****

**Serija pogodb Sveta Evrope - št. 39 in št. 111**

**Evropski sporazum o izmenjavi reagentov za določanje krvnih skupin**

(Uradni list RS, št. 78/2000 z dne 1. 9. 2000)

Vlade podpisnice držav članic Sveta Evrope so se

glede na to, da reagenti za določanje krvnih skupin niso na voljo v neomejenih količinah,

glede na to, da je nadvse zaželeno, da si države članice v duhu evropske solidarnosti med seboj pomagajo pri oskrbi z reagenti za določanje krvnih skupin, če se pokaže potreba po njih,

glede na to, da je taka medsebojna pomoč možna le, če glede lastnosti in uporabe reagentov za določanje krvnih skupin veljajo pravila, ki jih skupaj določijo države članice, in če se pri uvozu odobrijo ustrezne olajšave in oprostitve,

sporazumele o naslednjem:

**1. člen**

V tem sporazumu se izraz "reagenti za določanje krvnih skupin" nanaša na reagente človeškega, živalskega, rastlinskega in drugega izvora, ki se uporabljajo za določanje krvnih skupin in za odkrivanje krvnih neskladnosti.

Pogodbenica lahko z izjavo generalnemu sekretarju Sveta Evrope ob podpisu tega sporazuma ali ob deponiranju svoje listine o ratifikaciji, odobritvi ali pristopu omeji uporabo tega sporazuma na reagente za določanje krvnih skupin človeškega izvora. To izjavo lahko kadar koli umakne z uradnim obvestilom generalnemu sekretarju Sveta Evrope.

**2. člen**

Pogodbenice se zavezujejo, da dajo reagente za določanje krvnih skupin na voljo drugim pogodbenicam, ki jih nujno potrebujejo, če imajo dovolj zalog za lastne potrebe, in da zaračunajo le stroške zbiranja, predelave in prevoza teh snovi ter morebitne stroške njihovega nakupa.

**3. člen**

Reagenti za določanje krvnih skupin se dajo drugim pogodbenicam na voljo pod pogojem, da z njimi ne ustvarjajo dobička, da jih uporabljajo izključno v medicinske namene in da jih dobavljajo le organom, ki jih določijo njihove vlade

**4. člen**

Pogodbenice potrjujejo, da upoštevajo določbe protokola k temu sporazumu.

Izpolnjujejo tudi pravila, ki so jih sprejele glede na mednarodno standardizacijo na tem področju.

Vsem pošiljkam reagentov za določanje krvnih skupin mora biti priložen certifikat, ki potrjuje, da so bili pripravljeni v skladu s specifikacijami v protokolu. Ta certifikat je narejen po vzorcu iz priloge k protokolu.

Protokol in njegova priloga sta upravni dogovor, zato ju lahko vlade pogodbenic tega sporazuma spremenijo ali dopolnijo.

**5. člen**

Pogodbenice ukrenejo vse potrebno, da so reagenti za določanje krvnih skupin, ki jim jih dajo na voljo druge pogodbenice, oproščeni vseh uvoznih dajatev.

Prav tako ukrenejo vse potrebno, da omogočijo hitro dobavo teh snovi po najkrajši poti prejemnikom, omenjenim v 3. členu tega sporazuma.

**6. člen**

Pogodbenice si po generalnem sekretarju Sveta Evrope pošljejo seznam organov, pooblaščenih za izdajo certifikatov, določenih v 4. členu tega sporazuma.

Prav tako pošljejo seznam organov, pooblaščenih za distribucijo uvoženih reagentov za določanje krvnih skupin. Če je mogoče, naj bodo ti organi isti kot v 6. členu Evropskega sporazuma o izmenjavi zdravilnih učinkovin človeškega izvora.

**7. člen**

Ta sporazum je na voljo za podpis članicam Sveta Evrope, ki lahko postanejo njegove pogodbenice s:

a) podpisom brez pridržka glede ratifikacije ali odobritve ali

b) podpisom s pridržkom glede ratifikacije ali odobritve, ki mu sledi ratifikacija ali odobritev.

Listine o ratifikaciji ali odobritvi se deponirajo pri generalnem sekretarju Sveta Evrope.

 **8. člen**

Ta sporazum začne veljati en mesec po dnevu, ko tri članice Sveta v skladu s 7. členom tega sporazuma podpišejo sporazum brez pridržka glede ratifikacije ali odobritve ali ga ratificirajo ali odobrijo.

Za vsako članico Sveta, ki pozneje podpiše sporazum brez pridržka glede ratifikacije ali odobritve ali ki ga ratificira ali odobri, začne sporazum veljati en mesec po dnevu podpisa ali dnevu deponiranja listine o ratifikaciji ali odobritvi.

**9. člen**

Odbor ministrov Sveta Evrope lahko po začetku veljavnosti tega sporazuma povabi katero koli državo nečlanico, da pristopi k temu sporazumu. Pristop začne veljati en mesec po dnevu deponiranja listine o pristopu pri generalnem sekretarju Sveta Evrope.

**10. člen**

Generalni sekretar Sveta Evrope uradno obvesti članice Sveta in države, ki so pristopile k sporazumu, o:

a) datumu začetka veljavnosti tega sporazuma in imenih tistih članic, ki so ga podpisale brez pridržka glede ratifikacije ali odobritve ali ki so ga ratificirale ali odobrile,

b) deponiranju vsake listine o pristopu v skladu z določbami 9. člena,

c) vsaki izjavi ali uradnem obvestilu, prejetem v skladu z določbami drugega odstavka 1. člena,

d) vsakem uradnem obvestilu, prejetem v skladu z določbami 11. člena, in o datumu začetka njegove veljavnosti,

e) vsaki spremembi protokola in njegove priloge po četrtem odstavku 4. člena.

**11. člen**

Ta sporazum velja nedoločen čas.

Vsaka pogodbenica lahko preneha uporabljati sporazum eno leto po uradnem obvestilu generalnemu sekretarju Sveta Evrope.

V potrditev tega so podpisani, ki so jih njihove vlade za to pravilno pooblastile, podpisali ta sporazum.

Sestavljeno v Strasbourgu 14. maja 1962 v angleškem in francoskem jeziku, pri čemer sta besedili enako verodostojni, v enem izvodu, ki se hrani v arhivu Sveta Evrope. Generalni sekretar pošlje overjene kopije vladam podpisnic in vladam tistih držav, ki pristopijo k temu sporazumu.

**PROTOKOL K EVROPSKEMU SPORAZUMU O IZMENJAVI REAGENTOV ZA DOLOČANJE KRVNIH SKUPIN**

**SPLOŠNE DOLOČBE**

**1. Specifičnost**

Reagenti za določanje krvnih skupin1 morajo reagirati z vsemi testiranimi krvnimi vzorci, ki vsebujejo antigen, ustrezen protitelesu ali drugi snovi, navedeni na etiketi.

Kadar se reagent uporablja skladno z metodo, ki jo priporoča proizvajalec, ne sme biti znakov za nobenega od naslednjih dejavnikov ali pojavov:

a) hemolitične lastnosti,

b) protitelesa ali druge snovi poleg navedenih na etiketi,

c) bakterijske produkte, ki bi lahko povzročili lažno pozitivne ali lažno negativne reakcije,

d) psevdoaglutinacijo s tvorjenjem rolojev,

e) prozonske pojave.

**2. Jakost**

Titer reagenta merimo z zaporednimi dvakratnimi razredčitvami reagenta, ki ga preverjamo v ustreznem mediju. K vsaki razredčini dodamo enak volumen suspenzije rdečih krvnih celic. Titer je recipročna vrednost števila, ki predstavlja največje razredčenje reagenta, pri katerem nastopi reakcija. Pri izračunu razredčitve ne upoštevamo volumna suspenzije krvnih celic v skupnem volumnu.

Pri reagentih anti-A, anti-B kot tudi drugih, ki so za uporabo na stekleni ploščici, avidnost izrazimo s časom, ki je potreben za aglutinacijo na stekleni ploščici.
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
1 Ob sprejemanju te različice protokola in pripadajočih prilog so se predstavniki pogodbenic dogovorili, da v angleškem besedilu sporazuma izraz "blood incompatibilities" pomeni "blood grouping incompatibilities".

Dogovorjeno je bilo tudi, da je treba izraz "blood-grouping" z vezajem v angleškem besedilu sporazuma in protokola razumeti kot "blood grouping" brez vezaja.

**3. Mednarodni standardi in mednarodne enote**

Mednarodne standarde je določila Svetovna zdravstvena organizacija za reagente
anti-A in anti-B ter nekompletne reagente anti-D za določanje krvnih skupin; v postopku določanja so še standardi za reagente za določanje krvnih skupin drugih specifičnosti. Mednarodni standardni pripravek po definiciji vsebuje določeno število mednarodnih enot na mg ali ml; ta definicija je neodvisna od titrov, ugotovljenih z dodanimi določenimi suspenzijami1 rdečih krvnih celic.

**4. Stabilnost in rok uporabnosti**

Vsak reagent mora obdržati zahtevane lastnosti najmanj eno leto, kadar je shranjen pod pogoji, ki jih priporoča proizvajalec.

Rok uporabnosti reagenta v tekoči obliki, kot je označen na etiketi, ni daljši od enega leta od dneva zadnjega preverjanja njegove jakosti, ki zadosti zahtevam. S ponavljanjem preverjanja jakosti se rok njegove uporabnosti vsakokrat lahko podaljša za eno leto.

Rok uporabnosti reagentov v dehidrirani obliki, kot je naveden na etiketi, je v skladu z ugotovitvami preizkusov njihove stabilnosti in ga potrdijo državni kontrolni organi.
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
1 Jakost reagentov za določanje krvnih skupin večine specifičnosti je izražena kot aglutinacijski titer, ugotovljen pri serijskem razredčenju reagenta in z dodano suspenzijo rdečih krvnih celic. Titer označuje zadnje razredčenje reagenta v seriji, ki še kaže mikroskopsko vidno aglutinacijo.
Jakost reagentov za določanje krvnih skupin, za katere obstajajo mednarodni standardni pripravki (trenutno anti-A in anti-B in nepopoln anti-D), se lahko izrazi v mednarodnih enotah\* na podlagi titracije neznanega reagenta v primerjavi z mednarodnim standardom ali državnim podstandardom.

Mednarodni standardni pripravki serumov za določanje krvnih skupin so na voljo v ampulah, ki vsebujejo dehidriran človeški serum. Kadar seruma anti-A in anti-B rekonstituiramo na volumen
1 ml, vsebujeta po definiciji 256 mednarodnih enot na ml. Dobiti ju je mogoče brezplačno pri Mednarodnem laboratoriju za biološke standarde pri Svetovni zdravstveni organizaciji, *Statens Seruminstitut*, Köbenhavn.

Naslednja tabela prikazuje primer primerjalne titracije mednarodnega standardnega seruma anti-A (S) in "neznanega" reagenta anti-A (U) z rdečimi krvnimi celicami A1 in rdečimi krvnimi celicami A2B.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|       | Serum S | Reagent U | Serum S | Reagent U |
| Krvna celica A1 | 1 : 512 | 1 : 128 | 256 | 64 |
| Krv. celica A2B  | 1 : 32 | 1 : 16 | 256 | 128 |
|     | titri (ugotovljeni) | titri (ugotovljeni) | enote (po definiciji) | enote (po primerjavi) |

\* Glej *Bull, World Health Organization 1954, 10, 937, 941 - 1950, 3, 301.*

**5. Shranjevanje**

Reagente za določanje krvnih skupin lahko hranimo v tekočem ali v dehidriranem stanju. Dehidrirane reagente hranimo v atmosferi inertnega plina ali v vakuumu v steklenički, v kateri so bili dehidrirani in ki je zaprta tako, da se prepreči prodiranje vlage. Dehidrirani reagent ne sme izgubiti več kot 0,5 odstotka svoje mase po dodatnem 24-urnem sušenju v prisotnosti fosforjevega pentoksida pri tlaku, ki ne presega 0,02 mm živega srebra.

Reagente pripravljamo v aseptičnih pogojih in ne smejo biti bakteriološko kontaminirani. Za preprečitev rasti bakterij lahko pristojni državni organ odloči, da se reagentu (ali kateri koli raztopini, ki je priložena dehidriranim reagentom) doda antiseptik in/ali antibiotik pod pogojem, da v prisotnosti dodane učinkovine reagent še vedno izpolnjuje zahteve glede specifičnosti in jakosti.

Serumi človeškega izvora za določanje krvnih skupin morajo vsebovati najmanj
2,5 mg proteinskega dušika na ml tekočega ali rekonstituiranega seruma.

Reagenti v tekočem stanju ali po rekonstituciji morajo biti prozorni in ne smejo vsebovati nobene usedline, gela ali vidnih delcev.

**6. Obarvanje**

Reagenti za določanje krvnih skupin za mednarodno izmenjavo naj ne bodo, če je le mogoče, umetno obarvani, vsaj dokler ni dosežen mednarodni dogovor o enotnem sistemu. Kakršen koli dodatek barvila ne sme motiti specifične reakcije.

**7. Odmerjanje in volumen**

Reagente za določanje krvnih skupin pripravimo in razdelimo tako in v takih volumnih, da reagent v eni steklenički poleg izvedbe testov z neznanimi krvnimi celicami zadostuje za izvedbo testov s pozitivnimi in negativnimi kontrolnimi krvnimi celicami. Volumen ene stekleničke je takšen, da vsebina, če je to potrebno, omogoča izvedbo ustreznih testov jakosti, opisanih v tem protokolu.

**8. Dokumentacija in vzorci**

Laboratorij, ki proizvaja reagente, hrani pisno dokumentacijo o vseh fazah proizvodnje in kontrole reagentov za določanje krvnih skupin. Laboratorij hrani ustrezne vzorce vseh izdanih reagentov tako dolgo, da lahko utemeljeno domneva, da serija ni več v uporabi.

**9. Klasifikacija reagentov**

Reagenti, ki se uporabljajo za določanje krvnih skupin, lahko vsebujejo učinkovine človeškega, živalskega, rastlinskega (ali mineralnega) izvora, od katerih so nekatere aktivna sestavina, druge pa so dodatki za povečanje aktivnosti ali vzdrževanje stabilnosti reagentov.

Reagenti so iz tehničnih razlogov razdeljeni v tri kategorije glede na izvor svoje aktivne sestavine. To pa ne pomeni, da reagenti človeškega izvora vsebujejo izključno učinkovine človeškega izvora ali da živalski in rastlinski reagenti ne morejo vsebovati učinkovin človeškega izvora.

**10. Etikete, kontrolni listi in certifikati**

Na vsaki končni steklenički je nalepljena etiketa, natisnjena v angleškem in francoskem jeziku, v črni barvi na belem papirju z naslednjimi podatki:

1. ime in naslov proizvajalca;
2. ime reagenta, kot je navedeno v naslovu ustrezne specifikacije;
3. ime in količina antiseptika in/ali antibiotika, če sta prisotna in/ali navedba njune odsotnosti;
4. volumen, ali če je reagent dehidriran, volumen in sestava tekočine, ki je potrebna za rekonstitucijo;
5. rok uporabnosti;
6. številka serije.

Ta etiketa ali etiketa na kartonski škatli, v kateri je več posameznih stekleničk, ali kontrolni list, ki je priložen stekleničkam, vsebuje naslednje podatke:

1. polno ime in naslov proizvajalca;
2. ime reagenta, kot je navedeno v naslovu ustrezne specifikacije;
3. volumen, ali če je reagent dehidriran,volumen in sestava tekočine, ki je
potrebna za rekonstitucijo;
4. datum zadnjega preverjanja jakosti;
5. rok uporabnosti (če obstaja);
6. številka serije;
7. ustrezen opis načina uporabe, ki ga priporoča proizvajalec;
8. pogoji hranjenja neodprtih ampul in varnostni ukrepi, ki jih je treba upoštevati po
odprtju ampul;
9. natančna sestava, vključno z navedbo antiseptika in/ali antibiotika, če sta dodana;
10. izjava o tem, ali izdelek vsebuje snovi človeškega izvora ali ne.

Vsaki pošiljki je priložen certifikat, kot je navedeno v 4. členu sporazuma in v prilogi k temu protokolu. Vzorca etikete in kontrolnega lista sta priložena temu protokolu.

**POSEBNE DOLOČBE
A) SERUMI ZA DOLOČANJE KRVNIH SKUPIN ČLOVEŠKEGA IZVORA**

**a) Serumi človeškega izvora za določanje krvnih skupin AB0**

i) *Serum anti-A za določanje krvnih skupin (humani)*

Serum anti-A pridobivamo iz krvi izbranih oseb skupine B, ki so bile imunizirane ali ne z rdečimi krvnimi celicami skupine A ali s specifično učinkovino skupine A. Serum anti-A aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen A, to je krvne celice krvnih skupin A in AB, vključno s podskupinami A1, A2, A1B in A2B, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena A, to je krvnih celic krvnih skupin 0 in B.

JAKOST

Titracija
Serum anti-A titriramo ločeno za suspenzije krvnih celic A1, A2 in A2B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim referenčnim pripravkom. Jakost seruma je v vsakem primeru najmanj 64 mednarodnih enot na ml.

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-A na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic A1, A2 in A2B z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se mora aglutinacija pojaviti v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo.

ii) *Serum anti-B za določanje krvnih skupin (humani)*

Serum anti-B pridobivamo iz krvi izbranih oseb skupine A, ki so bile imunizirane ali ne z rdečimi krvnimi celicami skupine B ali s specifično učinkovino skupine B. Serum anti-B aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen B, to je krvne celice krvnih skupin B in AB, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena B, to je krvnih skupin 0 in A.

JAKOST

Titracija
Serum anti-B titriramo in dodamo suspenzijo krvnih celic skupine B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim referenčnim pripravkom. Jakost seruma je najmanj 64 mednarodnih enot na ml.

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-B na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic skupine B z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se mora aglutinacija pojaviti v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo.

iii) *Serum anti-A + anti-B (skupina 0) za določanje krvnih skupin(humani)*

Serum anti-A + anti-B (skupina 0) pridobivamo iz krvi izbranih oseb skupine 0, ki so bile imunizirane ali ne z rdečimi krvnimi celicami skupine A in skupine B ali s specifičnima učinkovinama skupine A in skupine B. Serum anti-A + anti-B (skupina 0) aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigene A ali B ali oboje, to je krvne celice skupine A vključno s podskupinama A1 in A2, skupine B in skupine AB vključno s podskupinama A1B in A2B, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigenov A ali B, to je krvnih celic skupine 0. Aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen Ax (Ay ali A o) (ki jih serum anti-A, pridobljen iz krvi krvodajalcev skupine B, običajno ne aglutinira).

JAKOST

Titracija
Serum anti-A + anti-B (skupina 0) titriramo ločeno za suspenziji krvnih celic A1 in A2 vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim standardnim pripravkom. Titriramo ga tudi s suspenzijo krvnih celic skupine B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim standardnim pripravkom.

Jakost seruma je v vseh primerih najmanj 64 mednarodnih enot na ml.

Nerazredčeni serum anti-A + anti-B (skupina **0**) za določanje krvnih skupin prav tako omogoča ugotavljanje aglutinacije rdečih krvnih celic skupine Ax (Ay ali Ao).

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-A + anti- B (skupina 0) na stekleni ploščici zmešamo z enakima volumnoma suspenzij celic A1 in A2 z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija pojavi v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo. Kadar serum anti-A + anti- B (skupina 0) na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic B (skupina 0) z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija pojavi v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo. Kadar serum anti-A + anti-B (skupina 0) na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic Ax (Ay ali Ao ) z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija pojavi v največ 5 minutah pri temperaturi od 18 C do 25 C.

**b) Serumi človeškega izvora za določanje krvnih skupin Rh**

Serumi anti-Rh za določanje krvnih skupin, kakršna koli že je njihova specifičnost, so dveh vrst, ki se razlikujeta v pogojih, pod katerimi dosežemo aglutinacijo homolognih krvnih celic. Določeni serumi, splošno znani kot "kompletni", aglutinirajo krvne celice, suspendirane v fiziološki raztopini. Pri drugih, splošno znanih kot "nekompletni", lahko dosežemo aglutinacijo le v prisotnosti določenih koloidov, kot je goveji albumin, ali s pomočjo drugih posebnih metod. Serume je treba uporabljati pod pogoji, kot jih podrobno navaja laboratorij, ki je serume pripravil.

Nekateri "nekompletni" serumi aglutinirajo tudi homologne rdeče krvne celice, shranjene v njihovem lastnem serumu ali v plazmi na steklenih ploščicah.

Ko bodo mednarodni standardni pripravki na voljo, bo morda treba revidirati naslednje zahteve glede jakosti serumov za določanje krvnih skupin Rh.

i) S*erum anti-D (anti-Rh0 ) za določanje krvnih skupin (humani)*

Serum anti-D pridobivamo iz krvi ene ali več oseb, imuniziranih z antigenom D sistema Rh. Reagira s človeškimi rdečimi krvnimi celicami, ki vsebujejo antigen D, ne reagirajo pa z rdečimi krvnimi celicami, ki ne vsebujejo antigena D.

JAKOST

Titracija
"Kompletni" serumi anti-D imajo titer najmanj 32 s celicami CcDee, suspendiranimi v raztopini, ki vsebuje 9 gramov natrijevega klorida na liter.

"Nekompletni" serum anti-D titriramo in dodamo krvne celice CcDee vzporedno z rekonstituiranim, toda nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom nekompletnega anti-D (anti-Rh0) ali z enakovrednim referenčnim pripravkom. Njegova jakost je najmanj 32 mednarodnih enot. Poleg reagiranja z vsemi rdečimi krvnimi celicami, ki vsebujejo antigen D, mora serum, kolikor je to mogoče, reagirati s krvnimi celicami, ki vsebujejo antigen Du.

Določanje avidnosti
Serumi anti-D, ki so namenjeni uporabi v Diamondovem in Abelsonovem testu na stekleni ploščici, potem ko smo jih pri približno 40 C na stekleni ploščici zmešali z enakim volumnom 40-50-odstotne suspenzije krvnih celic CcDee, pokažejo vidno aglutinacijo v 30 sekundah, aglutinacija pa mora biti končana v 120 sekundah.

ii) *Serumi anti-C (anti-Rh') za določanje krvnih skupin (humani)*

Serum anti-C pridobivamo iz krvi ene ali več oseb, imuniziranih z antigenom C sistema Rh. Aglutinira suspenzije človeških rdečih krvnih celic, ki vsebujejo antigen C, ne aglutinirajo pa rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena C. V tej zvezi se za antigen C šteje, da vključuje antigen Cw.

Večina diagnostičnih serumov anti-C vsebuje "kompletne" anti-C skupaj z "nekompletnimi" anti-D. Navedeni serumi so zato specifični za antigen C le, kadar so celice, ki jih preverjamo, suspendirane v raztopini, ki vsebuje 9 g/l natrijevega klorida.

JAKOST

Titracija
Serumi anti-C ("kompletni" ali "nekompletni") morajo imeti titer najmanj 8 s krvnimi celicami Ccddee.

Določanje avidnosti
Serumi anti-C, ki so namenjeni uporabi v Diamondovem in Abelsonovem testu na stekleni ploščici (in ki ne smejo vsebovati nobene oblike anti-D), morajo pokazati, potem ko smo jih pri približno 40 C na stekleni ploščici zmešali z enakim volumnom suspenzije celic Ccddee z volumensko frakcijo od 0,4 do 0,5, vidno aglutinacijo v 30 sekundah, aglutinacija pa mora biti končana v 120 sekundah.

iii) *Serumanti-E (anti-rh'') za določanje krvnih skupin (humani)*

Serum anti-E pridobivamo iz krvi ene ali več oseb, imuniziranih z antigenom E sistema Rh. Reagira s človeškimi rdečimi krvnimi celicami, ki vsebujejo antigen E.

JAKOST

Titracija
Serumi anti-E ("kompletni" ali "nekompletni") morajo imeti titer najmanj 8 s krvnimi celicami ccddEe.

Določanje avidnosti
Serumi anti-E, ki so namenjeni uporabi v Diamondovem in Abelsonovem testu na stekleni ploščici (in ki ne smejo vsebovati nobene oblike anti-D), morajo pokazati, potem ko smo jih pri približno 40 C na stekleni ploščici zmešali z enakim volumnom suspenzije krvnih celic ccddEe z volumensko frakcijo od 0,4 do 0,5, vidno aglutinacijo v 30 sekundah, aglutinacija pa mora biti končana v 120 sekundah.

iv) *Serum anti-D + C (anti-Rh0rh') za določanje krvnih skupin (humani)
Serum anti-D + E (anti-Rh0rh'') za določanje krvnih skupin(humani)*Serume specifičnosti anti-D + C in specifičnosti anti-D + E pridobivamo neposredno iz krvi imuniziranih posameznikov, lahko pa jih pripravimo z mešanjem seruma anti-D s serumom anti-C ali anti-E. V danem serumu morajo biti oboja protitelesa aktivna hkrati pod pogoji reakcije, ki jih podrobno navaja proizvajalec. Vsak serum mora reagirati z vsemi vrstami rdečih krvnih celic, ki bi reagirale z enimi ali drugimi vsebovanimi protitelesi, ne smejo pa reagirati z rdečimi krvnimi celicami, ki ne vsebujejo niti antigena C ali D v primeru anti-D + C niti antigena D ali E v primeru anti-D + E. Titri morajo biti najmanj taki, kot so navedeni za posamezna protitelesa, toda v primeru anti-D + C (ki je pogosta kombinacija v serumu imuniziranih oseb) je zaželeno, da je titer anti-C najmanj 32, in v primeru anti-D + E je zaželeno, da je titer anti-E najmanj 8. Kadar je serum namenjen uporabi v Diamondovem in Abelsonovem testu na stekleni ploščici, morajo biti časi aglutinacije za vse reaktivne vrste rdečih krvnih celic najmanj taki, kot so navedeni za posamezna protitelesa.

**B. REAGENTI, KI NISO ČLOVEŠKEGA IZVORA**

**a) Serumi živalskega izvora**

i) *Serum anti-A za določanje krvnihskupin(živalski)*

Serum anti-A pridobivamo iz krvi živali, ki so bile imunizirane ali ne z rdečimi krvnimi celicami skupine A ali s specifičnimi učinkovinami skupine A. Serum anti-A aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen A, to je krvne celice krvnih skupin A in AB, vključno s podskupinami A1, A2, A1B in A2B, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena A, to je krvnih celic krvnih skupin 0 in B.

JAKOST

Titracija
Serum anti-A titriramo ločeno za suspenzije rdečih krvnih celic A1, A2 in A2B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim referenčnim pripravkom. Jakost seruma je v vsakem primeru najmanj 64 mednarodnih enot na ml.

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-A na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic A1, A2 in A2B z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija posamezne suspenzije v vsakem primeru pojavi v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo.

ii) *Serum anti-B za določanje krvnih skupin (živalski)*

Serum anti-B pridobivamo iz krvi živali, ki so bile imunizirane ali ne z rdečimi krvnimi celicami skupine B ali s specifičnimi učinkovinami skupine B. Serum anti-B aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen B, to je krvne celice krvnih skupin B in AB, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena B, to je krvnih skupin 0 in A.

JAKOST

Titracija
Serum anti-B titriramo in dodamo suspenzijo krvnih celic skupine B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim referenčnim pripravkom1. Jakost seruma je najmanj 64 mednarodnih enot na ml.
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
1 Mednarodni standardni pripravek je človeškega izvora; enakovreden referenčni pripravek, če ga uporabljamo, je lahko človeškega izvora ali pa ne.

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-B na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije krvnih celic skupine B z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija posamezne suspenzije pojavi v najmanj dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo.

iii) *Antiglobulinski serumi (živalski)1*

Antiglobulinski serum za uporabo v serologiji krvnih skupin mora vsebovati aglutinacijska protitelesa proti globulinom IgG in aglutinacijska protitelesa proti faktorjem komplementa. Pridobivamo ga iz krvi živali, imuniziranih z injekcijo humanega serumskega proteina. Aglutinirati mora vse človeške rdeče krvne celice, prekrite s humanim IgG in/ali faktorji komplementa. V pogojih, ki jih podrobno navaja izdelovalec, ne aglutinira neprekritih človeških rdečih krvnih celic katere koli skupine.

Specifičnost
Specifičnost antiglobulinskega seruma za uporabo v serologiji krvnih skupin mora biti testirana s človeškimi rdečimi krvnimi celicami, prekritimi z raznolikimi protitelesi, to je rdečimi krvnimi celicami, senzibiliziranimi s človeškimi nekompletnimi protitelesi anti-D, anti-K in anti-Fya, rdečimi krvnimi celicami, senzibiliziranimi z nekompletnimiprotitelesi anti-Lea, ki vežejo komplement v prisotnosti svežega humanega seruma, in rdečimi krvnimi celicami, senzibiliziranimi s tako imenovanimi "nekompletnimi hladnimi protitelesi", in s taniranimi rdečimi krvnimi celicami, senzibiliziranimi s humanim IgG, in končno, z 10 različnimi vzorci neprekritih človeških rdečih krvnih celic z antigeni A in B ali brez.

JAKOST
Titracija
Antiglobulinski serum, kot ga dostavljajo dobavitelji, ali v razredčini, ki je priporočena na etiketi, močno aglutinira človeške rdeče krvne celice, prekrite s humanim nekompletnim serumom anti-D, ki ima titer 4 (ali manj), z D-pozitivnimi krvnimi celicami, ko titracijo izvajamo z metodo nadomeščanja z albuminom. Pri enaki razredčitvi aglutinira K-pozitivne človeške rdeče krvne celice, senzibilizirane z izbranimi šibkimi protitelesi anti-K, in Fya pozitivne človeške rdeče krvne celice, senzibilizirane z izbranimi šibkimi protitelesi anti-Fya.

Prav tako pri enaki ali različni razredčitvi, kot je navedeno na etiketi, aglutinira človeške rdeče krvne celice, senzibilizirane s šibkimi nekompletnimi protitelesi anti-Lea, ki vežejo komplement v prisotnosti svežega seruma.

Za klinično uporabo je zaželeno, da je prekritost z vsemi vrstami nekompletnih protiteles, navedenih zgoraj, mogoče odkriti z enkratno razredčino antiglobulinskega seruma.
\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
1 Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. in Race, R.R. (1945), Lancet, iii 5
Coombs, R.R.A., Mourant, A.E. in Race, R.R. (1945), Brit. J. exp. Path, 26, 255.

**b) Reagenti za določanje krvnih skupin rastlinskega izvora**

i*) Reagent anti-A za določanje krvnih skupin (rastlinski)*

Reagent anti-A pripravljamo iz izvlečkov semen ali drugih delov ustrezne rastline, čemur sledi, če je potrebno, čiščenje. Reagent anti-A aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen A, to je krvne celice krvnih skupin A in AB, vključno s podskupinami A1, A2, A1B in A2B, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena A, to je krvnih celic krvnih skupin 0 in B.

JAKOST

Titracija
Reagent anti-A titriramo ločeno za suspenzije krvnih celic A1, A2 in A2B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim referenčnim pripravkom1.

Jakost seruma je v vsakem primeru najmanj 64 mednarodnih enot na ml.

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-A na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic A1, A2 in A2B z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija posamezne suspenzije pojavi v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-A za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo.

ii) *Reagent anti-B za določanje krvnih skupin (rastlinski)*

Reagent anti-B pripravljamo iz izvlečkov semen ali drugih delov ustrezne rastline, čemur sledi, če je potrebno, čiščenje. Reagent anti-B aglutinira človeške rdeče krvne celice, ki vsebujejo antigen B, to je krvne celice krvnih skupin B in AB, ne aglutinira pa človeških rdečih krvnih celic, ki ne vsebujejo antigena B, to je krvnih celic krvnih skupin 0 in A.

JAKOST

Titracija
Reagent anti-B titriramo in dodamo suspenzijo krvnih celic skupine B vzporedno z rekonstituiranim, vendar nerazredčenim mednarodnim standardnim pripravkom seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z enakovrednim referenčnim pripravkom1. Jakost seruma je v vsakem primeru najmanj 64 mednarodnih enot na ml.

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_
1 Mednarodni standardni pripravek je človeškega izvora; enakovreden referenčni pripravek, če ga uporabljamo, je lahko človeškega izvora ali pa ne.

Določanje avidnosti
Kadar serum anti-B na stekleni ploščici zmešamo z enakim volumnom suspenzije celic B z volumensko frakcijo od 0,05 do 0,1, se aglutinacija pojavi v največ dvakratnem času, ki je potreben za izvedbo enakega testa na rekonstituiranem, vendar nerazredčenem mednarodnem standardnem pripravku seruma anti-B za določanje krvnih skupin ali z referenčnim standardom z enakovredno avidnostjo.

**VZOREC ETIKETE

SVET EVROPE**

Evropski sporazum o izmenjavi reagentov
za določanje krvnih skupin

*a) Tekoči serum*

1. ... laboratorij, Amsterdam
2. Serum anti-A (humani)
3. Natrijev azid 0,1 %
4. 5 ml
5. 7. september 1965
6. Št. 1 2 3 4

*b) Dehidrirani serum*

1. ... laboratorij, Amsterdam
2. Serum anti-B (živalski)
3. Mersalate 0,1 %
4. Rekonstituirati s 5 ml destilirane vode
5. 31. december 1968
6. Št. 4321

**VZOREC KONTROLNEGA LISTA

SVET EVROPE**

Evropski sporazum o izmenjavi reagentov
za določanje krvnih skupin

1. Centralni laboratorij za transfuzijo krvi
1 Main Street, Metropolis, Westland
2. Serum anti-E (anti-rh' ') (humani)
3. 10 ml
4. Datum zadnjega preverjanja aktivnosti: 30. maj 1961
5. Rok uporabnosti: 30. maj 1962
6. Št. 5432

7. Rdeče krvne celice, ki jih preverjamo, je treba enkrat ali večkrat oprati z
raztopino 9 g/l NaCl. Pripravimo 3-odstotno suspenzijo eritrocitov, tako da zmešamo eno volumensko enoto ali kapljico koncentriranih rdečih krvnih celic s 30 volumenskimi enotami ali kapljicami izotonične raztopine NaCl. Na podlagi izkušenj jakost suspenzije lahko ocenimo po videzu.

S Pasteurjevo pipeto kanemo kapljico seruma v precipitinsko epruveto (6 mm x
30 mm) in dodamo enako kapljico suspenzije rdečih krvnih celic. (Na podlagi izkušenj lahko dosežemo znaten prihranek, če serum in celično suspenzijo pipetiramo s pipeto z označenim volumnom 10 l). Vsebino epruvete premešamo in dve uri inkubiramo pri 37 C. Vsebino epruvete nato previdno prenesemo na objektno stekelce in jo rahlo razmažemo. Če aglutinacija ni dobro vidna s prostim očesom, preparat pregledamo pod mikroskopom, da ugotovimo prisotnost in stopnjo aglutinacije.

8. Hranimo pri –20 C ali nižjih temperaturah. Če bo reagent, ki smo ga odprli,
uporabljen naslednji dan, dodamo 0,1 ml raztopine, ki vsebuje 100 g/l
natrijevega azida.

9. Humani serum anti-E ("anti-rh''): 5 ml; raztopina, ki vsebuje 300 g/l govejega
albumina: 5 ml.

10. Izdelek vsebuje snovi človeškega izvora.

**PRILOGA K PROTOKOLU**

Svet Evrope

Evropski sporazum o izmenjavi
reagentov za določanje krvnih skupin

**Certifikat**
*(4. člen)*

NE SME SE LOČITI OD POŠILJKE

.............................................19..........
(kraj) (datum)

Število paketov Podpisani potrjuje, da je pošiljka, opisana ob robu, ........................ .............................................................................................
........................ za katere pripravo je odgovoren .....................................
Oznake .............................................................................................
........................ .............................................................................................
........................ eden od organov, navedenih v 6. členu sporazuma, pripravljena skladno s specifikacijami protokola k sporazumu,
in se lahko takoj dostavi prejemniku (ime in kraj)
...............................................................................................
Številka serije ...............................................................................................

(žig) (podpis) (naziv)

****

**Serija pogodb Sveta Evrope - št. 111**

**Dodatni protokol k Evropskemu sporazumu o izmenjavi reagentov za določanje krvnih skupin**

Države članice Sveta Evrope, pogodbenice Evropskega sporazuma o izmenjavi reagentov za določanje krvnih skupin z dne 14. maja 1961 (v nadaljevanju "sporazum"), so se

ob upoštevanju določb prvega odstavka 5. člena sporazuma, po katerem "pogodbenice ukrenejo vse potrebno, da so reagenti za določanje krvnih skupin, ki jim jih dajo na voljo druge pogodbenice, oproščeni vseh uvoznih dajatev",

glede na to, da je za odobritev te oprostitve državam članicam Evropske gospodarske skupnosti pristojna Skupnost, ki je za to pooblaščena na podlagi pogodbe, s katero je bila ustanovljena,

glede na to, da je za izvajanje prvega odstavka 5. člena sporazuma potrebno, da Evropska gospodarska skupnost lahko postane pogodbenica sporazuma,

sporazumele o naslednjem:

**1. člen**

Evropska gospodarska skupnost lahko postane pogodbenica sporazuma, tako da ga podpiše. Za Skupnost začne sporazum veljati prvi dan v mesecu, ki sledi podpisu.

**2. člen**

1. Ta dodatni protokol je na voljo za sprejetje pogodbenicam sporazuma. Veljati začne prvi dan v mesecu, ki sledi dnevu, ko zadnja pogodbenica deponira svojo listino o sprejetju pri generalnem sekretarju Sveta Evrope.

2. Ne glede na to začne ta dodatni protokol veljati po izteku dveh let od dneva, ko je dan na voljo za sprejetje, razen če ena od pogodbenic uradno izjavi, da nasprotuje začetku veljavnosti. Če je bilo uradno obveščeno o takem nasprotovanju, se uporabi prvi odstavek tega člena.

**3. člen**

Od dneva začetka veljavnosti je ta dodatni protokol sestavni del sporazuma. Po tem dnevu ne more nobena država postati pogodbenica sporazuma, ne da bi hkrati postala pogodbenica dodatnega protokola.

**4. člen**

Generalni sekretar Sveta Evrope uradno obvesti države članice Sveta Evrope, vsako državo, ki je pristopila k sporazumu, in Evropsko gospodarsko skupnost o vsakem sprejetju ali nasprotovanju po 2. členu in o datumu začetka veljavnosti tega dodatnega protokola v skladu z 2. členom.

Generalni sekretar tudi Evropsko gospodarsko skupnost uradno obvesti o vsakem aktu, uradnem obvestilu ali sporočilu, ki se nanaša na sporazum.

Sestavljeno v Strasbourgu 29. septembra 1982 v angleškem in francoskem jeziku in dano na voljo za sprejetje 1. januarja 1983. Besedili sta enako verodostojni in se v enem izvodu hranita v arhivu Sveta Evrope. Generalni sekretar Sveta Evrope pošlje overjene kopije vsaki državi članici Sveta Evrope, vsaki državi, ki je povabljena, da pristopi k sporazumu, in Evropski gospodarski skupnosti.