

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 (sr)

Samo za profesionalnu
upotrebu

Test sa mikrokolonama za detekciju ili identifikaciju antitela crvenih krvnih zrnaca i određivanje krvne grupe

Opšte informacije

Cellbind Screen analiza je sistem ispitivanja na mikrokolonama gde se senzibilisana crvena krvna zrnca iz suspenzije hvataju gel matricom koja sadrži anti-IgG, anti-IgM i anti-C3d u sredstvu za poboljšanje velike gustine. Svaka test kartica se sastoji od šest mikrokolona koje sadrže gel u sredstvu velike gustine. Cellbind Screen je namenjen za detekciju ili identifikaciju antitela crvenih krvnih zrnaca i određivanje krvne grupe, unakrsno sparivanje i modifikovani direktni antiglobulinski test (DAT, za detekciju *in vivo* oblaganjem crvenih krvnih zrnaca antitelima i komplementima). Cellbind Screen odgovara upotrebi u ručnim kao i (polu)automatskim sistemima. Cellbind Screen analiza ispunjava zahteve odgovarajućih standarda i smernica. Karakteristike performansi su date u dokumentima o puštanju u promet koji se na zahtev prilažu uz proizvod. Test se zasniva na imunofiksaciji senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca u mikrokoloni koja sadrži gel matricu. Suspenzija ćelija se dodaje u pregradu za inkubaciju na mikrokolonama zajedno sa plazmom, serumom ili reagensom za određivanje krvne grupe radi ispitivanja. Tokom faze inkubacije, crvena krvna zrnca pozitivna na antigen se vezuju sa odgovarajućim anti-antitelima crvenih krvnih zrnaca prisutnih u plazmi, serumu ili reagensu. Nakon toga, kartice prolaze kroz tri faze centrifugiranja. U prvoj fazi, sredstvo velike gustine izaziva odvajanje crvenih krvnih zrnaca iz plazme, seruma ili reagensa. U drugoj fazi, senzibilisana crvena krvna zrnca se lepe i hvataju na površinu gel matrice u mikrokoloni dok se u trećoj fazi nesenzibilisana ili veoma slabo senzibilisana crvena krvna zrnca kreću ka dnu mikrokolone. Snažno se preporučuje uključivanje pozitivnih i negativnih kontrola sa svakom serijom utvrđivanja krvne grupe.

Mere predostrožnosti

Samo za *in vitro* dijagnostičku upotrebu. Cellbind Screen kartice treba skladištiti u originalnoj kutiji od polistirena na 2-8 °C. Kutiju zatvoriti nakon upotrebe. Cellbind Screen kartice treba čuvati u uspravnom položaju. Ukoliko to nije slučaj, treba ih držati u uspravnom položaju oko 15 minuta pre upotrebe da bi se omogućilo ponovno slaganje gel matrice. Ne koristite Cellbind Screen kartice koje imaju znakove sušenja (tj. nejednak nivo sredstva velike gustine u mikrokolonama jedne kartice ili male količine sredstva velike gustine u kolonama), znakove kondenzacije (tj. kapljice u pregradi za inkubaciju ili na donjoj strani prekrivnih traka), oštećene prekrivne trake ili imaju vazdušne mehuriće u sredstvu velike gustine ili gel matrici. Vazdušni mehurići, bilo u sredstvu velike gustine ili gel matrici, koji su nastali tokom transporta mogu u većini slučajeva biti uklonjeni rotiranjem zaptivenih Cellbind Screen kartica u Cellbind Centrifuge pre upotrebe. Cellbind Screen kartice ne treba koristiti nakon isteka roka trajanja koji je odštampan na oznaci na karticama. Nakon očitavanja rezultata, kartice treba prekriti u uspravnom položaju na 2-8 °C do nedelju dana. Hloramfenikol <0,1% se koristi kao konzervans. Ne sme se pretpostavljati da su reagensi oslobođeni infektivnih agenasa. Mora se voditi računa prilikom upotrebe i odlaganja svakog kontejnera i njegovog sadržaja. Odlaganje otpada nakon okončanja testa treba obavljati u skladu sa propisima u vašoj laboratoriji.

Uzimanje uzoraka i priprema

Uzorak:

Uzorke krvi treba uzimati aseptično sa ili bez dodavanja antikoagulanata. Snažno se savetuje centrifugiranje epruveta za uzimanje krvi na 3000 rcf pre uzimanja uzoraka seruma (10 minuta) ili plazme (5 minuta) da bi se sprečile lažne pozitivne reakcije. Uzimanje uzoraka seruma ili plazme treba sprovesti koristeći pipetu, a ne izlivanjem plazme ili seruma. Uzorci plazme ili seruma treba da budu oslobođeni belih krvnih zrnaca, fragmenata gela i/ili ostataka fibrina da bi se izbeglo blokiranje gel matrice. Za detekciju ili identifikaciju antitela crvenih krvnih zrnaca savetuje se korišćenje sveže plazme ili seruma (u roku od 48 sati nakon vađenja). Uzorci seruma ili plazme koji se ne ispitaju odmah se mogu skladištiti tokom 48 sati na 2-8 °C, ili duže na <-18 °C. Pre ispitivanja se savetuje centrifugiranje uzoraka seruma ili plazme nakon odmrzavanja tokom 5 minuta na 3000 rcf da bi se uklonio percipitat. Za modifikovani direktni antiglobulinski test treba koristiti svežu krv (u okviru od 48 časova po uzimanju), po mogućstvu izvađenu u EDTA da bi se sprečilo *in vitro* oblaganje crvenih krvnih zrnaca komplementima. Plazma nije odgovarajuća za detekciju antitela koja vezuju komplement, pošto će antikoagulansi inhibirati aktivaciju komplementa.

Reagensi:

Cellbind Screen	REF K7000	: Kutija sadrži 48 kartica sa 6 mikrokolona na svakoj.
Cellbind LISS	REF K7100	: Sredstvo za razblaživanje za pripremu 0,5% suspenzije crvenih krvnih zrnaca pacijenta – ili crvenih krvnih zrnaca donora (250 ml).
	REF K7110	: Sredstvo za razblaživanje za pripremu 0,5% suspenzije crvenih krvnih zrnaca pacijenta – ili crvenih krvnih zrnaca donora (100 ml).
	REF K7130	: Sredstvo za razblaživanje za pripremu 0,5% suspenzije eritrocita pacijenta – ili eritrocita donora (25 ml).
Cellbind DILUENT	REF K7180	: Sredstvo za razblaživanje za pripremu 0,5% suspenzije crvenih krvnih zrnaca od 3% Sanquin panela ili Sanquin suspenzije crvenih krvnih zrnaca reagensa (100 ml).
Cellbind P2	REF K7200	: (2 x 10 ml) 0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca za detekciju antitela crvenih krvnih zrnaca.
Cellbind P3	REF K7210	: (3 x 10 ml) 0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca za detekciju antitela crvenih krvnih zrnaca.

Cellbind P3-P (papain)	[REF] K7211	:	(3 x 10 ml) 0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca tretirana papainom za detekciju antitela crvenih krvnih zrnaca.
Cellbind ID16	[REF] K7230	:	(16 x 3 ml) 0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca za identifikaciju antitela crvenih krvnih zrnaca.
Cellbind ID16-P (papain)	[REF] K7231	:	(16 x 3 ml) 0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca tretirana papainom za identifikaciju antitela crvenih krvnih zrnaca.
Cellbind A ₁ reagent red cells	[REF] K7240	:	0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca reagensa za detekciju anti-A antitela.
Cellbind A ₂ reagent red cells	[REF] K7241	:	0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca reagensa za upotrebu kao pozitivna ili negativna kontrola.
Cellbind B reagent red cells	[REF] K7242	:	0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca reagensa za detekciju anti-B antitela.
Cellbind O, D-positive reagent red cells	[REF] K7243	:	0,5% suspenzija crvenih krvnih zrnaca reagensa za upotrebu kao pozitivna ili negativna kontrola

Artikli:

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

Suspenzije eritrocita:

1. Za određivanje tipa, unakrsno sparivanje, modifikovani direktni antiglobulinski test i autokontrolu, mora se pripremiti 0,5% suspenzija eritrocita pacijenta ili donora u Cellbind LISS (**[REF]** K7100 **[REF]** K7110 or **[REF]** K7130).
2. Za detekciju ili identifikaciju antitela, moraju se koristiti Sanquin (0,5% ili 3,0%) paneli ili suspenzije eritrocita reagensa. Savetuje se upotreba već pripremljenih 0,5% Cellbind panela ili Cellbind suspenzija crvenih krvnih zrnaca reagensa. Ako se koriste 3% Sanquin paneli ili Sanquin suspenzije crvenih krvnih zrnaca reagensa, 0,5% suspenziju u Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180) treba pripremiti u skladu sa donjim protokolom za pripremu. Za korišćenje drugih panela ili eritrocita reagensa, provera od strane korisnika je obavezna.

Napomena: ovaj protokol se može primeniti samo na ćelije koje nisu tretirane enzimima (**[REF]** K1384 i **[REF]** K1393). Ako postoji potreba za ispitivanjem sa ćelijama tretiranim enzimima, mora se koristiti Cellbind P3-P (**[REF]** K7211) ili Cellbind ID16-P (**[REF]** K7231).

Priprema 0,5% suspenzije crvenih krvnih zrnaca:

1. 11 µl pakovana crvena krvna zrnca pacijenta ili donora + 2 ml Cellbind LISS (**[REF]** K7100, **[REF]** K7110 ili **[REF]** K7130)
2. 200 µl 3% Sanquin panela ili Sanquin suspenzije crvenih krvnih zrnaca reagensa + 1 ml Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180)

Radna procedura za Cellbind Centrifuge

Da bi se koristila Hettich centrifuge za Cellbind kartice treba sprovesti sledeće korake:

1. Postavite Cellbind Rotor u skladu sa Hettich priručnikom za rukovanje.
2. Centrifuga prepoznaje rotor i automatski se programira u skladu sa Cellbind protokolom.
3. Za korak centrifugiranja naveden u procedurama za Cellbind test ispod, treba pritisnuti „start“ i centrifuga će se rotirati u naredna 3 koraka:

- 0-2 minuta	75 rcf	780 rpm
- 2-3 minuta	200 rcf	1280 rpm
- 3-10 minuta	1790 rcf	3840 rpm
4. Nakon centrifugiranja, možete podići poklopac i izvaditi kartice.

Procedure testa

Ostavite reagense da dostignu sobnu temperaturu (18-25 °C). Nemojte koristiti Cellbind Screen kartice koje imaju vazdušne mehuriće u gel matrici, probijene zaptivke ili znakove sušenja (neispravan ili suv nivo iznad gel matrice).

Detekcija ili identifikacija antitela

1. Uklonite prekrivnu traku sa potrebnog broja kolona.
2. Dodajte 40-50 µl 0,5% suspenzije eritrocita ispitnih ćelija u pregradu za inkubaciju.
3. Dodajte istu zapreminu (40-50 µL) plazme ili seruma u pregradu za inkubaciju.
4. Inkubirajte tokom 15 minuta na 37 °C u Cellbind Incubator.
5. Postavite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja su već programirani.
6. Očitajte reakcije.

Tipizacija antigena krvne grupe

1. Uklonite prekrivnu traku sa potrebnog broja kolona.
2. Dodajte 40-50 µl 0,5% suspenzije eritrocita pacijenta ili donora u pregradu za inkubaciju.
3. Dodajte 20 µl Sanquin reagensa za određivanje krvne grupe u pregradu za inkubaciju.
Napomena: Lista potvrđenih Sanquin reagenasa za određivanje krvne grupe je dostupna na veb stranici www.cellbind.nl. Za neke od ovih reagenasa potreban je dodatan korak inkubacije što je prikazano na ovoj listi. Upotreba bilo kojih drugih agenasa za tipizaciju dovodi do odstupajućih rezultata i stoga ih korisnik treba potvrditi.
4. Postavite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja su već programirani.
5. Očitajte reakcije.

Obrnuta tipizacija

1. Uklonite prekrivnu traku sa potrebnog broja kolona.
2. Dodajte 40-50 µL 0,5% suspenzije eritrocita reagensa u pregradu za inkubaciju.
3. Dodajte istu količinu (40-50 µL) plazme u pregradu za inkubaciju.

4. Postavite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja su već programirani.
5. Očitajte reakcije.

Modifikovani direktni antiglobulinski test (DAT)

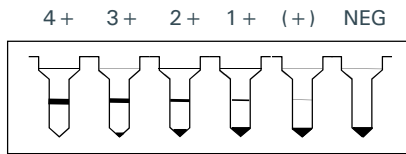
1. Uklonite prekrivnu traku sa potrebnog broja kolona.
2. Dodajte kap (40-50 μ L) 0,5% suspenzije crvenih krvnih zrnaca pacijenta u pregradu za inkubaciju.
3. Postavite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja su već programirani.
4. Očitajte reakcije.

Unakrsno sparivanje

1. Uklonite prekrivnu traku sa potrebnog broja kolona.
2. Dodajte 40-50 μ L 0,5% suspenzije eritrocita donatora u pregradu za inkubaciju.
3. Dodajte istu zapreminu (40-50 μ L) plazme ili seruma pacijenta u pregradu za inkubaciju.
4. Inkubirajte tokom 15 minuta na 37 °C u Cellbind Incubator.
5. Postavite kartice u Cellbind Centrifuge (10 minuta). Parametri centrifugiranja su već programirani.
6. Očitajte reakcije.

Tumačenje

Kod pozitivnih reakcija, crvena krvna zrnca se hvataju u gornji sloj gel matrice. Kod negativnih reakcija, videće se samo mala grupa crvenih krvnih zrnaca na dnu mikrokolone. Rezultujući obrasci reakcije su prikazani na slici:



Količina crvenih krvnih zrnaca uhvaćena na gornjem sloju gel matrice zavisiće od parametara kao što su gustina antigena crvenih krvnih zrnaca i titer i afinitet antitela. Takođe se određuje trajanjem druge faze centrifugiranja i centrifugalne sile tokom treće faze. Prema tome, ako je reakcija slabija od 4+, ćelije će se takođe javiti na dnu mikrokolone. Isti obrazac će biti prisutan kod mešovite reakcije.

Detekcija ili identifikacija antitela

Pozitivne reakcije označavaju prisustvo antitela crvenih krvnih zrnaca u plazmi ili serumu. Negativne reakcije označavaju odsustvo antitela crvenih krvnih zrnaca. Pozitivna autokontrola može označavati prisustvo auto-antitela.

Tipizacija antigena krvne grupe

Pozitivne reakcije sa reagensima za određivanje krvne grupe označavaju prisustvo odgovarajućih antigena na crvenim krvnim zrnacima. Negativne reakcije sa reagensima za određivanje krvne grupe označavaju da prisustvo odgovarajućih antigena na crvenim krvnim zrnacima ne može biti detektovano.

Obrnuta tipizacija

Pozitivne reakcije sa eritrocitima reagensa označavaju prisustvo odgovarajućeg alo-antitela. Negativna reakcija označava da prisustvo odgovarajućeg alo-antitela ne može da se otkrije.

Modifikovani direktni antiglobulinski test (DAT)

Pozitivne reakcije označavaju *in vivo* oblaganje crvenih krvnih zrnaca antitelima i/ili komplementima.

Unakrsno sparivanje

Pozitivne reakcije označavaju nekompatibilnost krvi donatora sa primaocem. Negativne reakcije označavaju kompatibilnost krvi donatora sa primaocem.

Ograničenja

Neočekivani pozitivni rezultati usled: pseudoaglutinacije, autoaglutinacije, mešovite reakcije, određenih lekova, prevelike koncentracije crvenih krvnih zrnaca ili crvenih krvnih zrnaca senzibilisanih *in vivo* antitelima i/ili komplementima. Neočekivani negativni ili slabi rezultati usled: slabih antigena, slabih antitela, mali broj titara antitela, mešovite reakcije, smanjene aktivnosti reagenasa, nedovoljne interakcije između suspenzije eritrocita i plazme, seruma ili reagenasa u pregradi za inkubaciju i/ili prerane interakcije između sadržaja pregrade za inkubaciju i sredstva velike gustine. Lažni pozitivni ili lažni negativni rezultati se mogu javiti usled prisustva vazdušnih mehurića u gel matrici, kontaminacije testnih materijala ili nekog odstupanja od preporučenih tehnika. Kada se koriste snažni hemolitički uzorci, može doći do nespecifičnih reakcija. Ako uzorak sadrži ostatke fibrina, to može izazvati hvatanje nesenzibilisanih ćelija tokom centrifugiranja, što rezultira tankom crvenom linijom na površini gel matrice.

Reference

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.

Sanquin proizvodi imaju garantovane performanse kao što je opisano u uputstvima za upotrebu originalnog proizvođača. Strogo pridržavanje ovih procedura, izgleda testa i preporučenih reagenasa i opreme je od suštinskog značaja. Sanquin odriče svaku odgovornost koja dolazi iz odstupanja od ovoga.