

Instructions for use



Sanquin Reagents B.V.
Plesmanlaan 125
1066 CX Amsterdam
The Netherlands

Phone: +31 20 5123599
Fax: +31 20 5123570
Reagents@sanquin.nl
www.sanquin.org/reagents

Cellbind Screen

REF K7000

IVD CE

060_v02 01/2017 (bg)

Само за професионална употреба

Микроколонен тест за откриване или идентифициране на антитела към еритроцити, както и за определяне на кръвната група

Обща информация

Cellbind Screen е система за изследване чрез микроколони, в която сенсibiliзираните еритроцити от суспензия се улавят от гелна матрица, съдържаща анти-IgG, анти-IgM и анти-C3d в усилваща среда с висока плътност. Всяка скрининг карта се състои от шест микроколони, в които се съдържа гелът в средата с висока плътност. Cellbind Screen е предназначен за откриване или анализиране на антитела към еритроцити, както и за определяне на кръвната група, кръстосана проба за съвместимост и изменения директен антиглобулинов тест (DAT, за откриване на *in vivo* покриване на еритроцитите с антитела и компоненти на комплемента). Cellbind Screen е подходящ за използване в ръчни, полуавтоматични и автоматични системи. Cellbind Screen отговаря на изискванията на съответните стандарти и указания. Работните характеристики се описват в документите на изданието, които се предоставят с продукта при поискване. Тестът се основава на имунофiksация на сенсibiliзирани еритроцити в микроколони, съдържаща гелна матрица. Клетъчната суспензия се добавя в инкубационното отделение на микроколоната заедно с плазмата, серума или реагента за определяне на кръвната група, които ще се изследват. През инкубационната фаза антиген-положителните еритроцити се свързват със съответните антиеритроцитни антитела в плазмата, серума или реагента. След това картите се подлагат на центрофугиране в три фази. През първата фаза средата с висока плътност причинява разделяне на еритроцитите от плазмата, серума или реагента. През втората фаза сенсibiliзираните еритроцити се слепват и улавят на върха на гелната матрица в микроколоната, а през третата – несенсибилизирани и твърде слабо сенсibiliзираните еритроцити се придвижват към дъното на микроколоната. Силно се препоръчва използване на положителна и отрицателна контрола при всяка серия определяне на кръвната група.

Предпазни мерки

За използване само при *in vitro* диагностика. Cellbind Screen трябва да се съхраняват в оригиналната полистиролова кутия при температура 2-8 °C. След употреба затворете кутията. Cellbind Screen трябва да се съхраняват изправени. Ако това не е спазено, те трябва да се оставят в изправено положение около 15 минути преди употреба, за да се утаи гелната матрица. Не използвайте карти Cellbind Screen, които показват признаци на изсъхване (т.е. различно ниво на средата с висока плътност в микроколониите на една карта или ниско ниво на средата с висока плътност в колоните), признаци на кондензиране (т.е. капки в инкубационното отделение или по долната страна на покриващите ленти), имат повредени покриващи ленти или въздушни мехурчета в средата с висока плътност или гелната матрица. Въздушните мехурчета в средата с висока плътност или гелната матрица, проникнали при транспортиране, в повечето случаи могат да се отстранят, като преди употреба запечатаните Cellbind Screen се завъртят в Cellbind Centrifuge. Cellbind Screen не трябва да се използват след изтичане на срока им на годност, който е отпечатан върху етикета им. След отчитане на резултатите картите могат да се покрият и съхраняват в изправено положение при температура 2-8 °C за една седмица. Използван е хлорамфеникол <0,1% като консервант. Не може да се приеме, че реагентите не съдържат заразни вещества. Трябва да внимавате при използването и изхвърлянето на всеки контейнер и съдържанието му. Изхвърлянето на отпадъците след завършване на изследването трябва да спазва правилата на лабораторията.

Събиране и подготовка на проби

Проба:

Кръвните проби трябва да се вземат асептично със или без добавяне на антикоагуланти. Силно препоръчително е да центрофугирате епруветките при 3000 gcf (относителна центробежна сила) преди събиране на проби от серум (в продължение на 10 минути) или проби от плазма (в продължение на 5 минути), за да се избегнат грешно положителни реакции. Събирането на такива проби трябва да се извършва с пипета, а не чрез наливане на плазмата или серума. В пробите от плазма или серум не трябва да има левкоцити, съставки на гела и/или остатъци от фибрин, за да се избегне блокиране на гелната матрица. За откриване или идентифициране на антитела към еритроцити е препоръчително да използвате прясна плазма или серум (до 48 часа от вземането). Пробите от серум или плазма, които не се изследват веднага, могат да бъдат съхранявани 48 часа при температура 2-8 °C или по-дълго при температура под -18 °C. За да се премахнат утайките, след затопляне на пробите е препоръчително да ги центрофугирате 5 минути при 3000 gcf преди изследване. За изменения директен антиглобулинов тест трябва да се използва прясна кръв (до 48 часа след вземането), за предпочитане взета в EDTA, за да се предотврати *in vitro* покриване на еритроцитите с антитела и компоненти на комплемента. Плазмата не е подходяща за откриване на антитела, които се свързват с комплемента, защото антикоагулантите потискат активирането на му.

Реагенти:

Cellbind Screen	REF K7000	:	Кутия, съдържаща 48 карти, всяка от които с по 6 микроколони.
Cellbind LISS	REF K7100	:	инкубационна среда за приготвяне на еритроцитни суспензии 0,5% от еритроцити на пациента или донора (250 ml).
	REF K7110	:	инкубационна среда за приготвяне на еритроцитни суспензии 0,5% от еритроцити на пациента или донора (100 ml).
	REF K7130	:	Разреждаща среда за приготвяне на еритроцитни суспензии 0,5% от еритроцити на пациента или донора (25 ml).
Cellbind DILUENT	REF K7180	:	Разреждаща среда за приготвяне на еритроцитни суспензии 0,5% от еритроцитни суспензии с 3% реагент Sanquin panels или Sanquin reagent (100 ml).

Cellbind P2	[REF] K7200	:	(2 x 10 ml) еритроцитни суспензии с 0,5% реагент за откриване на антитела към еритроцити.
Cellbind P3	[REF] K7210	:	(3 x 10 ml) еритроцитни суспензии с 0,5% реагент за откриване на антитела към еритроцити.
Cellbind P3-P (papain)	[REF] K7211	:	(3 x 10 ml) третирани с папаин еритроцитни суспензии с 0,5% реагент за откриване на антитела към еритроцити.
Cellbind ID16	[REF] K7230	:	16 x 3 ml) еритроцитни суспензии с 0,5% реагент за идентифициране на антитела към еритроцити.
Cellbind ID16-P (papain)	[REF] K7231	:	(16 x 3 ml) третирани с папаин еритроцитни суспензии с 0,5% реагент за идентифициране на антитела към еритроцити.
Cellbind A ₁ reagent red cells	[REF] K7240	:	еритроцитна суспензия с 0,5% реагент за откриване на анти-A-антитела.
Cellbind A ₂ - reagent red cells	[REF] K7241	:	еритроцитна суспензия с 0,5% реагент за използване като положителна или отрицателна контрола.
Cellbind B- reagent red cells	[REF] K7242	:	еритроцитна суспензия с 0,5% реагент за откриване на анти-B-антитела..
Cellbind O, D-positive reagent red cells	[REF] K7243	:	еритроцитна суспензия с 0,5% реагент за използване като положителна или отрицателна контрола..

Материали:

Cellbind Centrifuge	[REF] K7302
Cellbind Rotor	[REF] K7303
Cellbind Incubator	[REF] K7304
Cellbind Dispenser	[REF] K7300
Cellbind Workstation	[REF] K7301

Еритроцитни суспензии:

1. За определяне на кръвната група, кръвосанатата проба за съвместимост, изменения директен антиглобулинов тест и автоконтролата трябва да се приготви 0,5% суспензия от еритроцити на пациента или донора в Cellbind LISS (**[REF]** K7100 **[REF]** K7110 или **[REF]** K7130).
2. За откриване и идентифициране на антитела трябва да се използват еритроцитни суспензии с панели или реагент Sanquin (0,5% или 3,0%). Препоръчително е да използвате готови за употреба еритроцитни суспензии с 0,5% Cellbind panels или Cellbind реагент. Ако се използват еритроцитни суспензии с 3% Sanquin panels or Sanquin реагент, трябва да се приготви 0,5% суспензия в Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180) съгласно протокола за приготвяне по-долу. Ако се използват еритроцити с други панели или реагенти, те задължително трябва да се потвърждават от потребителя.
Забележка: този протокол не може да се прилага към клетки, които са третирани с ензими (**[REF]** K1384 и **[REF]** K1393). Ако е необходимо изследване на клетки, третирани с ензими, трябва да се използва Cellbind P3-P (**[REF]** K7211) или Cellbind ID16-P (**[REF]** K7231)

Приготвяне на 0,5% еритроцитни суспензии:

1. 11 µl концентрирани еритроцити от пациента или от донора + 2 ml Cellbind LISS (**[REF]** K7100, **[REF]** K7110 или **[REF]** K7130)
2. 200 µl еритроцитна суспензия с 3% реагент Sanquin panel или Sanquin reagent + 1 ml Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180)

Работна процедура за Cellbind Centrifuge

За да използвате центрофугата Hettich за карти Cellbind, трябва да изпълните следните стъпки:

1. Поставете Cellbind Rotor съгласно ръководството за работа на Hettich.
2. Роторът се разпознава от центрофугата и се програмира автоматично съгласно протокола на Cellbind.
3. В стъпката за центрофугиране, описана в тестовите процедури на Cellbind по-долу, трябва само да натиснете „start“ (старт) и центрофугата ще се върти в следните 3 фази:

- 0-2 минути	75 rcf	780 rpm	(об/мин.)
- 2-3 минути	200 rcf	1280 rpm	
- 3-10 минути	1790 rcf	3840 rpm	
4. След центрофугирането капакът може да бъде отворен и картите да се извадят.

Тестови процедури

Оставете всички реагенти да достигнат стайна температура (18-25 °C). Не използвайте Cellbind Screen с въздушни мехурчета в гелната матрица, нарушени опаковки или признаци на изсъхване (липсващо или неправилно ниво на течността над матрицата).

Откриване и идентифициране на антитела

1. Отстранете покриващата лента от необходимия брой колонии.
2. Добавете 40-50 µl от 0,5% еритроцитната суспензия на тестови клетки в инкубационното отделение.
3. В него добавете и същия обем (40-50 µL) плазма или серум.
4. Инкубирайте 15 минути при 37 °C в Cellbind Incubator.
5. Поставете картите в Cellbind Centrifuge (10 минути). Параметрите на центрофугиране вече са програмирани.
6. Отчетете реакциите.

Определяне на антигените на кръвните групи

1. Отстранете покриващата лента от необходимия брой колонии.
2. Добавете 40-50 µl от 0,5% суспензията на еритроцити от пациента или донора в инкубационното отделение.
3. Добавете 20 µl реагент за кръвни групи Sanquin в инкубационното отделение.
Забележка: Списък с одобрените реагенти за кръвни групи Sanquin се предоставя на уебсайта: www.cellbind.nl. За някои от тези реагенти се изисква допълнителна инкубационна стъпка, което е посочено в списъка. Използването на друг вид реагент може да доведе до отклонения в резултатите и затова трябва да бъде проверено от потребителя.
4. Поставете картите в Cellbind Centrifuge (10 минути). Параметрите на центрофугиране вече са програмирани.
5. Отчетете реакциите.

Кръстосана проба за съвместимост

1. Отстранете покриващата лента от необходимия брой колонии.
2. Добавете 40-50 µl от 0,5% еритроцитна суспензия 0,5% от еритроцити с реагент в инкубационното отделение.
3. В него добавете и същия обем (40-50 µl) плазма в инкубационното отделение.
4. Поставете картите в Cellbind Centrifuge (10 минути). Параметрите на центрофугиране вече са програмирани.
5. Отчетете реакциите.

Изменен директен антиглобулинов тест (DAT)

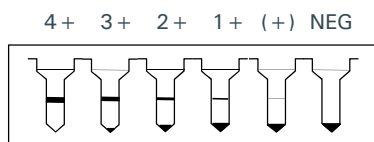
1. Отстранете покриващата лента от необходимия брой колонии.
2. Добавете една капка (40-50 µl) от 0,5% суспензията на еритроцити на пациента в инкубационното отделение.
3. Поставете картите в Cellbind Centrifuge (10 минути). Параметрите на центрофугиране вече са програмирани.
4. Отчетете реакциите.

Кръстосана проба за съвместимост

1. Отстранете покриващата лента от необходимия брой колонии.
2. Добавете 40-50 µl от 0,5% суспензията на еритроцити на донора в инкубационното отделение.
3. В него добавете и същия обем (40-50 µl) плазма или серум на пациента.
4. Инкубирайте 15 минути при 37 °C в инкубатора Cellbind.
5. Поставете картите в Cellbind Centrifuge (10 минути). Параметрите на центрофугиране вече са програмирани.
6. Отчетете реакциите.

Интерпретиране

При положителни реакции еритроцитите ще бъдат уловени в горния слой на гелната матрица. При отрицателни реакции ще се вижда само малко петно еритроцити в дъното на микроколоната. Шаблоните на получените реакции са показани на фигурата:



Количеството еритроцити, уловени в горния слой на гелната матрица, зависи от параметри като антигенната плътност на еритроцитите, както и титъра и афинитета на антитялото. То се определя също от продължителността на втората фаза на центрофугиране и от центрофугиращата сила по време на третата фаза.

Следователно, ако реакцията е по-слаба от 4+, на дъното на микроколоната също ще има клетки. Същият шаблон ще се наблюдава и при реакции от смесен тип.

Откриване и идентифициране на антитела

Положителните реакции указват наличие на антитела към еритроцити в плазмата или серума. Отрицателните реакции указват отсъствие на такива антитела. Положителна автоконтрола може да означава наличие на автоантитела.

Определяне на антигените на кръвните групи

Положителните реакции с реагенти за кръвни групи указват наличие на съответните антигени в еритроцитите. Отрицателните означават, че не може да се открие наличие на такива антигени в еритроцитите.

Обратно определяне на кръвните групи

Положителните реакции с реагент за кръвни групи указват наличие на съответното алоантитяло. Отрицателна реакция означава, че не може да се открие такова наличие.

Изменен директен антиглобулинов тест (DAT)

Положителните реакции указват *in vivo* покриване на еритроцити с антитела и/или компоненти на комплемента.

Кръстосана проба за съвместимост

Положителните реакции указват несъвместимост между кръвта на донора и приемника. Отрицателните реакции указват съвместимост между кръвта на донора и приемника.

Ограничения

Неочаквани положителни резултати поради: псевдоаглутинация, автоаглутинация, реакция от смесен тип, някои лекарства, твърде висока концентрация на еритроцитите или сенсibiliзиране на еритроцитите *in vivo* с антитела и/или компоненти на комплемента. Неочаквани отрицателни или слаби резултати поради: слаби антигени, слаби антитела, слаби титри на антителата, реакция от смесен тип, понижена активност на реагентите, недостатъчно взаимодействие между еритроцитната суспензия и плазмата, наличие на серум или реагент в инкубационното отделение и/или преждевременно взаимодействие между съдържанието на инкубационното отделение и средата с висока плътност. Грешно положителни или грешно отрицателни резултати могат да възникнат при наличие на въздушни мехурчета в гелната матрица, замърсяване на тестовите материали или отклонение от препоръчителните техники. Ако се използват силно хемолитични проби, могат да възникнат неспецифични реакции. Ако пробата съдържа остатъци от фибрин, могат да се захванат несенсибилизирани клетки по време на центрофугирането, в резултат на което да се образува тънка червена линия върху горния слой на гелната матрица.

Източници

1. Race R.R. and Sanger R.; Blood Groups in Man, 6th ed. Oxford Blackwell Scientific Publishers 1975.
2. Issit P.D.; Applied Blood Group Serology, 3rd ed. Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1985.
3. Daniels G.; Human Blood Groups. Blackwell Science Ltd. 1995.
4. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion In Clinical Medicine, 9th ed. Blackwell, Oxford, 1993.

Гарантира се ефективност на продуктите Sanqip като тази, описана в инструкциите за употреба на първоначалния производител. От съществено значение е строгото спазване на процедурите, тестовите постановки и препоръчителните реагенти и оборудване. Sanqip не поема никаква отговорност при отклонение от горепосоченото.