

PROTOKOL K EVROPSKÉ DOHODĚ

o výměně činidel pro stanovení krevních skupin

OBECNÁ USTANOVENÍ

1. Specifita

Činidlo pro stanovení krevních skupin¹ musí reagovat se všemi vyšetřovanými vzorky krve, které obsahují antigen odpovídající protilátce nebo jiným látkám uvedeným na etiketě.

Pokud se při použití činidla postupuje způsobem, který doporučuje výrobce, nesmí se objevit žádný z těchto faktorů nebo jevů:

- a) známky hemolýzy;
- b) protilátky nebo jiné látky kromě těch, které jsou uvedeny na etiketě;
- c) bakteriální produkty, které mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní reakce;
- d) pseudoaglutinace vytvářením *rouleaux*;
- e) fenomén prozóny.

2. Účinnost

Titr se měří postupným dvojnásobným zředěním zkoumaného činidla ve vhodném médiu. Do každého zředěného roztoku se přidá stejné množství suspenze červených krvinek. Titr je reciproká hodnota čísla, které představuje největší zředění séra, v němž lze pozorovat viditelnou reakci. Při výpočtu zředění se do celkového objemu nezapočítává objem suspenze krvinek.

V případě anti-A, anti-B a dalších činidel určených k použití na podložních sklíčkách se avidita vyjadřuje jako čas nutný k aglutinaci na sklíčku.

3. Mezinárodní normy a mezinárodní jednotky

¹ V okamžiku schválení této verze protokolu a jeho příloh zástupci smluvních stran vzali na vědomí, že pokud je v anglickém znění dohody uveden výraz „blood incompatibilities“ (inkompatibilita krve), rozumí se tím rovněž „blood grouping incompatibilities“ (inkompatibilita krevních skupin). Bylo též dohodnuto, že výraz „blood-grouping“ s pomlčkou v anglickém znění dohody a protokolu by měl být považován za „blood grouping“ bez pomlčky.

Světová zdravotnická organizace vytvořila mezinárodní normy pro činidla krevních skupin anti-A, anti-B a neúplný anti-D a připravuje normy pro činidla krevních skupin jiných specifit. Mezinárodní standardní preparát obsahuje podle definice určitý počet mezinárodních jednotek v miligramu nebo mililitru a tato definice nezávisí na titrech pozorovaných u jednotlivých preparátů červených krvinek².

4. **Stabilita a doba použitelnosti**

Při skladování za podmínek doporučených výrobcem by si všechna činidla měla uchovat požadované vlastnosti nejméně po dobu jednoho roku.

Doba použitelnosti činidel v kapalně formě uvedená na etiketě nesmí být delší než jeden rok od data poslední uspokojivé kontroly účinnosti. Prováděním opakovaných kontrol účinnosti lze dobu použitelnosti prodlužovat vždy o jeden rok.

Doba použitelnosti sušených činidel uvedená na etiketě závisí na výsledku zkoušky stability a musí ji schválit vnitrostátní kontrolní orgány.

5. **Uchování**

² Účinnost činidel pro stanovení krevních skupin většiny specifit se vyjadřuje jako aglutinační titer pozorovaný v sérii zředění na suspenzi červených krvinek. Titr udává zředění činidla použitého v poslední směsi, v níž dochází k mikroskopicky viditelné aglutinaci.

Účinnost činidel pro stanovení krevních skupin, pro které existují mezinárodní standardní preparáty (v současné době anti-A, anti-B a neúplný anti-D) lze vyjádřit v mezinárodních jednotkách (viz Bull. Wld. Hlth. Org. 1954, 10, 937, 941-1950, 3, 301) na základě srovnání titrace neznámého činidla s mezinárodním standardním preparátem nebo vnitrostátním podstandardem.

Mezinárodní standardní preparáty sér krevních skupin se distribují v ampulích obsahujících sušené lidské sérum. Po rekonstituci na objem 1 ml, séra anti-A a anti-B obsahují podle definice 256 mezinárodních jednotek v 1 ml. Tato séra poskytuje bezplatně Mezinárodní laboratoř biologických standardů Světové zdravotnické organizace, Statens Seruminstitut, Kodaň.

V následující tabulce je uveden příklad srovnávací titrace mezinárodního standardu séra anti-A (S) a „neznámého“ činidla anti-A (U) s červenými krvinkami A₁ a červenými krvinkami A₂B.

	Sérum S	Činidlo U	Sérum S	Činidlo U
Krvinky A ₁	1:512	1:128	256	64
Krvinky A ₂ B	1:32	1:16	256	128
	Titry (pozorovan é)	Titry (pozorovan é)	Jednotky (podle definice)	Jednotky (podle srovnání)

Činidla pro stanovení krevních skupin se mohou uchovávat v kapalném nebo sušeném stavu. Sušená činidla se musí uchovávat v atmosféře inertního plynu nebo ve vakuu ve skleněné nádobě uzavřené tak, aby se zabránilo pronikání vlhkosti. Při následném sušení za přítomnosti oxidu fosforečného a při tlaku nejvýše 0,02 mm sloupce rtuti po dobu 24 hodin nesmí sušené činidlo ztratit více než 0,5 % své hmotnosti.

Činidla se musí připravovat v aseptických podmínkách a nesmí být kontaminována bakteriemi. S cílem zabránit růstu bakterií může příslušný vnitrostátní orgán rozhodnout o tom, že do činidla (nebo do rozpouštědla, které se dodává se sušenými činidly) se přidá antiseptikum a/nebo antibiotikum, a to pod podmínkou, že za přítomnosti této přidané látky bude činidlo nadále splňovat požadavky na specifitu a účinnost.

Séra lidského původu pro stanovení krevních skupin musí obsahovat nejméně 2,5 mg proteinového dusíku v 1 ml kapalného nebo rekonstituovaného séra.

Kapalná nebo rekonstituovaná činidla musí být průhledná a nesmí obsahovat žádný sediment, gel, ani žádné viditelné částice.

6. **Zbarvení**

Je vhodné, aby činidla pro stanovení krevních skupin určená pro mezinárodní výměnu nebyla uměle barvena, nejméně do doby, než bude uzavřena mezinárodní dohoda zavádějící jednotný systém. Žádná přidaná barvicí látka nesmí ovlivnit specifické reakce.

7. **Distribuce a objem**

Činidla pro stanovení krevních skupin musí být distribuována takovým způsobem a v takových objemech, aby obsah činidla v jedné nádobce stačil jak na zkoušky s pozitivními a negativními kontrolními krvinkami, tak na zkoušky s neznámými krvinkami. Objem nádoby musí být takový, aby její obsah mohl být případně použit na provedení příslušných zkoušek účinnosti, které jsou popsány v tomto protokolu.

8. **Záznamy a vzorky**

Výrobní laboratoř musí pořizovat písemné záznamy o všech fázích výroby a kontroly činidel pro stanovení krevních skupin. Laboratoř musí rovněž uchovávat odpovídající vzorky všech distribuovaných činidel, dokud nebude možné se oprávněně domnívat, že příslušná šarže se již nepoužívá.

9. **Klasifikace činidel**

Činidla používaná pro stanovení krevních skupin mohou obsahovat látky lidského, živočišného, rostlinného (nebo minerálního) původu, z nichž některé jsou účinnou látkou a jiné pomocnými látkami nezbytnými pro zvýšení účinnosti nebo udržení stability činidla.

Z technických důvodů byla tato činidla rozdělena do tří kategorií podle původu jejich účinné látky. To neznamená, že činidla lidského původu obsahují pouze látky lidského původu nebo že činidla živočišného nebo rostlinného původu nemohou obsahovat látky lidského původu.

10. **Etikety, příbalové letáky a osvědčení**

Každá nádobka obsahující konečný produkt musí být opatřena bílou etiketou s černě vytištěným textem v angličtině a francouzštině, v němž jsou uvedeny tyto údaje:

1. jméno a adresa výrobního zařízení;
2. název činidla tak, jak je uveden v záhlaví příslušné specifikace;
3. název a množství případně použitého antiseptika a/nebo antibiotika, nebo konstatování, že do produktu nebyly tyto látky přidány;
4. objem kapaliny, a u sušeného činidla objem a složení kapaliny nutné pro jeho rekonstituci;
5. doba použitelnosti;
6. číslo šarže.

Na této etiketě, na etiketě kartónu obsahujícího několik balení konečného produktu nebo na příbalovém letáku, který se dodává s těmito baleními, musí být kromě toho uvedeny tyto údaje:

1. jméno a adresa výrobního zařízení;
2. název činidla tak, jak je uveden v záhlaví příslušné specifikace;
3. objem kapaliny, nebo u sušeného činidla objem a složení kapaliny nutné pro jeho rekonstituci;
4. datum poslední kontroly účinnosti;
5. případná doba použitelnosti;
6. číslo šarže;
7. příslušný popis způsobu použití doporučený výrobcem;
8. podmínky skladování dosud neotevřených ampulí a preventivní opatření, která je třeba učinit po jejich otevření;
9. přesné složení, včetně případného antiseptika a/nebo antibiotika;
10. konstatování, že produkt obsahuje nebo neobsahuje materiál lidského původu.

Ke každé zásilce musí být přiloženo osvědčení uvedené v článku 4 dohody a přílohy k tomuto protokolu. Vzory etiket a příbalových letáků jsou uvedeny v příloze tohoto protokolu.

ZVLÁŠTNÍ USTANOVENÍ

A. ČINIDLA LIDSKÉHO PŮVODU PRO STANOVENÍ KREVNÍCH SKUPIN

a) SÉRA LIDSKÉHO PŮVODU PRO STANOVENÍ KREVNÍ SKUPINY AB₀

i) **(Lidské) sérum anti-A pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-A pochází z krve vybraných osob skupiny B, které byly nebo nebyly imunizovány červenými krvinkami skupiny A nebo specifickými látkami skupiny A. Sérum anti-A aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigeny A, tj. červené krvinky krevních skupin A a AB, včetně podskupin A₁, A₂, A₁B a A₂B, a nepůsobí na lidské červené krvinky neobsahující antigeny A, tj. krvinky skupin 0 a B.

Účinnost

Titrace

Sérum anti-A se titruje odděleně v suspenzích krvinek skupin A₁, A₂ a A₂B, souběžně s rekonstituovaným, avšak nezředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo rovnocenným referenčním preparátem. Účinnost séra nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na ml.

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-A se stejným objemem suspenze krvinek A₁, A₂ a A₂B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace každé suspenze začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace v případě, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním standardem rovnocenné avidity.

ii) **(Lidské) sérum anti-B pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-B pochází z krve vybraných osob skupiny A, které byly nebo nebyly imunizovány červenými krvinkami skupiny B nebo specifickými látkami skupiny B. Sérum anti-B aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigeny B, tj. červené krvinky krevních

skupin B a AB, a nepůsobí na lidské červené krvinky neobsahující antigeny B, tj. krvinky skupin 0 a A.

Účinnost

Titrace

Sérum anti-B se titruje odděleně v suspenzích krvinek skupiny B souběžně s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo rovnocenným referenčním preparátem. Účinnost séra nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na ml.

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-B se stejným objemem suspenze krvinek B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace v případě, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo se standardním přípravkem rovnocenné avidity.

iii) **(Lidské) sérum anti-A + anti-B (skupina 0) pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-A + anti-B (skupina 0) pochází z krve vybraných osob skupiny 0, které byly nebo nebyly imunizovány červenými krvinkami skupiny A nebo skupiny B nebo specifickými látkami skupiny A a skupiny B. Sérum anti-A + anti-B (skupina 0) aglutinuje lidské červené krvinky obsahující aglutinogeny A nebo B nebo aglutinogeny A a B, tj. červené krvinky skupiny A, včetně podskupin A₁ a A₂, skupiny B a skupiny AB, včetně podskupin A₁B a A₂B, a nepůsobí na lidské červené krvinky, které neobsahují aglutinogeny A nebo B, tj. krvinky skupiny 0. Uvedené sérum aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigen A_x (A_y nebo A₀), které obvykle nejsou aglutinovány sérem anti-A pocházejícím od dárců skupiny B.

Účinnost

Titrace

Sérum anti-A + anti-B (skupina 0) se titruje odděleně v suspenzích krvinek skupin A₁ a A₂, souběžně s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo rovnocenným referenčním preparátem. Sérum anti-A + anti-B (skupina 0) se rovněž titruje v suspenzi krvinek skupiny B, souběžně s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo rovnocenným referenčním preparátem.

Účinnost séra nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na ml.

V neředěném séru anti-A + anti-B (skupina 0) pro stanovení krevní skupiny musí rovněž docházet ke zjevné aglutinaci červených krvinek skupiny A_x (A_y nebo A_0)

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-A + anti-B (skupina 0) se stejným objemem suspenze krvinek skupiny A_1 a A_2 o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace každé suspenze začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace v případě, když se provádí stejná zkouška s rekonstituovaným, avšak neředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním standardem rovnocenné avidity. Poté, co se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-A + anti-B (skupina 0) se stejným objemem suspenze krvinek skupiny B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace v případě, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním preparátem rovnocenné avidity. Pokud se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-A + anti-B (skupina 0) se stejným objemem suspenze krvinek skupiny A_x (A_y nebo A_0) o objemovém podílu 0,05 – 0,1, aglutinace musí začít nejdéle po 5 minutách při teplotě mezi 18°C a 25°C.

b) SÉRA LIDSKÉHO PŮVODU PRO STANOVENÍ KREVNÍCH SKUPIN Rh

Séra pro stanovení krevních skupin Rh libovolné specifity mohou být dvojího druhu; tyto druhy se liší podmínkami, za kterých dochází k aglutinaci homologních červených krvinek. Některá séra nazývaná „kompletní“ aglutinují červené krvinky v solném roztoku. Jiná séra nazývaná „nekompletní“ jsou schopná vyvolat aglutinaci pouze za přítomnosti některých koloidů, jako je hovězí albumin, nebo pomocí jiných odpovídajících metod. Séra musí být používána za podmínek stanovených laboratoří, která je připravila.

Některá „nekompletní“ séra rovněž aglutinují na podložním sklíčku homologní červené krvinky v suspenzi v jejich vlastním séru nebo plazmě.

Následující požadavky týkající se účinnosti sér pro skupiny Rh mohou být přezkoumány, jakmile budou k dispozici mezinárodní standardní preparáty.

i) (Lidské) sérum anti-D (anti-Rh₀) pro stanovení krevní skupiny

Sérum anti-D pochází z krve od jedné nebo více osob, které byly imunizovány antigenem D systému Rh. Sérum reaguje se suspenzemi lidských červených krvinek obsahujícími antigen D, avšak

nereaguje se suspenzemi lidských červených krvinek, které antigen D neobsahují.

Účinnost

Titrace

Titr „kompletních“ sér anti-D nesmí být menší než 32 v suspenzi krvinek CcDee v solném prostředí (9 gramů NaCl na litr).

„Nekompletní“ séra anti-D se titrují v suspenzi krvinek CcDee souběžně s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem nekompletního séra anti-D (anti-Rh₀) nebo rovnocenným referenčním preparátem. Účinnost séra nesmí být v žádném případě nižší než 32 mezinárodních jednotek na mililitr. Séra musí reagovat se všemi krvinkami obsahujícími antigen D a kromě toho rovněž v největší možné míře s krvinkami obsahujícími antigen D^u.

Stanovení avidity

V sérech anti-D určených k použití při zkoušce na podložním sklíčku podle Diamonda a Abelsona by po smíchání se stejným objemem suspenze krvinek CcDee o objemovém podílu 0,4 – 0,5 na podložním sklíčku při teplotě asi 40°C mělo dojít k viditelné aglutinaci do 30 sekund a aglutinace by měla být dokončena do 120 sekund.

ii) **(Lidské) sérum anti-C (anti-Rh) pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-C pochází z krve jedné nebo více osob, které byly imunizovány aglutinogenem C systému Rh. Aglutinuje suspenze lidských červených krvinek obsahujících antigen C, avšak ne suspenze lidských červených krvinek, které antigen C neobsahují. Předpokládá se, že antigen C obsahuje antigen C^w.

Většina sér anti-C používaných k diagnostickým účelům obsahuje „kompletní“ protilátku anti-C, jakož i „nekompletní“ protilátku anti-D. Tato séra jsou tedy specifická pro antigen C pouze tehdy, jestliže vyšetřované červené krvinky jsou suspendovány v roztoku obsahujícím 9 g chloridu sodného v 1 litru.

Účinnost

Titrace

Titr sér anti-C („kompletních“ nebo „nekompletních“) nesmí být v suspenzi krvinek Ccdee menší než 8.

Stanovení avidity

V sérech anti-C, která jsou určena k použití při zkoušce na podložním sklíčku podle Diamonda a Abelsona a která nesmí obsahovat žádnou

formu anti-D, by po smíchání se stejným objemem suspenze krvinek Ccddee o objemovém podílu 0,4 –0,5 na podložním sklíčku při teplotě asi 40°C mělo dojít k viditelné aglutinaci do 30 sekund a aglutinace by měla být dokončena do 120 sekund.

iii) **(Lidské) sérum anti-E (anti-Rh^e) pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-E pochází z krve jedné nebo více osob, které byly imunizovány antigenem E systému Rh. Sérum reaguje se suspenzemi lidských červených krvinek obsahujících antigen E, avšak nikoliv s lidskými červenými krvinkami, které antigen E neobsahují.

Účinnost

Titrace

Titr sér anti-E („kompletních“ nebo „nekompletních“) nesmí být v suspenzi krvinek ccddEe menší než 8.

Stanovení avidity

V sérech anti-E, která jsou určena k použití při zkoušce na podložním sklíčku podle Diamonda a Abelsona a která nesmí obsahovat žádnou formu anti-D, by po smíchání se stejným objemem suspenze krvinek ccddEe o objemovém podílu 0,4 –0,5 na podložním sklíčku při teplotě asi 40°C mělo dojít k viditelné aglutinaci do 30 sekund a aglutinace by měla být dokončena do 120 sekund.

iv) **(Lidské) sérum anti-D + C (anti-Rh₀rh^c) pro stanovení krevní skupiny**

(Lidské) sérum anti-D + E (anti-Rh₀rh^e) pro stanovení krevní skupiny

Séra specifity anti-D+C nebo anti-D+E lze získat přímo z krve imunizovaných osob nebo je lze připravit smícháním séra anti-D se séry anti-C nebo anti-E. Pokud reakce probíhá za podmínek stanovených výrobcem, obě protilátky musí být v daném séru účinné současně. Každé sérum musí reagovat se všemi druhy červených krvinek, které by reagovaly s jednou z protilátek v nich obsažených, a nesmí reagovat s červenými krvinkami, které v případě séra anti-D+C neobsahují antigen C ani antigen D a v případě séra anti-D+E neobsahují antigen D ani antigen E. Příslušné titry by neměly být nižší než titry stanovené pro protilátky v nich obsažené, avšak v případě séra anti-D+C (což je častá kombinace v séru imunizovaných osob) je třeba, aby titr anti-C byl nejméně 32 a v případě séra anti-D+E je třeba, aby titr anti-E nebyl nižší než 8. Pokud je sérum určeno k použití při zkoušce na podložním sklíčku podle Diamonda a Abelsona, doba aglutinace u všech druhů reagujících červených krvinek by neměla být kratší než doba stanovená pro protilátky v nich obsažené.

B. ČINIDLA JINÉHO NEŽ LIDSKÉHO PŮVODU

a) SÉRA ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU

i) **(Živočišné) sérum anti-A pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-A pochází z krve zvířat, která byla nebo nebyla imunizována červenými krvinkami skupiny A nebo specifickými látkami skupiny A. Sérum anti-A aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigeny A, tj. červené krvinky skupin A a AB, včetně podskupin A₁, A₂, A₁B a A₂B, a neaglutinuje lidské červené krvinky, které antigeny A neobsahují, tj. krvinky skupin 0 a B.

Účinnost

Titrace

Sérum anti-A se titruje odděleně v suspenzích červených krvinek skupin A₁, A₂ a A₂B, souběžně s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo s rovnocenným referenčním preparátem¹. Účinnost séra nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na mililitr.

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-A se stejným objemem suspenze krvinek skupiny A₁, A₂ a A₂B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace každé suspenze začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním standardem rovnocenné avidity.

ii) **(Živočišné) sérum anti-B pro stanovení krevní skupiny**

Sérum anti-B pochází z krve zvířat, která byla nebo nebyla imunizována červenými krvinkami skupiny B nebo specifickými látkami skupiny B. Sérum anti-B aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigen B, tj. červené krvinky skupin B a AB, a neaglutinuje lidské červené krvinky, které antigen B neobsahují, tj. krvinky skupin 0 a A.

Účinnost

Titrace

¹ Mezinárodní standardní preparát je lidského původu; je-li použit rovnocenný referenční preparát, může být lidského či jiného původu.

Sérum anti-B se titruje odděleně v suspenzi krvinek skupiny B souběžně s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo rovnocenným referenčním preparátem¹⁾. Účinnost séra nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na mililitr.

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá sérum anti-B se stejným objemem suspenze krvinek skupiny B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace suspenze začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neřaděným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním standardem rovnocenné avidity.

iii) **(Živočišné) sérum lidského antiglobulinu²**

Sérum lidského antiglobulinu určené k použití v sérologii krevních skupin musí obsahovat aglutinační protilátky anti-IgG a aglutinační protilátky proti doplňkovým faktorům. Sérum pochází z krve zvířat imunizovaných vstříknutím lidských sérových proteinů. Sérum musí aglutinovat všechny druhy lidských červených krvinek pokrytých lidským globulinem IgG a/nebo doplňkovými faktory. Pokud se při použití séra postupuje podle podmínek stanovených výrobcem, sérum neaglutinuje nepokryté lidské červené krvinky bez ohledu na to, k jaké krevní skupině náleží.

Specifita

Specifita séra lidského antiglobulinu určeného k použití v sérologii krevních skupin musí být ověřena lidskými červenými krvinkami senzibilizovanými různými protilátkami: červenými krvinkami senzibilizovanými nekompletními lidskými protilátkami anti-D, anti-K a anti-Fy^a, červenými krvinkami senzibilizovanými nekompletními protilátkami, které váží doplněk anti-Le^a za přítomnosti čerstvého lidského séra, červenými krvinkami senzibilizovanými tzv. „nekompletními studenými protilátkami“, zhnědlými červenými krvinkami pokrytými lidským imunoglobulinem IgG a nakonec 10 různými vzorky nepokrytých lidských červených krvinek s antigeny A a B nebo bez těchto antigenů.

Účinnost

Titrace

² Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. and Race, R.R (1945), Lancet, ii, 15
Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. and Race, R.R (1945), Brit. J. ext. Path, 26, 255.

Sérum lidského antiglobulinu, tak, jak se dodává, nebo zředěné podle pokynů uvedených na etiketě, silně aglutinuje lidské červené krvinky pokryté nekompletním sérem anti-D lidského původu o titru nejvýše 4, pokud se titrace provádí v suspenzi D-pozitivních krvinek metodou „albumin replacement“ (náhrady albuminu). Při tomtéž zředění musí sérum aglutinovat K-pozitivní lidské červené krvinky senzibilizované vybranými slabými protilátkami anti-K a pozitivními červenými krvinkami Fy^a senzibilizovanými slabými protilátkami anti-Fy^a vybranými za tímto účelem.

Při tomtéž zředění nebo při jiném zředění uvedeném na etiketě musí sérum rovněž aglutinovat lidské červené krvinky senzibilizované slabými nekompletními protilátkami, které vážou doplněk anti-Le^a za přítomnosti čerstvého lidského séra.

Pro běžné klinické použití je třeba, aby bylo možné detekovat senzibilizaci všech druhů výše uvedených nekompletních protilátek pomocí jednoho zředění séra lidského antiglobulinu.

b) ČINIDLA ROSTLINNÉHO PŮVODU PRO STANOVENÍ KREVNÍCH SKUPIN

i) **(Rostlinné) činidlo anti-A pro stanovení krevní skupiny**

Činidlo anti-A se připravuje extrakcí ze semen nebo jiných částí vhodné rostliny a v případě potřeby se následně čistí. Činidlo anti-A aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigeny A, tj. červené krvinky skupin A a AB, včetně podskupin A₁, A₂, A₁B a A₂B, a neaglutinuje lidské červené krvinky, které antigeny A neobsahují, tj. krvinky skupin 0 a B.

Účinnost

Titrace

Činidlo anti-A se titruje odděleně v suspenzích krvinek skupin A₁, A₂ a A₂B, souběžně s rekonstituovaným, avšak neředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo s rovnocenným referenčním preparátem¹. Účinnost činidla nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na mililitr.

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá činidlo anti-A se stejným objemem suspenze krvinek skupiny A₁, A₂ a A₂B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace každé suspenze začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neředěným

¹ Mezinárodní standardní preparát je lidského původu; je-li použit rovnocenný referenční preparát, může být lidského nebo jiného původu.

mezinárodním standardním preparátem séra anti-A pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním standardem rovnocenné avidity.

ii) **(Rostlinné) činidlo anti-B pro stanovení krevní skupiny**

Činidlo anti-B se připravuje extrakcí z příslušné části rostliny vhodné k tomuto účelu a v případě potřeby se následně čistí. Činidlo anti-B aglutinuje lidské červené krvinky obsahující antigen B, tj. červené krvinky skupin B a AB, a neaglutinuje lidské červené krvinky, které antigen B neobsahují, tj. krvinky skupin 0 a A.

Účinnost

Titrace

Činidlo anti-B se titruje odděleně v suspenzi krvinek skupiny B souběžně s rekonstituovaným, avšak neředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo rovnocenným referenčním preparátem¹. Účinnost činidla nesmí být v žádném případě menší než 64 mezinárodních jednotek na mililitr.

Stanovení avidity

Poté, co se na podložním sklíčku smíchá činidlo anti-B se stejným objemem suspenze krvinek skupiny B o objemovém podílu 0,05 – 0,1, musí aglutinace začít dříve než uplyne dvakrát delší doba než je doba nezbytná pro zahájení aglutinace, když se stejná zkouška provádí s rekonstituovaným, avšak neředěným mezinárodním standardním preparátem séra anti-B pro stanovení krevní skupiny nebo s referenčním standardem rovnocenné avidity.

PŘÍKLADY ETIKETY

RADA EVROPY

**EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ ČINIDEL PRO STANOVENÍ
KREVNÍCH SKUPIN**

a)	kapalné sérum
1.	Laboratoř X, Amsterdam
2.	Sérum anti-A (lidské)
3.	Azid sodný 0,1%
4.	5 ml
5.	7. září 1965
6.	Č. 1 2 3 4
b)	sušené sérum
1.	Laboratoř X, Amsterdam
2.	Sérum anti-B (živočišné)
3.	Mersalat 0,1%
4.	Rekonstituovat 5 ml destilované vody
5.	31. prosince 1968
6.	Č. 4 3 2 1

PŘÍKLAD LETÁKU

RADA EVROPY

**EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ ČINIDEL PRO STANOVENÍ
KREVNÍCH SKUPIN**

1. Centrální laboratoř krevní transfúze, 1 Main Street, Metropolis, Westland
2. Sérum anti-E („anti-rh“) (lidské)
3. 10 ml
4. Datum poslední kontroly účinnosti: 30. května 1961
5. Použitelné do: 30. května 1962.
6. Č. 5432
7. Červené krvinky, které mají být vyšetřeny, se promyjí jednou nebo vícekrát v solném roztoku 9 g/l. Poté se připraví suspenze červených krvinek o objemovém podílu asi 0,03 smícháním jednoho objemového podílu nebo kapky reziduálních nebo usazených červených krvinek s 30 objemovými podíly nebo kapkami isotonického solného roztoku. Zkušený pracovník může vizuální kontrolou dostatečně posoudit stupeň koncentrace suspenze.

Pasteurovou pipetou se do zkumavky pro hemolýzu (6 mm x 30 mm) napipetuje malá kapka séra. Poté se přidá kapka suspenze červených krvinek. (Zkušenější pracovník může dosáhnout značné hospodárnosti tím, že sérum a suspenzi krvinek napipetuje pomocí dělených pipet po 10 µl). Obsah zkumavky se promíchá a nechá inkubovat při teplotě 37°C po dobu dvou hodin. Obsah zkumavky se potom opatrně přenesení na podložní mikroskopické sklíčko a jemně se na něm rozetře. Pokud není aglutinace viditelná pouhým okem, sklíčko se pozoruje pod mikroskopem, aby bylo možné stanovit, zda k aglutinaci skutečně došlo a v jaké intenzitě.
8. Uchovává se při teplotě nejméně –20°C. Pokud se sérum nepoužije v den otevření, přidá se do něj 0,1 ml roztoku obsahujícího 100 g azidu sodného na litr.
9. Lidské sérum anti-E („anti-rh“): 5 ml; roztok obsahující 300 gramů hovězího albuminu na litr: 5 ml.
10. Toto činidlo obsahuje látku lidského původu.

PŘÍLOHA PROTOKOLU

RADA EVROPY

**EVROPSKÁ DOHODA O VÝMĚNĚ ČINIDEL PRO STANOVENÍ
KREVNÍCH SKUPIN**

OSVĚDČENÍ

(Článek 4)

NEODDĚLOVAT OD ZÁSILKY

.....
(místo) (datum)

Počet balení Níže podepsaný potvrzuje, že zásilka,

.....

Značka za jejíž přípravu zodpovídá

.....

Č. šarže jeden ze subjektů uvedených v článku 6 dohody, splňuje ustanovení protokolu k dohodě a lze ji okamžitě doručit adresátovi

.....

..... (jméno a místo)

.....

.....
(razítko)

.....
(podpis)

.....
(titul)