwszej minuty i osiągnąć nasilenie równe 3+ lub 4+ w ciągu 3 minut. Reakcje z surowicami ludzkimi odczytuje się po 10 minutach.
4. Oceniając zestaw, zwrócić uwagę na zachowanie się krwinek grupy 0, które powinny pozostać w postaci jednorodnej zawiesiny.
5. Zestaw diagnostyczny nadaje się do użytku jeżeli uzyskane wyniki odpowiadają schematowi w tabeli 2. Należy wyeliminować z niego te składniki, które wykazują reakcje nieswoiste, jak również te, których aktywność nie odpowiada kryteriom wymienionym w pkt. 3
6. Numery serii oraz symbole odczynników i krwinek zakwalifikowanych do zestawu diagnostycznego zapisuje się w książce badań grup krwi (wzór 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

1. Po lewej stronie płyty wypisać kolejno numery badanych próbek krwi, a u góry płyty symbole odczynników (anty-A, anty-B i ewentualnie anty-A,B) oraz krwinek wzorcowych (0, A₁, B).
2. Pod symbolami zestawu wzorcowego umieścić w pionowych rzędach po kropli odpowiedniego odczynnika i krwinek wzorcowych.
3. W rzędach poziomych dodać do odczynników monoklonalnych po kropli zawiesiny krwinek badanych pobranych bezpośrednio z próbówki macierzystej, a do surowic diagnostycznych po kropli 10% zawiesiny krwinek w roztworze NaCl.
4. Do wzorcowych krwinek dodać po kropli badanej surowicy.
5. Poszczególne reagenty wymieszać za pomocą suchej bagietki lub w przypadku płyty z wgłębieniami poprzez poruszanie jej okrężnymi ruchami.
6. Po upływie 3 minut (przy użyciu odczynników monoklonalnych) lub 10 minut (przy użyciu ludzkich surowic) odczytywać wyniki.

UWAGI

- A.** Wyniki badań grup krwi odczytują na przemian 2 osoby -jedna podaje uzyskane reakcje a druga protokołuje je w książce badań za pomocą symboli + (aglutynacja) i - lub 0 (brak aglutynacji). Po zapisaniu wyników, druga osoba odczytuje reakcje na płycie a ta, która je odczytywała poprzednio sprawdza ich zgodność z zapisem w książce.
- B.** Jeżeli wyniki obserwowanych reakcji są niezgodne ze schematem (Tab.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 rozdziale 5.15. automaty i półautomaty stosowane w badaniach serologicznych), wynik badania jest odczytywany i walidowany przez jedną osobę.

Po odczytaniu i zapisaniu wyników przeprowadza się badanie kontrolne, polegające na ponownym określeniu antygenów na krwinkach za pomocą odczynników diagnostycznych 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 na szkiełku podstawowym lub płycie za pomocą lektyny anty-A₁. Najczęściej stosowanym odczynnikiem jest Dolichotest.

1. Do jednej kropli 10% zawiesiny krwinek grupy A dodać kroplę lektyny anty-A₁
2. Po zmieszaniu reagentów odczytać wyniki po 5 minutach (może być wymagany inny czas, ustalony przez producenta).

Wyrażna 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 .

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

Błędy natury technicznej

1. Zanieczyszczone płyty lub pipety,
2. Niewłaściwa proporcja krwinek / odczynnik.
3. Niedokładne mieszanie krwinek z odczynnikiem
4. Opóźnione odczytanie wyniku (wysychanie mieszaniny).
5. Zanieczyszczenie odczynników lub badanych krwinek i surowicy.
6. Nie dodanie odczynnika diagnostycznego lub badanej surowicy.
7. Nie sprawdzenie krwinek wzorcowych po ich przygotowaniu.
8. Błąd w identyfikacji badanych zawiesin krwinek lub surowic (zamiana próbek).

Nietypowe właściwości badanych krwinek lub surowic

1. Bardzo słabo reagujące regularne aglutyniny w badanej surowicy.
2. Obecność hemolizyn.
3. Obecność autoaglutynin.
4. Obecność drobnych skrzepów imitujących aglutynację,
5. Obecność nieregularnych przeciwciał w surowicy badanej.
6. Poliaglutynacja krwinek badanych wykrywana ludzkimi surowicami diagnostycznymi
7. Obecność słabej odmiany antygeny A lub B wykrywana najczęściej ludzkimi surowicami diagnostycznymi
8. Obecność 2 populacji krwinek (chimeryzm naturalny, potransfuzyjny i przeszczepowy).

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

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

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

Słabe odmiany antygenów układu ABO (Tab.3)

Za obecnością słabych odmian antygenów A lub B przemawia:

1. Znaczne osłabienie lub brak aglutynacji badanych krwinek z odczynnikami diagnostycznym anti-A lub anti-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 A_x i A_3 .

Dla potwierdzenia i identyfikacji odmiany układu ABO postępowanie jest następujące:

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

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:

1. Obecność słabej odmiany A_3 lub B_3 (w badaniach z surowicami ludzkimi).
4. Depresja antygeny A lub B w części populacji krwinek czerwonych w przebiegu chorób rozrostowych układu krwiotwórczego.
5. Po przetoczeniu krwinek innej grupy krwi (np. osobie grupy AB krwinek A, B lub O) - zjawisko przemijające.
6. Po przeszczepieniu allogenicznych hemopoetycznych komórek macierzystych od dawcy o innej grupie ABO - zjawisko przemijające.
7. Chimeryzm u bliźniąt dwujajowych - zjawisko trwałe.
8. Zaburzenia procesu zapłodnienia - dispermia (zjawisko trwałe)

UWAGI

A. W przypadku obserwacji 2 populacji krwinek, należy podjąć próbę ich rozdzielenia, zgodnie z metodą 6.8. 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 czerwonych pod wpływem enzymów bakteryjnych lub innych nieznanych 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 to 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, których 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.4).

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 odsłaniające antygen Tn nie jest znany. Działają 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 biorem nie należy przetaczać osocza.*

7.1.8. 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:

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 probówkową.

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; w przypadkach chorobowych - w hipo lub agammaglobulinemii.

Postępowanie.

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

1. Przygotować 3 probówki, oznakowane symbolami O, A₁, B.
2. W każdej probówce umieścić po 2 krople badanej surowicy.
3. Dodać po 2 krople 3-4% zawiesiny krwinek zgodnie z symbolami na probówkach.
4. Probówki pozostawić w temperaturze pokojowej przez kilka minut.
5. Zawartość probówek odwirować (30 do 60 s.).
6. Odczytać wyniki makroskopowo, delikatnie potrząsając probówki.

Nie wykrycie alloaglutynin metodą probówkową (brak aglutynacji krwinek z odpowiednim odczynnikiem) 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:

- a) nie występuje u osób zdrowych,
- b) może pojawić się u chorych z zaburzeniami w białkach osocza (makroglobulinemie, choroby nowotworowe, oparzenia),
- c) jest obserwowane po przetoczeniu wysokocząsteczkowego dekstranu lub po dożylnym stosowaniu preparatu cieniującego do badań rentgenologicznych,
- d) w badaniu makroskopowym nie można rozróżnić rulonizacji krwinek od aglutynacji.

Postępowanie

1. Przenieść kroplę zlepionych krwinek na szkiełko podstawowe i obejrzeć 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 i 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

Obecność przeciwciał anty-A₁

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

1. Sprawdzić czy krwinki badane są A₂ lub A₂B za pomocą lektyny anty-A₁,
2. Zbadać surowicę z zawiesinami krwinek wzorcowych A₁ (z innej próbki) i A₂,
3. Zastosować większą liczbę krwinek A₁ i A₂ w celu ostatecznej identyfikacji przeciwciał.

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-A₁ mogą to być inne „naturalne” przeciwciała, reagujące w temperaturze pokojowej, jak anty-P₁, 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, np.:

O NNSs P₁ Le(a-b+) 0 MMSS P₁ Le(a+b-)

O MNss P₁ Le(a-b+) 0 MNss P₂ Le(a-b-) Lu(a+)

O MMSs P₂ Le(a-b+) krwinki jednoimienne w ABO

Surowicę bada się z zawiesinami krwinek w roztworze NaCl lub/i w roztworze LISS w następujący sposób:

1. W opisanych probówkach umieścić po 2 krople surowicy badanej.
2. Dodać po 1 lub 2 krople 3-4% zawiesiny odpowiednich krwinek.
3. Pozostawić 15 minut w temperaturze pokojowej.
3. Odwirować przez 1 minutę, przy 342 x g.
4. Odczytać wyniki, protokolując nasilenie aglutynacji.

UWAGI.

A. U osób grupy A₁ i A₁B, 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 0, A₂ i A₁. Aglutynacja krwinek grupy 0 i A₂, przy braku reakcji z krwinkami A₁ oraz zahamowanie aktywności przy pomocy śliny wydzielacza grupy 0, 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 anti-I.*
- C. Jeżeli reakcje otrzymane z poszczególnymi rodzajami krwinek pozwalają na ustalenie swoistości 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 anti-M, anti-S, anti-Le^a, anti-P₁*

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.

Postępowanie

1. Powtórnie pobrać krew „na ciepło,” za pomocą ogrzanego zestawu, z żyły zgięcia łokciowego, ogrzanego uprzednio termoforem.
2. Część pobranej krwi przenieść do suchej probówki, część do probówki zawierającej antykoagulant (EDTA-Na₂), umieszczonej w naczyniu z wodą o temperaturze 40°C.
3. Przygotować zawiesinę krwinek po kilkakrotnym ich przemyciu roztworem NaCl, ogrzanym do 40°C.
4. Oddzielić od skrzepu surowicę i doprowadzić do temperatury 37°C.
5. Badania grup krwi ABO przeprowadzić w temperaturze 37°C.

UWAGA

Stosując mikrometodę kolumnową obowiązują te same zasady.

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 drugiego roku życia dziecka. W związku z tym, w badaniach krwinek w okresie wcześniejszym, mogą wystąpić słabsze i opóźnione reakcje z odczynnikami diagnostycznymi anti-A i anti-B, w porównaniu z krwinkami dorosłych. Z drugiej strony, wytwarzanie naturalnych przeciwciał układu ABO rozpoczyna się najczęściej w 3-cim miesiącu życia, co sprawia, że mogą one nie być wykrywane w surowicy noworodka podczas określania grup krwi. Należy więc w tych badaniach:

1. Stosować czulsze metody probówkowe.
2. Posługiwać się wyłącznie monoklonalnymi odczynnikami anti-A i anti-B.

Postępowanie

1. W oznakowanych dwóch probówkach umieścić po 2 krople odpowiedniego odczynnika anti-A i anti-B.
2. W dodatkowej probówce umieścić 2 krople surowicy ludzkiej grupy AB (sprawdzonej na nieobecność przeciwciał).
4. Do wszystkich probówek dodać po 2 krople 3-4% zawiesiny krwinek badanych w roztworze NaCl i wymieszać.

5. Zawartość probówek odwirować przez 1 minutę przy 152 – 342 x g lub zgodnie z zaleceniami producenta.
6. Odczytać wyniki makroskopowo, wstrząsając lekko probówkami.
7. Wykonać w ten sam sposób badanie kontrolne z zastosowaniem odczynników diagnostycznych, pochodzących z innych klonów.

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. Słabej ekspresji antygeny A czy B na krwinkach, do drugiego roku życia dziecka, 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 poliaaglutynacji 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 GRUP KRWI UKŁADU Rh

6.3.1. Badanie antygeny D

Obecność lub nieobecność antygeny D na krwinkach czerwonych decyduje o zakwalifikowaniu ich do grupy Rh+ albo Rh-. Określenie antygeny D przeprowadza się za pomocą dwóch odczynników anti-D.

a/ odczynnik monoklonalny anti-D IgM,

b/ odczynnik monoklonalny anti-D IgM pochodzący z innego klonu.

Technika oznaczania antygeny D przy pomocy odczynników monoklonalnych musi być zgodna z zaleceniami producenta.

Jednocześnie z każdą serią badań wykonuje się kontrolę odczynnika anti-D z krwinkami Rh+ i Rh-.

UWAGI

- A. W przypadku stosowania dwóch odczynników monoklonalnych, jeden z nich (np. z klonu RUM-1) powinien rozpoznawać u krwiodawców większość przypadków o słabej ekspresji (dawne mianownictwo D^u) oraz większość kategorii antygeny D, z wyjątkiem D^{VI}.*
- B. Odczynniki monoklonalne anti-D umożliwiają bezpośrednie określenie Rh na krwinkach chorych z NAIH typu ciepłego.*
- C. Dopuszcza się odczynnik Blend (mieszanina przeciwciał anti-D IgM+IgG); stosując taki odczynnik nie należy przedłużać zalecanego czasu inkubacji, ponieważ jej wydłużenie może sprawić, że przeciwciała IgG zablokują dostęp przeciwciał IgM do determinant na krwinkach i uzyska się reakcję fałszywie ujemną.*

Badania antygeny D z odczynnikami monoklonalnymi

Odczynniki anti-D IgM stosowane są do badań bezpośrednich w teście szkiełkowym lub probówkowym w środowisku NaCl. Odczynniki anti-D IgM+IgG można stosować również w pośrednim teście antyglobulinowym wyłącznie u krwiodawców. U chorych nie wolno oznaczać antygeny D pośrednim testem antyglobulinowym. Przy stosowaniu odczynników monoklonalnych należy przestrzegać zaleceń producenta.

Interpretacja wyników badań

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

UWAGA

W badaniach rutynowych krwinek dawców poleca się stosowanie testu probówkowego ze względu na jego większą czułość, a tym samym wyższą wykrywalność słabych odmian antygenu D.

6.3.2. Trudności w interpretacji wyników badań antygenu D.

Słaba aglutynacja krwinek badanych z odczynnikami anti-D.

Wystąpienie słabszej reaktywności krwinek badanych może wskazywać na słabą ekspresję antygenu D, tzw. D_{słabe} (D^u). U krwiodawców w takich przypadkach należy:

1. Wykonać badania z różnymi odczynnikami anti-D pochodzenia ludzkiego i monoklonalnymi; w przypadkach wątpliwości inkubować krwinki z poliklonalną surowicą anti-D lub monoklonalnym odczynnikiem IgM + IgG i wykonać pośredni test antyglobulinowy.
2. W wyjątkowych przypadkach bardzo słabej ekspresji antygenu D, potwierdzić jego obecność badaniami eluatu, po inkubacji krwinek z przeciwciałami anti-D,

UWAGI

- A. Słaby antygen D na krwinkach różni się od antygenu wykształconego prawidłowo jedynie obniżoną ekspresją. W związku z tym osoby takie są zaliczane do grupy Rh + i jako biorcy otrzymują krew Rh dodatnią.*
- B. Krew dawców ze słabym antygenem D przeznacza się dla biorców Rh dodatnich.*
- C. U biorców krwi nie należy wykonywać badań antygenu D pośrednim testem antyglobulinowym ze względu na możliwość uzyskania fałszywie dodatniego wyniku. W przypadku bardzo słabej, budzącej wątpliwości w ocenie, reaktywności krwinek należy takiego biorcę zaliczyć do grupy Rh -. Na wyniku należy w uwadze podać: Bardzo słabe reakcje z odczynnikami anti-D.*

Kategorie antygenu D (D częściowe).

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

1. Obecności alloprzeciwciał anti-D u osób Rh+.
2. Rozbieżności w wynikach uzyskanych z zestawem odczynników anti-D. W takich sytuacjach dysponując specjalnym zestawem monoklonalnych przeciwciał anti-D można ustalić kategorię tego antygenu. Badania te wykonuje Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT.

UWAGI

- A. Odmiany antygenu D zaliczane do poszczególnych kategorii zdarzają się bardzo rzadko. Spośród nich najczęściej rozpoznawaną jest kategoria D^{VI}.*
- B. W praktyce rozpoznanie kategorii antygenu D dotyczy najczęściej osób Rh dodatnich, u których wykryto alloprzeciwciała anti-D; swoistość tych przeciwciał jest skierowana do epitopów antygenu D, których brak na autologicznych krwinkach.*
- C. Osoby, u których wykryto kategorię D^{VI} antygenu D są zaliczane do grupy Rh - i do przetoczenia dobiera się krew Rh ujemną, a kobiety są objęte profilaktyką konfliktu Rh.*
- D. Odmiana D^{VI} nie jest immunogenna; wykrycie jej u dawcy upoważnia do zaliczenia go do grupy Rh ujemnej*
- E. Osoby ze wszystkimi kategoriami antygenu D, poza D^{VI} są oznaczane jako Rh+ i należą jako biorcy i jako dawcy do grupy Rh dodatniej.*

Dwie populacje krwinek w następstwie niedawnej transfuzji

U chorych, którym przetoczono krew niezgodną pod względem antygenu D (np. osobie Rh⁺, krew Rh⁻), można obserwować dwie populacje (duże aglutynaty na tle wolnych krwinek) po kontakcie krwinek badanych z odczynnikiem anti-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 wg metody 6.8. 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 wykrywania i identyfikacji przeciwciał. Należą do nich:

- a/ krwinki homozygot w 2 lub kilku układach grupowych (DCC^{ee}, Dcc^{EE}, dccc^{ee}, MM, NN, SS, ss, Fy(a-b⁺), Fy(a+b⁻), Jk(a-b⁺), Jk(a+b⁻)),
- b/ krwinki nie zawierające antygenów powszechnych np. KK, Kp(a+b⁻), Lan⁻, Ge⁻, Rh_{null}, Bombay, Vel⁻, Yt(a⁻), Yk(a⁻), LW(a⁻), Co(a⁻),
- c/ krwinki posiadające antygeny o niskiej lub bardzo niskiej częstości występowania, np.: 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 (u dawcy i biorcy).

Badania fenotypów krwinek czerwonych u krwiodawców należy wykonać dwukrotnie, posługując się dwoma próbkami krwi z różnych pobrań.

Uzyskanie zgodnych wyników z dwóch niezależnie pobranych próbek, upoważnia do ich wpisania w kartotekę i w legitymację dawcy.

Fenotypy krwinek czerwonych u chorych można określać w jednej próbce krwi.

Obecnie do badań fenotypowych stosuje się głównie odczynniki monoklonalne różnych firm zagranicznych, dostępne na rynku krajowym. 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 są wykonywane przeważnie metodą próbówkową w środowisku NaCl, za pomocą odczynników monoklonalnych: anti-D, anti-C, anti-C^w, anti-c, anti-E i anti-e. Każda seria badań wymaga równoległego stosowania, dla każdego odczynnika, kontroli dodatniej z krwinkami o pojedynczej dawce antygenu i kontroli ujemnej z krwinkami nie posiadającymi danego antygenu. 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). Symbolu tego nie ma potrzeby pisać podwójnie*
- B. Ustalenie fenotypu Rh nie zawsze pozwala na wyciąganie pewnych wniosków odnośnie genotypu, gdyż wymaga to badań rodzinnych lub genetycznych. Na podstawie fenotypu można jedynie przewidywać najbardziej prawdopodobny genotyp, w oparciu o wiedzę na temat częstości występowania poszczególnych kombinacji antygenów, przekazywanych przez pojedynczy kompleks genowy (Tab. 5).*

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 probówkowa, umożliwiającą 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, konieczne jest posługiwanie się odczynnikami poliklonalnymi pochodzenia ludzkiego. Badania te, jak np. w przypadku określania antygenów układu Duffy, wymagają stosowania pośredniego testu antyglobulinowego.

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

Przykład dokumentacji badań fenotypów krwinek czerwonych:

Data	Nazwisko		Odczynniki diagnostyczne anty-							
	imię	Nr próbki	-D	-C	-C ^w	-c	-E	-e	-K,	-k
		kontr.+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+
		kontr.-	0	0	0	0	0	0	0	0
		XXX	4+	4+	0	4+	0	4+	0	4+

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 do hemoterapii chorych uodpornionych antygenami krwinek czerwonych. Pochodzi ona głównie od dawców grupy O, ponieważ ich krwinki można przetoczyć również biorcom innych grup krwi.

W immunizacji poprzetoczeniowej największe kliniczne znaczenie, poza antygenem D, ma antygen K z układu Kell oraz u biorców D dodatnich antygeny E, c i C^w 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, np. 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 np.:

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 nie posiadającą 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.

Koncentraty krwinek czerwonych wszystkich dawców, których krwinki nie zawierają antygenów występujących z dużą lub bardzo dużą częstością (ponad 95%) powinna być przechowywana w stanie zamrożenia jako zabezpieczenie autotransfuzji lub hemoterapii u chorych z obecnymi przeciwciałami do antygeny powszechnego. Przykłady takich fenotypów to: Bombay(O_h), dCCee, dccEE, Rh_{null}, LW(a-), KK, Kp(b-), p, Lu(b-), Lan-, Co(a-), Ge-.

Spośród swoistości przeciwciał występujących przeważnie jako naturalne, w niektórych przypadkach wykrywana jest ich aktywność również w 37°C. Należą do nich: anti-Le^a, anti-M, a wyjątkowo rzadko anti-P₁ i anti-A₁. Dla takich biorców powinna być dostępna krew o fenotypach: Le(a-b-), P₂, i NN. Dobranie krwi dla biorcy z przeciwciałami anti-A₁ aktywnymi w 37°C musi być poprzedzone wyszukaniem krwi A₂ za pomocą lektyny anti-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 anti-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. 6). 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. Najprostszy zestaw powinien składać się z dwóch rodzajów krwinek Rh dodatnich, zawierających antygen C^w (np. DC^wCee) oraz antygen E w podwójnej dawce (DccEE) oraz z krwinek Rh 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.

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 przedstawia Tab. 7.

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 (antygeny) i z co najmniej dwoma nie zawierającymi danego antygeny (antygenów).

Od zasady tej można odstąpić tylko wtedy, jeśli wykryje się przeciwciała do antygeny występującego albo powszechnie albo bardzo rzadko w populacji.

Jeżeli badanie przeglądowe z krwinkami wzorcowymi wskazuje na obecność przeciwciał z układu Rh, należy wykonać test LEN i PTA-LISS z odpowiednio dobranym zestawem krwinek.

W przypadku wykrycia przeciwciał u osoby Rh ujemnej zestaw winien zawierać krwinki Dccee, dCcee i dccE.

W przypadku wykrycia przeciwciał u osoby Rh dodatniej zestaw winien zawierać krwinki DCC^wee i DccEE.

Wykrycie w badaniu przeglądowym alloprzeciwciał aktywnych wyłącznie w pośrednim teście antyglobulinowym wskazuje na ich swoistość spoza układu Rh. Zestaw krwinek wzorcowych należy tak skompletować, aby umożliwił identyfikację z układów Kell, Duffy, Kidd, MNS i Lewis. W przypadkach, gdy badania sugerują obecność w surowicy przeciwciał o kilku swoistościach, ich identyfikacja często wymaga stosowania absorpcji przez wybrane krwinki oraz badań wykonanych z nich eluatów.

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

6.6.1. 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 od 50.

UWAGA

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

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.

Krwiodawcy mężczyźni, u których wykryto przeciwciała anty-D powinni być werbowani do przeprowadzenia u nich 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 i surowic 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.

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. Chorem, którzy kiedykolwiek wytworzyli alloprzeciwciała odpornościowe i chorem, u których stwierdza się autoprzeciwciała aktywne w 37°C należy dobierać krew zgodną fenotypowo w układzie Rh i zgodną w antygenie K z układu Kell w celu zapobiegania dalszej immunizacji.
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 czerwone zabarwienie tych składników.

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

- stany zagrażające życiu, gdy brak krwi jednoimiennej;
- obecne alloprzeciwciała odpornościowe, gdy brak krwi zgodnej jednoimiennej;
- bardzo słaba ekspresja antygeny A lub B, albo trudności w określeniu grupy ABO;
- brak krwi Rh ujemnej jednoimiennej w układzie ABO; wówczas należy przetaczać krew grupy O Rh-.

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

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.

Właściwa próba zgodności jest uzupełniona następującymi badaniami:

1. Badanie przeglądowe surowicy biorcy w teście LEN i PTA w kierunku odpornościowych alloprzeciwciał.
2. Kontrola grup układu ABO u dawcy i biorcy
3. Kontrola antygeny D u biorcy, a gdy biorca jest Rh ujemny również kontrola antygeny D u dawcy.

UWAGA

Wyżej wymienione badania można wykonywać jednocześnie z próbą zgodności.

Krew biorcy. Próbę zgodności i wszystkie towarzyszące jej badania wykonuje się z próbki krwi chorego, oddzielnie w tym celu pobranej. Nie należy wykonywać próby 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 winna być przekazana do laboratorium wraz ze skierowaniem na próbę zgodności (wzór 6). Próbkę krwi, po sprawdzeniu danych na etykiecie probówki i danych na skierowaniu, należy opatrzyć numerem rejestracyjnym i wpisać do książki prób zgodności (wzór 7). Trzecia rubryka książki jest przeznaczona dla kolejnych numerów biorców. W przypadku badań z kilkoma pojemnikami krwi w rubryce trzeciej wpisuje się tylko raz numer biorcy, który nanosi się na probówkę z jego krwią. Nie należy opatrzywać dodatkowym numerem poszczególnych donacji.

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 jego etykiecie i na pojemniku i 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 wykonuje się przed sporządzeniem tych koncentratów.

Próbki krwi dawców odwirowuje się jednocześnie z krwią biorcy i eliminuje 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 u biorcy, w badaniu przeglądowym, nie wykryto przeciwciał odpornościowych oraz jeśli brak jest informacji o uodpornieniu w przeszłości, jak również jeśli u biorcy nie stwierdza się autoprzeciwciał typu ciepłego, do przetoczenia dobiera się krew od tzw. 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.
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. Jeżeli w danej chwili nie jest dostępna krew nie zawierająca antygenów, do których biorca wytworzył przeciwciała, należy w próbkach krwi przypadkowych dawców określić te antygeny i wybrać do próby zgodności tylko te, które ich nie zawierają. Czynności te wykonuje centrum.

Kontrola grup krwi układu ABO. Kontrolę tę przeprowadza się w sposób uproszczony oznaczając antygen A i B na krwinkach za pomocą odczynników monoklonalnych anty-A i anty-B.

Kontrola antygeny D. Kontrolę tę wykonuje się za pomocą monoklonalnego odczynnika anty-D.

W przypadku stwierdzenia niezgodności grupy krwi biorcy z danymi na skierowaniu należy:

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.

Jeżeli stwierdzono rozbieżność między wynikiem grupy krwi w próbce z segmentu drenu i danymi na etykiecie pojemnika należy:

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

7.1. WYKONANIE PRÓBY ZGODNOŚCI

1. Przygotować zaplanowaną liczbę próbek odpowiednio oznakowanych (nr biorcy, nr donacji, skrót nazwy testu).
2. Po odwirowaniu próbek krwi biorcy i dawców przenieść surowice i osocze do oddzielnych próbek.
3. Przemyć krwinki roztworem NaCl, a następnie roztworem LISS i sporządzić 3-4% zawiesiny w tym roztworze.
4. Surowicę biorcy zbadać z krwinkami dawców w teście PTA - LISS zgodnie z metodyką 5.2. i 5.4.2.2.

UWAGI

- A. Wykonanie próby zgodności metodami klasycznymi można zastąpić testami mikrokolumnowymi, które nie tylko ułatwiają wykrycie przeciwciał odpornościowych, lecz także eliminują znaczną część nieswoistych reakcji, zwłaszcza rulonizację.*
- 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 przypadkach wyjątkowo pilnego jej dobrania, wynik tego badania, wykonanego nie wcześniej 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 temperaturze 37°C).*

7.2. ODCZYTYWANIE I INTERPRETACJA WYNIKÓW PRÓBY ZGODNOŚCI

Wyniki odczytuje się makroskopowo. Próbę ocenia się jako zgodną, jeśli w żadnym z testów nie wystąpiła aglutynacja lub hemoliza. W przypadkach trudności w ocenie wyników, przenosi się zawiesiny na szkiełka podstawowe i odczytuje mikroskopowo. W ten sposób można odróżnić rulony krwinek od aglutynacji u chorych z zaburzeniami białek osocza. Rulonizacja występuje w teście LEN.

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 nie zawierającą 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 probówki w celu określenia swoistości alloprzeciwciał.

Wykrycie w surowicy biorcy alloprzeciwciał reagujących tylko z krwinkami wzorcowymi, a nie reagujących z krwinkami dawcy, nie upoważnia do wnioskowania, 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.

Jeżeli surowica biorcy reaguje z całym zestawem krwinek użytych do wykrywania alloprzeciwciał oraz z próbkami dobieranych krwinek w teście LEN i/lub w PTA należy badania uzupełnić autokontrolą; dodatni wynik wskazuje na obecność autoprzeciwciał; należy wówczas wykonać BTA u biorcy. Ujemny wynik autokontroli może świadczyć o obecności wieloswoistych przeciwciał albo przeciwciał do powszechnego antygeny.

U niektórych chorych, za słabo dodatnie reakcje surowicy biorcy ze wszystkimi krwinkami, może być odpowiedzialny komplement zaadsorbowany in vitro. Wówczas próbę zgodności należy powtórzyć w klasycznym PTA lub zastosować odczynnik antyglobulinowy anti-IgG.

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

1. Obecność u biorcy alloprzeciwciał do rzadko występującego antygeny obecnego u dawcy i nieobecnego w zestawie krwinek wzorcowych.
2. 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 ew. u dziecka w kierunku konfliktu serologicznego.*

Próbki krwi dawców i biorców (krew pełna i oddzielona surowica), należy zabezpieczyć po zakończonej próbie zgodności i przechowywać w lodówce w temp. 2-6°C przez 5 dni w celu umożliwienia badań serologicznych w razie wystąpienia powikłań poprzetoczeniowych.

7.3. FORMUŁOWANIE WYNIKÓW PRÓBY ZGODNOŚCI

Wynik próby zgodności wypisuje się na specjalnym formularzu (wzór nr 8). Po jego wypełnieniu dwie osoby kontrolują zgodność wszystkich danych z protokołem w książce oraz z etykietami na probówce 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:

- a) krew dawcy nr.....zgodna
b) krew dawcy nr.....niezgodna

c) 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 i dawcy oraz informacją o obecności lub nie wykryciu odpornościowych przeciwciał, jeżeli takie badania były jednocześnie wykonywane.

UWAGA

Jeżeli badania są wykonywane w czasie dyżuru w jednoosobowej obsadzie, to przed wydaniem wyniku powinien być on sprawdzony z protokołem badań oraz z dokumentacją na próbkach krwi i podpisany przez lekarza dyżurnego lub inną kompetentną osobę. Lekarz dyżurny nie jest zobowiązany do odczytywania wyników badań. Gdy nie ma możliwości sprawdzenia wyniku przez drugą osobę, osoba wykonująca badanie odpowiada również za sformułowanie wyniku.

7.4. DOBIERANIE KRWI DO PILNEJ TRANSFUZJI W NAGŁYCH PRZYPADKACH

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

1. Zarejestrować próbki krwi biorcy i dawców w książce prób zgodności.
2. Określić antygeny ABO i D za pomocą odczynników monoklonalnych 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 winna być odnotowana na zapotrzebowaniu na krew do pilnej transfuzji. Jeżeli pilna transfuzja dotyczy kobiet, to do okresu menopauzy należy wydać KKCz grupy O Rh- (minus). Po wydaniu pojemników z krwią należy natychmiast przystąpić do badań podanych powyżej.

7.5. BADANIA WYKONYWANE PRZED PRZETOCZENIEM KRWI U NOWORODKÓW I NIEMOWLĄT DO 4-EGO MIESIĄCA ŻYCIA

U dzieci poniżej 4-ego miesiąca życia przed przetoczeniem krwi należy:

1. Określić grupę krwi w układzie ABO i antygen D z układu Rh u matki i 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, wydaje się do przetoczenia krew zgodną w układzie ABO i antygenie D z krwinkami dziecka bez próby zgodności pod warunkiem sprawdzenia grupy ABO i antygenu D we krwi przeznaczonej do przetoczenia. Wyniki tych badań należy dokumentować w książce prób zgodności. Te zasady można stosować nawet przy wielokrotnych transfuzjach.

Jeżeli u matki wykryto odpornościowe przeciwciała, należy dziecku dobierać krew bez odpowiadającego im antygenu i przed każdym przetoczeniem wykonywać próbę zgodności z surowicą matki. W takich przypadkach należy pobrać od matki ok. 10 ml krwi, 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 nakazuje określić ich swoistość i przeprowadzanie prób zgodności przed każdą transfuzją.

Dzieciom grupy A lub B urodzonych przez matki grupy 0 należy przetaczać krwinki grupy O. W tych przypadkach krew grupy jednoimiennej z dzieckiem można przetaczać po przeprowadzeniu badań surowicy matki, które wykażą nieobecność przeciwciał anty-A lub anty-B klasy IgG lub po wykonaniu próby zgodności z surowicą dziecka za pomocą PTA.

7.6. BADANIA WYKONYWANE PRZED AUTOTRANSFUZJĄ

U chorych przed pobraniem krwi należy wykonać:

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

Przed autotransfuzją należy wykonać:

1. Kontrolę grupy ABO z próbki krwi pobranej z segmentu drenu i skonfrontować ją z wynikiem grupy krwi chorego.
2. 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 nie zawierające 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 Załączniku do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia

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 badań krwi dawcy zawartej w pojemnikach należy sprawdzić czy zostały pobrane z nich próbki do badań bakteriologicznych.

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

1. Sprawdzić grupę układu ABO i Rh w próbkach krwi biorcy pobranej przed i po przetoczeniu oraz krwi dawców z pojemników i krwi z segmentów drenów, która pozostała 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. mikrotest kolumnowy); w badaniach należy posługiwać się poza krwinkami przetoczonymi, wzorcowymi krwinkami zawierającymi antygeny w podwójnej dawce.

UWAGI.

- A. W przypadkach, w których BTA jest dodatni, a 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 skierowanym przeciwko antygenom występującym tylko na krwinkach płytkowych lub na granulocytach.*

8.2. ODCZYN OPÓŹNIONY

U osób uczulonych poprzednimi przetaczaniami krwi lub ciążami może dojść do wystąpienia opóźnionego odczynu hemolitycznego, który najczęściej występuje między 3 a 21 dniem po transfuzji serologicznie zgodnej krwi. 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:

1. Bezpośredni test antyglobulinowy; uzyskanie dodatniego wyniku nakazuje ustalenie swoistości przeciwciał w eluacie.
2. Poszukiwanie i ustalenie swoistości alloprzeciwciał w surowicy.

UWAGA

Jeżeli od ostatniego przetoczenia upłynęło więcej niż 3 dni wskazane jest rozdzielenie krwinek chorego od przetoczonych i wykonanie badań populacji krwinek dawcy (metoda 6.7.).

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 NOWORODKA (ChHN)

Badania immunohematologiczne należy rozpocząć wcześnie w okresie prenatalnym, ażeby wyodrębnić ciążę z ryzykiem ChHN do wewnątrzmacicznej diagnostyki, umożliwiającą rozpoczęcie leczenia oraz rozwiązanie ciąży w optymalnym dla dziecka czasie. Zakres badań przedstawia rycina 2.

9.1. BADANIA W CZASIE CIĄŻY

Podstawowe badania diagnostyczne wykonują wyznaczone pracownie serologii transfuzjologicznej, do których kobiety ciężarne zarówno Rh dodatnie, jak i Rh ujemne są kierowane przez ginekologa dwukrotnie w czasie ciąży:

1. W okresie do 12 tygodnia ciąży.
2. W 28 tygodniu ciąży.

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

1. Wynik grupy krwi ABO i Rh
2. Informację o wykrytych przeciwciałach następującej treści: „W surowicy wykryto alloprzeciwciała reagujące z krwinkami.... w testach Konieczna kontrola w pracowni diagnostyki konfliktu serologicznego, adres.....”

Zakres badań w pracowniach specjalistycznych

1. Ustalenie swoistości przeciwciał.
2. Miano przeciwciał
3. Badania krwi ojca dziecka.

Uzyskane wyniki pozwalają ocenić ryzyko wystąpienia ChHN.

W czasie ciąży nie bada się przeciwciał odpornościowych z układu ABO, ponieważ diagnostyczna wartość wyników tych badań jest bardzo niska. Matczyne przeciwciała 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 przeciwciał z układu Rh oraz z innych układów grupowych

1. Do wykrywania przeciwciał polecane są dwa testy: PTA-LISS i LEN.
2. W miarę możliwości wskazane jest stosowanie testów o wyższej czułości, jak test polibrenowy, testy kolumnowe, PEG.
3. W badaniach stosuje się taki sam zestaw krwinek wzorcowych, jak przy wykrywaniu przeciwciał u biorców krwi (6.5.).
4. Jeżeli wyniki grup krwi ABO na to pozwalają, dołącza się do badań krwinki ojca.

UWAGI

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

9.1.2. Identyfikacja alloprzeciwciał

Określenie swoistości przeciwciał, wykrytych w surowicy matki jest konieczne dla:

1. Oceny klinicznego znaczenia przeciwciał w patogenezie ChHN.
2. Przeprowadzenia odpowiednich badań krwi ojca dziecka, pozwalających niejednokrotnie przewidzieć obecność lub brak na krwinkach płodu 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 Rozdziale 7.6.

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 nie posiadających 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 ChHN, należy określić ich miano w PTA-NaCl.

1. W pierwszej próbce, w której zostały wykryte.
2. W próbkach pobieranych w miesięcznych odstępach czasu.
3. Od 24 tygodnia ciąży w próbkach pobieranych nawet w dwutygodniowych odstępach czasu, w zależności od dynamiki wzrostu poziomu przeciwciał.

Pozostałą surowicę z badanej próbki należy przechowywać zamrożoną do następnego badania. Kolejne badania wykonuje się równolegle w surowicy ze świeżo pobranej próbki oraz z próbki z poprzedniego badania za pomocą krwinek heterozygoty - tego samego dawcy lub innego o takim samym fenotypie. Takie postępowanie umożliwia właściwą ocenę narastania poziomu przeciwciał u matki.

Interpretacja wyników badań

1. Miano przeciwciał anti-D z układu Rh powyżej 16 w PTA świadczy o ich wysokim poziomie i jest jednym ze wskazań, oprócz wywiadu położniczego i wyników badań USG, do wewnątrzmacicznej diagnostyki.
2. Dla przeciwciał o innej swoistości, graniczna wartość miana nie jest ustalona.

UWAGA

W ustaleniu wskazania do wewnątrzmacicznej diagnostyki pomocna jest ocena reaktywności przeciwciał w surowicy matki w testach czynnościowych, głównie w teście chemiluminescencji, którego wykonanie należy zlecić Zakładowi Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT w Warszawie. Wyniki tych testów mogą ograniczyć konieczność wykonania kordocentez.

9.1.4. Badania krwi ojca dziecka

1. Określenie grupy krwi ABO i Rh.
2. Jeżeli u matki wykryto tylko przeciwciała anti-RhD, a ojciec jest Rh ujemny, nie prowadzić dalszych badań, ponieważ dziecko musi być też Rh ujemne.
3. Jeżeli ojciec jest Rh dodatni, określić jego fenotyp Rh za pomocą dodatkowych odczynników: anti-C, anti-c, anti-E i anti-e. Ustalić prawdopodobny genotyp (Tab. 5) i w sposób następujący sformułować wynik: np. „Rh+ (DCCee). Prawdopodobny genotyp DCE/DCe”. Obecnie istnieje możliwość określenia genotypu ojca i genu D płodu metodami biologii molekularnej. Badania te wykonywane są w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie.
4. Jeżeli u matki wykryto przeciwciała z układu Rh, np. anti-c, anti-C^w, anti-E lub przeciwciała z innych układów grupowych, np. 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 konfliktowego antygeny na krwinkach płodu.

5. UWAGA

Badania wymienione w punkcie 3 i 4 można zastąpić/ uzupełnić określeniem genotypu (przekazanie materiału do badań patrz str.).

9.1.5. Serologiczne badania krwinek płodu

W ciąży z wysokim ryzykiem ChHN stosuje się nakłucie naczyń pępowiny (kordocenteza) w celu bezpośredniej oceny nasilenia choroby hemolitycznej płodu. Zakres badań immunohemolitycznych jest następujący:

1. Oznaczenie grupy krwi układu ABO i antygeny D z układu Rh. W przypadku stwierdzenia u płodu identycznej grupy krwi ABO i Rh 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 można oznaczyć metodą nieinwazyjną, bo w osoczu matki, a geny odpowiedzialne za dziedziczenie przez płód innych antygenów bada się w płynie owodniowym lub w kosmkach łożyskowych.

W celu wykonania wymienionych badań materiał należy przesłać do Zakładu Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHiT w Warszawie.

Wykonywanie badań molekularnych pozwala na znaczne ograniczenie potrzeby wykonywania kordocentezy.

9.2. BADANIA PO PORODZIE

10.2.1. Krew matki

Kobiety przyjęte do oddziału położniczego powinny posiadać wyniki badań grup krwi ABO i Rh oraz przeciwciał odpornościowych. Jeżeli badania te nie były wykonywane podczas ciąży należy je bezzwłocznie przeprowadzić. Wykrycie alloprzeciwciał odpornościowych u matki zasygnalizuje możliwość choroby hemolitycznej u dziecka. Należy wówczas przekazać próbkę krwi matki do pracowni konsultacyjnej centrum w celu:

1. Potwierdzenia i identyfikacji przeciwciał.
2. Określenia ich znaczenia w immunopatologii ciąży.
3. Dobrania krwi do ewentualnego przetoczenia matce lub dziecku.

UWAGA.

U dziecka urodzonego przez matkę, posiadającą przeciwciała odpornościowe należy natychmiast wykonać badania z zakresu diagnostyki ChHN.

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 w temp. 2-6° C przez 3-5 dni do ewentualnego wykorzystania, gdy przeprowadzenie badań immunohematologicznych okaże się konieczne.

UWAGI.

A. *Badanie grup krwi i BTA wykonuje się u wszystkich noworodków urodzonych przez kobiety Rh- (kwalifikacja do podania Gamma anti-D); jeżeli matce podano podczas ciąży immunoglobulinę anti-RhD, BTA u noworodka nie wykonuje się.*

B. *U pozostałych noworodków, urodzonych przez matki Rh + nie uodpornione antygenami krwinek czerwonych nie wykonuje się serologicznych badań krwi.*

9.2.3. Diagnostyka ChHN

Badania diagnostyczne przeprowadza się w każdym przypadku wykrycia u matki przeciwciał odpornościowych podczas ciąży lub w okresie okołoporodowym. Z próbki krwi pępowinowej wykonuje się:

1. Określenie grupy krwi ABO i Rh.
2. Określenie antygenów z innych układów grupowych, odpowiednio do swoistości alloprzeciwciał matki.
3. Bezpośredni test antyglobulinowy (BTA).
4. W niektórych przypadkach, a mianowicie gdy u dziecka stwierdza się dodatni BTA, a u matki nie wykrywa się przeciwciał w badaniu przeglądowym, lub wykrywa się przeciwciała wieloswoiste wskazane jest wykonanie elucji przeciwciał z krwinek noworodka

U noworodków oznaczenie grup krwi układu ABO (6.2.) i antygeny D z układu Rh przeprowadza się wyłącznie za pomocą odczynników monoklonalnych metodą probówkową. Gdy krwinki noworodka są mocno opłaszczane przeciwciałami IgG zastosowanie ludzkich surowic anti-D może prowadzić do błędnej interpretacji wyników. Podobne problemy występują również podczas określania innych antygenów ludzkimi surowicami. W takich przypadkach, gdy brak jest odpowiednich odczynników monoklonalnych (np. anti-Fy^a, anti-s) należy przed wykonaniem badania usunąć przeciwciała z krwinek czerwonych, np. za pomocą kwaśnej glicyny i EDTA (5.10.2.).

Określenie swoistości przeciwciał związanych z krwinkami wymaga zastosowania metod elucji, szczególnie, gdy u matki występują przeciwciała o kilku swoistościach.

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

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

UWAGI

A. Diagnostykę w kierunku ChHN należy przeprowadzić także w każdym przypadku jeżeli u noworodka wystąpią nieoczekiwane kliniczne objawy choroby hemolitycznej (patologiczna żółtaczka, niedokrwistość). Nieoczekiwana ChHN 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 ChHN mogą być odpowiedzialne przeciwciała z układu ABO (konflikt ABO) lub przeciwciała do rzadko występującego antygeny.

9.2.4. Diagnostyka ChHN w konflikcie ABO

1. Poszukiwanie przeciwciał IgG anti-A/anti-B w surowicy matki, po termicznej inaktywacji przeciwciał naturalnych IgM:
 - a/ rozcieńczyć surowicę równą objętością roztworu NaCl,
 - b/ po dokładnym wymieszaniu umieścić w łaźni wodnej o temp. 70°C na 20 minut,
 - c/ po oziębieniu do temperatury pokojowej, wykonać PTA z krwinkami dziecka oraz dawcy o zgodnej z dzieckiem grupie krwi ABO.

Interpretacja wyników:

- Wystąpienie aglutynacji z krwinkami dawcy świadczy o obecności przeciwciał odpornościowych u matki.

- Aglutynacja krwinek dziecka świadczy o dojrzałości antygeny ABO do immunologicznej reakcji.
- Nie wykrycie przeciwciał IgG u matki bezpośrednio po porodzie nie wyklucza ChHN, ponieważ w okresie okołoporodowym może nastąpić spadek ich stężenia do ilości niewykrywanych w rutynowo stosowanych testach serologicznych. Wstępne rozpoznanie ChHN 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.

2. Badania u noworodka :

a/ określenie grupy krwi ABO i Rh,

b/ wykonanie BTA

c/ jeżeli została zachowana krew pępowinowa, wykonanie badań przeciwciał w surowicy (bez inaktywacji) oraz w eluacie z krwinek czerwonych,

UWAGA

A. Wyniki badań krwi pępowinowej lepiej potwierdzają kliniczne rozpoznanie ChHN niż badania krwi matki.

B. Zaleca się metodę elucji przeciwciał wg Landsteinera lub podaną niżej metodę Lui.

9.2.4.1. Elucja przeciwciał metodą Lui

1. Przemycić krwinki sześć razy roztworem NaCl, pozostawiając nadsącz z ostatniego przemycia (kontrola eluatu).
2. W probówkach umieścić po 0,5 ml przemitych 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 w temperaturze -20°C do -70°C na 10 minut.
6. Po ich wyjęciu szybko rozmrozić krwinki pod strumieniem gorącej wody i wirować przez 2 minuty z przyspieszeniem 1000xg.
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 ChHN 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 anti- C^w z układu Rh (częstość antygeny C^w - 2%), anti- Kp^a z układu Kell (1%), anti- 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 absorpcję za pomocą krwinek przypadkowego dawcy odpowiedniej grupy krwi. Można też posłużyć się eluatem z krwinek noworodka,

badając go bezpośrednio 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 ChHN można więc prowadzić w ciągu kilku następnych 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 anti-k i anti- Kp^b z układu Kell, anti- Di^b z układu Diego, anti- Co^a z układu Colton lub anti-Lan. Częstość występowania antygenów, do których są one skierowane przekracza 99% w populacji. W badaniach immunohematologicznych 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 takich przypadkach należy rozważyć pobieranie krwi od ciężarnej w celu zabezpieczenia matki i dziecka w zgodną krew. Diagnostyka rozpoczęta dopiero po porodzie może uniemożliwić konieczne leczenie krwią zarówno matki jak i dziecka.

9.3. ZASADY DOBIERANIA KRWI DO PRZETOCZENIA WYMIENNEGO I WEWNĄTRZMACICZNEGO

Szczegóły dotyczące preparatyki są zawarte w Rozdziale „Preparatyka krwi i jej składników”

1. W konflikcie Rh, dotyczącym antygeny D podaje się wyłącznie krew Rh-. Grupa krwi ABO powinna być zgodna z krwią dziecka. Wyjątek stanowią noworodki grupy A lub B matek grupy 0, dla których bezpieczniej jest przygotować krew „uniwersalną” dla układu ABO (krwinki 0 Rh- w osoczu zgodnym z grupą krwi dziecka lub w osoczu grupy AB). Krew jednoimienną w tym układzie grupowym można podawać tylko wtedy, jeżeli w surowicy matki (lub w surowicy krwi pępowinowej) nie stwierdza się obecności przeciwciał IgG anti-A lub / i anti-B w badaniu w PTA
2. Do transfuzji wewnątrzmacicznych w konflikcie Rh (przeciwciała anti-D) należy przygotować ubogoleukocytarny KKCz grupy 0 Rh- K-,. Konieczne jest napromienianie krwi w celu zapobiegania powikłań GvHD. Można przetaczać krwinki jednoimienne w układzie ABO, jeżeli znana jest grupa krwi płodu i próba zgodności została wykonana z surowicą matki.
3. Do transfuzji wymiennej w konflikcie ABO podaje się krew „uniwersalną” (KU ABO) dla tego układu grupowego. Jest to koncentrat krwinek czerwonych o Rh zgodnym z krwią dziecka, przygotowany z krwi dawcy grupy 0, z niskim mianem przeciwciał anti-A lub anti-B w zależności od grupy krwi dziecka. Miano aglutynin nie może przekraczać 32. Zamiast oznaczenia miana można wykonać PTA, badając osocze rozcieńczone 1:50 wobec krwinek A₁ lub B. Dodatni wynik testu eliminuje KU ABO.
Do przetoczenia, koncentrat krwinek grupy 0 uzupełnia się osoczem grupy AB lub zgodnym grupowo z krwią dziecka.
4. W konflikcie serologicznym w zakresie innych antygenów, krew do przetoczenia, oprócz zgodności w układzie ABO i Rh, nie może zawierać antygeny odpowiedzialnego za uodpornienie matki. Wybiera się ją za pomocą odpowiednich odczynników diagnostycznych.
5. Dla zapewnienia wysokiej aktywności biologicznej krwinek i maksymalnego czasu ich przeżycia, okres od pobrania krwi do transfuzji wymiennej i dopłodowej nie powinien przekraczać 5 dni.
6. W okresie pierwszych 4 miesięcy życia, do następnych przetoczeń stosuje się krew tej samej grupy krwi ABO i Rh jak do pierwszej transfuzji. Krew w małych objętościach (transfuzje uzupełniające) stosuje się w okresie jej przydatności (35 dni).

9.3.1. Próba serologicznej zgodności

Wykonuje się ją zgodnie z metodyką podaną w Rozdziale....., przestrzegając dodatkowo następujących zasad:

1. Jako surowicę biorcy należy stosować surowicę matki. Jeżeli dziecko uodpornionej matki przenoszone jest do innego szpitala, razem z nim należy przekazać 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).
2. Gdy przeciwciała układu ABO matki nie pozwalają na dobieranie krwi zgodnej grupowo z krwią dziecka, należy dobierać krwinki grupy 0.

3. Wykonując próbę zgodności z koncentratem krwinek czerwonych, zawieszonych w osoczu innej grupy krwi ABO, należy pamiętać aby w badaniach kontrolnych dawcy sprawdzić poza krwinkami również i osocze za pomocą krwinek wzorcowych 0, A_I i B.
4. Jeżeli surowica matki jest nieosiągalna, należy użyć surowicę noworodka, a w przypadku dodatniego BTA, również eluat z jego krwinek.

9.4. PROFILAKTYKA KONFLIKTU Rh

Polega ona na podaniu kobietom Rh ujemnym przeciwciał anti-RhD w celu zahamowania pierwotnej odpowiedzi immunologicznej na antygen D Rh dodatniego płodu. Postępowanie to dotyczy również kobiet z odmianą antygenu D kategorii D^{VI}. Przeciwciała anti-D stosowane są w postaci czystej frakcji immunoglobuliny G, wyizolowanej z osocza osób uodpornionych, głównie dawców krwi poddanych zamierzonej immunizacji. Polski preparat immunoglobuliny anti-RhD nosi nazwę Gamma anti-D i produkowany jest w dawkach 150 i 50 mikrogramów. Podaje się go domięśniowo w czasie nie przekraczającym 72 godzin:

1. Po urodzeniu dziecka Rh +:

150 mikrogramów, jeżeli poród był fizjologiczny

300 mikrogramów, jeżeli poród był patologiczny (np. cięcie cesarskie, ręczne wydobycie łożyska, poród martwego płodu) lub bliźniaczy.

W przypadku podejrzenia dużego krwawienia płodowo - matczyne, np. znaczna niedokrwistość noworodka bezpośrednio po urodzeniu, należy ocenić objętość krwi płodowej w krążeniu matki metodą Kleihauera - Betke lub cytometrii przepływowej. Po jej ustaleniu należy obliczyć dawkę immunoglobuliny anti-RhD. Zakłada się, że na każde 15 ml krwi płodu potrzeba 150 mikrogramów immunoglobuliny, czyli zawartość jednej ampułki Gamma anti-D 150. Liczbę ampulek ustala się dzieląc wykrytą objętość krwi płodu przez 15.

2. Po poronieniu samoistnym lub przerwaniu ciąży, amniopunkcji diagnostycznej, usunięciu ciąży pozamacicznej, urazu brzucha oraz w przypadku zagrażającego porodu przedwczesnego z krwawieniem z dróg rodnych:

50 mikrogramów do 12 tygodnia ciąży

150 mikrogramów po 12 tygodniu ciąży

Przed podaniem immunoglobuliny po porodzie należy wykonać następujące badania kwalifikacyjne:

1. W krwi matki badania przeciwciał anti-D za pomocą PTA – LISS.

2. W krwi pępowinowej oznaczenie antygenu D z układu Rh oraz bezpośredni test antyglobulinowy.

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

Przed podaniem immunoglobuliny podczas ciąży (300µg przeciwciał w 28 tygodniu ciąży) wykonuje się badanie przeciwciał anti-D za pomocą PTA - LISS. Do podania immunoglobuliny kwalifikuje się kobietę Rh ujemną, u której nie wykryto przeciwciał anti-D i której partner jest Rh dodatni.

UWAGI

- A. Kobieta, która w czasie ciąży otrzymała immunoglobulinę anti-RhD, powinna otrzymać powtórnie odpowiednią dawkę preparatu po urodzeniu Rh dodatniego dziecka. Przed podaniem immunoglobuliny nie wykonuje się u matki badania przeciwciał anti-D, ponieważ mogą być one obecne, jako biernie nabyte. Z tych samych przyczyn nie wykonuje się BTA u noworodka.*
- B. Informacja o rozpoczętej profilaktyce w czasie ciąży powinna być zamieszczona w dokumentacji pacjentki i przekazana pracowni serologii transfuzjologicznej.*
- C. Rozpowszechnienie badania genu D płodu w osoczu matki może w przyszłości znacznie*

ograniczyć zużycie immunoglobuliny anti-D podawanej w profilaktyce ciąży (ciężarne, których płód jest D minus nie będą potrzebowały podania immunoglobuliny).

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

Odczynniki

1. Bufor McIlvaine'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 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ rozcieńczyć wodą destylowaną do 1 l, przechowywać w lodówce w temp. 2-6° C.

b) Roztwór macierzysty B - 0,2 mol/L fosforan sodowy

71,63 g $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ rozcieńczyć wodą destylowaną do 1 l, przechowywać w lodówce w temp. 2-6° C.

2. Barwniki

a) 0,5 % wodny roztwór erytrozyny B

b) Kwaśna hematoksylina (Harrisa)

3. 80% alkohol etylowy.

Kontrola dodatnia - mieszanina krwi osoby dorosłej (10 części) i krwi pępowinowej (jedna część).

Kontrola ujemna - krew osoby dorosłej.

Wykonanie badania

1. Przygotować cienkie rozmazy krwi.

2. Wysuszyć przez 10 min w powietrzu.

3. Utrwalić rozmazy 80 % alkoholem etylowym przez 5 min.

4. Przemyć wodą destylowaną.

5. Doprowadzić bufor Mc Ilvaine'a do temperatury 37°C i zanurzyć szkiełka z rozmazami na 5 minut.

6. Przemyć wodą destylowaną.

7. Zanurzyć szkiełka z rozmazami w hematoksylinie na 5 min.

8. Przemyć dokładnie przez minutę bieżącą wodą.

9. Zanurzyć szkiełka z rozmazami w erytrozynie na 5 min.

10. Przemyć bieżącą wodą.

11. Policzyc pod mikroskopem 2000 krwinek czerwonych i odnotować liczbę krwinek płodowych.

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

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 - matczyne w ml pełnej krwi = procent krwinek płodowych x 50.

10. BADANIA WYKONYWANE W NIEDOKRWISTOŚCI AUTOIMMUNOHEMOLITYCZNEJ (NAIH)

10.1. NAIH Z AUTOPRZECIWCIAŁAMI TYPU CIEPŁEGO

Do badań należy pobrać ok. 5 ml krwi do suchej probówki oraz 4 ml krwi na EDTA- Na_2 .

Wykonuje się następujące badania:

1. Bezpośredni test antyglobulinowy (BTA) z odczynnikami poliwalentnym.
2. BTA z odczynnikami monoswoistymi jeśli z odczynnikami poliwalentnym uzyskano wynik dodatni.
3. Wykonanie eluatu z krwinek chorego zgodnie z metodami na str. i badanie jego aktywności z zestawem krwinek wzorcowych.
4. Badania surowicy z zestawem krwinek wzorcowych i z krwinkami autologicznymi.
5. W przypadku uzyskania wyników dodatnich, przeprowadzenie adsorpcji autoprzeciwciał z surowicy zgodnie z metodami 5.9.2.
6. Wykrywanie alloprzeciwciał w surowicy po adsorpcji autoprzeciwciał.
7. Określenie fenotypu Rh i w miarę potrzeby innych antygenów krwinek czerwonych stosując odczynniki monoklonalne; jeśli posługuje się ludzkim surowicami diagnostycznymi, należy najpierw usunąć z krwinek autoprzeciwciała (metoda 5.10.).
8. Dobranie do przetoczenia krwi zgodnej fenotypowo w układzie Rh i antygenie K.
9. 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 temp. 37°C i natychmiast przeniesiona do termostatu o tej samej temperaturze. Po wykrzepieniu krwi należy oddzielić surowicę a krwinki przenieść 3 razy roztworem NaCl o temperaturze 37°C. Wykonuje się następujące badania:

1. Określenie grupy krwi ABO i antygeny D za pomocą odczynników monoklonalnych
2. Wykonanie BTA.
3. Określenie amplitudy cieplnej zimnych autoprzeciwciał (aglutynin).

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

Autoprzeciwciała typu zimnego, wykrywane podczas oznaczania grup krwi układu ABO, mają najczęściej swoistość z układu Ii. 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. Występują również u osób z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego oraz z chorobą zimnych aglutynin. Autoprzeciwciała anti-I o znaczeniu patologicznym wiążą komplement, mają wysokie miano i szeroką amplitudę cieplną. Dla potwierdzenia ich obecności, badania przeprowadza się równolegle w trzech temperaturach: 20°C, 30°C i 37°C.

Postępowanie

1. Przygotować 3% zawiesiny 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 surowicy badanej.
4. W trzeciej i w czwartej probówce każdego rzędu, umieścić po jednej kropli surowicy badanej i po jednej kropli 30% 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 probówki surowicy w każdym rzędzie, dodać po kropli 3% zawiesiny krwinek autologicznych, natomiast do drugiej i czwartej po kropli 3% zawiesiny krwinek wzorcowych grupy O.

7. Po zmieszaniu, zawartość probówek inkubować przez 2 godziny w odpowiednich temperaturach.
8. Odczytywać wyniki makroskopowo, delikatnie wstrząsając każdą probówką i protokołować nasilenie aglutynacji.
9. Ustalić amplitudę cieplną reakcji przeciwciał na podstawie wyników badań w poszczególnych temperaturach.

Jako klinicznie ważne uznaje się autoprzeciwciała reagujące w zakresie temperatur 30°C - 37°C. W tych przypadkach dobiera się do przetoczenia krwi zgodną fenotypowo w układzie Rh oraz pod względem antygenu 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 autoprzeciwciała mają charakter patologiczny wskazane jest wykonanie następującego badania:

1. Przygotować dwa szeregi rozcieńczeń badanej surowicy w roztworze NaCl.
2. Do pierwszego szeregu dodać taką samą objętość 3 – 4% krwinek jednoimiennych zawieszonych w roztworze NaCl, a do drugiego krwinek grupy O.
3. 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)

NZH 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 antygenu 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).

Przygotowanie materiału

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

Wykonanie badania

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

Interpretacja wyników

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

UWAGA

Wobec często występującego obniżenia aktywności komplementu w surowicy chorego z NZH hemoliza w próbówce z dodatkiem świeżej surowicy dawcy może być znacznie bardziej nasilona niż w próbówce 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 klinicznie ważnych antygenów z uwzględnieniem antygenów M, N, P₁.
2. Wykonać badanie przeglądowe przeciwciał przeciw krwinkom czerwonym, a w przypadku ich wykrycia, określić ich swoistość.
3. Uzyskać dokładne dane od lekarza prowadzącego dotyczące leczenia krwią w przeszłości, a u kobiet także informacje o przebytych ciążach.
4. Przed przeszczepieniem dobierać krew zgodną w fenotypie Rh i antygenie K.
5. Jeżeli biorca i dawca przeszczepu różnią się w antygenie D, tzn. biorca Rh dodatni, dawca Rh ujemny albo biorca Rh ujemny, dawca Rh dodatni, we wczesnym okresie po przeszczepieniu dobierać krew Rh ujemną.

Postępowanie w przypadkach niezgodności w układzie ABO między biorcą i dawcą

Rozróżnia się dużą i małą niezgodność w układzie ABO (Tab. 8)

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, określa się miano przeciwciał z układu ABO odpowiedzialnych za dużą niezgodność.

1. W roztworze NaCl w temperaturze pokojowej.
2. W PTA po zniszczeniu przeciwciał IgM za pomocą 2ME.

UWAGA

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

W 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. Częstotliwość tych badań określa lekarz prowadzący. Przetaczane osocze i KKP są zgodne w ABO z dawcą.

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 technikami omówionymi 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 wówczas, gdy na krwinkach nie stwierdza się antygenów biorcy.

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

Jednoczesna duża i mała niezgodność w układzie ABO . Występuje ona wówczas, gdy u biorcy są przeciwciała skierowane do antygeny na krwinkach dawcy, a u dawcy przeciwciała do antygeny na krwinkach biorcy. W tych przypadkach przed wykonaniem przeszczepu zaleca się wykonanie wszystkich badań omówionych przy dużej i małej niezgodności. Do przetoczeń dobiera się 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).

Odczyn hemolityczny 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.

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 przeciwciała układu ABO. Należy wówczas wykonać następujące badania:

1. Wykonanie BTA.
2. 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.

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 (ang. passenger lymphocytes) dawcy, które powodują lizę krwinek biorcy. Badania te obejmują:

1. Poszukiwanie przeciwciał układu ABO w surowicy.
2. Wykonanie BTA oraz poszukiwanie przeciwciał układu ABO w eluacie z krwinek.

Pierwsze badanie kontrolne powinno być wykonane 5 -ego dnia po przeszczepieniu. Badania należy powtarzać przez kilka tygodni co kilka dni.. Dodatnie wyniki mogą wyprzedzać kliniczne objawy hemolizy. Wówczas należy 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 innych niż ABO układów grupowych. Są one produkowane albo przez przetrwałe limfocyty B biorcy, albo przez przeniesione z przeszczepem limfocyty dawcy.

Wyniki badań fenotypowych biorcy i dawcy przed przeszczepieniem mogą ułatwić ich identyfikację. W takich przypadkach należy dobierać KKCz, który nie zawiera antygenu odpowiadającego wykrytym przeciwciałom.

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 w Rozdziale 11.

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.

Wykrywanie chimeryzmu

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 różniących się w antygenach i wykrywanych w reakcji z odpowiednią surowicą diagnostyczną w postaci aglutynatów na tle jednorodnej zawiesiny świadczy o częściowym chimeryzmie. Chimeryzm najłatwiej badać w przypadkach niezgodności w układzie ABO. Jeżeli natomiast chory otrzymuje zgodny przeszczep w tym układzie, ustalenie chimeryzmu w okresie leczenia krwią jest trudne. Często wiarygodne dane uzyskuje się dopiero po 5 miesiącach od przeszczepienia. O wyborze antygenów do badania chimeryzmu decydują wyniki badań fenotypowych u biorcy i dawcy przed dokonaniem przeszczepu.

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:

1. Oznaczenie grupy krwi układu ABO.
2. Oznaczenie antygenu D z układu Rh.
3. Badanie przeglądowe w kierunku obecności przeciwciał odpornościowych.
4. 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 pełnią tylko osoby, które odbyły szkolenie w centrum i posiadają zaświadczenia wydane przez dyrektora RCKiK,

uprawnijące do wpisywania wyników do dokumentów tożsamości (Wzór nr 10). RCKiK prowadzi rejestr osób uprawnionych.

Wpisu grup krwi można dokonać:

1. Na podstawie dwóch wyników z pracowni, w której dokonuje się wpisu (obowiązuje wpisanie dwóch numerów i dat badań).
2. 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 jednej próbki krwi, w której zostały one wykryte.

UWAGI

A. 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.

B. 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 nr 11) wszystkie dane zgodnie z wyszczególnionymi rubrykami.
2. Na określonej stronie dokumentu umieścić stempel o ustalonych wymiarach wg Wzoru 12.
3. W rubryce „Grupa krwi” umieścić odpowiedniej wielkości stempel, np. O Rh+(plus), lub O Rh+ (dodatni) AB Rh- (minus), lub AB Rh- (ujemny)
4. W rubryce „Uwagi” wpisać swoistość przeciwciał odpornościowych, w przypadku ich wykrycia.
5. W następnej rubryce wpisać dwa numery badań, łamane przez daty ich wykonania np. 148/02.07. 2001
395/19.03. 2003
6. Z lewej strony ostatniej rubryki podać nr wpisu z księgi ewidencyjnej, natomiast z prawej strony tej rubryki, osoba odpowiedzialna za wpis, umieszcza swoją wąską i czytelną pieczętkę oraz podpis.

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 szczegółowy 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 w dokumencie.

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.

12. 2. Karty identyfikatory grup krwi

W nowych dowodach osobistych nie ma miejsca na wpisanie grup krwi. W związku z tym zostały opracowane wzory kart identyfikatorów grup krwi (Wzór nr 13).

Informacje zawarte w karcie:

- awers karty zawiera dane osobowe (imiona, nazwisko, data i miejsce urodzenia, PESEL, imiona rodziców);
- na rewersie karty prostokątna pieczęć o przepisowych wymiarach zgodnie z podanym wzorem trwałej dokumentacji z poziomymi rubrykami.

Karta wielkości nowego dowodu osobistego powinna być usztywniona i zafoliowana lub z tworzywa sztucznego z możliwością dokonywania niezmywalnych wpisów.

Karty grupy krwi mogą wydawać tylko pracowni i osoby upoważnione przez dyrektora centrum w porozumieniu z kierownikiem działu immunologii transfuzjologicznej na podstawie przedstawionego i zatwierdzonego wzoru (wzór 10).

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 pracowni oraz osoby odpowiedzialnej za prawidłowość dokonanego wpisu, a także złożony przez nią podpis.

UWAGI

- A. Osoby upoważnione mogą wydawać karty identyfikatory grup krwi na podstawie prawidłowo dokonanych wpisów w anulowanych dowodach osobistych*
- B. Rozpowszechniane nielegalne karty, nie odpowiadające powyższym kryteriom 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 są odpowiednio dokumentowane i protokolowane.

13.1. KONTROLA ODCZYNNIKÓW DIAGNOSTYCZNYCH DO BADAŃ GRUP KRWI

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

Pracownia prowadzi książkę badań odczynników diagnostycznych, która zawiera dokumentację i protokoły badań oraz ostateczną ocenę odczynnika. Każda seria odczynnika diagnostycznego podlega następującej ocenie:

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

UWAGA

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: zawiesina krwinek według zaleceń producenta; aglutynacja pojawia się po 10 sekundach i osiąga nasilenie 3+ do 4+ po 3 minutach.

Minimalne miano: Odczynniki monoklonalne anty-A

Krwinki wzorcowe A₁ A₂

Test szkiełkowy 64 32

Test probówkowy 128 64

Odczynniki monoklonalne anty-B

Krwinki wzorcowe B A₂B

Test szkiełkowy 64 32

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** analogiczne do badań odczynników dla układu ABO.

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

Odczynniki monoklonalne IgM

Test szkiełkowy 64

Test probówkowy 128

UWAGA

Miano bada się 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 odczynniki anty-D.

Miano: nie niższe niż 16 w testach szkiełkowym i probówkowym

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

Odczynniki winny 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 nie zawierającą 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.

Postępowanie po dokonaniu oceny firmowych odczynników diagnostycznych

1. Odczynniki każdej sprawdzonej serii, pochodzące z importu, należy zaopatrzyć w przepisy użycia w języku polskim.
2. Jeżeli w trakcie stosowania odczynnika w terminie nie przekraczającym jego ważności, zgłoszone zostaną jakieś zastrzeżenia, należy odczynnik ponownie skontrolować i ewentualnie złożyć 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 6,6–7,6. Jeśli pH nie mieści się w tych granicach, należy doprowadzić do odpowiedniej wartości za pomocą buforu fosforanowego.

13.2.2. Roztwór LISS

Optymalne pH 6,7. Dopuszczalne granice 6,5 – 7,0. Jeśli pH nie mieści się w tych granicach, należy doprowadzić do odpowiedniej wartości za pomocą HCl lub NaOH.

13.2.3. Odczynnik papainowy

Reaktywność: a) dodanie odczynnika nie powoduje aglutynacji ani hemolizy zawiesiny krwinek w roztworze NaCl;
b) dodanie odczynnika nie powoduje aglutynacji ani hemolizy zawiesiny krwinek w roztworze NaCl do której dodano równą objętość surowicy nie zawierającej przeciwciał;
c) dodanie odczynnika do zawiesiny krwinek w roztworze NaCl do której dodano równą objętość Standardu anti-D powoduje ich aglutynację.

13.3. KONTROLA SEROLOGICZNA POBRANEJ KRWI

Kontrolę tę przeprowadza się albo bezpośrednio po pobraniu krwi albo w późniejszym czasie (np. krew pobierana na ekipach wyjazdowych). 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 anti-A, anti-B i anti-D. Zaleca się następującą kolejność czynności:

1. Do książki kontroli serologicznej przepisać numer donacji z etykiety pojemnika pobranej krwi. Zaleca się wklejanie etykiet samoprzylepnych z numerem donacji.
2. Napisać w górnej części płyty symbole odczynników (anti-A, anti-B, anti-D), a z lewej strony numer donacji.
3. Umieścić na płycie po kropli odpowiednich odczynników, zgodnie z wypisanymi ich symbolami.
4. Przenieść z drenu na płytę po kropli badanej krwi.
5. Po zmieszaniu reagentów i upływie trzech minut odczytać wyniki i zaprotokołować je w książce.
6. Porównać uzyskany wynik grupy krwi z treścią etykiety głównej pojemnika, jeżeli badana krew pochodzi od dawcy wielokrotnego.
7. Po sprawdzeniu zgodności wyników oraz całej dokumentacji, nakleić na pojemnik z krwią i na wszystkie puste pojemniki satelitarne, wypełnione etykiety kontroli serologicznej (wzór Nr 14), z podpisem lub numerem kodowym osoby kontrolującej.

Wszystkie segmenty drenu oznakować numerem donacji oraz wynikiem grupy krwi ABO i Rh zgodnie z etykietą główną.

UWAGI

- A. Jeżeli protokolowanie badania i uzyskane wyniki są bezpośrednio rejestrowane w komputerze można nie prowadzić książki kontroli serologicznej.*
- B. Etykieta główna dawcy pierwszorazowego 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.*

13.4. KONTROLA OSOCZA ORAZ INNYCH SKŁADNIKÓW KRWI POBIERANYCH METODĄ AFEREZY

Osocze pobierane metodą plazmaferezy ręcznej lub automatycznej, oraz koncentraty krwinek płytkowych podlegają kontroli z krwinkami wzorcowymi O, A₁, B. Koncentrat granulocytarny powinien być sprawdzany z odczynnikami anti-A, anti-B i anti-D, ponieważ

zawiera znaczną domieszkę krwinek czerwonych. Badanie wykonywane na płycie, jest identyczne z badaniem przeciwciał anty-A i anty-B w surowicy przy określaniu grup krwi ABO. 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.

13.5. KONTROLA JAKOŚCI BADAŃ Z ZAKRESU IMMUNOLOGII TRANSFUZJOLOGICZNEJ

Rozróżnia się kontrolę wewnętrzną, dotyczącą pracowników centrum i zewnętrzną, obejmującą pracowników laboratoriów szpitalnych i innych wykonujących badania z zakresu serologii transfuzjologicznej.

Celem kontroli jest ocena prawidłowości i dokładności pracy każdej osoby upoważnionej do wykonywania badań w pracowni serologicznej oraz podczas dyżurów szpitalnych na terenie całego regionu. Powinna być ona prowadzona przynajmniej raz w roku, a w miarę potrzeby częściej.

Sposób przeprowadzenia kontroli:

1. Jako materiał kontrolny, przygotować odpowiednie objętości osocza lub surowic ze słabo reagującymi przeciwciałami (o mianie 4 lub niższym).
2. Jedną z próbek kontrolnych powinna być surowica lub osocze nie zawierające przeciwciał.
3. Poszczególne odczynniki kontrolne rozlać do ampulek (ok. 2 ml) oznaczonych numerami kodowymi i przechowywać w temperaturze -20°C.
4. Przeprowadzić ostateczną kontrolę serologiczną próbek z udziałem całego personelu działu immunologii transfuzjologicznej (standaryzacja materiału kontrolnego i wewnętrzna ocena pracowników)
5. Do wysyłanych próbek kontrolnych dołączyć formularze z protokołami badań oraz pismo przewodnie z dokładną instrukcją postępowania i dokumentacji wyników oraz terminem przekazania ich do centrum.

UWAGI.

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

Zadania dla osób kontrolowanych:

1. 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.
2. Wykonanie miana przeciwciał w odpowiednich testach.
3. Dokładne protokolowanie przez osobę kontrolowaną wykonanych badań z uwzględnieniem nasilenia aglutynacji (od +sł do 4+).

Protokół badania powinien zawierać następujące dane:

- a/ imię i nazwisko osoby kontrolowanej,
- b/ datę badania,
- c/ datę otrzymania próbki kontrolnej,
- d/ numer kodowy próbki,
- e/ numery krwinek stosowanych do badań oraz serii odczynników,
- f/ informację o zatrudnieniu (praca w systemie ciągłym w pracowni serologii transfuzjologicznej; w systemie zmianowym; wyłącznie na dyżurach) wraz z datą wydania zaświadczenia przez centrum dopuszczającego do wykonywania badań.

Po otrzymaniu wszystkich protokołów badań należy dokonać analizy wyników oraz sporządzić zestawienie z imienną oceną każdego pracownika. Na tej podstawie regionalne centrum decyduje o konieczności dodatkowego przeszkolenia niektórych pracowników.

14. ZASADY UODPARNIANIA KRWIODAWCÓW

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

14.1. WYTYCZNE W SPRAWIE ORZECZEŃ LEKARSKICH O DOPUSZCZALNOŚCI DO UODPNIENIA W CELU UZYSKANIA LECZNICZYCH PRODUKTÓW KRWIOPOCHODNYCH

Powyższe wytyczne zawarte są w Rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia.....Dz. U...

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

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

14.2. ZASADY POBIERANIA I KWALIFIKOWANIA KRWI SŁUŻĄCEJ DO UODPARNIANIA

1. Zabiegi uodparniania i pobieranie próbek krwi powinny być wykonywane w oddzielnym pomieszczeniu, w którym musi znajdować się zestaw do reanimacji.
2. Krwiodawcy w trakcie uodparniania krwinkami czerwonymi nie mogą oddawać krwi do celów leczniczych.
3. Z chwilą pojawienia się w ich surowicy przeciwciał odpornościowych, należy ten fakt odnotować w zaświadczeniu (Wzór nr 15).
4. Osocze od dawcy uodpornionego pobiera się w dziale pobrań krwi.

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 oraz DNA HIV, RNA HIV oraz materiału genetycznego parwowirusa B19. Jeśli nie ma możliwości wykonania tych badań, należy przesłać próbkę krwi do Pracowni Biologii Molekularnej IHiT.

1. Pobrana krew do uodparniania podlega 4-miesięcznej karencji w stanie zamrożenia.
2. Pod koniec okresu karencji należy skontrolować u dawcy znaczniki zakażeń wirusowych testami immunoenzymatycznymi oraz metodami biologii molekularnej.
3. Przechowywanie i rozmrażanie krwi według metodyki w Rozdziale...

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 preparatów Gamma anty-D. Dotychczas nie udało się uzyskać monoklonalnych przeciwciał anty-D, które można byłoby zastosować w profilaktyce konfliktu Rh.

1. Uodparnia się wybranych dawców Rh- (dccee) niezależnie od ich grupy układu ABO.
2. 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 Rh dodatnie o innym fenotypie.

3. 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.
4. Podawanie krwinek odbywa się powoli poprzez ich dożylną wstrzyknięcie.
5. Po każdym zabiegu dawca musi pozostawać w centrum pod obserwacją personelu pielęgniarskiego w ciągu około jednej godziny.
6. 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 regionalnych centrów krwiodawstwa i krwiolecznictwa.

14.3.1.1. Wywołanie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej

Schemat 1

- a/ pierwsza dawka - 5 ml krwinek,
 - b/ po upływie jednego miesiąca kontrola przeciwciał,
 - c/ po 3 miesiącach od wstrzyknięcia kontrola przeciwciał i przy ich braku: druga dawka - 2 ml krwinek.
 - d/ po miesiącu kontrola przeciwciał i przy ich braku trzy dawki po 2 ml krwinek w odstępach 2-tygodniowych, kontrolując przeciwciała przed każdym wstrzyknięciem,
 - e/ 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.

- a/ pierwsza dawka - 5 ml krwinek
- b/ po miesiącu kontrola przeciwciał i przy ich braku druga dawka - 2 ml krwinek,
- c/ po miesiącu kontrola przeciwciał i przy ich braku trzecia dawka - 2 ml krwinek,
- d/ po miesiącu kontrola przeciwciał
- g/ po 3 miesiącach kontrola przeciwciał i przy ich braku rezygnacja z dalszego uodparniania (patrz Schemat 1).

Schemat 3.

- a/ pierwsza dawka - 5 ml krwinek,
- b/ po 2 tygodniach druga dawka - 2 ml krwinek,
- c/ po 2 tygodniach kontrola przeciwciał i przy ich braku trzecia dawka - 2 ml krwinek,
- d/ po 2 tygodniach kontrola przeciwciał i przy ich braku czwarta dawka - 2 ml krwinek,
- e/ kontrola przeciwciał po 2 i 4 tygodniach oraz po 3 miesiącach od ostatniego wstrzyknięcia.

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

Schemat 4.

- a/ pierwsza dawka - 10 ml krwinek,
- b/ po 2 tygodniach kontrola przeciwciał i przy ich braku druga dawka - 5 ml krwinek,
- c/ po 2 tygodniach kontrola przeciwciał i przy ich braku trzecia dawka - 2 ml krwinek,
- d/ 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, uodparnianie według schematu ustalonego dla krwinek świeżych nie spełnia zamierzonych oczekiwań w wywołaniu pierwotnej odpowiedzi immunologicznej przy zastosowaniu krwinek przechowywanych w zamrożeniu.*
- 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, polegających na skróceniu przerw między poszczególnymi dawkami lub zwiększeniu początkowych dawek.*
- D. Uodparnianie dawców ochotników powinno się rozpoczynać w możliwie dużej ich grupie, ze względu na prawdopodobieństwo uzyskania zamierzonego efektu w 50 do 60%.*

14.3.1.2. Stymulacja wtórnej odpowiedzi immunologicznej

Jeżeli w którymkolwiek badaniu kontrolnym, w trakcie pierwszego cyklu uodparniania, zostanie ujawniona obecność przeciwciał anti-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 uodpornionych osób jest następujące:

1. Pobierane osocze należy systematycznie kontrolować (półilościowe badanie przeciwciał w mianie).
2. Przydatność osocza do produkcji preparatu Gamma anti-D ocenia się na podstawie miana przeciwciał anti-D w teście antyglobulinowym, wykonanym metodą probówkową. Nie powinno być ono niższe niż 256.
3. Gdy miano przeciwciał ulega obniżeniu stosuje się dalszą stymulację dawkami 1 ml krwinek; odstępy pomiędzy wstrzyknięciami powinny wynosić nie mniej niż 3 miesiące.

UWAGA

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 dawców uodparnianych

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

1. Dane personalne.
2. Oświadczenie podpisane przez dawcę.
3. Kwalifikację lekarską dawcy do uodparniania.
4. Protokoły wstępnych badań serologicznych, kwalifikujących dawcę do uodparniania odpowiednimi krwinkami.
5. Wyniki kontrolnych badań w kierunku zakażeń wirusowych.
6. Protokoły zabiegów z datą, rodzajem, ilością wstrzykniętej krwi (imię i nazwisko osoby od której pochodzi).
7. Uwagi na temat samopoczucia dawcy po zabiegach.
8. Protokoły kontrolnych badań serologicznych i terminy dalszych wstrzyknięć krwi.

Odpowiednie adnotacje dotyczące uodparniania muszą też być zamieszczone w głównej kartotece krwiodawcy - data rozpoczęcia uodparniania, data zakwalifikowania do plazmaferezy, data rezygnacji z dalszego uodparniania, obowiązujący okres badań kontrolnych.

14.4. ZAMIERZONE UODPARNIENIE W CELU PRODUKCJI IMMUNOGLOBULINY ANTY-HBs

U stałych krwiodawców raz w roku należy wykonać badanie przeciwciał anti-HBs za pomocą testu immunoenzymatycznego. Nie należy ich powtarzać u tych osób, u których nie wykryto przeciwciał anti-HBs. Poszukiwanie przeciwciał należy wykonać w surowicy rozcieńczonej 1:100 płodową surowicą bydlęcą. Jeżeli w rozcieńczonej surowicy absorbancja przekroczy 2000, osocze dawcy nadaje się do produkcji immunoglobuliny. Natomiast jeśli jest ona poniżej 2000 dawca kwalifikuje się do domięśniowego podania jednej dawki przypominającej szczepionki HBs.

Poziom przeciwciał u szczepionego dawcy należy skontrolować po upływie miesiąca. Jeżeli absorbancja w surowicy rozcieńczonej 1:100 przekracza 2000 osocze nadaje się do produkcji immunoglobuliny anti-HBs. Jeśli wartość absorbancji jest niższa, badanie należy powtórzyć po 2 miesiącach od szczepienia. Jeśli po tym czasie stwierdzi się, że poziom przeciwciał jest zbyt niski można podać drugą dawkę szczepionki albo zrezygnować z przeznaczenia osocza tego dawcy do produkcji immunoglobuliny anti-HBs.

U dawców zakwalifikowanych do oddawania osocza metodą plazmaferezy należy co 2 - 3 miesiące sprawdzać poziom przeciwciał anti-HBs. W przypadku spadku absorbancji poniżej 2000 można ponowić szczepienie.

Wzór 1

(pieczęć placówki kierującej)

Do
Pracowni Konsultacyjnej
..... Centrum
Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
w

Proszę o wykonanie badania.....

Nazwisko i imię chorego.....

Data urodzenia lub PESEL.....

Rozpoznanie.....

Wywiad (cięża- daty, przetoczenia krwi – daty)

Wyniki badań serologicznych: Grupa krwi.....BTA.....

Przeciwciała odpornościowe.....

Wynik próby zgodności.....

Inne.....

Dane hematologiczne: Krwinki czerwoneHb.....Ht.....

Bilirubina.....Inne.....

.....

.....
(czytelny podpis i pieczęć osoby kierującej)

..... **Centrum**
Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
w.....
Pracownia Konsultacyjna

Data otrzymania próbki.....
Data wykonania badania.....
Nr badania.....

Do
(pieczęć placówki kierującej)

WYNIKI BADAŃ

Nazwisko i imię chorego.....

Data urodzenia lub PESEL

.....
.....
.....

.....
(pieczęć i podpis Kierownika Pracowni)

Oddział/Klinika
(pieczęć)

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

.....
czytelny podpis lekarza kierującego

KSIĄŻKA BADAŃ GRUP KRWI

(dla chorych i kobiet w ciąży)

Strona 1

L.p.	Data	Nazwisko i imię data urodzenia lubPESEL	Oddział	Wynik badania			Uwagi
				Grupa krwi		Nieregularne przeciwciała	
				ABO	Rh		

strona 2

[illegible]

(pieczęć Pracowni)

Data.....

Nr bad.....

Oddział.....

WYNIK
badania grupy krwi

Nazwisko i imię.....

Data urodzenia lub PESEL

Grupa krwi.....

Przeciwciała odpornościowe.....

Uwagi.....

.....

Wykonał:

.....

(czytelny podpis)

Sprawdził:

(pieczęć i podpis)

PROTOKÓŁ BADAŃ KONTROLNYCH ZESTAWU WZORCOWEGO

Data.....

Swoistość odczynnika	Seria (klon)	Reakcje z krwinkami:						K+	K-
		O	A ₁	B	Rh+	Rh-			
anty-A									
anty-B									
anty-D									
anty-K									
Standard anty-D									

KRWINKI WZORCOWE DO BADAŃ PRZECIWCIAŁ

Data (oddo.....)

Nr (donacja)	Fenotyp
I	
II	
III	

* Można wklejać wydruki przesłane przez producenta krwinek wzorcowych

(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, ciążę
(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 pojemnika

.....

.....

pracownika banku krwi

Podpis

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 (podpis i pieczętka)

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.....

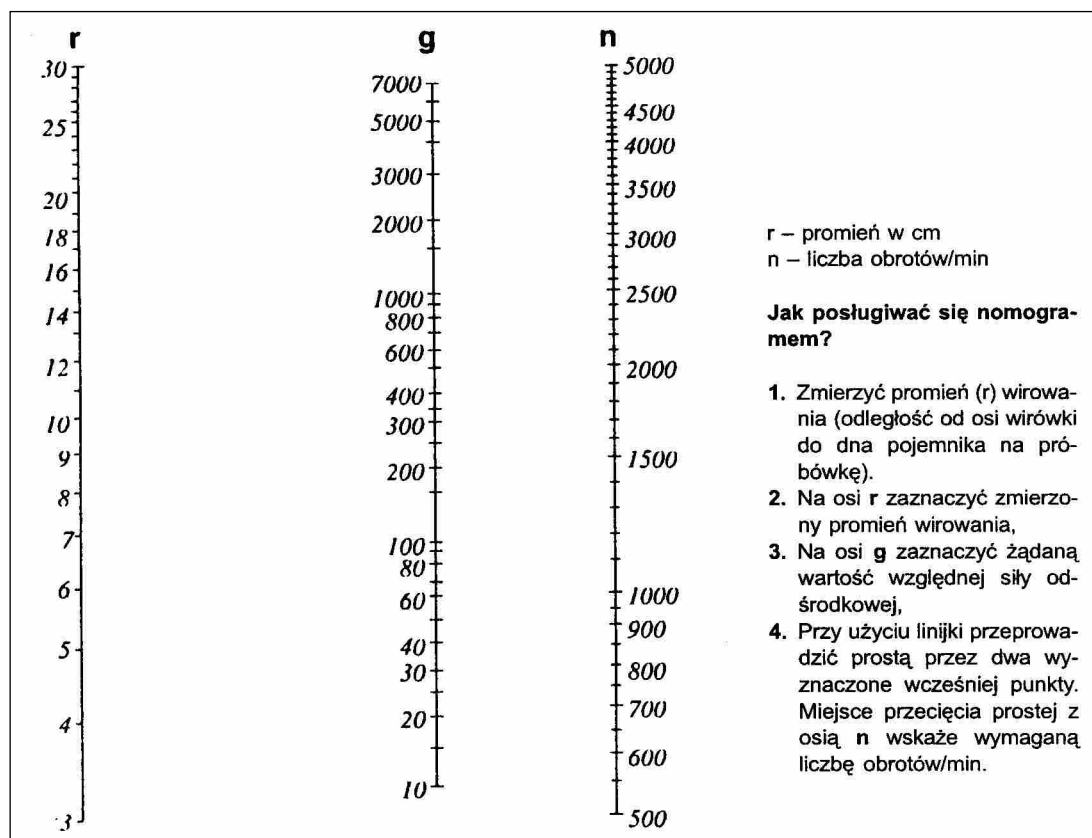
data urodzenia (PESEL).....

grupa krwi (ABO i Rh) chorego.....

.....
Pieczęć i czytelny podpis lekarza

Rycina 1

Normogram do obliczania względnej siły odśrodkowej (g)



Rycina 2

Przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych Transfuzje składników krwi w niezgodności ABO

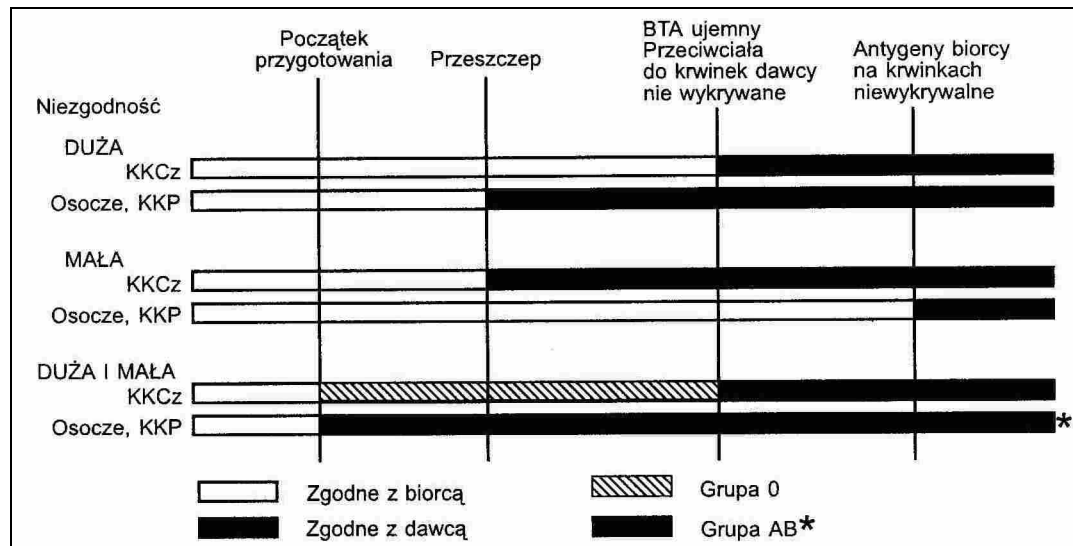


Tabela 1.
Ocena wydzielania substancji grupowej A

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

Tabela 2.
Schemat wyników oznaczeń grup krwi układu ABO

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
<i>Nr 4</i>	+	+	-	-	-	<i>AB</i>

Tabela 3.

Zestawienie najbardziej typowych reakcji rzadkich odmian antygenów układu 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	aglut. miesz.	0	aglut. miesz.	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	aglut. miesz.	aglut. miesz.	4+	4+	4+	0	0	Bi H	
B _m	0	0	0 / ±	4+	4+	3+	0	0	Bi H	
B _x	0	0 / ±	0 / 2+	4+	4+	3+	0	0	H	
B _{część.}	0	±	±	+ sł	3+	2+	±	0	Bi 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

Tabela 4. Różnicowanie przyczyn poliglutynacji

Odsłonięcie antygenów	Czynnik działający	Reakcja krwinek z lektyną					Polibren
		Arachis hypogea	Dolichos biflorus	Helix pomatia	Salvia sclarea	Salvia horminum	
T	neuraminidaza	+	-	-	-	-	brak agregacji
T _k	endo-galaktozydaza	+	-	-	-	-	agregacja
T _n	nie znany	-	+	+	+	+	brak agregacji
VA	α-fukozydaz	-	-	+	+	+	agregacja
Cad	genetycznie uwarunkowany	-	-	+	-	-	agregacja
HEMPAS	genetycznie uwarunkowany	-	-	+	-	-	brak agregacji
NOR	genetycznie uwarunkowany	-	-	-	-	-	agregacja

Tabela 5.

Częściej spotykane fenotypy osób Rh⁺ i ich najbardziej prawdopodobne genotypy

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

Tabela 6

Przykład zestawu krwinek wzorcowych do wykrywania nieregularnych alloprzeciwciał

<i>Rh</i>	<i>Rh</i>						<i>Kell</i>		MNSs				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^wee	+	+	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	+	0
<i>DccEE</i>	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+
ddccee	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+

Tabela 7

Przykład zestawu krwinek wzorcowych do identyfikacji alloprzeciwciał

Rh	Rh						<i>Kell</i>		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
<i>DCCee</i>	+	+	0	0	+	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+
DCC^wee	+	+	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	+	+

Tabela 8

Niezgodność w układzie ABO między biorcą i dawcą macierzystych komórek hemopoetycznych

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