

# 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 (cs)

Pouze pro profesionální použití

Mikroslopcový test pro detekci nebo identifikaci erytrocytárních protilátek a pro stanovení krevních skupin

### Všeobecné informace

Cellbind Screen test je mikroslopcový testovací systém, ve kterém jsou senzibilizované erythrocyty obsažené v suspenzi zachyceny gelovou matrix obsahující anti-IgG, anti-IgM a anti-C3d v zesilujícím médiu o vysoké hustotě. Každá screeningová karta se skládá ze 6 mikroslopců, které obsahují gel v médiu o vysoké hustotě. Cellbind Screen je určen pro detekci nebo identifikaci erythrocytárních protilátek, stejně jako pro stanovení krevních skupin, křížové reakce a modifikovaný přímý antiglobulinový test (DAT, pro detekci protilátek a složek komplementu navázaných na erythrocyty in vivo). Cellbind Screen je vhodný pro jak manuální použití, tak pro (polo-)automatické systémy. Cellbind Screen splňuje požadavky příslušných standardů a doporučení. Parametry jsou uvedeny v propouštěcích dokumentech, které jsou poskytnuty s produktem na vyžádání. Test je založen na imunofixaci senzibilizovaných krvinek v mikroslopci obsahující gelovou matrix. Suspenze krvinek se přidává do inkubační části mikroslopcu společně s testovanou plazmou, sérem nebo krevně skupinovým diagnostikem.

V průběhu inkubační fáze navazují antigen pozitivní erythrocyty příslušné anti-erythrocytární protilátky přítomné v plazmě, séru nebo diagnostiku. Poté karta prochází třemi fázemi centrifugace. V první fázi prostředí o vysoké hustotě způsobuje oddělení erythrocytů od plazmy, séra nebo diagnostika. Ve druhé fázi jsou senzibilizované erythrocyty aglutinovány a zachyceny na povrchu gelové matrix, zatímco ve třetí fázi nesenzibilizované nebo slabě senzibilizované erythrocyty klesají na dno mikroslopců. Při stanovení krevních skupin se doporučuje použít pozitivní a negativní kontrolu s každou sérií vzorků.

### Upozornění

Diagnostikum je určeno pouze pro použití in vitro. Cellbind Screen karty se musí skladovat v původní polystyrenové krabici při teplotě 2-8 °C. Po použití krabici zavřete. Karty testu Cellbind Screen by měly být skladovány ve svislé poloze. V opačném případě se musí postavit do svislé polohy 15 minut před použitím, aby klesla gelová matrix. Nepoužívejte karty testu Cellbind Screen, které jeví známky vyschnutí (tj. nestejněměrná úroveň média o vysoké hustotě v mikroslopcích jedné karty nebo nízké úrovně média o vysoké hustotě ve sloupcích), známky kondenzace (tj. kapky v inkubační části nebo pod spodní stranou krycí lišty), poškození krycí lišty nebo mají bublinky vzduchu v médiu o vysoké hustotě nebo gelové matrix. Bublinky vzduchu v médiu o vysoké hustotě nebo v gelové matrix, které mohou vzniknout během transportu, se odstraní centrifugací karet v Cellbind centrifuze před použitím. Cellbind Screen karty se nesmí použít po uplynutí expirační doby, která je označena na etiketě karty. Po odečtení výsledků se karty mohou zakrýt a skladovat ve svislé poloze až jeden týden při 2-8 °C. Jako konzervační přípravek se používá <0,1% chloramfenikol. U diagnostik nelze zcela vyloučit přítomnost infekčního agens. Pozornost musí být věnována při užití a nakládání s každým obalem a jeho obsahem. Odstranění odpadu po provedeném testování se provádí v souladu s postupy dané laboratoře.

### Odběr a příprava vzorků

#### Vzorky:

Vzorky krve se odebírají asepticky s nebo bez přidání antikoagulačního roztoku. Před stažením séra nebo plazmy se doporučuje centrifugovat vzorky krve (10 minut) při 3000 rcf (relativní odstředivá síla) nebo vzorky plazmy (5 minut), aby se zabránilo falešným pozitivním reakcím. Stažení séra nebo plazmy se musí provést pipetou nikoliv odlitím. Vzorky z plazmy nebo séra nesmí obsahovat bílé krvinky, fragmenty gelu a/nebo fibrinové zbytky, aby nedošlo k blokování gelové matrix. Pro detekci nebo identifikaci erythrocytárních protilátek se doporučuje použít čerstvou plazmu nebo sérum (do 48 hodin po odběru). Vzorky sér nebo plazem, které se nebudou ihned testovat, mohou být uchovávány až 48 hodin při 2-8 °C, nebo déle při <-18 °C. Doporučuje se po rozmražení centrifugovat vzorky sér nebo plazem 5 minut při 3000 rcf před testováním, aby se odstranil precipitát. Pro modifikovaný přímý antiglobulinový test se používá čerstvá krev, (do 48 hodin po tažení), přednostně odebraná do EDTA, aby se zabránilo in vitro vazbě složek komplementu na erythrocyty. Plazma není vhodná pro detekci komplement vázajících protilátek, vzhledem k tomu, že antikoagulační inhibují aktivaci komplementu.

#### Diagnostika:

Cellbind Screen	REF K7000	: box obsahující 48 karet, z nichž každá má 6 mikroslopců.
Cellbind LISS	REF K7100	: inkubační médium pro přípravu 0,5% suspenze erythrocytů pacienta nebo dárce (250 ml).
	REF K7110	: inkubační médium pro přípravu 0,5% suspenze erythrocytů pacienta nebo dárce (100 ml).
	REF K7130	: inkubační médium pro přípravu 0,5% suspenze erythrocytů pacienta nebo dárce (25 ml).
Cellbind DILUENT	REF K7180	: inkubační médium pro přípravu 0,5% suspenze erythrocytů z 3% panelů Sanquin nebo suspenze erythrocytů v reagentii Sanquin (100 ml).
Cellbind P2	REF K7200	: (2 x 10 ml) 0,5% suspenze erythrocytů pro detekci erythrocytárních protilátek.
Cellbind P3	REF K7210	: (3 x 10 ml) 0,5% suspenze erythrocytů pro detekci erythrocytárních protilátek.
Cellbind P3-P (papain)	REF K7211	: (3 x 10 ml) 0,5% suspenze erythrocytů natrávených papainem pro detekci erythrocytárních protilátek.
Cellbind ID16	REF K7230	: (16 x 3 ml) 0,5% suspenze erythrocytů pro identifikaci protilátek proti erythrocytům.

Cellbind ID16-P (papain)	<b>REF</b> K7231	: (16 x 3 ml) 0,5% suspenze erytrocytů natrávených papainem pro identifikaci protilátek proti erytrocytům.
Cellbind A <sub>1</sub> reagent red cells	<b>REF</b> K7240	: 0,5% suspenze erytrocytů pro detekci protilátek anti-A.
Cellbind A <sub>2</sub> reagent red cells	<b>REF</b> K7241	: 0,5% suspenze erytrocytů pro použití jako pozitivní nebo negativní kontrola.
Cellbind B reagent red cells	<b>REF</b> K7242	: 0,5% suspenze erytrocytů pro detekci protilátek anti-B.
Cellbind O, D-positive reagent red cells	<b>REF</b> K7243	: 0,5% suspenze erytrocytů pro použití jako pozitivní nebo negativní kontrola.

#### *Materiál:*

Cellbind Centrifuge	<b>REF</b> K7302
Cellbind Rotor	<b>REF</b> K7303
Cellbind Incubator	<b>REF</b> K7304
Cellbind Dispenser	<b>REF</b> K7300
Cellbind Workstation	<b>REF</b> K7301

#### *Erytrocytární suspenze:*

- Pro typizaci, křížovou zkoušku se musí připravit modifikovaný přímý antiglobulinový test a autokontrola 0,5% suspenze erytrocytů pacienta nebo dárce v Cellbind LISS (**REF** K7100 **REF** K7110 nebo **REF** K7130).
- Pro detekci nebo identifikaci protilátek musí být použity panely Sanguin (0,5% nebo 3,0%) nebo reagentní suspenze erytrocytů. Doporučuje se použít 0,5% panely Cellbind nebo erytrocytární suspenze Cellbind, které jsou k přímému použití. V případě, že se použije 3% panel Sanquin nebo erytrocytární suspenze Sanquin, musí se připravit 0,5% suspenze erytrocytů v Cellbind DILUENT (**REF** K7180) podle protokolu přípravy uvedeného níže. Pro použití jiných reagensů erytrocytů je nutné ověření uživatelem.

Poznámka: tento postup nelze použít pro krvinky, které byly natráveny enzymy (**REF** K1384 a **REF** K1393). V případě nutnosti testování s enzymem natrávenými krvinkami se musí použít Cellbind P3-P (**REF** K7211) nebo Cellbind ID16-P (**REF** K7231).

#### *Příprava 0,5% suspenze erytrocytů:*

- 11 µl erytrocytárního sedimentu pacienta nebo dárce + 2 ml Cellbind LISS (**REF** K7100, **REF** K7110 nebo **REF** K7130)
- 200 µl 3% panel Sanquin nebo erytrocytární suspenze Sanquin + 1 ml Cellbind DILUENT (**REF** K7180)

#### **Postup pro práci s Cellbind centrifugou**

Pro použití centrifugy firmy Hettich s Cellbind kartami se musí provést následující kroky:

- Vloží se Cellbind rotor v souladu s Hettich operačním manuálem.
- Centrifuga rozpozná rotor a automaticky se naprogramuje v souladu s Cellbind protokolem.
- Pro centrifugaci uvedenou níže v Cellbind testovacím postupu, se musí stisknout pouze „start“ a centrifuga bude rotovat ve 3 následujících krocích:
 

- 0–2 minuta	75 rcf	780 rpm	(ot./min)
- 2–3 minuta	200 rcf	1280 rpm	
- 3–10 minuta	1790 rcf	3840 rpm	
- Po ukončení se otevře víko centrifugy a karty se vyjmou ven.

#### **Postupy testu**

Všechna diagnostika se vytemperují na teplotu místnosti (18–25 °C). Nepoužívejte karty Cellbind Screen, které vykazují bublinky vzduchu v gelové matrixi, poškozené zapečetění nebo známky vyschnutí (nepravidelná nebo nulová hladina tekutiny nad gelovou matrixi).

#### *Detekce nebo identifikace protilátek*

- U požadovaného počtu sloupců se sejme ochranný kryt.
- Do inkubační části mikrosloupce se přidá 40–50 µl 0,5% suspenze testovaných erytrocytů.
- Dále se do inkubační části přidá stejný objem (40–50 µl) plazmy nebo séra.
- Karta se inkubuje 15 minut při 37 °C v Cellbind inkubátoru.
- Karta se přenese do Cellbind centrifugy (10 minut). Parametry centrifugace jsou naprogramovány.
- Odečtou se výsledky reakcí.

#### *Stanovení krevně skupinových antigenů*

- U požadovaného počtu sloupců se sejme ochranný kryt.
- Do inkubační části mikrosloupce se přidá 40–50 µl 0,5% suspenze testovaných erytrocytů pacienta nebo dárce.
- Dále se do inkubační části přidá 20 µl krevně skupinového diagnostika firmy Sanquin.  
Poznámka: Seznam validovaných krevně skupinových diagnostik firmy Sanquin je k dispozici na stránce [www.cellbind.nl](http://www.cellbind.nl). Pro některé z těchto činidel je zapotřebí dodatečný inkubační krok, jejich názvy jsou uvedeny v tomto seznamu. Použití jiných diagnostik může vést k odchylným výsledkům a musí být před tím validováno uživatelem.
- Karta se přenese do Cellbind centrifugy (10 minut). Parametry centrifugace jsou naprogramovány.
- Odečtou se výsledky reakcí.

#### *Obrácena typizace*

- U požadovaného počtu sloupců se sejme ochranný kryt.
- Do inkubační části mikrosloupce se přidá 40–50 µl 0,5% reagentní suspenze erytrocytů.
- Dále se do inkubační části přidá stejný objem (40–50 µl) plazmy.
- Karta se přenese do Cellbind centrifugy (10 minut). Parametry centrifugace jsou naprogramovány.
- Odečtou se výsledky reakcí.

#### *Modifikovaný přímý antiglobulinový test (DAT)*

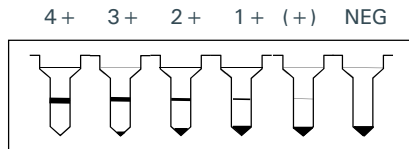
- U požadovaného počtu sloupců se sejme ochranný kryt.
- Do inkubační části mikrosloupce se nakape jedna kapka (40–50 µl) 0,5% suspenze erytrocytů pacienta.
- Karta se přenese do Cellbind centrifugy (10 minut). Parametry centrifugace jsou naprogramovány.
- Odečtou se výsledky reakcí.

#### Křížová zkouška

1. U požadovaného počtu sloupců se sejme ochranný kryt.
2. Do inkubační části mikrosloupce se přidá 40–50 µl 0,5% suspenze erytrocytů dárce.
3. Dále se do inkubační části přidá stejný objem (40–50 µl) plazmy nebo séra pacienta.
4. Karta se inkubuje 15 minut při 37 °C v Cellbind inkubátoru.
5. Karta se přenese do Cellbind centrifugy (10 minut). Parametry centrifugace jsou naprogramovány.
6. Odečtou se výsledky reakcí.

#### Hodnocení

V případě pozitivní reakce jsou erytrocyty zachyceny ve vrchní části gelové matrix. V případě negativní reakce je vidět pouze malý terčík erytrocytů na dně mikrosloupce. Charakter výsledných reakcí vzorků je ukázán na následujícím obrázku.



Množství erytrocytů zachycených v povrchové části gelové matrix závisí na takových parametrech jako jsou hustota antigenů na erytrocytech a titer a afinita protilátek. Toto je také ovlivněno délkou druhé centrifugační fáze a *rcf* během třetí fáze. Proto, je-li reakce slabší než 4+, objevují se erytrocyty na dně mikrosloupce. Tentýž obraz je pozorován v případě smíšeného reakčního pole.

#### Detekce nebo identifikace protilátek

Pozitivní reakce indikuje přítomnost erytrocytárních protilátek v plazmě nebo séru. Negativní reakce indikuje chybění erytrocytárních protilátek. Pozitivní autokontrola může indikovat přítomnost autoprotilátek.

#### Stanovení krevě skupinových antigenů

Pozitivní reakce s krevně skupinovým diagnostikem indikuje přítomnost odpovídajícího antigenu na červených krvinkách. Negativní reakce s krevně skupinovým diagnostikem indikuje, že příslušný antigen nebyl na červených krvinkách detekován.

#### Obrácená typizace

Pozitivní reakce s reagenscí erytrocytů indikuje přítomnost odpovídající aloproulátky. Negativní reakce s reagenscí erytrocytů indikuje, že příslušná aloproulátka nebyla detekována.

#### Modifikovaný přímý antiglobulinový test (DAT)

Pozitivní reakce indikuje senzibilizaci krvinek *in vivo* protilátkami a/nebo složkami komplementu.

#### Zkouška kompatibility

Pozitivní reakce indikuje inkompatibilitu krve dárce s krví příjemce. Negativní reakce indikuje kompatibilitu krve dárce s krví příjemce.

#### Omezení

Neočekávané pozitivní výsledky mohou být způsobeny: pseudoaglutinací, autoaglutinací, smíšeným reakčním polem, některými léky, vysokou koncentrací erytrocytů nebo krvinkami senzibilizovanými *in vivo* protilátkami a/nebo složkami komplementu. Neočekávané negativní nebo slabé reakce mohou být způsobeny: slabými antigeny, nízkými titry protilátek, smíšeným reakčním polem, snížením aktivity diagnostik, nedostatečnou interakcí suspenze erytrocytů a plazmy, séra nebo reagentu v inkubační části a/nebo předčasnou interakcí mezi obsahem inkubační části a médiem o vysoké hustotě. Falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledky se mohou objevovat při přítomnosti vzduchových bublin v gelové matrix, kontaminaci testovaného materiálu nebo odchylce od doporučené techniky. Jsou-li použity silně hemolytické vzorky, mohou se objevovat nespecifické reakce. V případě, že vzorek obsahuje zbytky fibrinu, může dojít k zachycení nesenzibilizovaných erytrocytů během centrifugace, jehož výsledkem je tenká červená linie na povrchu sloupce gelové matrix.

#### Reference

1. Race R.R. and Sanger R.; Blood Groups in Man, 6<sup>th</sup> ed. Oxford Blackwell Scientific Publishers 1975.
2. Issitt P.D.; Applied Blood Group Serology 3<sup>rd</sup> 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, 9<sup>th</sup> ed. Blackwell, Oxford, 1993.

*Sanquin zaručuje, že funkční charakteristiky jejích produktů budou takové, jaké jsou popsány v původních návodech k použití od výrobce. Je nezbytné přesně dodržovat postupy, rozvržení testů a doporučení k činidlům a vybavení. Nadace Sanquin se zříká veškeré zodpovědnosti v případě jakýchkoli odchylek od těchto postupů, rozvržení a doporučení.*