

RCKiK w Białymstoku		
Nr wersji: 02	SOP-DIT/PKIKC-PR-22	Strona zał. 1 z 3
Załącznik nr: 7	Wersja zał. nr: 01	Data: 24.06.2025



**REGIONALNE CENTRUM
KRWIODAWSTWA I KRWIOLECNICTWA
W BIAŁYMSTOKU**

ul. M. Skłodowskiej - Curie 23, 15-950 Białystok, skr. poczt. 211

Tel. (85) 744 70 02, Fax (85) 744 71 33

www.rckik.bialystok.pl

KRWINKI WZORCOWE DO WYKRYWANIA PRZECIWCIAŁ

INFORMACJE O WYROBIE

Zestaw krwinek wzorcowych do wykrywania przeciwciał zawiera krwinki o następujących fenotypach:

- O RhD +, DC^cCee, K-
- O RhD +, DccEE, K-
- ORhD -, dccc. K+

Krwinki wzorcowe są produktem uzyskiwanym z krwi zdrowych, wyselekcjonowanych, wielokrotnych dawców krwi, o określonych i potwierdzonych fenotypach w następujących układach: Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNSs, Lewis, P. W zestawie powinny znajdować się krwinki zawierające antygeny w podwójnej dawce (homozygotyczne), co umożliwia wykrycie słabo reagujących przeciwciał.

Krwinki wzorcowe produkowane są od dawców o ujemnych wynikach testów na obecność wirusów HIV typ 1i 2, HCV, HBV oraz bakterii Krętek błędy. Krwinki wzorcowe zawieszone są w płynie konserwującym z dodatkiem roztworu wzbogacającego ADSOL/SAGM, zabezpieczającym krwinki przed hemolizą i zapewniającym stałą ekspresję antygenów krwinek czerwonych w okresie ich ważności.

Krwinki wzorcowe nie nadają się do użycia gdy zaobserwujemy strąty, zmętnienie lub wyraźną hemolizę. Nieznaczna hemoliza pojawiająca się w trakcie przechowywania krwinek wzorcowych nie dyskwalifikuje odczynnika i można je używać do badań.

Zestaw jest gotowy do użycia po uprzednim przemyciu krwinek roztworem PBS i sporządzeniu odpowiedniej zawiesiny, zgodnej z metodyką wykonywanego testu serologicznego.

ZASTOSOWANIE

Zestaw stosuje się wyłącznie w diagnostyce laboratoryjnej in vitro w badaniach serologicznych do wykrywania:

- nieregularnych przeciwciał typu zimnego w teście solnym
- przeciwciał odpornościowych w testach enzymatycznych
- przeciwciał typu ciepłego w testach antyglobulinowych

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Wszystkie produkty, które pochodzą z krwi, powinny być traktowane jak produkty potencjalnie zakaźne. Dlatego zaleca się zachować wszelkie środki ostrożności podczas stosowania krwinek wzorcowych, niszczenia zużytych opakowań. Nie należy pipetować krwinek wzorcowych ustami.

SPRZĘT I INNE NIEZBĘDNE MATERIAŁY DO WYKONANIA BADAŃ

- buforowany roztwór NaCl o pH 6,85- 7,2 - roztwór PBS
- roztwór NaCl o niskiej sile jonowej – roztwór - LISS do zawieszania krwinek czerwonych stosowany w technikach probówkowych.
- roztwór NaCl o niskiej sile jonowej – roztwór - LISS do zawieszania krwinek czerwonych stosowany w technikach mikrokolumnowych
- odczynnik papainowy
- Standard anty-D/ Standard anty-D MIKRO
- odczynnik antyglobulinowy poliwalentny
- odczynnik monowalentny/ odczynnik monoklonalny anty-IgG
- standaryzowane krwinki wzorcowe opłaszczone przeciwciałami anty-D
- 20% roztwór glikolu polietylenowego - odczynnik PEG
- enzym proteolityczny zalecany przez producenta karty mikrokolumnowej, np. bromelina
- karty mikrokolumnowe z żelalem obojętnym
- karty mikrokolumnowe z odczynnikiem antyglobulinowym
- inkubator
- wirówka laboratoryjna/wirówka do kart mikrokolumnowych
- pipety automatyczne/półautomatyczne
- końcówki do pipet
- próbówki jednorazowe
- automat do badań serologicznych

MATERIAŁ BIOLOGICZNY POTRZEBNY DO PRZEPROWADZENIA BADAŃ

W celu uzyskania wiarygodnych wyników zaleca się wykonywanie badań z próbek krwi pobranych na skrzep lub na EDTA przechowywanych w zakresie temperatur od +2 °C do +8 °C nie dłużej niż przez okres 7 dni. Dopuszcza się przechowywanie próbek w zakresie temperatur od 18 °C do 22 °C nie dłużej niż 2 dni. Badanie jednak powinno być wykonane jak najszybciej by zminimalizować uzyskanie wyników fałszywie ujemnych lub fałszywie dodatnich.

ZALECANE TECHNIKI STOSOWANIA

Test w środowisku roztworu NaCl (PBS)

1. Przygotować 3-4 % zawiesinę krwinek wzorcowych z zestawu w roztworze NaCl (PBS).
2. Do odpowiednio opisanych, jednorazowych próbek przenieść po 2 krople surowicy badanej.
3. Dodać po 2 krople zawiesiny krwinek wzorcowych i dokładnie wymieszać, wstrząsając delikatnie próbkami.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 15 minut.
5. Wirować przez 60 sekund przy 150-340g (1000-1500obr./min).
6. Odczytać wynik makroskopowo, delikatnie wstrząsając próbką.

Uwaga! Równoległe z właściwym badaniem należy wykonać badanie kontrolne z krwinkami autologicznymi oraz surowicą badaną lub surowicą grupy AB.

Interpretacja wyniku

Aglutynacja/hemoliza krwinek wzorcowych świadczy o dodatnim wyniku testu i wskazuje na obecność przeciwciał w badanej surowicy. Brak reakcji serologicznej świadczy o ujemnym wyniku badania i wskazuje, że badana surowica nie zawiera wykrywalnych ilości przeciwciał do antygenów obecnych na krwinkach wzorcowych.

Test enzymatyczny w niskiej sile jonowej (test LEN)

1. Przemyc dwukrotnie krwinki roztworem NaCl (PBS) i raz roztworem LISS.
2. Sporządzić 3- 4 % zawiesinę krwinek wzorcowych do wykrywania przeciwciał w roztworze LISS.
3. Sporządzić odczynnik LEN - rozcieńczyć odczynnik papainowy roztworem LISS w stosunku objętościowym- 1 kropla odczynnika papainowego i 2 krople roztworu LISS.
4. Do odpowiednio opisanych, jednorazowych próbek przenieść po 2 krople zawiesiny krwinek wzorcowych.
5. Dodać po 1 kropli odczynnika LEN i dokładnie wymieszać zawartość próbek przez delikatne wstrząsanie próbkami.
6. Inkubować w temperaturze +37°C przez 10 minut.
7. Po inkubacji dodać po 2 krople surowicy badanej i dokładnie wymieszać.

RCKiK w Białymstoku		
Nr wersji: 02	SOP-DIT/PKIKC-PR-22	Strona zał. 2 z 3
Załącznik nr: 7	Wersja zał. nr: 01	Data: 24.06.2025

8. Inkubować ponownie w temperaturze +37°C przez 3 minuty.
9. Wirować przez 30- 60 sekund przy 150-340g (1000-1500obr./min).

Odczytać wyniki makroskopowo, delikatnie wytrząsając probówką.

Uwaga! Odczyt i interpretacja wyniku testu powinny następować bezpośrednio po odwirowaniu zawartości probówek.

Równocześnie z właściwym badaniem należy przeprowadzić badania kontrolne:

- kontrola dodatnia - krwinki wzorcowe grupy O Rh + (dodatni) z Standardem anty-D
- kontrola ujemna - krwinki wzorcowe grupy O Rh - (ujemny) z Standardem anty-D

Interpretacja wyniku testu LEN

Aglutynacja/hemoliza krwinek wzorcowych świadczy o dodatnim wyniku testu i wskazuje na obecność przeciwciał w badanej surowicy. Brak aglutynacji/ hemolizy krwinek wzorcowych wskazuje, że badana surowica nie zawiera wykrywalnych ilości przeciwciał skierowanych do antygenów obecnych na krwinkach wzorcowych.

Pośredni test antyglobulinowy klasyczny (PTA- NaCl)

1. Przygotować 3-4% zawiesiny krwinek wzorcowych w roztworze NaCl (PBS).
2. Do odpowiednio opisanych, jednorazowych probówek dodać po 5 kropli surowicy badanej.
3. Dodać po 2 krople krwinek wzorcowych i wymieszać zawartość probówek.
4. Inkubować w temperaturze +37°C przez 60 minut.
5. Po inkubacji sprawdzić czy zawiesina jest jednorodna*.
6. Jednorodne zawiesiny krwinek przemyć 4 razy dużą objętością roztworu NaCl (PBS).
7. Po ostatnim przemyciu usunąć dokładnie nadsącz.
8. Do osadu krwinek dodać po2 krople odczynnika antyglobulinowego.
9. Wirować przez 30-60 sek., przy 150-340g (1000- 1500 obr./min).
10. Odczytać wynik makroskopowo przez delikatnie wytrząsając probówką i obserwować obecność aglutynatów.

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

1. Przemycić krwinki dwukrotnie roztworem NaCl (PBS) i raz roztworem LISS.
2. Przygotować 3-4% zawiesiny krwinek wzorcowych w roztworze LISS.
3. Do odpowiednio opisanych, jednorazowych probówek wprowadzić po 2 krople surowicy badanej.
4. Dodać po 2 krople zawiesiny krwinek wzorcowych w roztworze LISS i delikatnie wymieszać zawartość probówek.
5. Inkubować w temperaturze +37°C przez 20 minut.
6. Sprawdzić, czy zawiesiny krwinek pozostały jednorodne*.
7. Jednorodne zawiesiny przemyć 4 razy dużą objętością roztworu NaCl (PBS).
8. Po ostatnim przemyciu dokładnie usunąć nadsącz.
9. Do osadu krwinek dodać po 2 krople odczynnika antyglobulinowego.
10. Wirować przez 30-60 sek., przy 150-340g (1000-1500 obr./min).
11. Odczytać wynik makroskopowo przez delikatnie wytrząsając probówką i obserwować obecność aglutynatów.

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

1. Przygotować 4% zawiesiny krwinek wzorcowych roztworze NaCl o pH 7,2 (PBS).
2. Do odpowiednio opisanych, jednorazowych probówek przenieść po 2 krople surowicy badanej, dodać 1 kroplę zawiesiny krwinek wzorcowych i 4 krople roztworu PEG (temperatura pokojowa).
3. Zawartość probówek dokładnie wymieszać.
4. Inkubować w temperaturze +37°C przez 15 minut.
5. Po inkubacji sprawdzić, czy zawiesiny krwinek pozostały jednorodne*.
6. Jednorodne zawiesiny krwinek przemyć 4 razy dużą objętością roztworu NaCl (PBS).
7. Po ostatnim przemyciu dokładnie usunąć nadsącz.
8. Do osadu krwinek dodać po 2 krople odczynnika anty- IgG i wymieszać.
9. Wirować przez 20 sekund przy 150-340g (1000 – 1500 obr./min.).
10. Odczytać wynik makroskopowo przez delikatnie wytrząsając probówką i obserwować obecność aglutynatów.

* Stwierdzona po inkubacji hemoliza lub aglutynacja krwinek czerwonych, świadczy o obecności w surowicy badanej alloprzeciwciał kompletnych (IgM), należy wtedy odstąpić od kontynuowania testu.

UWAGA

Przerwy w toku wykonywania czynności we wszystkich etapach testu antyglobulinowego po fazie inkubacji krwinek z surowicą, a zwłaszcza przerwy w czasie przemyciania krwinek, mogą prowadzić do elucji przeciwciał związanych z krwinkami.

Konieczne jest jednocześnie wykonanie badań kontrolnych:

- krwinki wzorcowe grupy O RhD+ (dodatni) z odczynnikiem Standard anty-D (kontrola dodatnia)
- krwinki wzorcowe grupy O RhD – (ujemny) z odczynnikiem Standard anty-D (kontrola ujemna)

Interpretacja wyników pośrednich testów antyglobulinowych (PTA- NaCl, PTA- LISS, PTA- PEG)

Wynik testu jest dodatni, jeżeli krwinki wzorcowe z zestawu „Krwinki wzorcowe do wykrywania przeciwciał” uległy aglutynacji/hemolizie pod wpływem odczynnika antyglobulinowego - poliwalentnego lub odczynnika anty- IgG. Świadczy to o obecności przeciwciał w badanej surowicy.

Brak aglutynacji krwinek wzorcowych wskazuje, że badana surowica nie zawiera wykrywalnych ilości przeciwciał, skierowanych do antygenów obecnych na krwinkach (ujemny wynik badania). Wszystkie ujemne wyniki testu antyglobulinowego należy potwierdzić przeprowadzając kontrolę wiarygodności ujemnego testu antyglobulinowego, przy użyciu standaryzowanych krwinek wzorcowych opłaszczonych przeciwciałami anty-D.

Test enzymatyczny – technika mikrokolumnowa

1. Badaną krew rozdzielić metodą wirowania.
2. Wykonać zalecaną przez producenta zawiesinę krwinek czerwonych w odczynniku LISS.
 - z pobranej próbki krwi po jej całkowitym wykrzepieniu pobrać z dna probówki kilka kropli krwinek i przenieść do oddzielnej probówki
 - zalać roztworem 0,9 % NaCl i wirować 3 min. z prędkością 342 x g
3. Opisać karty do badań (karty mikrokolumnowe z żelem obojętnym).
4. Zerwać folię ochronną.
5. Do kolumnienek nanieść zalecaną przez producenta kart mikrokolumnowych ilość zawiesiny krwinek panelowych
6. Dodać zalecaną przez producenta ilość surowicy lub osocza.
7. Dodać zalecaną przez producenta ilość enzymu proteolitycznego, np. bromeliny.
8. Karty włożyć do inkubatora o temperaturze +37°C i inkubować przez czas zalecany przez producenta.
9. Wirować karty mikrokolumnowe przez czas zalecany przez producenta.
10. Wyjąć karty mikrokolumnowe i odczytać otrzymane wyniki.

Uwaga!

Równocześnie z właściwym badaniem należy przeprowadzić badania kontrolne:

- kontrola dodatnia - krwinki wzorcowe grupy O Rh + (dodatni) z Standardem anty-D
- kontrola ujemna - krwinki wzorcowe grupy O Rh - (ujemny) z Standardem anty-D

Test antyglobulinowy - technika mikrokolumnowa (metoda manualna)

1. Badaną krew rozdzielić metodą wirowania.
2. Wykonać zalecaną przez producenta zawiesinę krwinek czerwonych w odczynniku LISS.

RCKiK w Białymstoku		
Nr wersji: 02	SOP-DIT/PKIKC-PR-22	Strona zał. 3 z 3
Załącznik nr: 7	Wersja zał. nr: 01	Data: 24.06.2025

- z pobranej próbki krwi po jej całkowitym wykrzepieniu pobrać z dna próbówki kilka kropli krwinek i przenieść do oddzielnej próbówki
- zalać roztworem 0,9 % NaCl i wirować 3 min. z prędkością 342 x g

- Opisać karty do badań (karty mikrokolumnowe z odczynnikami antyglobulinowymi).
- Zerwać folię ochronną.
- Do kolumnienek nanieść zalecaną przez producenta kart mikrokolumnowych ilość zawiesiny krwinek panelowych
- Dodać zalecaną przez producenta ilość surowicy lub osocza.
- Karty włożyć do inkubatora o temperaturze +37°C i inkubować przez czas zalecany przez producenta.
- Wirować karty mikrokolumnowe przez czas zalecany przez producenta.
- Wyjąć karty mikrokolumnowe i odczytać otrzymane wyniki.

Uwaga!

Równocześnie z właściwym badaniem należy przeprowadzić badania kontrolne:

- kontrola dodatnia - krwinki wzorcowe grupy O Rh + (dodatni) z Standardem anty-D
- kontrola ujemna - krwinki wzorcowe grupy O Rh - (ujemny) z Standardem anty-D

Metoda mikrokolumnowa (półautomatyczna / automatyczna)

- Przygotować zawiesinę krwinek wzorcowych w roztworze LISS o stężeniu zalecanym przez producenta mikrokart.
- Umieścić krwinki wzorcowe do automatu.
- Kontrolować proces pipetowania, inkubacji oraz wirowania prowadzony przez automat.
- Autoryzować wynik badania zinterpretowany przez automat.

Interpretacja wyników testów w technice mikrokolumnowej

Wyniki należy podawać w skali (od 0 do 4+) zależnie od nasilenia aglutynacji. Charakterystyczny obraz guziczka na dnie kolumny wskazuje na wynik ujemny (wartość wynosi 0) - brak przeciwciał. O reakcji dodatniej świadczy pierścień w górnej części kolumny utworzony przez zaglutynowane krwinki (wartość 4+), bądź aglutynaty krwinkowe zatrzymane wewnątrz kolumny (wartość od 1+ do 3+) - wykryto obecność przeciwciał odpornościowych.

OGRANICZENIE METODY

Przyczynami fałszywie dodatnich lub ujemnych wyników badań mogą być:

- niedokładnie umyte szkło laboratoryjne- zaleca się jednorazowego użytku,
- niewłaściwa proporcja - odczynnik/krwinki,
- nieprawidłowy czas lub temperatura inkubacji,
- zanieczyszczenie odczynników lub próbki badanej,
- niewłaściwe wirowanie lub przemywanie krwinek.

WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Zestaw „Krwinki wzorcowe do wykrywania przeciwciał” należy przechowywać w temperaturze od +2 °C do +8°C . Jeżeli warunki przechowywania krwinek wzorcowych są zgodne z zaleceniem producenta to produkt jest stabilny i zachowuje 100% czułość i 100% specyficzność do czasu jego ważności podanej na opakowaniu również po jego otwarciu.

TERMIN WAŻNOŚCI

Termin ważności zestawu podany jest na opakowaniu.

PIŚMIENNICTWO

- Aktualne obwieszczenie Ministra Zdrowia w sprawie wymagań dobrej praktyki pobierania krwi i jej składników, badania, preparatyki, przechowywania, wydawania i transportu dla jednostek organizacyjnych publicznej służby krwi.
- J. Wawelska, G. Kuśnierz- Alejska. Wartość stosowania środowiska o niskiej sile jonowej w pośrednim teście antyglobulinowym z krwinkami czerwonymi. Acta Haematologica Polonica., 1979, 10, 159- 168.
- I. Wawelska, H. Seyfriedowa, B. Michalewska, B. Lenkiewicz. Spostrzeżenia nad rutynowym stosowaniem testu enzymatycznego LEN (LISS- ENZYM) w badaniach immunohematologicznych. Acta Haematologica Polonica, 1990, 21, 219- 224. B. Michalewska, I. Wawelska, H. Seyfriedowa, G. Kuśnierz-Alejska. Wartość stosowania glikolu polietylenowego w pośrednim teście antyglobulinowym z krwinkami czerwonymi. Acta Haematologica Polonica, 1991, 22, 105- 112.
- Fabiańska-Mitek J, Bochenek-Jantczak D, Grajewska A.: Badania immunohematologiczne w transfuzjologii, Fundacja Pro Pharmacia Futura, Warszawa: 2024
- ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (UE) 2017/746 z dnia 5 kwietnia 2017 r. w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki in vitro oraz uchylenia dyrektywy 98/79/WE i decyzji Komisji 2010/227/UE

WYJAŚNIENIE SYMBOLI STOSOWANYCH NA ETYKIETACH

	wytwórca		kod partii/ serii
	wyrób medyczny do diagnostyki in vitro		data ważności
	przechowywanie w zakresie temperatur		należy zapoznać się z instrukcją stosowania
	deklaracja wytwórcy, że wyrób, który został wprowadzany do obrotu, spełnia wymagania zasadnicze oraz przepisy prawa, normy jakości i bezpieczeństwa dotyczące tego wyrobu		