

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 (hu)

Kizárólag professzionális
használatra

Mikro-oszlopos teszt vörösvértest ellenanyagok kimutatására vagy azonosítására, valamint vércsoportmeghatározáshoz

Általános információk

A Cellbind Screen egy mikro-oszlopos tesztrendszer, amelyben az érzékenyített vörösvértesteket a szuszpenzióból az anti-IgG-t, anti-IgM-et, és anti-C3d-t tartalmazó gél-mátrix megköti, serkentett, magas denzitású médiumban. Minden Screenkártya 6 mikrooszlopot tartalmaz, amelyek a gél nagy sűrűségű közegben tartalmazzák. A Cellbind Screen vörösvértest antitestek kimutatására és azonosítására, vércsoport-meghatározáshoz, keresztpróba-hoz és a módosított direkt antiglobulin teszthez (DAT, ellenanyaggal és komplement-komponensekkel *in vivo* fedett vörösvértestek kimutatására) használatos. A Cellbind Screen teszt végezhető manuális és fél-automata módon is. A Cellbind Screen a megfelelő előírásoknak és irányvonalaknak megfelel. A reagens tulajdonságainak leírása minden dobozban megtalálható. A teszt szentitizálódott vörösvértesteknek a gél-mátrixot tartalmazó mikro-oszlopokban történő immunfixációján alapul. A sejtuszuszpenziót a vizsgálandó plazmával, szérummal vagy vércsoport reagenssel együtt kell hozzáadni a mikro-oszlop inkubációs kamrájához. Az inkubációs fázis alatt az antigén-pozitív vörösvértestek megkötik a plazmában, a szérumban vagy a reagensben jelenlevő megfelelő (anti-vörösvértest antitesteket. Ezután a kártyákat 3 fázisú centrifugálásnak vetjük alá. Az első fázisban a nagy sűrűségű közeg a vörösvértesteket elválasztja a szérumtól, plazmától vagy a reagenstől. A második fázisban az érzékenyített vörösvértestek agglutinálódnak és a gél-mátrix tetején megkötődnek a mikro-oszlopban, míg a harmadik fázisban a nem érzékenyített és a nagyon gyengén érzékenyített vörösvértestek a mikro-oszlop alja felé mozognak. Pozitív és negatív kontroll használata minden sorozat vércsoport meghatározáshoz ajánlott.

Figyelmeztetések

Diagnosztikai reagens, csak *in vitro* használatra. A Cellbind Screen kártyákat az eredeti polisztirol dobozban, 2-8 °C-on kell tárolni. Használat után zárja vissza a dobozt. A teszt-kártyákat állított állapotban kell tárolni, ellenkező esetben a kártyák felhasználás előtt kb. 15 percig álló pozícióban tartandóak, hogy a gél-mátrix újra leülepedhessen. Ne használja a Cellbind Screen kártyákat, ha kiszáradás (tehát egyenetlen a nagy sűrűségű médium szintje a kártya mikro-oszlopaiban, vagy alacsony a nagy sűrűségű közeg szintje az oszlopokban) vagy kondenzáció (tehát cseppek az inkubálókamrában vagy a zárócsíkok alján) jeleit mutatják, megsérültek a zárócsíkok, illetve buborékok vannak a nagy sűrűségű médiumban vagy a gélmátrixban. A szállítás során a nagy sűrűségű közegbe vagy a gél-mátrixba bekerült levegőbuborékokat a legtöbb esetben kiszedhetjük úgy, hogy a lezárt kártyákat lecentrifugáljuk használat előtt. A Cellbind kártyákat, a rajtuk lévő címkén feltüntetett lejárati időn túl ne használjuk. Az eredmények leolvasása után a kártyák lefedve és álló pozícióban, 2-8 °C-on egy hétig tárolhatók. A tartósítószer < 0,1%-os chloramphenicol. A reagens nem tekinthető fertőzésmentesnek, ezért elővigyázatosan kezelendő. A teszt elvégzése után a kidobandó anyagokat a laboratórium saját előírásainak megfelelően kell megsemmisíteni.

A minta gyűjtése és előkészítése

Minta:

A vérmintákat aseptikusan kell levenni, antikoagulánsal vagy anélkül. Az álpozitív reakciók megelőzése érdekében kifejezetten ajánlott a szérummintákat (10 percig) vagy plazmamintákat (5 percig) levétel előtt 3000 RCF-en lecentrifugálni. A szérum vagy plazma gyűjtése pipettával történjen és ne leöntve. A plazmának vagy szérumnak fehérversejt-, gélfagmentumok -és/vagy fibrin maradék-mentesnek kell lennie, ezzel megelőzhetjük a gél-mátrix blokkolását. A vörösvértest antitestek kimutatására vagy azonosítására vagy szérum használatra javasolt (mintavételtől számított 48 órán belül). Azok a minták, amelyeket nem dolgozunk azonnal fel, eltarthatók 48 óráig 2-8 °C-on, vagy tovább < -18 °C-on. Tanácsos a szérumot vagy plazmát felolvasztás után 5 percig 3000-es fordulatszámra lecentrifugálni, hogy megszabaduljunk minden kicsapódástól. A módosított direkt antiglobulin teszthez friss, lehetőleg EDTA-s vért kell használni (a levételtől számított 48 órán belül), megelőzendő a vörösvértestek *in vitro* lefedését komplement elemekkel. A komplement-kötő antitestek kimutatására a plazma nem alkalmas, mert az antikoagulánsok meggátolják a komplement aktiválódását.

Reagensok:

Cellbind Screen	REF K7000	: A doboz 48 db 6 mikro-oszlopos kártyát tartalmaz.
Cellbind LISS	REF K7100	: Inkubációs médium 0,5%-os vörösvértestszuszpenzió készítéséhez a beteg vagy a donor vörösvértestjeiből (250 ml).
	REF K7110	: Inkubációs médium 0,5%-os vörösvértestszuszpenzió készítéséhez a beteg vagy a donor vörösvértestjeiből (100 ml).
	REF K7130	: Inkubációs médium 0,5%-os vörösvértestszuszpenzió készítéséhez a beteg vagy a donor vörösvértestjeiből (25 ml).
Cellbind DILUENT	REF K7180	: Inkubációs médium 0,5%-os vörösvértest-suszpenzió készítéséhez 3%-os Sanquin panelekből vagy Sanquin reagens vörösvértest-suszpenzióból (100 ml).
Cellbind P2	REF K7200	: (2 x 10 ml) 0,5%-os reagens vörösvértest-suszpenzió vörösvértest ellenanyagok detektálásához.
Cellbind P3	REF K7210	: (3 x 10 ml) 0,5%-os reagens vörösvértest-suszpenzió vörösvértest ellenanyagok detektálásához.

Cellbind P3-P (papain)	REF K7211	:	(3 x 10 ml) papain-kezelt 0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió vörösvértest ellenanyagok detektálásához.
Cellbind ID16	REF K7230	:	(16 x 3 ml) 0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió vörösvértest-ellenanyagok azonosításához..
Cellbind ID16-P (papain)	REF K7231	:	16 x 3 ml) papain-kezelt 0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió vörösvértest-ellenanyagok azonosításához.
Cellbind A ₁ reagent red cells	REF K7240	:	0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió anti-A antitestek azonosítására.
Cellbind A ₂ reagent red cells	REF K7241	:	0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió pozitív vagy negatív kontrollként való használatra.
Cellbind B reagent red cells	REF K7242	:	0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió anti-B antitestek azonosítására.
Cellbind O, D-positive reagent red cells	REF K7243	:	0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenzió pozitív vagy negatív kontrollként való használatra.

Eszközök

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

Vörösvértest-szuszenziók:

1. Meghatározáshoz, keresztpórához, módosított direkt antiglobulinteszthez és az autokontrollhoz 0,5%-os suszpenziót kell készíteni a beteg vagy a donor vörösvértestjeiből a Cellbind LISS (**REF** K7100, **REF** K7110 vagy **REF** K7130) segítségével.
2. Ellenanyagok detektálásához vagy azonosításához Sanguin (0,5% vagy 3,0%) paneleket vagy reagens vörösvértest-szuszenziót kell használni. Használatra kész 0,5%-os Cellbind panelek vagy Cellbind reagens vörösvértest-szuszenziók alkalmazása javasolt. Ha 3%-os Sanquin paneleket vagy Sanquin reagens vörösvértest-szuszenziókat használnak, akkor az alábbi előkészítési protokollnak megfelelően 0,5%-os suszpenziót kell készíteni Cellbind DILUENT (**REF** K7180) inkubációs médiumban. Más panelek vagy reagens vörösvértestek használata esetén a felhasználónak kötelezően el kell végeznie a validálást.
Megjegyzés: ez a protokoll nem alkalmazható enzimekkel (**REF** K1384 és **REF** K1393) kezelt sejteken. Ha enzimmel kezelt sejtekkel végzett vizsgálatra van szükség, akkor Cellbind P3-P (**REF** K7211) vagy Cellbind ID16-P (**REF** K7231) suszpenziót kell alkalmazni.

0,5%-os vörösvértest-szuszenzió elkészítése:

1. 11 µl beteg vagy donor vörösvértest-szedimentum + 2 ml Cellbind LISS (**REF** K7100, **REF** K7110 vagy **REF** K7130)
2. 200 µl 3%-os Sanquin panel vagy Sanquin reagens vörösvértest-szuszenzió + 1 ml Cellbind DILUENT (**REF** K7180)

A Cellbind Centrifuga használata

A Cellbind kártyához használatos Hettich centrifuga a következő lépések szerint használatos:

1. Szereljük be a Cellbind Rotort a Hettich használati útmutatója szerint.
2. A centrifuga felismeri a rotort és automatikusan beprogramozza magát a Cellbind protokollnak megfelelően.
3. A centrifugálási fázishoz meg kell nyomni a „start” gombot, és a centrifuga a következő 3 lépésben fog forogni:

- 0-2 minutes	75 rcf	780 rpm
- 2-3 minutes	200 rcf	1280 rpm
- 3-10 minutes	1790 rcf	3840 rpm
4. A centrifugálás után a tető kinyitható és a kártyákat ki lehet venni.

A teszt kivitelezése

Melegítsük szobahőmérsékletűre (18-25 °C) az összes reagenst. Ne használjon olyan Cellbind Screen kártyát, amelyen a gélmátrixban levegőbuborékok, sérült zár, vagy a kiszáradás jelei (szabálytalan folyadékszint, vagy nincs folyadékszint a gélmátrix felett) láthatók.

Ellenanyag kimutatás és azonosítás

1. Vegyük le a zárócsíkot a kívánt számú oszlopról.
2. Pipetázzunk 40-50 µl 0,5%-os tesztsejt vörösvértest-szuszenziót az inkubálókamrába.
3. Pipetázzuk ugyanazon a mennyiségű (40-50 µl) plazmát vagy szérumot az inkubálókamrába.
4. Inkubáljuk 15 percig 37 °C-on a Cellbind inkubátorban.
5. Tegyük a kártyákat a Cellbind centrifugába (10 perc). A centrifugálási paraméterek előre programozottak.
6. Olvassuk le a reakciót

Vércsoport antigének meghatározása

1. Vegyük le a zárócsíkot a kívánt számú oszlopról.
2. Pipetázzunk 40-50 µl 0,5%-os beteg vagy donor vörösvértest-szuszenziót az inkubálókamrába.
3. Pipetázzunk 20 µl Sanquin vércsoport reagenst az inkubálókamrába.
Megjegyzés: A validált Sanquin vércsoport-reagensek listája rendelkezésre áll a www.cellbind.nl webhelyen. Egyes reagensekhez további inkubálási lépés szükséges; ezek a reagensek szerepelnek ebben a listában. Minden más tipizáló reagens használata megváltozott eredményekhez vezethet és ezáltal a felhasználónak azokat validálnia kell.
4. Tegyük be a kártyákat a Cellbind Centrifugába (10 perc). A centrifugálás paraméterei előre programozottak.
5. Olvassuk le a reakciókat.

Indirekt meghatározás

1. Vegyük le a zárócsíkot a kívánt számú oszlopról.
2. Pipetázzunk 40-50 µl 0,5%-os reagens vörösvértest-szuszenziót az inkubálókamrába.
3. Pipetázzuk ugyanennyi (40-50 µl) plazmát az inkubálókamrába.
4. Tegyük a kártyákat a Cellbind centrifugába (10 perc). A centrifugálási paraméterek előre programozottak.

5. Olvassuk le a reakciót.

Módosított direkt antiglobulinteszt (DAT)

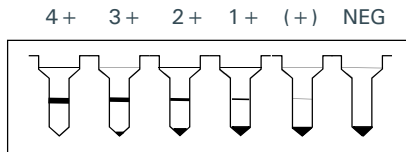
1. Vegyük le a zárócsíkot a kívánt számú oszlopról.
2. Pipetázzunk egy csepp (40-50 µl) 0,5%-os beteg vörösvértest-szuszpenziójából az inkubáló kamrába.
3. Tegyük a kártyákat a Cellbind centrifugába (10 perc). A centrifugálási paraméterek előre programozottak.
4. Olvassuk le a reakciót.

Keresztpróba

1. Vegyük le a zárócsíkot a kívánt mennyiségű oszlopról.
2. Pipetázzunk 40-50 µl 0,5%-os donor vörösvértest-szuszpenziót az inkubálókamrába.
3. Pipetázzunk ugyanennyi mennyiségű (40-50 µl) betegplazmát vagy szérumot az inkubálókamrába.
4. Inkubáljuk 15 percig 37 °C-on a Cellbind inkubátorban.
5. Tegyük a kártyákat a Cellbind centrifugába (10 perc). A centrifugálási paraméterek előre programozottak.
6. Olvassuk le a reakciót.

Értékelés

Positív reakciók esetén a vörösvértestek a gélmátrix felső rétegében kötődnek meg. Negatív reakciók esetén egy diszkrét vörösvértest-csomó látható a mikrooszlop alján. A reakcióeredmények az ábrán láthatóak.



A gél-mátrix felső rétegében megkötődött vörösvértestek mennyisége olyan paramétereiktől függ, mint a vörösvértestek antigénsűrűsége, az ellenanyag titere és affinitása. A második centrifugálási fázis tartama és a harmadik fázis centrifugálási ereje szintén meghatározó. Ezért ha a reakció gyengébb, mint 4+, sejtek tűnnek fel a mikro-oszlop alján is. Ugyanezen minta látható kevert-mezős reakciók esetén.

Ellenanyag kimutatás és azonosítás

A pozitív reakciók vörösvértest ellenanyagok jelenlétét mutatják a plazmában és a szérumban. Negatív reakciók vörösvértest ellenanyagok hiányát jelzik a plazmában és a szérumban. A pozitív autokontroll autoantitestek jelenlétét jelentheti.

Vércsoport antigének meghatározása

Vércsoport reagensekkel kapott pozitív reakciók a megfelelő antigén jelenlétét jelentik a vörösvértestek felszínén. Negatív reakciók azt jelentik, hogy a megfelelő antigének jelenléte nem mutatható ki a vörösvértesteken.

Indirekt meghatározás

A reagens vörösvértestekkel kapott pozitív reakciók a megfelelő alloantitest jelenlétét jelzik. A negatív reakció azt jelzi, hogy nem mutatható ki a megfelelő alloantitestek jelenléte.

Módosított direkt antiglobulinteszt (DAT)

A pozitív reakciók a vörösvértestek ellenanyaggal és/vagy komplement-komponensekkel való *in vivo* fedettségét jelzik.

Keresztpróba

A pozitív reakciók a donorvér és a recipiens közti inkompatibilitást jelzik. A negatív reakciók a donorvér és a recipiens kompatibilitását jelzik.

Az eljárás korlátjai

Nem várt pozitív eredményeket okozhatnak: pseudoagglutináció, autoagglutináció, kevertmezős reakció, bizonyos gyógyszerek, túl magas vörösvértest koncentrációk vagy *in vivo*, antitestekkel és/vagy komplement-komponensekkel szenzitizálódott vörösvértestek. Nem várt negatív vagy gyenge reakciókat okozhatnak: gyenge antigének, gyenge antitestek, antitestek alacsony titere, kevertmezős reakciók, a reagensek csökkenő aktivitása, elégtelen kölcsönhatás a vörösvértest-szuszpenzió és a plazma, az inkubálókamrában lévő szérum vagy reagens között és/vagy túl korai kölcsönhatás az inkubálókamra tartalma és a nagy sűrűségű médium között. Fals pozitív vagy fals negatív eredményeket kaphatunk, ha a reagensek levegőbuborékok jelenléte a gélmátrixban, befertőződnek vagy eltérnek az ajánlott kivitelezési technikától. Erősen hemolizált minta használata esetén, nem-specifikus reakció jelentkezhet. Ha a minta fibrinmaradványokat tartalmaz, ez visszatarthatja a nem érzékenyített vörösvértesteket a centrifugálás során egy vékony vörös vonalat képezvén a gél-mátrix tetején.

Referenciák

1. Race R.R. and Sanger R.: Blood Groups in Man, 6th ed. Oxford Blackwell Scientific Publishers 1975.
2. Issitt 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.

A Sanquin termékek garancia nélkül az eredeti gyártó használati utasításában megadottaknak megfelelő teljesítményt nyújthatnak. Rendkívül fontos, hogy szigorúan betartsák az adott eljárásokat, a tesztek elrendezését, és ragaszkodjanak az ajánlott reagensek és berendezések használatához. A Sanquin az előzőekben leírtaktól történő bármilyen eltérés esetén minden felelősséget elhárít.