

Zur Anwendung bei Entnahme und Separation von peripheren mononukleären Zellen
aus Vollblut

PACKUNGSBEILAGE

Zur *In-vitro*-Diagnostik

Diese Packungsbeilage bezieht sich auf die Anwendung von:

Leucosep™-Röhrchen (Katalognummer: LTK.615)

Verwendungszweck

Leucosep Röhrchen wurden zur Gewinnung und Separation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus Vollblut entwickelt. Die Röhrchen vereinfachen die Separation von PBMCs aus Vollblut vor der Verwendung dieser Zellen in ELISPOT-Assays mithilfe eines polysucrose basierten Trennmediums.

Einleitung

Für die ELISPOT-Verfahren werden T-Zellen aus PBMCs verwendet, die aus Vollblut separiert wurden. Bei einer Separationsmethode werden die Zellen mithilfe eines polysucrose basierten Separationsmediums getrennt. Dieses Verfahren umfasst mehrere Schritte, die mit gr o ter Sorgfalt ausgeführt werden müssen, um optimale Ergebnisse zu erhalten. Durch die Verwendung von Leucosep Röhrchen verringert sich die Anzahl der notwendigen Verfahrensschritte, das Verfahren selbst wird dadurch stabiler und der Zeitaufwand für die Durchführung der Separation wird reduziert.

Prinzipien der Methode

Leucosep Röhrchen wurden zur optimalen Separation von PBMCs aus humanem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation entwickelt. Leucosep Röhrchen sind aus transparentem Polypropylen und enthalten eine poröse Trennscheibe. Diese biologisch inerte Trennscheibe besteht aus hochwertigem Polyethylen. Mit den Leucosep Röhrchen entfällt das zeitaufwändige und mühsame  berschichten von polysucrose basierten Separationsmediums mit dem Probenmaterial. Antikoaguliertes Vollblut wird mit Kulturmedium gemischt und dann in die Leucosep Röhrchen gegossen. Eine Durchmischung mit dem Separationsmedium wird durch die poröse Trennscheibe verhindert. Während der Zentrifugation werden die PBMCs aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von unerwünschten Erythrozyten separiert und in einer Schicht an der Grenzfläche oberhalb des Separationsmediums angereichert. Nach erfolgter Separation wird durch die Trennscheibe eine Rekontamination der PBMC-Fraktion während der Entnahme verhindert.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für die In-vitro-Diagnostik.
2. Nur zur Verwendung durch qualifiziertes Fachpersonal, das in diesem Verfahren geschult ist.
3. Blutproben müssen als potenziell infektiös angesehen werden. Material humanen Ursprungs ist daher immer unter Einhaltung geeigneter Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln.
4. Der Umgang mit Vollblutproben und Assay-Bestandteilen bei Verwendung, Lagerung und Entsorgung muss in Übereinstimmung mit den in entsprechenden nationalen Sicherheitsrichtlinien oder den hierzu geltenden Vorschriften definierten Verfahren zur Biogef hrdung erfolgen.
5. Jede Abweichung von den empfohlenen Verfahren zu Pipettierung, Waschtechniken, Zentrifugationszeiten und/oder Temperaturvorgaben kann sich auf die Reinheit der PBMC-Isolationen auswirken und folglich die Testergebnisse beeinflussen.
6. Das Blut darf nicht in CPT-Röhrchen (Cell Preparation Tubes - CPT™, Becton Dickinson) oder EDTA-Blutentnahmeröhrchen abgenommen werden, da diese nicht mit den Leucosep Röhrchen kompatibel sind.
7. Vollblutproben dürfen nicht gekühlt oder eingefroren werden. Die Lagerung der Blutproben und der Transport zum Labor muss bei einer Temperatur von 18-25  C erfolgen, bzw. bei einer Temperatur von 10-25  C , wenn die Proben mit dem T-Cell *Xtend*™-Reagenz behandelt werden.
8. Das Blut sollte nicht länger als 8 Stunden gelagert werden, bzw. nicht länger als 32 Stunden, wenn es später mit dem T-Cell *Xtend*-Reagenz behandelt wird.
9. Für die Entnahme von venösem Blut dürfen nur Einmalbeh lter verwendet werden.
10. Nach dem Verfallsdatum darf das Produkt nicht mehr verwendet werden.
11. Bei der Verwendung dieses Produkts sind aseptische Techniken anzuwenden.
12. Leucosep Röhrchen müssen vor direkter Lichteinstrahlung gesch tzt werden.
13. Nicht verwenden, wenn die Leucosep-Röhrchen beschädigt sind oder wenn die polysucrose-basierte Trennlösung bereits verfallen ist, was anhand einer deutlichen Gelbfärbung oder Partikelbildung in der sonst klaren Lösung deutlich erkennbar ist.
14. Leucosep-Röhrchen nicht wiederverwenden. Jedes Röhrchen ist nur zum Einmalgebrauch vorgesehen.
15. Bei der Entnahme von Vollblut sind die Anweisungen für die Blutentnahmeröhrchen zu befolgen.

Mitgelieferte Materialien

Jede Packung enthält:

50 Leucosep Röhrchen vorbefüllt mit polysucrose basierter Trennlösung.

CD mit Packungsbeilage und Sicherheitsdatenblätter (MSDS – Material Safety Data Sheet).

Lagerung und Stabilität

Ungeöffnet kann das Produkt bei 4-30 °C bis zum auf der Packung angegebenen Verfallsdatum verwendet werden. Das Produkt kann nach Öffnen der äußeren Verpackung bei Raumtemperatur (18-25 °C) gelagert werden und muss innerhalb von 12 Wochen nach Anbruch verbraucht werden, sofern diese Frist nicht das auf der Verpackung angegebene Verfallsdatum überschreitet.

Benötigte aber nicht mitgelieferte Ausrüstung und Materialien

1. Heparinisierte Blutentnahmeröhrchen.
2. AIM V®- und RPMI-Zellkulturmedium.
3. 15-mL-Zentrifugenröhrchen.
4. Zentrifuge für die Fraktionierung von PBMCs mit einer Leistung von mindestens 1000 RZB (g). Die Zentrifuge sollte die Proben auf Raumtemperatur (18-25 °C) halten.
5. Biosicherheitswerkbank der Klasse 2 (BL 2) (empfohlen).
6. Pipetten und sterile Pipettenspitzen.
7. ELISPOT Kit.
8. Falls Proben verwendet werden, die älter als 8 Stunden sind, kann die Verwendung von T-Cell *Xtend*-Reagenz erforderlich sein.

Durchführung

Hinweis: Die folgenden Schritte sind im Rahmen der Guten Laborpraxis (GLP – Good Laboratory Practice) durchzuführen:

1. Stellen Sie sicher, dass die benötigte Anzahl an Leucosep Röhrchen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25 °C) gebracht wird.
2. Falls sich Trennlösung oberhalb der porösen Trennscheibe angesammelt hat, zentrifugieren Sie die Leucosep Röhrchen für 1 Minute bei 350xg, um die Trennlösung unter die Trennscheibe zu bringen .
3. Invertieren Sie das Röhrchen mit der Vollblutprobe und verdünnen Sie dann die Probe in einem Verhältnis von 5 Teilen Blut zu 3 Teilen AIM V- oder RPMI-Zellkulturmedium in einem 15-mL-Zentrifugenröhrchen. Zum Mischen invertieren Sie das Zentrifugenröhrchen mehrmals.
4. Gießen Sie das verdünnte Blut direkt in die Leucosep Röhrchen und zentrifugieren Sie es bei 1000 x g für 10 Minuten bei 18-25 °C ohne Bremse.
5. Entnehmen Sie die trübe PBMC-Schicht und füllen Sie sie mit AIM V- oder RPMI-Medium in einem 15-mL-Zentrifugenröhrchen bis auf ca. 10 mL auf. Zum Mischen invertieren Sie das Zentrifugenröhrchen.
6. Zentrifugieren Sie die Mischung für 7 Minuten bei 600 x g. Verwerfen Sie den Überstand.
7. Resuspendieren Sie das Zellpellet mit AIM-V- oder RPMI-Medium, füllen Sie entsprechend mit AIM V- oder RPMI-Medium bis auf ca. 10 mL auf und zentrifugieren Sie nochmals für 7 Minuten bei 350 x g.
8. Verwerfen Sie den Überstand und resuspendieren Sie das Zellpellet in dem für den ELISPOT-Assay erforderlichen Volumen an AIM V-Medium (**nicht** RPMI-Medium).
9. Wenn Sie Zellen zur Antigenstimulation in einem ELISPOT-Assay benötigen, verdünnen Sie die Zellen entsprechend mit AIM V-Medium (**nicht** RPMI-Medium).

Einschränkungen

1. Wie bei anderen Separationsmethoden kann sich auch mit Leucosep Röhrchen der Anteil einiger Untergruppen von PBMCs (z. B. T-Zellen und B-Zellen) gegenüber denjenigen in nicht separiertem Vollblut verändern. Es wird davon ausgegangen, dass diese Veränderungen im Normalfall relativ unbedeutend sind.

Qualitätskontrolle

Als Bestandteil laboreigener Qualitätskontrollmaßnahmen sollten Zellzählmethoden festgelegt und validiert werden, um sicherzustellen, dass ausreichend PBMCs für das jeweilige Testsystem gewonnen wurden. Außerdem sollten im Rahmen der Qualitätskontrolle Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt werden, die so entwickelt wurden, dass sie die erwartete Leistung der T-Zellen innerhalb des jeweiligen Testsystems gewährleisten.

Leistungsmerkmale

Frischblut

6 mL-Blutproben wurden von 15 Spendern gewonnen. Die Proben jedes Spenders wurden innerhalb von 8 Stunden nach der venösen Abnahme mithilfe von Leucosep Rörchen mit polysucrose basierter Trennlösung verarbeitet. Die erhaltenen Zellen waren lebensfähig und funktional im ELISPOT test.

Gelagertes Blut unter Verwendung von T-Cell Xtend-Reagenz

Blutproben wurden von 205 Spendern gewonnen und zur Bestimmung der Zellausbeute verwendet. 6 mL Blut wurden zwischen 29-32 Stunden nach Blutentnahme, unter Verwendung von T-Cell Xtend-Reagenz und polysucrose Separationsmedium gefüllten Leucosep Rörchen, verarbeitet. Die erhaltenen Zellen waren lebensfähig und funktional im ELISPOT test.

Anmerkung: Es wird empfohlen mindestens 6 mL Blut pro Spender zu verwenden. Eine Verringerung der verwendeten Blutmenge kann sich auf die Zellausbeute auswirken.

Meldung ernster Zwischenfälle

Wenn ein ernster Zwischenfall im Zusammenhang mit diesem Produkt aufgetreten ist, sollte er dem Kundendienst gemeldet werden. In den Mitgliedstaaten der Europäischen Union sollten ernste Zwischenfälle auch der zuständigen Behörde Ihres Landes (der für In-vitro-Diagnostika zuständigen Regierungsstelle) gemeldet werden. Auf der Website Ihrer Regierung finden Sie Hinweise darauf, wie Sie sich an Ihre zuständige Behörde wenden können. Als „ernster Zwischenfall“ gilt jeder, der unmittelbar oder mittelbar mit Folgendem in Zusammenhang stand, gestanden haben könnte oder stehen könnte:

- Tod eines Patienten, Bedieners oder einer anderen Person;
- vorübergehende oder dauerhafte ernsthafte Verschlechterung des Gesundheitszustands eines Patienten, Bedieners oder einer anderen Person;
- ernsthafte Gefährdung der öffentlichen Gesundheit.

Kundendienstanschrift

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











Downloads zum Product Support und weitere technische Daten finden Sie auf unserer Website:
www.oxfordimmunotec.com

Problembekämpfung bei der Gewinnung und Separation von PBMCs für ELISPOT

Problem	Potenzielle Ursache	Mögliche Lösung
Niedrige Zellausbeute	Leukopenie	Zusätzliches Blutentnahmeröhrchen verwenden
	Fehler bei Blutentnahme	CPT und EDTA-Blutentnahmeröhrchen sind nicht mit Leucosep Röhrchen kompatibel
	Das Blutentnahmeröhrchen ist nicht auf Raumtemperatur (18-25 °C)	Blutentnahmeröhrchen auf Raumtemperatur bringen
	Das Blut wurde nicht bei der erforderlichen Temperatur gelagert	Sicherstellen, dass der Versand des Blutes bei 18-25 °C erfolgt, bzw. bei 10-25 °C, falls das T-Cell <i>Xtend</i> -Reagenz zur Anwendung kommt
	Die verwendeten Volumina oder Verdünnung entsprechen nicht den empfohlenen Werten	Sicherstellen, dass die Anweisungen korrekt befolgt werden
Erythrozytenkontamination	Das Blut wurde nicht bei der erforderlichen Temperatur gelagert	Sicherstellen, dass der Transport des Blutes bei 18-25 °C erfolgt, bzw. bei 10-25 °C, falls das T-Cell <i>Xtend</i> -Reagenz zur Anwendung kommt
	Blutentnahmeröhrchen ist nicht auf Raumtemperatur (18-25 °C)	Blutentnahmeröhrchen auf Raumtemperatur bringen
	Das Blut ist nicht verdünnt	Sicherstellen, dass das Blut entsprechend dem Verfahren verdünnt ist
	Umdrehen des Leucosep Röhrchens mit der Blutprobe	Sicherstellen, dass das Leucosep Röhrchen vor der Zentrifugation in aufrechter Position bleibt
	Fehler bei der Zentrifugation	Sicherstellen, dass die Zentrifugationsanweisungen befolgt werden Prüfen, ob eine Zentrifugenkühlung bei 18-25 °C möglich ist Prüfen, ob die Zentrifugenbremse ausgeschaltet ist
	Zellseparation unvollständig	Verlängerung des Zentrifugationsschritts um 10 Min

Problem	Potenzielle Ursache	Mögliche Lösung
Keine definierte oder deutliche Schicht aus mononukleären Zellen	Zellseparation unvollständig	Verlängerung des Zentrifugationsschritts um 10 Min
	Zentrifuge ist nicht richtig kalibriert	Zentrifuge neu kalibrieren
	Fehler bei der Zentrifugation	Sicherstellen, dass die Zentrifugationsanweisungen befolgt werden
	Hyperlipämische Probe	Nüchtern-Blutprobe abnehmen
Ungültige Ergebnisse	Ungültige Ergebnisse können durch eine Reihe von Fehlern bei der Probenbehandlung entstehen	Siehe oben stehende Abschnitte

Symbolerklärungen


	Verwendbar bis/Verfallsdatum (Jahr-Monat-Tag)
	Chargennummer
	Artikelnummer
	Achtung, siehe Gebrauchsanweisung
	Hersteller
	Ausreichend für „n“ Tests
	In-vitro-Diagnostikum
	Temperaturbeschränkung/Lagerung bei
	Siehe Gebrauchsanweisung
	Bevollmächtigter Vertreter in der EU

T-Cell *Xtend* und das Oxford-Immunotec-Logo sind Warenzeichen von Oxford Immunotec Limited.
 Leucosep ist ein Warenzeichen von Greiner Bio-One
 AIM-V ist ein Warenzeichen von Life Technologies Corporation.
 CPT ist ein Warenzeichen von Becton, Dickinson and Company.

Die Verwendung des T-Cell *Xtend*-Reagenz ist durch die folgenden Patente und Patentanmeldungen geschützt:
 EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205.

© 2022, Oxford Immunotec Limited. Alle Rechte vorbehalten.

 Hersteller:
Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Vereinigtes Königreich
www.oxfordimmunotec.com

 Bevollmächtigter Vertreter in der EU:
Oxford Immunotec (Ireland)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Republik Irland

Versionsstand	Ausgabedatum	Änderungen
1 - 4	Angaben auf Anfrage von Oxford Immunotec erhältlich.	
5	Juni 2022	Änderung der Herstelleranschrift. Ergänzung des Änderungsprotokolls. Aufnahme von Anweisungen zur Meldung ernster Zwischenfälle, Einzelheiten zum EC REP und zum EU-Importeur
6	Oktober 2022	Löschung der Angaben zum EU-Importeur.



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

www.oxfordimmunotec.com

