

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 (it)

Solo per uso professionale

Test in microcolonna per la rivelazione o l'identificazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti e per la determinazione del gruppo sanguigno

Informazioni generali

Il saggio Cellbind Screen è un test in microcolonna in cui eritrociti sensibilizzati in sospensione sono catturati da una matrice gel contenente anti-IgG, anti-IgM ed anti-C3d in un mezzo potenziante ad alta densità. Ogni card è costituita da sei microcolonne contenenti il gel nel mezzo ad alta densità. Cellbind Screen è stato progettato per la rivelazione o l'identificazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti, per la determinazione del gruppo sanguigno, la prova di compatibilità diretta ed il test antiglobulina diretto (DAT, per la rivelazione *in vivo* del coating degli eritrociti da parte di anticorpi e di componenti del complemento). Cellbind Screen è adatto per l'utilizzo in sistemi manuali ed in sistemi (semi) automatici. Il saggio Cellbind Screen soddisfa i requisiti delle normative e disposizioni vigenti. Le caratteristiche funzionali sono descritte nei documenti di rilascio forniti su richiesta a corredo del prodotto.

Il principio del test è l'immunofissazione degli eritrociti sensibilizzati in una microcolonna contenente una matrice gel. La sospensione cellulare è aggiunta al compartimento di incubazione della microcolonna, insieme al plasma, al siero o al reagente per la determinazione del gruppo sanguigno da analizzare. Nel corso della fase di incubazione, gli eritrociti antigene-positivi si legano ai corrispondenti anticorpi antieritrociti presenti nel siero, nel plasma o nel reagente. Successivamente, le card sono sottoposte a tre fasi di centrifugazione. Nella prima fase, il mezzo ad alta densità provocherà la separazione degli eritrociti dal plasma, dal siero o dal reagente. Nella seconda fase, gli eritrociti sensibilizzati saranno agglutinati e catturati sulla superficie della matrice gel. Nella terza fase, infine, gli eritrociti non sensibilizzati e quelli debolmente sensibilizzati si muovono verso il fondo della microcolonna.

Si raccomanda vivamente l'inclusione di controlli positivi e negativi in ogni serie di determinazioni di gruppo sanguigno.

Avvertenze

Unicamente per uso diagnostico *in vitro*. Conservare le Cellbind Screen card nella scatola originale in poliestere ad una temperatura 2-8 °C compresa. Chiudere la scatola dopo l'uso. In caso contrario, tenere il prodotto in posizione verticale per circa 15 minuti prima dell'uso, per permettere alla matrice gel di posizionarsi nuovamente in modo corretto. Non utilizzare le card Cellbind Screen se queste presentano segni di essiccazione (ad esempio, livello irregolare o assente del mezzo ad alta densità presente nelle microcolonne), condensa (ad esempio, gocce nel compartimento di incubazione o nella parte inferiore della striscia di copertura), strisce di copertura danneggiate o bolle d'aria nel mezzo ad alta densità o nella matrice di gel. Eventuali bolle d'aria nel mezzo ad alta densità o nella matrice gel, formati durante il trasporto, possono essere rimosse in molti casi centrifugando le Cellbind Screen card sigillate nella centrifuga Cellbind prima dell'uso. Non utilizzare le Cellbind Screen card oltre la data di scadenza riportata sull'etichetta delle card. Dopo aver letto i risultati, coprire le card e conservarle in posizione verticale a 2-8 °C fino ad una settimana. Come conservante è utilizzato cloramfenicolo allo <0,1%. I reagenti non possono essere considerati esenti da agenti infettivi. Prestare la massima cura nell'utilizzo e nello smaltimento di ciascun flacone e del rispettivo contenuto. Lo smaltimento dei rifiuti, al termine del test, dovrà essere eseguito nel rispetto delle normative interne di laboratorio.

Raccolta e preparazione dei campioni

Campione:

I campioni di sangue devono essere prelevati in condizioni asettiche con o senza l'aggiunta di anticoagulanti. Si consiglia vivamente di centrifugare le provette per la raccolta di sangue a 3000 rcf prima di prelevare i campioni di siero (centrifuga per 10 minuti) e di plasma (centrifuga per 5 minuti), al fine di evitare reazioni false positive. Prelevare il sangue o il siero con una pipetta senza versarli. Per evitare un eventuale intasamento della matrice gel i campioni non devono contenere globuli bianchi, frammenti di gel e/o residui di fibrina. Per la rivelazione o l'identificazione degli anticorpi diretti contro gli eritrociti si consiglia di utilizzare sangue o siero fresco (entro 48 ore dal prelievo). I campioni di siero o plasma non analizzati immediatamente devono essere conservati per 48 ore ad una temperatura compresa tra 2-8 °C, oppure, per periodi di tempo superiori, a <-18 °C. Dopo lo scongelamento, si consiglia di centrifugare i campioni per 5 minuti a 3000 rcf prima di analizzarli per rimuovere ogni eventuale precipitato. Nel caso del test antiglobulina diretto è necessario utilizzare sangue fresco (entro 48 ore dal prelievo), preferibilmente prelevato in EDTA, per impedire un eventuale coating *in vivo* degli eritrociti da parte dei componenti del complemento. Il plasma non è adatto per la rivelazione di anticorpi che si legano al complemento in quanto i fattori anticoagulanti inibiscono l'attivazione del complemento.

Reagenti:

Cellbind Screen	REF K7000	: scatola contenente 48 card ognuna con 6 microcolonne.
Cellbind LISS	REF K7100	: mezzo di incubazione per preparare le sospensioni cellulari allo 0,5% di eritrociti di donatori o pazienti (250 ml).
	REF K7110	: mezzo di incubazione per preparare le sospensioni cellulari allo 0,5% di eritrociti di donatori o pazienti (100 ml).
	REF K7130	: mezzo di incubazione per preparare le sospensioni cellulari allo 0,5% di eritrociti di donatori o pazienti (25 ml).
Cellbind DILUENT	REF K7180	: mezzo di incubazione per preparare le sospensioni cellulare da un pannello o da un reagente costituito da una sospensione di eritrociti al 3% Sanquin (100 ml).

Cellbind P2	[REF] K7200	:	(2 x 10 ml) reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per la rivelazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti.
Cellbind P3	[REF] K7210	:	(3 x 10 ml) reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per la rivelazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti.
Cellbind P3-P (papain)	[REF] K7211	:	(3 x 10 ml) reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5%, trattato con papaina, per la rivelazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti.
Cellbind ID16	[REF] K7230	:	(16 x 3 ml) reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per l'identificazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti.
Cellbind ID16-P (papain)	[REF] K7231	:	(16 x 3 ml) reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5%, trattato con papaina, per l'identificazione di anticorpi diretti contro gli eritrociti.
Cellbind A ₁ reagent red cells	[REF] K7240	:	reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per l'identificazione degli anticorpi anti-A.
Cellbind A ₂ reagent red cells	[REF] K7241	:	reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per l'utilizzo come controllo positivo o negativo.
Cellbind B reagent red cells	[REF] K7242	:	reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per l'identificazione degli anticorpi anti-B.
Cellbind O, D-positive reagent red cells	[REF] K7243	:	reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% per l'utilizzo come controllo positivo o negativo.

Materiali:

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

Sospensioni di eritrociti:

- Per la tipizzazione, le prove di compatibilità diretta, il test antiglobulina diretto modificato e per l'autocontrollo, preparare una sospensione di eritrociti di paziente o donatore allo 0,5% in Cellbind LISS (**[REF]** K7100 **[REF]** K7110 oppure **[REF]** K7130).
- Per la rivelazione o l'identificazione di anticorpi, è necessario utilizzare un pannello o reagente costituito da una sospensione di eritrociti di Sanquin (allo 0,5% o al 3%). Si consiglia di utilizzare un pannello o un reagente costituito da una sospensione di eritrociti allo 0,5% Cellbind pronto per l'uso. Se si utilizza un pannello o un reagente costituito da una sospensione di eritrociti al 3% Sanquin, preparare una sospensione allo 0,5% in Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180) seguendo il protocollo di preparazione descritto in seguito. Per l'utilizzo di altri eritrociti del pannello o reagente, è obbligatoria la convalida dell'utilizzatore.
Nota: questo protocollo può essere applicato solo a cellule non trattate enzimaticamente (**[REF]** K1384 e **[REF]** K1393). Se è necessario eseguire il test con cellule trattate enzimaticamente, si deve usare Cellbind P3-P (**[REF]** K7211) o Cellbind ID16-P (**[REF]** K7231).

Preparazione delle sospensioni cellulari di eritrociti allo 0,5%:

- 11 µl di eritrociti di donatori o pazienti inviati + 2 ml di Cellbind LISS (**[REF]** K7100, **[REF]** K7110 oppure **[REF]** K7130)
- 200 µl di pannello o reagente costituito da una sospensione di eritrociti al 3% Sanquin + 1 ml di Cellbind DILUENT (**[REF]** K7180)

Procedura operativa per centrifuga Cellbind

Per utilizzare la centrifuga Hettich per card Cellbind eseguire le seguenti operazioni:

- Inserire il rotore Cellbind seguendo le istruzioni riportate sul manuale operativo Hettich.
- Il rotore è riconosciuto dalla centrifuga ed è programmato automaticamente secondo il protocollo Cellbind.
- Per la fase di centrifugazione riportata nelle procedure del test Cellbind premere unicamente il tasto "start". La centrifuga ruoterà secondo il protocollo riportato di seguito:

- 0-2 minuti	75 rcf	780 giri/min.
- 2-3 minuti	200 rcf	1280 giri/min.
- 3-10 minuti	1790 rcf	3840 giri/min.
- Al termine dell'operazione di centrifugazione aprire il coperchio della centrifuga ed estrarre le card.

Metodiche

Portare i reagenti a temperatura ambiente (18-25 °C). Non usare le card Cellbind Screen in presenza di bolle d'aria nella matrice gel, rottura dei sigilli o segni di essiccazione (livello del liquido al di sopra della matrice gel irregolare o assente).

Rivelazione o identificazione di anticorpi

- Rimuovere la striscia di copertura dal numero di colonne richieste.
- Aggiungere 40-50 µl di sospensione di eritrociti di cellule da analizzare (allo 0,5%) nel compartimento di incubazione.
- Aggiungere lo stesso volume (40-50 µl) di plasma o siero nel compartimento di incubazione.
- Incubare per 15 minuti a 37 °C nell'incubatore Cellbind.
- Introdurre le card nella centrifuga Cellbind (10 minuti). I parametri di centrifugazione sono stati già programmati.
- Leggere le reazioni.

Tipizzazione degli antigeni del gruppo sanguigno

- Rimuovere la striscia di copertura dal numero di colonne richieste.
- Aggiungere 40-50 µl di sospensione di eritrociti (allo 0,5%) prelevati da paziente o donatore nel compartimento di incubazione.
- Aggiungere 20 µl di reagente per la determinazione del gruppo sanguigno Sanquin nel compartimento di incubazione.
Nota: sul sito www.cellbind.nl è disponibile un elenco dei reagenti convalidati per la determinazione del gruppo sanguigno Sanquin. Per alcuni di questi reagenti è necessaria un'ulteriore fase di incubazione; questi reagenti sono riportati in questo elenco. L'uso di qualsiasi altro reagente per la tipizzazione può determinare risultati aberranti e deve quindi essere convalidato dall'utilizzatore.

4. Introdurre le card nella centrifuga Cellbind (10 minuti). I parametri di centrifugazione sono stati già programmati.
5. Leggere le reazioni.

Tipizzazione indiretta

1. Rimuovere la striscia di copertura dal numero di colonne richieste.
2. Aggiungere 40–50 µl di sospensione di eritrociti del reagente nel compartimento di incubazione.
3. Aggiungere lo stesso volume (40–50 µl) di plasma nel compartimento di incubazione.
4. Introdurre le card nella centrifuga Cellbind (10 minuti). I parametri di centrifugazione sono stati già programmati.
5. Leggere le reazioni.

Test antiglobulina diretto (DAT) modificato

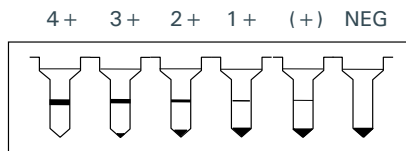
1. Rimuovere la striscia di copertura dal numero di colonne richieste.
2. Aggiungere una goccia (40-50 µl) di sospensione di eritrociti prelevati da paziente (allo 0,5%) nello scomparto di incubazione.
3. Introdurre le card nella centrifuga Cellbind (10 minuti). I parametri di centrifugazione sono stati già programmati.
4. Leggere le reazioni.

Prova di compatibilità diretta

1. Rimuovere la striscia di copertura dal numero di colonne richieste.
2. Aggiungere 40-50 µl di sospensione di eritrociti (allo 0,5%) nel compartimento di incubazione.
3. Aggiungere lo stesso volume (40-50 µl) di plasma o siero prelevato da paziente nel compartimento di incubazione.
4. Incubare per 15 minuti a 37 °C nell'incubatore Cellbind.
5. Introdurre le card nella centrifuga Cellbind (10 minuti). I parametri di centrifugazione sono stati già programmati.
6. Leggere le reazioni.

Interpretazione

In caso di reazione positiva gli eritrociti saranno catturati nello strato superficiale della matrice gel. In caso di reazione negativa sarà possibile vedere solo un bottone di eritrociti sul fondo della microcolonna. I pattern di reazione risultanti sono illustrati nella figura:



La quantità di cellule sensibilizzate catturate nello strato superficiale della matrice gel dipende da diversi parametri tra cui ricordiamo la densità antigenica degli eritrociti ed il titolo e l'affinità degli anticorpi. Essa, inoltre, è determinata dalla durata della seconda fase di centrifugazione e dalla forza di centrifugazione della terza fase.

Di conseguenza, se una reazione è inferiore a 4+, le cellule appariranno anche sul fondo della microcolonna. Lo stesso schema si osserva anche nelle reazioni a campo misto.

Rivelazione o identificazione di anticorpi

Le reazioni positive indicano la presenza di anticorpi diretti contro gli eritrociti nel plasma o nel siero. Le reazioni negative indicano l'assenza di anticorpi diretti contro gli eritrociti. Un autocontrollo positivo può indicare la presenza di autoanticorpi.

Tipizzazione degli antigeni del gruppo sanguigno

Una reazione positiva con i reagenti per la determinazione del gruppo sanguigno indica la presenza degli antigeni corrispondenti sugli eritrociti. Una reazione negativa con i reagenti per la determinazione del gruppo sanguigno indica che la presenza degli antigeni corrispondenti sugli eritrociti non può essere determinata.

Tipizzazione indiretta

Le reazioni positive con gli eritrociti del reagente indicano la presenza del relativo alloanticorpo. Una reazione negativa indica che la presenza del relativo alloanticorpo non può essere rilevata.

Test antiglobulina diretto (DAT) modificato

Le reazioni positive indicano il coating *in vivo* degli eritrociti da parte di anticorpi e/o di componenti del complemento.

Prova di compatibilità diretta

Le reazioni positive indicano l'incompatibilità tra il donatore di sangue ed il ricevente. Le reazioni negative indicano la compatibilità tra il donatore di sangue ed il ricevente.

Limitazioni

Risultati positivi imprevisti dovuti a: pseudoagglutinazione, autoagglutinazione, reazione a campo misto, alcuni farmaci, concentrazioni troppo elevate degli eritrociti o eritrociti sensibilizzati *in vivo* con anticorpi e/o componenti del complemento. Risultati negativi o deboli dovuti a: antigeni o anticorpi deboli, titolo ridotto degli anticorpi, reazione a campo misto, diminuita attività dei reagenti, interazione insufficiente tra sospensione di eritrociti e plasma, siero o reagente nel compartimento di incubazione e/o interazione prematura tra il contenuto del compartimento di incubazione e il mezzo ad alta densità. Risultati falsi positivi o falsi negativi possono essere dovuti alla presenza di bolle d'aria nella matrice gel, contaminazione dei materiali impiegati per il test o a qualunque deviazione rispetto alla tecnica raccomandate. In caso di campioni altamente emolizzati si possono verificare reazioni aspecifiche. Eventuali residui di fibrina presenti in un campione possono intrappolare cellule non sensibilizzate durante la centrifugazione dando origine ad una sottile linea rossa alla sommità della matrice gel.

Bibliografia

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

Si garantisce che i prodotti Sanquin daranno i risultati indicati nelle istruzioni d'uso del fabbricante originario. È essenziale attenersi rigorosamente a queste indicazioni circa le procedure e layout di prova e utilizzare i reagenti e le apparecchiature raccomandate. Sanquin declina ogni responsabilità per eventuali conseguenze derivanti dalla mancata osservanza di queste norme.