proLékaře.cz | 10.9.2025

DOPORUČENÍ SPOLEČNOSTI PRO TRANSFUZNÍ LÉKAŘSTVÍ ČLS JEP
Č. STL2011_07 ZE DNE 1. 3. 2011 VERZE 2 (2012_04)

ZÁKLADNÍ IMUNOHEMATOLOGICKÁ LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ČERVENÉ ŘADY – OBECNÉ ZÁSADY A TECHNICKÉ POSTUPY

1 Obecná doporučení

Požadavky na pracoviště, personál, přístroje a pomůcky a kontrolu kvality musí minimálně odpovídat Nepodkročitelným minimům odbornosti 222 – Transfuzní lékařství (publikovány a aktualizovány na stránkách www.transfuznispolecnost.cz).

Postupy pro laboratorní imunohematologická vyšetření:

- se před zavedením do rutinní praxe validují / verifikují,
- provádějí se podle vypracovaných standardních operačních postupů proškolenými pracovníky,
- monitorují se.

1.1 Přístroje a diagnostika

1.1.1 Používají se pouze přístroje a diagnostika, které splňují příslušné legislativní požadavky na příslušné zdravotnické prostředky a nesou označení CE.

1.1.2 U všech nových zařízení se provádí odborná **instalace** dodavatelem přístroje (instalační kvalifikace), uvedení do provozu se dokumentuje (instalační protokol, záznam o zaškolení).

1.1.3 Další **kvalifikace** (validace, event. kalibrace) přístroje provádí autorizovaný servisní technik podle postupů doporučovaných výrobcem. Doporučená četnost, není-li stanoveno výrobcem přístroje jinak, je

- 1x za 12 měsíců,
- po opravě přístroje, která může ovlivnit funkci přístroje,
- při podezření na špatnou funkci přístroje,
- při aktualizaci software.

O kvalifikaci se vedou patřičné záznamy.

1.1.4 Údržba přístrojů (včetně čištění) se provádí podle pokynů jejich výrobce a vedou se o ní záznamy.

1.1.5 Manuální automatické pipety pro imunohematologická vyšetření (včetně metody sloupcové aglutinace) se považují za orientační měřidla (jejich přesnost se ověřuje tomu odpovídajícím způsobem).

1.1.6 Je vypracován postup pro **příjem, skladování a propouštění** diagnostik do rutinního provozu, včetně určení odpovědností. Propouští se každá dodávka a každá šarže. Součástí propouštění je kontrola certifikátů k dané šarži a zhodnocení nezávadnosti diagnostik při fyzické přejímce. Do propuštění jsou nepropuštěná diagnostika skladovaná odděleně od propuštěných. Propuštěná diagnostika se označí příznakem propuštění.

Kontroly diagnostických erytrocytů a kontrolních souprav by měly zahrnovat evidenci neporušenosti balení a nepřítomnosti známek kontaminace a hemolýzy.

Doporučené postupy kontroly šarží diagnostik jsou uvedeny v příloze č. 1. Nejsou-li provedeny před propuštěním diagnostik k použití, mají být provedeny jako součást denní kontroly.

1.1.7 Diagnostika se **skladují a používají** podle návodů výrobce, případně jiným validovaným způsobem.

1.1.8 U použitých diagnostik se **zaznamenává** typ, výrobce a číslo šarže tak, aby byla zajištěna dohledatelnost těchto údajů pro vyšetření každého jednotlivého vzorku.

1.1.9 Vnitřní kontrola kvality

Laboratoř má stanovený systém vnitřní kontroly. Zahrnuje **denní kontrolu** reagencií, vizuální kontrolu používaných reagencií a materiálů a kontrolu laboratorních zařízení. Doporučené postupy jsou uvedeny v příloze č. 2.

Musí být stanoveny postupy při neshodách (odchylkách).

1.1.10 O **změně diagnostika** musí rozhodnout oprávněná osoba. Před zavedením nového diagnostika do rutinního používání se provádí validační studie. Validační studií se ověřuje, zda daný test dává na konkrétním pracovišti standardní výsledky.

1.2 Krevní vzorky

1.2.1 Typ

K testování se používá **srážlivá** nebo **nesrážlivá** krev příjemce. Výjimkou jsou vyšetření novorozenců a dětí do 4 měsíců věku (zejména v případě susp. hemolytického onemocnění novorozence), kdy se k vyšetření protilátek upřednostňuje použití plazmy/séra matky. V případě použití pupečníkové krve se doporučuje promytí erytrocytů. Pro odběr nesrážlivé krve je vhodné použít jako protisrážlivé přísady **EDTA** (chelatonan). Každá laboratoř zveřejňuje v laboratorní příručce stanovené požadavky na preanalytickou fázi vyšetření (odběrový systém, přípustné protisrážlivé přísady, množství odebírané krve pro příslušné vyšetření, podmínky pro transport, atd.).

1.2.2 Značení

Vzorek k laboratornímu vyšetření se označí tak, aby nebyla možná jeho záměna. Správnost údajů stvrzuje osoba, která vzorek odebrala, svým podpisem.

Zkumavku je nutné označit **před odběrem** krevního vzorku. Po nalepení štítku se má ověřit **identifikace pa-**

proLékaře.cz | 10.9.2025

cienta / příjemce transfuzního přípravku dotazem, event. ze zdravotnické dokumentace. Minimálně se vyplní jméno, příjmení a číslo pojištěnce (obvykle rodné číslo), event. datum odběru vzorku. Nejsou-li identifikační údaje známy, je nutné vygenerovat číslo pojištěnce tak, aby se vždy použilo unikátní číslo.

Dodatečné popisování, přelepování či přepisování štítku není přípustné.

Upřednostňuje se značení čárovým kódem.

1.2.3 Skladování

Před vyšetřením se vzorky uchovávají za vhodných podmínek (skladovací teplota, doba uchovávání) způsobem stanoveným ve vnitřní předpisové dokumentaci.

Doporučená maximální doba uchovávání vzorků před testováním

	18–25 °C	2–8 °C	≤ -20 °C
EDTA plná krev	do 12 hodin	do 7 dní	nelze
Separovaná plazma/sérum	nevhodné	do 7 dní	6 měsíců

V rámci **předtransfuzního vyšetření** lze pro screening protilátek a test kompatibility použít krevní vzorek do **72 hodin** od jeho odběru. Pokud došlo k potransfuzní reakci, užívá se pro další předtransfuzní vyšetření vždy čerstvý vzorek.

1.3 Dokumentace

1.3.1 Primární dokumentace obsahuje

- identifikaci vzorku (pacienta / příjemce transfuzního přípravku),
- výsledek každého testu (pozitivní, negativní, event. síla reakce; zaznamenávají se všechny dílčí reakce – každý sloupec, jamka, zkumavka),
- hodnocení výsledku (krevní skupina, specifita protilátky apod.).

V případě automatizovaného testování se výsledky zaznamenávají přednostně elektronicky (pomocí personálního počítače přímo z analyzátoru).

Je nutná dohledatelnost výsledku vyšetření každého vzorku včetně kontrol, názvu a čísla šarže diagnostika a identifikace pracovníka, který vyšetření provedl a kontroloval.

Jakékoliv odchylky od běžného postupu musí být dokumentovány.

1.3.2 Výsledková zpráva

Výsledková zpráva – vychází z primární dokumentace a obsahuje výsledné hodnocení daného vyšetření. Výsledkovou zprávu autorizuje oprávněná osoba.

1.3.3 Elektronický přenos dat

Přenos dat mezi dvěma různými informačními systémy, stejně jako přenos dat mezi automatizovanými laboratorními zařízeními a informačními systémy, musí probíhat validovaným způsobem, tak aby bylo zajištěno, že nemůže dojít k chybnému přiřazení dat k danému vyšetření či ke zkreslení dat.

1.4 Řízení neshod

Každá laboratoř má vypracován systém řízení neshod.

V případě automatického vyšetřování by mělo mít každé pracoviště jasně definován záložní manuální postup.

1.5 Vnitřní audity a externí hodnocení kvality

Laboratoř má mít zaveden systém pravidelných vnitřních auditů.

Laboratoř se má účastnit systému externího hodnocení kvality v imunohematologických metodách, které dané pracoviště používá.

1.6 Personál

V laboratoři má existovat dokumentovaný program vzdělávání a tréninku příslušných pracovníků v používaných imunohematologických metodách.

1.7 Verifikace kvalitativních imunohematologických metod

Základní metody se verifikují postupy uvedenými v příloze č. 3, při verifikaci ostatních metod se postupuje analogicky.

Poznámka: Tam, kde nejsou dostupné komerční vzorky, používají se vlastní kontrolní vzorky.

2 Postupy

Postupy v těhotenství a porodu jsou uvedeny v doporučení STL2010_06, u dárců krve a jejích složek v doporučení STL2011_09.

2.1 Stanovení AB0 a antigenu D (AB0, RhD)

2.1.1 AB0

U všech pacientů starších 4 měsíců by mělo být provedeno vyšetření antigenů a protilátek.

Minimálně: diagnostická séra anti-A a anti-B, diagnostické erytrocyty A_1 a B.

Interpretace výsledné skupiny AB0 si musí v případě antigenů i protilátek odpovídat, každá diskrepance musí být (pokud možno) vyřešena před vydáním výsledku.

U novorozenců a dětí do 4 měsíců věku, kde chybí možnost kontrolního vyšetření protilátek, by AB0 skupina měla být ověřena opakovaným (2x) vyšetřením antigenů pomocí diagnostických sér s 2 různými klony pro každou specifitu.

proLékaře.cz | 10.9.2025

2.1.2 Antigen D (RhD)

Každý vzorek se vyšetřuje **dvojmo** různými monoklonálními diagnostickými séry anti-D třídy IgM, která by neměla detekovat variantu D^{VI}. Pro určení antigenu D se nepoužívá antiglobulinový test.

Je důležité si uvědomit, že monoklonální diagnostika anti-D mohou jevit rozdílnou schopnost detekovat slabé a variantní antigeny D. Pokud je zachycena diskrepance a/nebo výrazné zeslabení reakcí, měl by být pacient považován za D-variantního až do doby vyřešení diskrepance. Vzorek by měl být zaslán do Referenční laboratoře či jiné specializované imunohematologické laboratoře k objasnění.

Použití diagnostického séra anti-CDE se nedoporučuje. Při vyšetření antigenu D rozlišujeme 3 kategorie výsledků:

RhD pozitivní = jasně pozitivní reakce se všemi použitými diagnostickými séry anti-D
RhD negativní = jasně negativní reakce se všemi použitými diagnostickými séry anti-D
$\mathbf{D^{w/v}}$ (slabý antigen D/varianta antigenu D) = na slabý antigen D či variantu antigenu D je vhodné myslet u:

- slabší reakce všech použitých diagnostických sér anti-D,
- zcela diskrepantních reakcí použitých diagnostických sér (pozitivní x negativní),
- rozdílu v síle reakcí použitých diagnostických sér anti-D,
- nečekaného nálezu anti-D imunizace bez autoreakce u osoby se zdánlivě normálním antigenem D,
- diskrepance mezi anamnestickým údajem a současným vyšetřením,
- diskrepance mezi výsledky vyšetření jedince postupy doporučenými pro dárce a příjemce krve.

2.1.3 Kontroly

Pozitivní a negativní kontrola/y mají být zařazeny minimálně denně v rámci denní kontroly diagnostik nebo při každé sérii vyšetření (viz příloha č. 2).

Nejsou-li dosaženy očekávané výsledky testování příslušných kontrolních vzorků, měla by se provést kontrola všech předcházejících vyšetření až po poslední validní výsledek testování kontrolních vzorků.

V případě doporučení výrobce se provádí testování s kontrolním diagnostikem bez specifické anti-D aktivity (Rh kontrola) k vyloučení falešně pozitivních výsledků.

Pokud se neprovádí vyšetření aglutininů AB0, je nutné zařazení negativní kontroly (reagencie s diluentem bez specifické účinnosti s erytrocyty příjemce).

Kontrola pomocí reagencie s diluentem bez specifické účinnosti se doporučuje v případě přítomnosti silných chladových autoprotilátek nebo v případě průkazu autoaglutinace pacientova krevního vzorku. Pomoci může promytí erytrocytů teplým fyziologickým roztokem před vlastním testováním.

2.1.4 Ověření výsledků

Výsledek stanovení AB0 RhD se musí vždy, kdy je to možné, ověřit proti minulému výsledku u daného pacienta. V případě již známé krevní skupiny AB0 RhD stačí provést **ověření** krevní skupiny pomocí diagnostických sér anti-A, anti-B, anti-D (1x).

U předtransfuzního vyšetření, jde-li o **první vyšetření** AB0 RhD, je vhodné provést nezávislé ověření (možný jen orientační test antigenů; provést odděleně od hlavního vyšetření a z originálního vzorku). S výhodou pak lze použít dvě různá diagnostická séra dané specifity. Jakákoliv diskrepance musí být vyřešena (pokud možno vyšetřením nového vzorku pacienta) před transfuzí erytrocytů nebo erytrocyty kontaminovaného přípravku.

2.1.5 Anomálie při určování skupiny

Slabé, variantní nebo získané antigeny, slabé nebo chybějící AB0 protilátky, přítomnost chladových alo- či autoprotilátek a jiné, musí být uvedeny na výsledku a tato informace musí být uvedena i ve zdravotnické dokumentaci pacienta.

2.1.5.1 Neočekávané reakce „smíšeného pole“ dvojí populace erytrocytů

U těchto reakcí je nutné opakovat testování AB0, RhD. Mohou být způsobeny podáním AB0/D neshodných erytrocytů nebo transplantací kostní dřeně event. kmenových buněk.

Vhodné je kontrolní vyšetření metodou sloupcové aglutinace.

2.1.5.2 Přítomnost chladových aloprotilátek a autoprotilátek

Je vhodné provést testování protilátek anti-A, anti-B při vyšší teplotě nebo za použití diagnostických erytrocytů bez přítomnosti antigenu, odpovídajícího chladové aloprotilátce.

2.1.5.3 Intrauterinní transfuze

Novorozenci, kteří dostávali intrauterinní transfuzi erytrocytů, mohou až několik měsíců vykazovat krevní skupinu (AB0, RhD) transfundovaných erytrocytů. Mohou být prokazatelné reakce „smíšeného pole“ či dvě populace (sloupcová aglutinace).

2.1.6 Postup při zjištěné diskrepanci / anomálii při vyšetření krevní skupiny AB0 RhD

(1) Opakovat vyšetření z originálního vzorku (nikoliv z použité suspenze vyšetřovaných erytrocytů).
(2) Zařadit autokontrolu.
(3) Promýt erytrocyty.
(4) Vyžádat nový vzorek (při zjištění jiné krevní skupiny oproti záznamům v databázi).

2.2 Screening protilátek

2.2.1 Techniky

2.2.1.1 Nepřímý antiglobulinový test *(NAT)* ve zkumavkovém provedení s použitím erytrocytů resuspendovaných v roztoku o nízké iontové síle (LISS-NAT) je považován za referenční techniku – hranice citlivosti LISS-NAT je brána jako standardní nepodkročitelné minimum. Za **standardní metody** jsou považovány: testy sloupcové aglutinace, testy „na pevné fázi“.

(Na základě dlouhodobých výsledků externí kontroly kvality je zřejmé, že lepších výsledků než zkumavková metoda dosahují robustnější metodiky sloupcové aglutinace a pevné fáze a tudíž by měly být preferovány.)

proLékaře.cz | 10.9.2025

Technika s normální iontovou silou (NISS) není vzhledem k delší inkubaci a potřebě většího objemu krevního vzorku doporučována, ale může být vhodná tam, kde se vyskytnou problémy vázané na LISS, jako LISS-dependentní autoprotilátky nebo jiné nespecifické reakce.

2.2.1.2 Enzymový test (ET). ET je doplňková technika, pouze vzácně citlivější než NAT (některé Rh protilátky). Jeho provedení může být jednostupňové (v reakci erytrocyty + enzym /bromelin, papain/ + sérum/plazma), nebo citlivější dvoustupňové (v reakci pouze enzymaticky /ficin, papain/ upravené erytrocyty + sérum/plazma). Nepovažuje se za rutinní metodu pro screening protilátek.

2.2.1.3 Pracovní postup se řídí návodem k použití příslušných diagnostik (diagnostických erytrocytů, antiglobulinového séra, enzymu, event. systémů sloupcové aglutinace nebo pevné fáze).

2.2.2 Výběr technik

Protože NAT metody mohou detekovat téměř všechny klinicky závažné protilátky, doporučuje se pro screening protilátek použití samotného NAT bez další doplňující screeningové techniky.

2.2.2.1 Screening protilátek v rámci předtransfuzního vyšetření

Za základní se považuje provedení **LISS-NAT při 37 °C**. ***Enzymový test*** lze zařadit:

(1) jako druhé vyšetření v laboratoři, která nedosahuje opakovaně správných výsledků ve vnitřní a vnější kontrole kvality (jako přechodné opatření do doby zjištění a odstranění nedostatků v používaných testech);
(2) jako doplňkové vyšetření při screeningu protilátek u pacientů, kde je anamnéza potransfuzních reakcí a při vyšetřování potransfuzní reakce;
(3) jako doplňkové vyšetření při screeningu protilátek u pacientů s dlouhodobou transfuzní substituční léčbou a těžším klinickým stavem (zejména pacienti s hematologickými a onkologickými diagnózami).

2.2.3 Diagnostické erytrocyty pro screening protilátek

Jako základní diagnostikum jsou doporučovány komerční CE certifikované screeningové panely.

Doporučuje se použití panelu 3 diagnostických erytrocytů s minimálním zastoupením následujících antigenů: C, C^w, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N, Le^a.

Jedny screeningové diagnostické erytrocyty by měly mít fenotyp DCe/DCe (R_1R_1), a jedny fenotyp DcE/DcE (R_2R_2). V screenigovém panelu by měly být v homozygotním zastoupení antigeny Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s.

Screeningové diagnostické erytrocyty se nesmějí používat ve směsi.

2.2.4 Kontroly Autologní kontrola nebo přímý antiglobulinový test (PAT) nejsou nutnou součástí screeningu protilátek, pokud nejde o vyšetření při podezření na potransfuzní hemolytickou reakci nebo AIHA.

2.3 Identifikace protilátek

2.3.1 Je-li ve screeningu detekována protilátka, měla by být určena její specifita a klinický význam.

2.3.2 Vzorek krve má být zaslán do specializované imunohematologické laboratoře nebo do referenční laboratoře, pokud jsou pochyby o správné identifikaci protilátky nebo nejsou-li vyloučeny případné další klinicky významné protilátky.

2.3.3 Laboratoře, které neprovádějí identifikaci protilátek v rámci systému externího hodnocení kvality a také pokud dosahují opakovaně nevyhovujících výsledků), musí posílat všechny vzorky s pozitivním výsledkem screeningu protilátek do laboratoře, která se tohoto systému účastní a dosahuje uspokojivých výsledků.

2.3.4 Vypovídací schopnost identifikačního panelu je limitována danou kombinací antigenních profilů jednotlivých diagnostických erytrocytů. Samotný jeden panel nemusí být dostačující pro identifikaci některých častých kombinací protilátek, proto je doporučováno užívání jiného dalšího identifikačního panelu těm laboratořím, které neposílají vzorky do Referenční laboratoře (aby mohly být vyloučeny další klinicky významné protilátky).

2.3.5 Princip identifikace protilátek

(1) Plazma/sérum pacienta jsou testovány příslušnou technikou proti identifikačnímu panelu diagnostických erytrocytů. Výchozí technika je taková, jakou byla protilátka detekována při screeningu. Vhodné je zařazení vlastních erytrocytů pacienta (= „autokontrola"), k odlišení protilátky proti antigenu o vysoké frekvenci výskytu od nespecifické autoprotilátky.
(2) Specifita protilátky by měla být potvrzena, jen když reaguje přinejmenším se dvěma typy diagnostických erytrocytů nesoucích daný antigen a nereaguje přinejmenším se dvěma typy negativními pro daný antigen.
(3) Je-li identifikována jedna protilátka, je důležité se ujistit, že nebyla opomenuta přítomnost dalších klinicky významných protilátek. Vícečetné protilátky mohou být potvrzeny výběrem diagnostických erytrocytů negativních pro antigen odpovídající první protilátce a pozitivních pro ostatní antigeny, proti nimž mohou být tvořeny klinicky významné protilátky.
(4) Použití doplňujících technik, jako enzymového testu a chladového solného testu, může pomoci zejména při identifikaci protilátek, reagujících slabě v NAT, nebo při směsi protilátek. Použití monospecifického antiglobulinového diagnostika místo polyspecifického diagnostika může pomoci při identifikaci směsi IgG protilátek a protilátek s vazbou komplementu.
(5) Ačkoliv většina protilátek prokazatelných pouze enzymovou technikou nemá pravděpodobně klinický význam, neměl by být specifický nález ignorován, případně může být konzultován se spádovou specializovanou imunohematologickou laboratoří.
(6) Měl by být určen fenotyp erytrocytů pacienta za použití vhodných diagnostik. Zde je obzvláště důležité zařazení diluentové kontroly nebo kontrolního AB séra, užitých stejnou technikou, jako diagnostikum. Pozitivita PAT může být příčinou neplatnosti výsledků.
(7) Pro predikci fenotypu lze použít CE certifikované diagnostické molekulárně-genotypovací postupy (dia-

proLékaře.cz | 10.9.2025

gnostické soupravy PCR-SSP, microarray BloodChip). Tento postup je vhodný zejména tam, kde není sérologická diagnostika spolehlivá (příjemce s pozitivitou PAT, polytransfundovaný) nebo dostupná (aloprotilátky u variantních fenotypů, nedostupnost diagnostických sér /např. Colton, Dombrock, Diego/)

2.3.6 Diagnostické erytrocyty pro identifikaci protilátek

Jako základní diagnostikum jsou doporučovány komerční CE certifikované identifikační panely.

Panel má umožnit spolehlivou identifikaci často se vyskytujících klinicky významných protilátek, např. anti-D, anti-E, anti-c, anti-K anti-Jk^a, anti-Fy^a aj.

Často se vyskytující klinicky závažné protilátky mají poskytovat dobře odlišitelné vzorce reaktivity.

Antigenní profil krvinek by měl, pokud možno, umožnit identifikaci protilátek ve směsi často se vyskytujících specifit, např. anti-D + K.

2.3.6.1 Použití panelu enzymaticky ošetřených diagnostických erytrocytů

Doporučuje se především u protilátek slabě reagujících v NAT nebo u směsí protilátek.

2.3.7 Komplikace při identifikaci protilátek.

Přítomnost tepelných či chladových autoprotilátek, LISS-dependentní protilátky, výskyt protilátek proti antigenům s vysokou a nízkou frekvencí výskytu jsou důvodem k zaslání vzorku do specializované imunohematologické laboratoře nebo do Referenční laboratoře.

2.3.7.1 Pozitivní screening a negativní identifikace

Může se jednat o záměnu vzorku nebo o protilátku proti antigenu s nízkou frekvencí výskytu.

2.3.7.2 Přítomnost nespecifických autoprotilátek

U nálezu nespecifických autoprotilátek je třeba pomocí adsorpčních a elučních testů vyloučit případnou přítomnost nepravidelné protilátky (s reakcemi zakrytými nespecifickou autoprotilátkou).

2.4 Ověření výsledku vyšetření protilátek

2.4.1 Všechny výsledky je nutno, kde je to možné, porovnat s výsledky minulých vyšetření. Tato kontrola může upozornit na event. možnou záměnu a umožní posouzení vývoje event. protilátkového nálezu.

2.4.2 Každá diskrepance proti minulým nálezům musí být objasněna před vydáním výsledku.

2.4.3 Diskrepance, mající původ v selhání lidského faktoru a/nebo používaného testu, je nutno zaznamenat a analyzovat.

2.5 Určení dalších antigenů erytrocytů pacienta

Je-li identifikována specifická protilátka, má se provést vyšetření odpovídajícího antigenu.

Je-li výsledek testování pozitivní, pak se jedná o:

a) autologní protilátku (měl by být pozitivní PAT),
b) navázání Ig na povrch erytrocytů (platí pro testování antigenu za pomocí AGH), PAT je pozitivní,
c) nesprávně určenou specifitu protilátky.

Kontroly

Pozitivní kontrola: heterozygotní zastoupení daného antigenu

Negativní kontrola: bez přítomnosti daného antigenu

Pokud se nejedná o diagnostické sérum třídy IgM bez „potenciátorů“, doporučuje se zařadit do testování kontrolní reagencii s diluentem bez specifické účinnosti nebo AB sérum. V případě pozitivního výsledku této kontroly nelze považovat výsledek stanovení daného antigenu za validní.

Sérologickou diagnostiku lze v indikovaných případech doplnit nebo nahradit stanovením genotypu (ověřeným validovaným postupem – PCR-SSP, microarray BloodChip, aj.).

2.6 Autologní protilátky

Mnoho autologních protilátek (autoprotilátek) nezpůsobuje žádné klinické problémy. U pacientů s autoimunitní hemolytickou anémií (AIHA) způsobují autoprotilátky zkrácené přežívání vlastních erytrocytů.

Sérologická vyšetření by měla být zaměřena především na správné stanovení krevní skupiny AB0 RhD, případně dalších klinicky významných antigenů (např. Rh fenotyp, Kell) a na možnou přítomnost aloprotilátek.

2.6.1 Chladová AIHA

Typický je silně pozitivní PAT s anti-komplementární složkou (anti-C3d). Erytrocyty by se před testováním měly promýt při 37 °C, aby se odstranily protilátky třídy IgM. Je důležité vyloučit přítomnost aloprotilátek za použití odděleně ohřátých erytrocytů a séra / plazmy při 37 °C. Užitečné může být použití anti-IgG místo polyspecifického AGH.

2.6.2 Tepelná AIHA

Typická je pozitivita anti-IgG, resp. anti-IgG+anti-C3d.

Doporučuje se provést autoadsorpční test s erytrocyty pacienta pro odlišení případné aloprotilátky, pokud nebyl pacient v nedávné době transfundován. Vhodné je předem elucí odstranit autoprotilátky z erytrocytů pacienta a erytrocyty enzymaticky je ošetřit. V případě nedávné transfuze erytrocytů lze provést aloadsorpci s fenotypově vhodnými dárcovskými erytrocyty.

2.7 Test kompatibility

Postupy jsou uvedeny v doporučení STL2011_08.

3 Použité zkratky

AIHA = autoimunitní hemolytická anémie

proLékaře.cz | 10.9.2025

EHK = externí hodnocení kvality
ET = enzymový test
LISS = roztok o nízké iontové síle
NAT = nepřímý antiglobulinový test
PAT = přímý antiglobulinový test
PCR = polymerázová řetězová reakce

4 Přílohy

Příloha 1. Kontrola jednotlivých šarží diagnostik.
Příloha 2. Denní kontrola kvality imunohematologické diagnostiky.
Příloha 3. Verifikace kvalitativních imunohematologických metod.

Literatura

1. *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 16th edition, Strasbourg, Council of Europe, 2011.*
2. *Guidelines for compatibility procedures in blood transfusion laboratories. Transfusion Medicine 2004; 14: 59-73.*
3. *Technical Manual. 16th edition. AABB Press 2008.*
4. *Klein HG, Anstee DJ. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Eleventh Edition, Blackwell Publishing 2005.*

Příloha 1. Kontrola jednotlivých šarží diagnostik.

Kontrolovaný parametr	Požadavky na kvalitu
Diagnostické erytrocyty A_1, B	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádná hemolýza či zákal v supernatantu
Reaktivita a specificita	Reakce s diagnostickými séry anti-A, -B. Reakce musí být jednoznačné a odpovídat před pokládanému antigenu.
Diagnostické erytrocyty pro screening antierytrocytových protilátek	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádná hemolýza či zákal v supernatantu
Reaktivita a specificita[1]	Viz denní kontrola.
Diagnostické erytrocyty pro identifikaci antierytrocytových protilátek	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádná hemolýza či zákal v supernatantu
Monoklonální diagnostická séra anti-A, -B, -AB	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádná hemolýza, precipitáty, částice, tvorba gelu
Reaktivita a specificita[1]	Žádné falešné reaktivity, imunitní hemolýza, rulování, prozóna.
	Kontrolní materiál: viz denní kontrola.
Diagnostická séra anti-D	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádná hemolýza, precipitáty, částice, tvorba gelu
Reaktivita a specificita[1]	Žádné falešné reaktivity, imunitní hemolýza, rulování, prozóna.
	Kontrolní materiál: viz denní kontrola.
Diagnostická séra anti-C, -E, -c, -e, -K	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádná hemolýza, precipitáty, částice, tvorba gelu
Reaktivita a specificita[1]	Žádné falešné reaktivity, imunitní hemolýza, rulování, prozóna.
	Kontrolní materiál: viz denní kontrola.
AGH, karty pro sloupcovou aglutinaci s AGH	
Vzhled	Namátková vizuální kontrola: žádné precipitáty, částice, tvorba gelu, porušení gelového sloupce, vysychání gelu
Reaktivita a specificita[1]	Žádné falešné reaktivity, bez hemolytického působení.
	Viz denní kontrola – screening protilátek.
Fyziologický roztok (0,9% roztok NaCl)	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádný zákal, precipitáty, částice
Obsah NaCl[2]	0,154 mol/l (= 9 g/l)
pH[2]	6,6–7,6
LISS	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádný zákal nebo částice
pH[2]	6,7 (6,5–7,0)
Proteázy	
Vzhled	Vizuální kontrola: žádný zákal, precipitáty, částice, tvorba gelu
Reaktivita[2]	Žádná hemolýza či aglutinace při použití AB séra, aglutinace erytrocytů senzibilizovaných slabou protilátkou IgG anti-D; žádná aglutinace či hemolýza při použití nesenzibilizovaných erytrocytů

[1]je možné jako součást denní kontroly
[2]garantuje výrobce

proLékaře.cz | 10.9.2025

Příloha 2. Denní kontrola kvality imunohematologické diagnostiky.

Parametr	Kontrolovaný materiál	Kontrolní materiál	Četnost kontrol
Stanovení antigenů AB0	Diagnostická séra anti-A, anti-B, event. anti-AB	1x erytrocyty 0, A_1, B	Min. 1x denně, pokud není změna sér
Stanovení protilátek anti-A, -B	Diagnostické erytrocyty A_1, B.	Známé sérum/plazma s anti-A, anti-B (krevní skupina 0)	Min. 1x denně, pokud není změna erytrocytů
Stanovení antigenu D	Diagnostická séra anti-D.	1x erytrocyty RhD pozitivní, RhD negativní	Min. 1x denně, pokud není změna sér
Stanovení fenotypu Rh a ostatních systémů	Diagnostická séra pro testování dalších erytrocytových antigenů.	*Pozitivní kontrola:* erytrocyty s daným antigenem v heterozygotním zastoupení (kde je to aplikovatelné). Výsledkem musí být jasná aglutinační reakce s erytrocyty nesoucími antigen odpovídající specifitě protilátky. *Negativní kontrola:* bez daného antigenu. Výsledkem musí být negativní reakce.	Min. 1x denně
Screening protilátek pacienti	Diagnostické erytrocyty pro screening protilátek proti erytrocytům.	*Pozitivní kontrola:* sérum/plazma se známou aloprotilátkou (např. protilátka anti-D s nízkým titrem; event. doplnit anti-Fy^a nebo anti-K apod.) *Negativní kontrola:* např. AB sérum; sérum/plazma bez protilátek proti erytrocytům	Min. 1x denně
Test kompatibility	-	-	EHK

Pozn. Denně v tomto kontextu znamená „v den, kdy je dané stanovení prováděno“. EHK = externí hodnocení kvality.

Příloha 3. Verifikace kvalitativních imunohematologických metod.
Název zkušební metody: ***Vyšetření krevní skupiny AB0***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	33 vzorků se známou krevní skupinou (vyšetření jak aglutinogenů, tak aglutininů): 10x A 10x B 10x 0 3x AB (alespoň některé by měly být komerční referenční vzorky)	10 vzorků se známou krevní skupinou (vyšetření jak aglutinogenů, tak aglutininů): 3x A 3x B 3x 0 1x AB (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)
Potvrzení reprodukovatelnosti	– 6 vzorků: 2 x A, 2 x B, 2 x 0 – vyšetření opakovat 2x v různých dnech	– 3 vzorky: 1 x A, 1 x B 1 x 0 – vyšetření opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	3 referenční vzorky (obvykle komerční): A, B, 0	3 referenční vzorky (obvykle komerční): A, B, 0
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK, frekvence min. 2x ročně

Pokud laboratoř provádí vyšetření AB0 různými metodami, validuje / verifikuje každou z nich a to v rozsahu, který odpovídá vyšetřovaným znakům

proLékaře.cz | 10.9.2025

Název zkušební metody: ***RhD***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	20 vzorků se známou krevní skupinou, z toho: • min. 5x D negativní • doporučují se 2x $D^{w/v}$ (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)	10 vzorků se známou krevní skupinou, z toho: • min. 3x D negativní • doporučuje se 1x $D^{w/v}$ (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)
Potvrzení reprodukovatelnosti	6 vzorků: z toho 3x RhD pozitivní, 3x RhD neg. – opakovat 2x v různých dnech (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)	4 vzorky: 2x RhD pozitivní, 2x RhD neg. opakovat 2x v různých dnech (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	4 referenční vzorky (obvykle komerční): 2x RhD pozitivní, 2x RhD neg.	4 referenční vzorky (obvykle komerční): 2x RhD pozitivní, 2x RhD neg.
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK

Název zkušební metody: ***Rh fenotyp (CcEe), Kell (K)***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	10 vzorků se známou hodnotou pro každý prověřovaný antigen: 5 negativních, 5 pozitivních (heterozygotní) (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)	6 vzorků se známou hodnotou pro každý prověřovaný antigen: 3 negativní, 3 pozitivní (heterozygotní) (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)
Potvrzení reprodukovatelnosti	4 vzorky pro každý prověřovaný antigen: – 2x pozitivní (heterozygot) a 2x negativní – opakovat 2x v různých dnech (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)	4 vzorky pro každý prověřovaný antigen: – 2x pozitivní (heterozygot) a 2x negativní – opakovat 2x v různých dnech (s výhodou lze použít komerční referenční vzorky)
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	4 referenční vzorky pro každý antigen: – 2x pozitivní (heterozygot) a 2x negativní	4 referenční vzorky pro každý antigen: – 2x pozitivní (heterozygot) a 2x negativní
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK, frekvence min. 2x ročně

Jako výchozí materiál se použije plná krev nebo segmenty transfuzních přípravků (erytrocyty)

Název zkušební metody: ***fenotyp Cw***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	6 vzorků se známou hodnotou: z toho 3 negativní, 3 pozitivní (heterozygotní)	4 vzorky se známou hodnotou: 2 negativní, 2 pozitivní (heterozygotní)
Potvrzení reprodukovatelnosti	4 vzorky: 2 pozitivní a 2x negativní – opakovat 2x v různých dnech	2 vzorky: – 1x pozitivní a 1x negativní opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	neověřuje se	neověřuje se
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK

použije se plná krev, segment vaku (erytrocyty)

proLékaře.cz | 10.9.2025

Název zkušební metody: ***Nepřímý antiglobulinový test – screening protilátek u dárce krve***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	20 vzorků se známou hodnotou: 15 negativních, 5 pozitivních (klinicky významné protilátky alespoň dvou různých specifit, z toho alespoň jeden vzorek referenčního / komerčního séra se slabou protilátkou cca 0,05 IU/ml)	10 vzorků se známou hodnotou: 7 negativní 3 pozitivní (klinicky významné protilátky alespoň dvou různých specifit, z toho alespoň jeden vzorek referenčního / komerčního séra se slabou protilátkou cca 0,05 IU/ml)
Potvrzení reprodukovatelnosti	– 3 vzorky pozitivní, protilátky alespoň dvou různých klinicky významných specifit, z toho alespoň jeden vzorek referenčního (komerčního) séra se slabou protilátkou (cca 0,05 IU/ml) – 3 vzorky negativní – opakovat 2x v různých dnech	– 3 vzorky pozitivní, protilátky alespoň dvou různých klinicky významných specifit z toho alespoň jeden vzorek referenčního (komerčního) séra se slabou protilátkou (cca 0,05 IU/ml) – 3 vzorky negativní – opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	3 referenční vzorky pozitivní (alespoň 2 různé klinicky významné specifity protilátek, z toho jeden vzorek se slabou protilátkou cca 0,05 IU/ml) 3 referenční vzorky negativní	3 referenční vzorky pozitivní (alespoň 2 různé klinicky významné specifity protilátek, z toho jeden vzorek se slabou protilátkou cca 0,05 IU/ml) 3 referenční vzorky negativní
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK, frekvence min. 2x ročně

použije se plná krev nebo sérum/plazma

Název zkušební metody: ***Nepřímý antiglobulinový test – screening protilátek u pacienta***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	10 vzorků se známou hodnotou: 5 negativních, 5 pozitivních (protilátky alespoň 2 různých klinicky významných specifit, z toho jeden vzorek kontrolního / komerčního séra se slabou klinicky významnou protilátkou cca 0,05 IU/ml)	6 vzorků se známou hodnotou: 3 negativní, 3 pozitivní (protilátky alespoň 2 různých klinicky významných specifit, z toho jeden vzorek kontrolního / komerčního séra se slabou klinicky významnou protilátkou cca 0,05 IU/ml)
Potvrzení reprodukovatelnosti	– 3 vzorky negativní – 3 vzorky pozitivní, protilátky alespoň dvou různých klinicky významných specifit z toho, alespoň jeden vzorek kontrolního (komerčního) séra se slabou protilátkou klinicky významnou (cca 0,05 IU/ml) – opakovat 2x v různých dnech	– 3 vzorky negativní – 3 vzorky pozitivní, protilátky alespoň dvou různých klinicky významných specifit z toho alespoň jeden vzorek kontrolního (komerčního) séra se slabou klinicky významnou protilátkou (cca 0,05 IU/ml) – opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	3 referenční vzorky pozitivní, protilátky alespoň dvou různých klinicky významných specifit z toho alespoň jeden vzorek se slabou klinicky významnou protilátkou (cca 0,05 IU/ml) 3 referenční vzorky negativní	3 referenční vzorky pozitivní, protilátky alespoň dvou různých klinicky významných specifit z toho alespoň jeden vzorek se slabou klinicky významnou protilátkou (cca 0,05 IU/ml) 3 referenční vzorky negativní
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK, frekvence min. 2x ročně

použije se plná krev nebo sérum/plazma

proLékaře.cz | 10.9.2025

Název zkušební metody: ***Nepřímý antiglobulinový test – test kompatibility***
(zachovává se AB0 shoda mezi sérem / plazmou a transfuzním přípravkem)

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	15 sad "erytrocyty + sérum / plazma": – 3x sérum/plazma bez protilátky – 3x sérum/plazma s protilátkou (alespoň jednou by mělo jít o referenční /komerční vzorek se slabou klinicky významnou protilátkou cca 0,05 IU/ml) a u každého vzorku 2x test kompatibility s erytrocytovými transfuzními přípravky, které znak odpovídající protilátce neobsahují, a 2x test kompatibility s erytrocytovými transfuzními přípravky, které znak odpovídající protilátce obsahují	6 sad "erytrocyty + sérum / plazma": – 2x sérum/plazma bez protilátky – 2x sérum/plazma s protilátkou (alespoň jednou by mělo jít o referenční /komerční vzorek se slabou klinicky významnou protilátkou cca 0,05 IU/ml) a u každého vzorku test kompatibility s erytrocytovým transfuzním přípravkem, který znak odpovídající protilátce neobsahuje, a test kompatibility s erytrocytovým transfuzním přípravkem, který znak odpovídající protilátce obsahuje
Potvrzení reprodukovatelnosti	– 2 vzorky pozitivní, z toho jeden referenční / komerční) vzorek se slabou klinicky významnou protilátkou cca 0,05 IU/ml) – reakce s erytrocytovými transfuzními přípravky, které obsahují znak odpovídající protilátce – 1 vzorek negativní – opakovat 2x v různých dnech	– 2 vzorky pozitivní, z toho jeden referenční / komerční) vzorek se slabou klinicky významnou protilátkou cca 0,05 IU/ml) – reakce s erytrocytovými transfuzními přípravky, které obsahují znak odpovídající protilátce – 1 vzorek negativní – opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	neověřuje se	neověřuje se
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK, frekvence min. 2x ročně

Název zkušební metody: ***Přímý antiglobulinový test***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	5 vzorků se známým výsledkem: 3 negativní, 2 pozitivní z toho alespoň jeden vzorek kontrolních (komerčních) erytrocytů PAT+	3 vzorky se známým výsledkem: 2x negativní, 1x pozitivní (optimálně vzorek kontrolních komerčních erytrocytů PAT+)
Potvrzení reprodukovatelnosti	3 vzorky pozitivní, 3 vzorky negativní opakovat 2x v různých dnech	3 vzorky pozitivní, 3 vzorky negativní opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	5 referenčních vzorků: 3 negativní, 2 PAT pozitivní (z toho alespoň jeden vzorek referenčních, komerčních erytrocytů PAT+, může být použita suspenze erytrocytů)	3 referenční vzorky: 2 negativní, 1 pozitivní (optimálně vzorek referenčních, komerčních erytrocytů PAT+, může být použita suspenze erytrocytů)
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK, frekvence min. 2x ročně

Název zkušební metody: ***Test na slabé D u dárce krve***

Rozsah verifikace	Vstupní verifikace	Následná roční pravidelná verifikace
Potvrzení správnosti	6 vzorků se známým výsledkem: – 3x $D^{w/v}$ pozitivní, 3x D negativní	4 vzorky se známým výsledkem: – 2x $D^{w/v}$ pozitivní, 2x D negativní
Potvrzení reprodukovatelnosti	4 vzorky: 2x $D^{w/v}$ pozitivní, 2x D negativní opakovat 2x v různých dnech	2 vzorky. 1x $D^{w/v}$ pozitivní, 1x D negativní opakovat 2x v různých dnech
Potvrzení návaznosti (referenční vzorky)	4 referenční vzorky: 2x $D^{w/v}$ pozitivní, 2x D negativní (1x může být použita suspenze $D^{w/v}$ pozitivních erytrocytů)	2 vzorky. 1x $D^{w/v}$ pozitivní, 1x D negativní
Potvrzení návaznosti v EHK	Externí hodnocení kvality např. SEKK – přihlášení k účasti	Externí hodnocení kvality např. SEKK

proLékaře.cz | 10.9.2025

Poznámky / výklad

– **správnost:** s použitím vzorků o známé hodnotě se ověřuje, že výsledek je takový, jaký má být (tj. stejný, jako vyšel dosud používanou metodou apod., lze použít i "referenční vzorky", ale těch je obvykle málo)
– **reprodukovatelnost** (= „mezidenní" opakovatelnost): ověřuje se, že se při měření v různé dny dostane stejný výsledek
– **návaznost:** ověřuje se, že výsledek je stejný, jako by dostal někdo jiný. Provádí se dvěma způsoby – jednak se vyšetří "referenční vzorky", jednak se laboratoř zapojí do systému "externího hodnocení kvality"(podle uspořádání testu a volby vzorku / vyšetřovaného materiálu lze ověřovat parametry "správnost / návaznost / reprodukovatelnost" současně = týmž vyšetřením, zejména pokud se využije komerčních vzorků určených pro kontrolu kvality)
– **referenční vzorek:** vzorek určený k vyšetření (= ke kontrole kvality), u kterého "kontrolní autorita" / výrobce garantují deklarovanou hodnotu / správný výsledek. (Pozor: tyto parametry obvykle nesplňují "diagnostické krvinky" nebo "diagnostická séra")
– pro **následnou / roční pravidelnou verifikaci** lze využít výsledky opakované / pravidelné (např. denní) kontroly kvality – v takovém případě se de facto v danou chvíli (= 1x za rok) vyhodnotí denně prováděná kontrolní vyšetření
– v případě **nevyhovujících výsledků verifikace** je nutné prověřit metodu, analyzovat příčiny selhání, odstranit závady..., a pak verifikaci provést znovu
– tam, kde **nejsou dostupné** komerční vzorky, použijí se vnitřní kontrolní vzorky