

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 Direct Type

REF K7012

IVD C E

066_v02 02/2017 (de)

Ausschließlich für berufliche
Zwecke

Mikrosäulentest zur Typisierung von Blutgruppenantigenen auf Erythrozyten, einschließlich Erythrozyten mit in vivo-Beschichtung mit Antikörpern und/oder Komplementkomponenten

Allgemeine Informationen

Der Cellbind Direct Type Assay ist ein Mikrosäulentest, bei dem sensibilisierte Erythrozyten aus einer Suspension sich an eine Gelmatrix anlagern in einem reaktionsverstärkenden Medium mit hoher Dichte. Der Cellbind Direct Type-Test ist zur Blutgruppenbestimmung und Serumgegenprobe bei Erythrozyten, einschließlich Erythrozyten mit in vivo-Beschichtung mit Antikörpern und/oder Komplementkomponenten bestimmt. Der Cellbind Direct Type eignet sich für manuelle sowie für (halb-)automatische Systeme. Der Cellbind Direct Type erfüllt die Anforderungen der geltenden Standards und Richtlinien. Die Leistungskennzeichen sind in den Freigabedokumenten aufgeführt, die auf Wunsch mit dem Produkt mitgeliefert werden. Der Test beruht auf der Immunfixierung sensibilisierter Erythrozyten in einer Mikrosäule, die eine Gelmatrix enthält. Die Zellsuspension wird gemeinsam mit dem zu testenden Plasma oder der blutgruppenbestimmenden Reagenz zum Inkubationskompartiment der Mikrosäule gegeben. Während der Inkubationsphase binden antigenpositive Erythrozyten die entsprechenden Anti-Erythrozytenantikörper, die in der Reagenz oder dem Plasma vorhanden sind. Im nächsten Schritt werden die Karten drei Zentrifugationsschritten unterzogen. Im ersten Schritt bewirkt das High-Density-Medium eine Trennung der Erythrozyten von Reagenz oder Plasma. Im zweiten Schritt werden die sensibilisierten Erythrozyten agglutiniert und an der Oberseite der Gelmatrix in der Mikrosäule angelagert, während im dritten Schritt nicht sensibilisierte und sehr schwach sensibilisierte Erythrozyten zum Boden der Mikrosäule wandern. Jede Testreihe der Blutgruppenbestimmungen sollte positive und negative Kontrollen enthalten.

Vorsichtsmaßnahmen

Nur zum Gebrauch für die in vitro Diagnostik. Die Cellbind Direct Type Karten sollten aufrecht gelagert werden. Ist dies nicht der Fall, sollten sie vor dem Gebrauch ungefähr 15 Minuten aufrecht positioniert werden, damit sich die Gelmatrix absetzen kann. Verwenden Sie keine Cellbind Direct Type Karten, die Zeichen einer Austrocknung aufweisen (z. B. uneinheitliches Niveau des High-Density-Mediums in den Mikrosäulen einer Karte oder niedrige Niveaus des High-Density-Mediums in den Säulen) oder Zeichen einer Kondensation (d. h. Tropfen in dem Inkubationskompartiment oder auf der Unterseite der Schutzstreifen), beschädigte Schutzstreifen oder Luftblasen in dem High-Density-Medium oder der Gelmatrix. Luftblasen im High-Density-Medium oder in der Gelmatrix, die sich beim Transport gebildet haben, können in den meisten Fällen entfernt werden, indem die verschlossenen Cellbind Direct Type Karten vor dem Gebrauch in der Cellbind Zentrifuge zentrifugiert werden. Cellbind Direct Type Karten sollten nur bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach dem Ablesen der Ergebnisse können die Karten abgedeckt und aufrecht bis zu eine Woche lang bei 2–8°C aufbewahrt werden. Als Konservierungsmittel ist <0,1% Chloramphenicol enthalten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Reagenzien infektiöse Erreger enthalten. Bei der Verwendung und Entsorgung der Behälter und deren Inhalt sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Nach Abschluss des Tests sollte der Abfall entsprechend den örtlichen Regelungen entsorgt werden.

Gewinnung und Vorbereitung der Proben

Proben:

Blutproben aseptisch und mit Zugabe von EDTA als Antikoagulans abnehmen. Es wird dringend empfohlen, die Blutabnahmeröhrchen vor dem Entnehmen von Plasmaproben 5 Minuten lang bei 3000 rcf zu zentrifugieren. Plasmaproben sollten mithilfe einer Pipette und nicht durch Abgießen entnommen werden. Zur Vermeidung einer Blockierung der Gelmatrix dürfen die Plasmaproben keine Leukozyten, Gelfragmente und/oder Fibrinreste enthalten. Für die Serumgegenprobe wird empfohlen, frisches Plasma zu verwenden (innerhalb von 48 Stunden nach dem Abnehmen). Plasmaproben, die nicht sofort getestet werden, können 48 Stunden lang bei 2–8°C oder für längere Zeit bei <–18°C aufbewahrt werden. Es empfiehlt sich, die Plasmaproben nach dem Auftauen 5 Minuten lang bei 3000 rcf zu zentrifugieren, bevor der Test durchgeführt wird, um alle Präzipitate zu entfernen.

Reagenzien:

Cellbind Direct Type	REF K7012: Schachtel mit 48 Karten mit jeweils 6 Mikrosäulen.
Cellbind LISS	REF K7100: Inkubationsmedium zur Herstellung einer 0,5%igen Erythrozytensuspension von Patienten- oder Spendererythrozyten (250 ml)
	REF K7110: Inkubationsmedium zur Herstellung einer 0,5%igen Erythrozytensuspension von Patienten- oder Spendererythrozyten (100 ml)
	REF K7130: Inkubationsmedium zur Herstellung einer 0,5%igen Erythrozytensuspension von Patienten- oder Spendererythrozyten (25 ml)
Cellbind Diluent	REF K7180: Inkubationsmedium zur Herstellung einer 0,5%igen Erythrozytensuspension von 3%igem Sanquin-Erythrozytensuspensionsreagenz (100 ml)
Cellbind A1 reagent red cells	REF K7240: 0,5%ige Erythrozytensuspensionsreagenz zum Nachweis von anti-A-Antikörpern
Cellbind B reagent red cells	REF K7242: 0,5%ige Erythrozytensuspensionsreagenz zum Nachweis von anti-B-Antikörpern
Cellbind O, D-positive reagent red cells	REF K7243: 0,5%ige Erythrozytensuspensionsreagenz zur Verwendung als Positiv- oder Negativkontrolle

Material:

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

Erythrozytensuspensionen:

1. Für die Typisierung muss eine 0,5%ige Suspension der Patienten- oder Spender-Erythrozyten in Cellbind LISS (**[REF]** K7100 **[REF]** K7110 oder **[REF]** K7130) hergestellt werden.
2. Für die Serumgegenprobe muss (0,5%ige oder 3%ige) Sanquin-Erythrozytensuspensionsreagenz verwendet werden. Es wird empfohlen, die fertige 0,5%ige Cellbind Erythrozytensuspensionsreagenz zu verwenden. Wenn 3%ige Sanquin-Erythrozytensuspensionsreagenz verwendet wird, muss eine 0,5%ige Suspension in Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180) nach dem nachstehenden Herstellungsprotokoll hergestellt werden. Für die Verwendung von anderen Erythrozytenreagenzien ist eine Validierung durch den Anwender obligatorisch.

Herstellung von 0,5%igen Erythrozytensuspensionen:

1. 11 µl gepackte Patienten- oder Spendererythrozyten + 2 ml Cellbind LISS (**[REF]** K7100, **[REF]** K7110 oder **[REF]** K7130)
2. 200 µl 3%ige Sanguin-Erythrozytensuspensionsreagenz + 1 ml Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180)

Betriebsanleitung für die Cellbind Zentrifuge

Zur Verwendung der Hettich Zentrifuge für Cellbind Karten sind die folgenden Schritte durchzuführen:

1. Den Cellbind Rotor entsprechend den Angaben im Betriebshandbuch von Hettich einsetzen.
2. Der Rotor wird von der Zentrifuge erkannt und automatisch entsprechend dem Cellbind Protokoll programmiert.
3. Für den nachfolgend im Cellbind Testverfahren erwähnten Zentrifugationsschritt muss „Start“ gedrückt werden und die Rotation der Zentrifuge erfolgt entsprechend den folgenden 3 Stufen:

- 0–2 Minuten	75 rcf	780 rpm
- 2–3 Minuten	200 rcf	1280 rpm
- 3–10 Minuten	1790 rcf	3840 rpm
4. Nach der Zentrifugation kann der Deckel geöffnet und die Karten herausgenommen werden.

Testverfahren

Alle Reagenzien sollten Raumtemperatur annehmen (18–25°C). Keine Cellbind Direct Type-Karten verwenden, die Luftblasen in der Gelmatrix, beschädigte Versiegelungen oder Anzeichen einer Austrocknung (unregelmäßiger Flüssigkeitsstand oder keine Flüssigkeit oberhalb der Gelmatrix) aufweisen.

Typisierung von Blutgruppenantigenen

1. Schutzstreifen von der benötigten Anzahl von Säulen entfernen.
2. 40–50 µl der 0,5%igen Erythrozytensuspension von Patienten- oder Spenderzellen in das Inkubationskompartiment geben.
3. 20 µl der Sanquin Reagenz zur Blutgruppenbestimmung in das Inkubationskompartiment geben.
Hinweis: Eine Liste validierter Blutgruppenreagenzien von Sanquin ist auf der Website www.cellbind.nl erhältlich. Die Verwendung anderer Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung kann zu falschen Ergebnissen führen und solche Reagenzien sind daher vom Anwender selbst zu validieren.
4. Karten in die Cellbind Zentrifuge einsetzen (10 Minuten). Die Zentrifugenparameter sind bereits einprogrammiert.
5. Reaktionen ablesen.

Serumgegenprobe

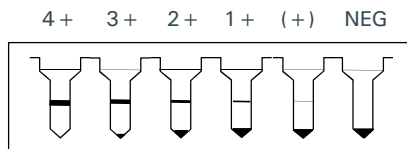
1. Schutzstreifen von der benötigten Anzahl von Säulen entfernen.
2. 40–50 µl der 0,5%igen Erythrozytensuspensionsreagenz in das Inkubationskompartiment geben.
3. Das gleiche Volumen (40–50 µl) Plasma in das Inkubationskompartiment geben.
4. Karten in die Cellbind Zentrifuge einsetzen (10 Minuten). Die Zentrifugenparameter sind bereits einprogrammiert.
5. Reaktionen ablesen.

Interpretation

Bei positiven Reaktionen legen sich Erythrozyten in der obersten Schicht der Gelmatrix an.

Bei negativen Reaktionen ist am Boden der Mikrosäule nur ein einzelner Erythrozytenknopf zu sehen.

Die resultierenden Reaktionsmuster sind in der Abbildung dargestellt:



Wie viele der Erythrozyten sich in der obersten Schicht der Gelmatrix anlegen, hängt von Parametern wie beispielsweise der Antigendichte der Erythrozyten und dem Titer und der Affinität des Antikörpers ab. Auch die Dauer der Anfangs-zentrifugationsschritte und die Zentrifugalkraft während der Endphase spielen eine Rolle.

Ist daher eine Reaktion schwächer als 4+, befinden sich die Zellen ebenfalls am Boden der Mikrosäule. Dasselbe Muster ist bei Mischfeldreaktionen zu erkennen.

Typisierung von Blutgruppenantigenen

Positive Reaktionen mit Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung zeigen das Vorhandensein der entsprechenden Antigene auf den Erythrozyten an. Eine positive Reaktion mit der Pelikloon control monoclonal zeigt, dass die Blutgruppenbestimmung nicht zuverlässig ist, in welchem Fall es wird empfohlen ein anderes Testverfahren zu verwenden. Negative Reaktionen mit Reagenzien zur Blutgruppenbestimmung zeigen, dass die entsprechenden Antigene auf den Erythrozyten nicht nachgewiesen werden konnten.

Serumgegenprobe

Positive Reaktionen mit Erythrozytensuspensionsreagenz zeigen das Vorhandensein des entsprechenden Alloantikörpers an. Eine negative Reaktion zeigt, dass der entsprechende Alloantikörper nicht nachgewiesen werden konnte.

Einschränkungen

Unerwartet positive Ergebnisse durch: Pseudoagglutination, Autoagglutination, Mischfeldreaktion, zu hohe Erythrozytenkonzentration, Erythrozyten, die in vivo mit IgM oder IgA Antikörpern sensibilisiert wurden, bestimmte Medikamente oder das Vorhandensein von Antikörpern, bei denen es sich nicht um anti-A- und / oder anti-B-Alloantikörpern handelt. Unerwartet negative oder schwache Ergebnisse durch: Mischfeldreaktion, Chimärismus, verringerte Aktivität der Reagenzien, unzureichende Interaktion der Erythrozytensuspension und des Plasmas oder der Reagenz in dem Inkubationskompartiment und/oder vorzeitige Interaktion zwischen dem Inhalt des Inkubationskompartiments und dem High-Density-Medium, oder die Tatsache, dass das untersuchte Plasma von einem Neugeborenen, einer Person im (weit) fortgeschrittenen Alter oder von einem Patienten mit Hypogammaglobulinämie stammt. Falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse können die Folge einer Vorhandensein von Luftblasen in der Gelmatrix, Verunreinigung von Testmaterialien oder einer etwaigen Abweichung von der empfohlenen Technik sein. Bei Verwendung stark hämolytischer Proben kann es zum Auftreten unspezifischer Reaktionen kommen. Wenn eine Probe Fibrinreste enthält, kann dies zu einem Trapping nicht sensibilisierter Zellen bei der Zentrifugation führen, woraufhin sich oben an der Gelmatrix eine dünne rote Linie bildet.

Quellen

1. Issitt P.D.; Applied Blood Group Serology, 3rd ed. Montgomery Scientific Publications, Miami, Florida, USA, 1985.
2. Mollison P.L. et al.; Blood Transfusion In Clinical Medicine, 9th ed. Blackwell, Oxford, 1993.

Sanquin garantiert, dass die Funktionsweise seiner Produkte der Beschreibung in der Originalgebrauchsanweisung des Herstellers entspricht. Die strikte Einhaltung der Verfahren und Testanordnungen sowie die Verwendung der empfohlenen Reagenzien und Gerätschaften ist unerlässlich. Falls der Anwender von diesen Maßgaben abweicht, lehnt Sanquin jegliche Verantwortung ab.