

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 (hr)

Samo za profesionalnu uporabu

Test s mikrostupcima za otkrivanje ili identifikaciju eritrocitnih antitijela kao i za određivanje krvne grupe

Opće informacije

Cellbind Screen analiza je sustav ispitivanja s mikrostupcima u kojem se senzibilizirani eritrociti iz suspenzije hvataju gel matricom koja sadrži anti-IgG, anti-IgM i anti-C3d u mediju za poboljšanje velike gustoće. Svaka se ispitna kartica sastoji od šest mikrostupaca koji sadrže gel u mediju velike gustoće. Cellbind Screen namijenjen je za uporabu u otkrivanju ili identifikaciji eritrocitnih antitijela kao i za određivanje krvne grupe, križnu probu i modificirani direktni antiglobulinski test (DAT, za otkrivanje *in vivo* oblaganja eritrocita antitijelima i komplementarnim komponentama). Cellbind Screen prikladan je za uporabu u ručnim kao i u (polu-) automatskim sustavima. Cellbind Screen analiza udovoljava zahtjevima odgovarajućih normi i smjernica. Izvedbena svojstva spominju se u dokumentima o stavljanju u uporabu koji se na zahtjev isporučuju uz proizvod. Ispitivanje se temelji na imunofiksaciji senzibiliziranih eritrocita u mikrostupcu koji sadrži gel matricu. Stanična suspenzija dodaje se u inkubacijski odjeljak mikrostupca, zajedno s plazmom, serumom ili reagensom za određivanje krvne grupe. Tijekom faze inkubacije antigen-pozitivni eritrociti vežu odgovarajuća antieritrocitna antitijela u plazmi, serumu ili reagensu. Zatim se kartice podvrgavaju trima fazama centrifuge. U prvoj fazi medij velike gustoće uzrokuje odvajanje eritrocita iz plazme, seruma ili reagensa. U drugoj fazi se senzibilizirani eritrociti aglutiniraju i hvataju na vrhu gel matrice u mikrostupcu, dok se u trećoj fazi nesenzibilizirani i slabo senzibilizirani eritrociti kreću prema dnu mikrostupca. Izričito se preporučuje uključivanje pozitivnih i negativnih kontrola sa svakom serijom određivanja krvne grupe.

Mjere opreza

Samo za *in vitro* dijagnostičku uporabu. Cellbind Screen kartice moraju se čuvati u originalnoj kutiji od stiropora na temperaturi od 2 – 8 °C. Zatvoriti kutiju nakon uporabe. Cellbind Screen kartice čuvati u uspravnom položaju. Ako to nije moguće, držati ih u uspravnom položaju otprilike 15 minuta prije uporabe, kako bi se gel matrica poravnala. Nemojte upotrebljavati Cellbind Screen kartice koje pokazuju znakove sušenja (tj. neravnomjernu razinu medija velike gustoće u mikrostupcima jedne kartice ili malu razinu medija velike gustoće u stupcima), znakove kondenzacije (tj. kapljice u inkubacijskom odjeljku ili na donjoj strani pokrovne trake), oštećene pokrovne trake ili imaju mjehuriće zraka u mediju velike gustoće ili gel matrici. Mjehuriće zraka bilo u mediju velike gustoće ili gel matrici nastale tijekom transporta u većini je slučajeva moguće ukloniti rotiranjem zabrtvljenih Cellbind Screen kartica u Cellbind Centrifuge prije uporabe. Cellbind Screen kartice ne smiju se upotrebljavati nakon isteka roka trajanja otisnutog na etiketi kartice. Nakon očitavanja rezultata, kartice je moguće prekriti i čuvati u uspravnom položaju na temperaturi 2 – 8°C do tjedan dana. Kloramfenikol <0,1 % koristi se kao konzervans. Ne može se pretpostaviti da u reagensima nema uzročnika zaraza. Paziti tijekom uporabe i zbrinjavanja svakog spremnika i njegovog sadržaja na otpad. Po završetku testa zbrinuti na otpad u skladu s laboratorijskim propisima.

Uzimanje i priprema uzoraka

Uzorak:

Uzorke krvi izvaditi aseptički, s ili bez dodavanja antikoagulansa. Izričito se savjetuje centrifugiranje epruveta s prikupljenom krvi pri 3000 rcf (relativna centrifugalna sila) prije prikupljanja uzoraka seruma (na 10 minuta) ili uzoraka plazme (na 5 minuta) kako bi se spriječile lažne pozitivne reakcije. Prikupljanje uzoraka seruma ili plazme provoditi pomoću pipete, a ne ulijevanjem plazme ili seruma. Uzorci plazme ili seruma moraju ostati bez leukocita, fragmenata gela i/ili ostataka fibrina kako bi se izbjeglo blokiranje gel matrice. Za otkrivanje ili identifikaciju eritrocitnih antitijela savjetuje se uporaba svježeg plazme ili seruma (unutar 48 sati nakon vađenja). Uzorci seruma ili plazme koji se ne testiraju trenutačno mogu se čuvati 48 sati na temperaturi 2 – 8 °C, ili duže pri <-18 °C. Savjetuje se centrifugiranje uzoraka seruma ili plazme nakon odmrzavanja na 5 minuta pri 3000 rcf (relativna centrifugalna sila) prije testiranja kako bi se uklonio talog. Za modificirani direktni antiglobulinski test upotrebljavajte svježnu krv (unutar 48 sati nakon vađenja), po mogućnosti izvađenu u EDT, kako bi se spriječilo *in vitro* oblaganje eritrocita komplementarnim komponentama. Plazma nije prikladna za otkrivanje antitijela koja na sebe vežu komplemente, jer antikoagulansi sprječavaju aktivaciju komplementa.

Reagensi:

Cellbind Screen	REF K7000	: Kutija sadrži 48 kartica s po 6 mikrostupaca na svakoj kartici.
Cellbind LISS	REF K7100	: Medij za razrjeđivanje za pripremu 0,5 %-tne suspenzije eritrocita bolesnikovih/darivateljevih eritrocita (250 ml).
	REF K7110	: Medij za razrjeđivanje za pripremu 0,5 %-tne suspenzije eritrocita bolesnikovih/darivateljevih eritrocita (100 ml).
	REF K7130	: Medij za razrjeđivanje za pripremu 0,5 %-tne suspenzije eritrocita bolesnikovih/darivateljevih eritrocita (25 ml).
Cellbind DILUENT	REF K7180	: Medij za razrjeđivanje za pripremu 0,5 %-tne suspenzije eritrocita od 3 %-tnih Sanquin panela ili Sanquin suspenzija testnih eritrocita (100 ml).
Cellbind P2	REF K7200	: (2 x 10 ml) 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za otkrivanje eritrocitnih antitijela.

Cellbind P3	REF K7210	: (3 x 10 ml) 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za otkrivanje eritrocitnih antitijela.
Cellbind P3-P (papain)	REF K7211	: (3 x 10 ml) papainom tretiranih 0,5 %-tnih suspenzija testnih eritrocita za otkrivanje eritrocitnih antitijela.
Cellbind ID16	REF K7230	: (16 x 3 ml) 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za identifikaciju eritrocitnih antitijela.
Cellbind ID16-P (papain)	REF K7231	: (16 x 3 ml) papainom tretiranih 0,5 %-tnih suspenzija testnih eritrocita za identifikaciju eritrocitnih antitijela.
Cellbind A ₁ reagent red cells	REF K7240	: 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za otkrivanje anti-A antitijela.
Cellbind A ₂ reagent red cells	REF K7241	: 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za uporabu kao pozitivne ili negativne kontrole.
Cellbind B reagent red cells	REF K7242	: 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za otkrivanje anti-B antitijela.
Cellbind O, D-positive reagent red cells	REF K7243	: 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita za uporabu kao pozitivne ili negativne kontrole.

Materijali:

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

Suspenzije eritrocita:

1. Za tipizaciju, križne probe, modificirani direktni antiglobulinski test i autokontrolu potrebno je pripremiti 0,5 %-tnu suspenziju bolesnikovih ili darivateljevih eritrocita u Cellbind LISS (**REF** K7100 **REF** K7110 or **REF** K7130) .
2. Za otkrivanje ili identifikaciju antitijela upotrebljavati Sanquin (0,5 %-tne ili 3,0 %-tne) panele ili suspenzije testnih eritrocita. Savjetujemo uporabu gotovih 0,5 %-tnih Cellbind panela ili Cellbind suspenzija testnih eritrocita. Ako se upotrebljavaju 3 %-tni Sanquin paneli ili Sanquin suspenzije testnih eritrocita, potrebno je pripremiti 0,5 %-tnu suspenziju u Cellbind DILUENT (**REF** K7180) u skladu s protokolom za pripremu navedenom u nastavku. Za uporabu drugih panela ili testnih eritrocita, obvezna je provjera od strane korisnika.
Napomena: ovaj protokol nije moguće primijeniti na stanice tretirane enzimima (**REF** K1384 i **REF** K1393). Ako postoji potreba za testiranjem stanica tretiranih enzimima, obvezna je uporaba Cellbind P3-P (**REF** K7211) ili Cellbind ID16-P (**REF** K7231).

Priprema 0,5 %-tne suspenzije eritrocita:

1. 11 µl koncentrata eritrocita bolesnika ili davatelja + 2 ml Cellbind LISS (**REF** K7100, **REF** K7110 ili **REF** K7130)
2. 200 µl 3 %-tnog Sanquin panela ili Sanquin suspenzije testnih eritrocita + 1 ml Cellbind DILUENT (**REF** K7180)

Radni postupak za Cellbind Centrifuge

Za uporabu Hettich centrifuge za Cellbind kartice potrebno je provesti sljedeće korake:

1. Umetnite Cellbind rotor u skladu s Hettich uputama za uporabu.
2. Centrifuga prepoznaje rotor i automatski se programira u skladu s protokolom za Cellbind.
3. Za korak centrifugiranja spomenut u Cellbind postupku ispitivanja u nastavku, potrebno je samo pritisnuti "start" i centrifuga će okretati u sljedeća 3 koraka:

- 0 – 2 minute	75 rcf	780 1/min
- 2 – 3 minute	200 rcf	1280 1/min
- 3 – 10 minuta	1790 rcf	3840 1/min
4. Nakon centrifugiranja možete otvoriti poklopac i izvaditi kartice.

Postupak testiranja

Ostavite sve reagense da dosegnu sobnu temperaturu (18 – 25 °C). Ne upotrebljavajte Cellbind Screen kartice s mjehurićima zraka u gel matrici, nepravilnim brtvama ili znakovima sušenja (nepravilna razina ili bez razine tekućine iznad gel matrice).

Otkrivanje ili identifikacija antitijela

1. Uklonite pokrovnu traku s potrebnog broja stupaca.
2. Dodajte 40 – 50 µl 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita u inkubacijski odjeljak.
3. Dodajte isti obujam (40 – 50 µl) plazme ili seruma u inkubacijski odjeljak.
4. Inkubirajte 15 minuta na 37 °C u Cellbind Incubator.
5. Umetnite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja već su programirani.
6. Očitajte reakcije.

Tipizacija antigena krvne grupe

1. Uklonite pokrovnu traku s potrebnog broja stupaca.
2. Dodajte 40 – 50 µl 0,5 %-tne suspenzije eritrocita bolesnika ili stanica darivatelja u inkubacijski odjeljak.
3. Dodajte 20 µl Sanquin reagensa za određivanje krvne grupe u inkubacijski odjeljak.
Napomena: Popis potvrđenih Sanquin reagensa za određivanje krvne grupe dostupan je na web-stranici www.cellbind.nl. Za neke od ovih reagensa potreban je dodatni korak, a ti su reagensi navedeni na popisu. Uporaba bilo kojeg drugog reagensa za tipizaciju može dovesti do nenormalnih rezultata te je stoga obvezna provjera od strane korisnika.
4. Umetnite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja već su programirani.
5. Očitajte reakcije.

Obrnuta tipizacija

1. Uklonite pokrovnu traku s potrebnog broja stupaca.
2. Dodajte 40 – 50 µl 0,5 %-tne suspenzije testnih eritrocita u inkubacijski odjeljak.
3. Dodajte isti obujam (40 – 50 µl) plazme u inkubacijski odjeljak.
4. Umetnite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja već su programirani.
5. Očitajte reakcije.

Modificirani direktni antiglobulinski test (DAT)

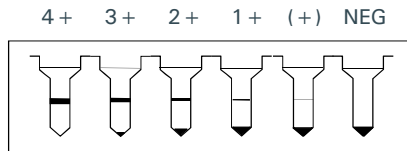
1. Uklonite pokrovnu traku s potrebnog broja stupaca.
2. Dodajte jednu kap (40 – 50 µl) 0,5 %-tne suspenzije eritrocita stanica bolesnika u inkubacijski odjeljak.
3. Umetnite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja već su programirani.
4. Očitajte reakcije.

Križna proba

1. Uklonite pokrovnu traku s potrebnog broja stupaca.
2. Dodajte 40 – 50 µl 0,5 %-tne suspenzije eritrocita derivatelja u inkubacijski odjeljak.
3. Dodajte isti obujam (40 – 50 µl) plazme ili seruma bolesnika u inkubacijski odjeljak.
4. Inkubirajte 15 minuta na 37 °C u Cellbind Incubator.
5. Umetnite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja već su programirani.
6. Očitajte reakcije.

Tumačenje

U pozitivnim reakcijama eritrociti će biti uhvaćeni u gornjem sloju gel matrice. U negativnim reakcijama samo će diskretan gumb eritrocita biti vidljiv na dnu mikrostupca. Rezultirajući uzorci reakcija prikazani su na slici:



Količina eritrocita uhvaćenih u gornjem sloju gel matrice ovisit će o parametrima poput antigenske gustoće eritrocita te o titru i afinitetu antitijela. To je također određeno trajanjem druge faze centrifugiranja i centrifugalne sile tijekom treće faze.

Stoga, ako je reakcija slabija od 4+, stanice će se pojaviti i na dnu mikrostupca. Isti je uzorak vidljiv i u reakcijama mješovitog polja.

Otkrivanje ili identifikacija antitijela

Pozitivne reakcije ukazuju na pristupnost eritrocitnih antitijela u plazmi ili serumu. Negativne reakcije ukazuju na nedostatak eritrocitnih antitijela. Pozitivna autokontrola može ukazivati na prisutnost autoantitijela.

Tipizacija antigena krvne grupe

Pozitivne reakcije s reagensima za određivanje krvne grupe ukazuju na prisutnost odgovarajućih antigena na eritrocitima. Negativne reakcije s reagensima za određivanje krvne grupe ukazuju na to da nije moguće otkriti prisutnost odgovarajućih antigena na eritrocitima.

Obrnuta tipizacija

Pozitivne reakcije s testnim eritrocitima ukazuju na prisutnost odgovarajućih aloantitijela. Negativna reakcija ukazuje na to da nije moguće otkriti prisutnost odgovarajućih aloantitijela.

Modificirani direktni antiglobulinski test (DAT)

Pozitivne reakcije ukazuju na *in vivo* oblaganje eritrocita antitijelima i/ili komplementarnim komponentama.

Križna proba

Pozitivne reakcije ukazuju na nekompatibilnost krvi derivatelja s krvi primatelja. Negativne reakcije ukazuju na kompatibilnost krvi derivatelja s krvi primatelja.

Ograničenja

Neočekivani pozitivni rezultati zbog: pseudoaglutinacije, autoaglutinacije, reakcije mješovitog polja, određenih lijekova, previsoke koncentracije eritrocita ili eritrocita sezbiliziranih *in vivo* s antitijelima i/ili komplementarnim komponentama. Neočekivani negativni ili slabi rezultati zbog: slabih antigena, slabih antitijela, slabih titara antitijela, reakcije mješovitog polja, smanjene aktivnosti reagensa, nedovoljne interakcije suspenzije eritrocita i plazme, seruma ili reagensa u inkubacijskom odjeljku i/ili preuranjene interakcije između sadržaja inkubacijskih odjeljaka i medija velike gustoće. Lažno pozitivni ili lažno negativni rezultati mogu se pojaviti zbog prisutnosti mjehurića zraka u gel matrici, kontaminacije testnih materijala ili bilo kakvog odstupanja od preporučene metode. Kad se upotrebljavaju jaki hemolitički uzorci, može doći do nespecifičnih reakcija. Ako uzorak sadrži ostatke fibrina, to može uzrokovati hvatanje nesezbiliziranih stanica tijekom centrifuge, što rezultira tankom crvenom linijom na vrhu gel matrice.

Literatura

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, SAD, 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.

Proizvodi organizacije Sanquin zajamčeno djeluju kao što je opisano u izvornim proizvođačevim uputama za uporabu. Strogo pridržavanje postupaka, postavki testa te preporučenih reagensa i opreme od ključne je važnosti. Sanquin se odriče svake odgovornosti koja proizlazi iz bilo kakvog nepridržavanja navedenog.

