

Pro použití při odběru a separaci periferních mononukleárních buněk z plné krve

PŘÍBALOVÁ INFORMACE

Pro diagnostické použití *in vitro*

Tento příbalový leták se vztahuje na použití:

Zkumavky Leucosep™ (katalogové číslo: LTK.615)

Účel použití

Zkumavky Leucosep jsou určeny k odběru a separaci periferních mononukleárních buněk (PBMC) z plné krve. Zkumavky usnadňují separaci PBMC z plné krve za použití polysacharidového roztoku pro gradientní separaci před jejich uplatněním v testech ELISPOT.

Úvod

Techniky ELISPOT využívají T buňky v PBMC separovaných z plné krve. Jedna z metod separace těchto buněk vyžaduje použití polysacharidového roztoku pro gradientní separaci. Tento postup zahrnuje řadu kroků, které je nutno provést pečlivě, aby bylo dosaženo optimálních výsledků. Použití zkumavek Leucosep umožňuje snížit počet jednotlivých kroků, uplatněna metoda je důkladnější a doba potřebná k provedení separace je kratší.

Princip metody

Zkumavky Leucosep byly vyvinuty s cílem dosáhnout optimální separace PBMC z lidské plné krve pomocí hustotní centrifugace. Zkumavky Leucosep obsahují porézní bariéru v průhledné polypropylénové zkumavce. Tato biologicky inertní bariéra sestává z vysoce kvalitního polyethylenu. Zkumavka Leucosep nevyžaduje časově náročné a pracné vrstvení materiálu vzorku na polysacharidový roztok pro gradientní separaci. Antikoagulovaná plná krev se smísí s kultivačním médiem a poté se přelije do zkumavky Leucosep. Porézní bariéra brání smísení krve se separačním médiem. Během centrifugace se PBMC následkem rozdílné hustoty separují od nežádoucích erytrocytů a shromáždí se na rozhraní nad separačním médiem. Po dokončení separace brání bariéra nové kontaminaci vrstvy PBMC při jejím odebírání.

Upozornění a bezpečnostní opatření

1. Pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
2. K použití pouze odbornými pracovníky; provádějící pracovník musí být řádně vyškolen, aby mohl tento postup aplikovat.
3. Vzorky krve musejí být považovány za potenciálně nebezpečné. Při manipulaci s materiálem lidského původu je nutno dbát zvýšené opatrnosti.
4. Manipulace se vzorky plné krve a komponenty testu během jejich používání, skladování a likvidace musí být v souladu s postupy stanovenými v příslušných národních předpisech a nařízeních týkajících se ochrany před biologickým nebezpečím.
5. Veškeré odchýlení se od doporučených postupů pipetování, promývacích technik, délek centrifugace či teploty může narušit izolaci PBMC a ovlivnit tak výsledky testů.
6. Neodebírejte krev do zkumavek určených k přípravě buněk (CPT™, Becton Dickinson), ani do zkumavek určených k odběru krve s EDTA, neboť nejsou kompatibilní se zkumavkami Leucosep.
7. Vzorky plné krve neuchovávejte v chladničce, ani je nezmrazujte. Pokud mají být vzorky zpracovány pomocí činidla *Xtend*®, uchovávejte je a přepravujte do laboratoře při teplotě od 18–25 °C, resp. 10–25 °C.
8. Krev nesmí být skladována déle než 8 hodin, anebo 32 hodin, pokud bude později zpracována činidlem T-Cell *Xtend*.
9. K odběru vzorků venózní krve používejte pouze nádoby k jednorázovému použití.
10. Nepoužívejte po uplynutí doby použitelnosti.
11. Při používání tohoto produktu používejte aseptický postup.
12. Zkumavky Leucosep neskladujte na přímém světle.
13. Zkumavky Leucosep nepoužívejte, pokud jsou poškozené, nebo pokud je polysacharidový roztok pro gradientní separaci znehodnocen, o čemž svědčí jasně žlutá barva nebo přítomnost pevných částic v čirém roztoku.
14. Zkumavky Leucosep nepoužívejte opakovaně. Každá zkumavka je určena k jednorázovému použití.
15. Při odběru plné krve postupujte dle pokynů pro zkumavky k odběru vzorků krve.

Dodávaný materiál

Každá krabička obsahuje:

50 zkumavek Leucosep předem naplněných polysacharidovým roztokem pro gradientní separaci.
CD s příbalovým letákem a bezpečnostním listem.

Skladování a stabilita

Uzavřené zkumavky uchovávejte při teplotě 4–30 °C až do data použitelnosti uvedeného na obalu. Otevřený výrobek pak uchovávejte při pokojové teplotě (18–25 °C) a upotřebte do 12 týdnů po otevření vnějšího obalu, nebo před uplynutím data použitelnosti uvedeného na krabičce podle toho, co nastane dříve.

Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí balení

1. Heparinizované zkumavky k odběru krve.
2. Buněčná kultivační média AIM-V® a RPMI.
3. Centrifugační zkumavky 15 mL.
4. Centrifuga k frakcionaci periferních mononukleárních buněk dosahující nejméně 1000 RCF (g), ve které je možno udržet vzorky při pokojové teplotě (18–25 °C).
5. Skříň 2. úrovně biologické bezpečnosti (BL 2) (doporučena).
6. Pipety a sterilní špičky.
7. Sada ELISPOT.
8. Může být požadováno činidlo T-Cell *Xtend*, pokud jsou použity vzorky starší než 8 hodin.

Postup

Poznámka: Při následujících krocích je nutno uplatnit zásady správné laboratorní praxe:

1. Před použitím zkumavek Leucosep zajistěte, aby byl jejich požadovaný počet o pokojové teplotě (18–25 °C).
2. Pokud je polysacharidový roztok pro gradientní separaci soustředěn nad porézní bariérou (škráloup), centrifugujte zkumavky Leucosep při 350 x g po dobu jedné minuty, aby se polysacharidový roztok pro gradientní separaci dostal pod škráloup.
3. Vzorek plné krve převratte a naředte v 15ml centrifugační zkumavce v poměru 5 dílů krve na 3 díly buněčného kultivačního média AIM-V nebo RPMI. Centrifugační zkumavku několikrát převratte, aby se obsah promíchal.
4. Naředěnou krev nalijte přímo do zkumavky Leucosep a centrifugujte při 1000 x g bez přestávky po dobu 10 minut při teplotě 18–25 °C.
5. Nasajte zkalenou vrstvu periferních mononukleárních buněk a v 15ml centrifugační zkumavce doplňte médiem AIM-V nebo RPMI do ~10 mL. Centrifugační zkumavku převratte, aby se obsah promíchal.
6. Centrifugujte při 600 x g po dobu 7 minut. Supernatant zlikvidujte.
7. Buněčnou peletu resuspendujte s AIM-V nebo s RPMI, doplňte AIM-V nebo RPMI do ~10 mL a centrifugujte při 350 x g dalších 7 minut.
8. Zlikvidujte supernatant a resuspendujte buněčnou peletu v objemu AIM-V (**nikoli** RPMI) potřebném pro test ELISPOT.
9. Pokud potřebujete buňky pro antigenní stimulaci v testu ELISPOT, naředte buňky příslušným způsobem pomocí AIM-V (**nikoli** RPMI).

Omezení

1. Stejně jako u jiných separačních metod, také zkumavky Leucosep mohou změnit podíl některých podskupin periferních mononukleárních buněk (např. T a B buněk) oproti buňkám v neseparované plné krvi. Tato změna je v běžných případech poměrně nevýznamná.

Kontrola kvality

V rámci kontroly kvality jednotlivých laboratoří musejí být navrženy a schváleny metody počítání buněk, aby bylo zajištěno, že pro příslušný testovací systém bylo získáno dostatečné množství PBMC. Dále je třeba zajistit, aby byly při kontrole kvality laboratoře použity pozitivní a negativní kontroly vyvinuté k zajištění předpokládané výkonnosti T buněk v příslušném testovacím systému.

Charakteristika výkonu

Čerstvá krev

Od 15 dárců bylo získáno 6 mL krve. Vzorky od jednotlivých dárců byly zpracovány během 8 hodin po venepunkci. Vzorky byly zpracovány ve zkumavkách Leucosep s použitím separačního média na bázi polysacharózy. Buňky získané ze všech vzorků byly životaschopné a funkční v testu ELISPOT.

Skladovaná krev s použitím činidla T-Cell Xtend

Byly získány vzorky krve od 205 dárců, které byly použity k testování obnovy buněk pomocí zkumavek Leucosep naplněných separačním médiem na bázi polysacharózy. Získáno bylo 6 mL krve na dárce a odebraná krev byla zpracována v rozmezí 29-32 hodin po venepunkci s použitím reakčního činidla T-Cell Xtend.

Buňky získané ze všech vzorků byly životaschopné a funkční v testu ELISPOT.

Poznámka::Doporučujeme použít 6 mL na dárce. Pokles objemu krve může mít vliv na obnovu buněk.

Hlášení závažných příhod

Dojde-li v souvislosti s tímto prostředkem k závažné příhodě, musí být nahlášena zákaznickému servisu. Ve členských státech Evropské unie musí být závažné příhody hlášeny také příslušným orgánům dané země (ministerstvu odpovědnému za zdravotnické prostředky pro diagnostické použití *in vitro*). Informace o tom, jak se obrátit na příslušný orgán, naleznete na vládních webových stránkách. Příhoda se označuje jako „závažná příhoda“, pokud přímo či nepřímo vedla, mohla vést nebo může vést k:

- úmrtí pacienta, uživatele nebo jiné osoby,
- dočasnému nebo permanentnímu závažnému zhoršení zdravotního stavu pacienta, uživatele nebo jiné osoby,
- závažnému ohrožení veřejného zdraví.

Kontaktní informace zákaznického servisu

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Spojené království
Tel.: +44 (0) 1235 442780
E-mail: info@oxfordimmunotec.com











Podpůrné dokumenty výrobku ke stažení a další technické informace naleznete na naší webové stránce:
www.oxfordimmunotec.com

Návod k řešení problémů při odběru a separaci periferních mononukleárních buněk pro test ELISPOT

Problém	Možná příčina	Možné řešení
Získání malého počtu buněk	<p>Leukopenie</p> <p>Nesprávný odběr krve</p> <p>Zkumavka učená k odběru krve nemá pokojovou teplotu (18–25 °C)</p> <p>Krev není uchovávána při požadované teplotě</p> <p>Nebyly uplatněny doporučené objemy nebo ředění</p>	<p>Přidejte další zkumavku na odběr krve</p> <p>CPT a zkumavky na odběr krve s EDTA nejsou kompatibilní se zkumavkami Leucosep</p> <p>Nechte zkumavku určenou k odběru krve uvést na pokojovou teplotu</p> <p>Zajistěte, aby byla krev přepravována při teplotě 18–25 °C nebo 10–25 °C, pokud je použito činidlo T-Cell <i>Xtend</i></p> <p>Zajistěte, aby byly dodržovány správné pokyny</p>
Kontaminace červenými krvinkami	<p>Krev není uchovávána při požadované teplotě</p> <p>Zkumavka učená k odběru krve nemá pokojovou teplotu (18–25 °C)</p> <p>Krev není naředěna</p> <p>Převrácení vzorku krve ve zkumavce Leucosep</p> <p>Nesprávná centrifugace</p> <p>Neúplná separace vzorku</p>	<p>Zajistěte, aby byla krev přepravována při teplotě 18–25 °C nebo 10–25 °C, pokud je použito činidlo T-Cell <i>Xtend</i></p> <p>Nechte zkumavku určenou k odběru krve uvést na pokojovou teplotu</p> <p>Zajistěte, aby byl dodržen postup ředění krve</p> <p>Zajistěte, aby byla zkumavka Leucosep před centrifugací ve svislé poloze</p> <p>Zajistěte, aby byly dodrženy pokyny k centrifugaci</p> <p>Zkontrolujte, zda je centrifuga schopna chladit při teplotě 18–25 °C</p> <p>Zkontrolujte, zda je brzda centrifugy vypnuta</p> <p>Prodlužte krok centrifugace o 10 minut</p>

Problém	Možná příčina	Možné řešení
Neohraničená nebo nezřetelná mononukleárová vrstva	Neúplná separace vzorku Centrifuga není správně kalibrována Nesprávná centrifugace Hyperlipidemický vzorek	Prodlužte krok centrifugace o 10 minut Proveďte kalibraci centrifugy Zajistěte, aby byly dodrženy pokyny k centrifugaci Odeberte vzorek na lačno
Neplatné výsledky	Neplatné výsledky mohou být způsobeny řadou problémů spojených s nesprávnou manipulací se vzorky	Viz výše uvedené oddíly

Vysvětlivky značka

-  Použit do / Datum expirace (rok-měsíc-den)
-  Číslo šarže
-  Katalogové číslo
-  Pozor, viz návod k použití
-  Výrobce
-  Stačí pro „n“ testů
-  Prostředek pro diagnostiku *in vitro*
-  Teplotní omezení / Skladovat při teplotě mezi
-  Viz návod k použití
-  Zplnomocněný zástupce pro EU

Loga T-Cell *Xtend* a Oxford Immunotec jsou ochrannými známkami společnosti Oxford Immunotec Limited.

Leucosep je ochrannou známkou společnosti Greiner Bio-One.

AIM-V je ochranná známka společnosti Life Technologies Corporation.

CPT je ochranná známka společnosti Becton, Dickinson and Company.

Použití činidla T-Cell *Xtend* je chráněno následujícími patenty a patenty v řízení:

EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

© 2022, Oxford Immunotec Limited. Všechna práva vyhrazena.

■ Výrobce:

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Spojené království
www.oxfordimmunotec.com

 Zplnomocněný zástupce pro EU:

Oxford Immunotec (Ireland)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Irská republika

Číslo revize	Datum vydání	Úpravy
1–4		Podrobnosti k dispozici na vyžádání od společnosti Oxford Immunotec.
5	Červen 2022	Změna adresy výrobce. Přidání historie revizí. Přidání pokynů k hlášení závažných příhod. Přidání EC REP a dovozce pro Evropskou unii podrobnosti.
6	října 2022	škrtnout podrobnosti Dovozece pro Evropskou unii



Oxford Immunotec Ltd.
143 Park Drive East, Milton Park,
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4SE, Spojené království.
Tel.: +44 (0)1235 442780
Fax: +44 (0)1235 442781



www.oxfordimmunotec.com