

Pour utilisation en vue du recueil et de la séparation des cellules mononucléaires
périphériques de sang total

NOTICE

Pour usage diagnostique *in vitro*

Cette notice concerne l'utilisation du produit suivant :

Tubes Leucosep™ (Numéro de catalogue : LTK.615)

Usage prévu

Les tubes Leucosep sont destinés au recueil et à la séparation des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) du sang total. Les tubes facilitent la séparation des PBMC du sang total grâce à une solution de séparation par gradient à base de polysucrose, avant l'utilisation de ces cellules lors de dosages ELISPOT.

Introduction

La technique ELISPOT utilise les lymphocytes T dans les PBMC qui ont été séparées du sang total. Une méthode pour séparer ces cellules nécessite l'utilisation d'une solution de séparation par gradient à base de polysucrose. Cette procédure implique un certain nombre d'étapes qui doivent être conduites avec soin afin d'assurer des résultats optimaux. L'utilisation de tubes Leucosep réduit le nombre d'étapes, rendant la procédure plus solide et réduisant le temps requis pour réaliser la procédure de séparation.

Principe de la méthode

Les tubes Leucosep ont été développés pour réaliser une séparation optimale des PBMC du sang total humain au moyen d'une centrifugation en gradient de densité. Les tubes Leucosep incorporent une barrière poreuse dans un tube en polypropylène transparent. Cette barrière biologiquement inerte est composée de polyéthylène de haute qualité. Le tube Leucosep élimine la stratification lente et laborieuse de l'échantillon sur une solution de séparation par gradient à base de polysucrose. Le sang anticoagulé est mélangé avec le milieu de culture et ensuite versé dans le tube Leucosep. La barrière poreuse empêche le mélange du sang avec le milieu de la séparation. Lors de la centrifugation, les PBMC sont séparées des érythrocytes indésirables en raison de leurs différentes densités, et recueillis dans l'interface au-dessus du milieu de séparation. Lorsque la séparation est terminée, la barrière empêche la recontamination de la couche de PBMC lors de son retrait.

Avertissements et précautions

1. Pour usage diagnostique *in vitro* uniquement.
2. Pour un usage professionnel uniquement ; les opérateurs doivent être formés à cette procédure.
3. Tous les échantillons doivent être manipulés comme des produits potentiellement infectieux. Des précautions doivent être prises lors de la manipulation de produits d'origine humaine.
4. La manipulation, l'utilisation, la conservation et l'élimination du sang complet et des composants du test doivent se faire conformément aux procédures définies par les lignes directrices ou les réglementations nationales en matière de biosécurité.
5. Toute déviation par rapport aux procédures recommandées pour le pipetage, les techniques de lavage, les temps et/ou les températures de centrifugation peut altérer la pureté de l'isolement de PBMC et influencer les résultats des tests ultérieurs.
6. Ne pas prélever le sang dans les tubes de préparation cellulaire CPT™ de Becton Dickinson ou dans des tubes de prélèvement sanguin avec EDTA, car ils sont incompatibles avec les tubes Leucosep.
7. Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons de sang total. Stocker et transporter les échantillons de sang au laboratoire à des températures comprises entre 18 et 25 °C ou 10 et 25 °C si les échantillons doivent être traités avec le réactif TCell Xtend®.
8. Le sang ne doit pas être entreposé pendant plus de 8 heures, ou 32 heures si traité ultérieurement avec le réactif TCell Xtend.
9. Utiliser uniquement des conteneurs à usage unique pour les prélèvements de sang veineux.
10. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.
11. Utiliser des techniques aseptiques lors de l'utilisation de ce produit.
12. Ne pas exposer les tubes Leucosep à la lumière directe.
13. Ne pas utiliser les tubes Leucosep s'ils sont endommagés ou si la solution de séparation par gradient à base de polysucrose s'est détériorée, comme en témoigne l'apparition d'une couleur jaune distincte ou la formation de particules dans la solution limpide.
14. Ne pas réutiliser les tubes Leucosep. Chaque tube est destiné à un usage unique.
15. Suivre les instructions relatives au tube de prélèvement d'échantillons de sang pour le prélèvement de sang total.

Matériel fourni

Chaque boîte contient ;

50 tubes Leucosep préremplis avec une solution de séparation par gradient à base de polysucrose.

CD contenant la notice et la FDS.

Conservation et stabilité

Conserver entre 4 et 30 °C non ouvert jusqu'à la date de péremption indiquée sur la boîte. Conserver le produit ouvert à température ambiante (18-25 °C) et l'utiliser dans les 12 semaines qui suivent l'ouverture de l'emballage externe, ou avant la date d'expiration sur la boîte, si elle est antérieure.

Équipement et matériels nécessaires, mais non fournis :

1. Tubes de prélèvement de sang héparinés.
2. Milieux de culture cellulaire AIM-V® et RPMI.
3. Tubes à centrifuger de 15 mL
4. Centrifugeuse pour le fractionnement des PBMC pouvant atteindre 1 000 g et en mesure de maintenir les échantillons à température ambiante (18-25 °C).
5. Hotte avec biosécurité de niveau 2 (BSL 2) (recommandée).
6. Pipettes et embouts stériles
7. Kit ELISPOT.
8. Le réactif T-Cell *Xtend* peut être requis si des échantillons de plus de 8 heures sont utilisés.

Procédure

Remarque : Les étapes suivantes doivent être exécutées en utilisant les principes de bonnes pratiques de laboratoire :

1. Avant utilisation, s'assurer que le nombre requis de tubes Leucosep est à température ambiante (18-25 °C).
2. Si la solution de séparation par gradient à base de polysucrose s'est accumulée au-dessus de la barrière poreuse, centrifuger les tubes Leucosep à 350 x g pendant une minute pour faire descendre la solution de séparation par gradient à base de polysucrose en dessous de la barrière poreuse.
3. Inverser l'échantillon de sang complet puis le diluer à raison de 5 volumes de sang pour 3 volumes de milieu de culture cellulaire AIM-V ou RPMI dans un tube à centrifuger de 15 mL. Inverser le tube plusieurs fois pour mélanger.
4. Verser directement le sang dilué dans le tube Leucosep et centrifuger à 1000 x g pendant 10 minutes à 18-25 °C sans frein.
5. Aspirer la couche opaque de PBMC et porter le volume à ~ 10 mL avec du AIM-V ou du RPMI dans un tube à centrifuger 15 mL. Inverser le tube pour mélanger.
6. Centrifuger à 600 x g pendant 7 minutes. Éliminer le surnageant.
7. Resuspendre le culot cellulaire avec du AIM-V ou du RPMI, portant le volume à ~ 10 mL et centrifuger à 350 x g pendant encore 7 minutes.
8. Éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans le volume d'AIM-V (**pas** dans du RPMI) requis par le dosage ELISPOT.
9. Si les cellules doivent être stimulées par un antigène lors du dosage ELISPOT, diluer les cellules en conséquence avec du AIM-V (**pas** du RPMI).

Limites

1. Comme avec d'autres méthodes de séparation, les tubes Leucosep peuvent modifier les proportions de certaines sous-populations de PBMC (p. ex. les lymphocytes T et B) par rapport à celle du sang non séparé. Cette altération est estimée être relativement négligeable dans les cas normaux.

Contrôle de la qualité

Dans le cadre de l'activité de contrôle de qualité d'un laboratoire, les méthodes de numération cellulaire doivent être étudiées et validées pour garantir que suffisamment de PBMC soient obtenues pour pouvoir tester. En outre, il est souhaitable que les activités de contrôle de qualité utilisent des

contrôles positifs et négatifs, développés afin de garantir les performances attendues pour les lymphocytes T au cours du test.

Caractéristiques de performance

Sang frais

6 mL de sang ont été obtenus de 15 donneurs. Les échantillons de chaque donneur ont été traités dans les 8 heures après ponction veineuse. Les échantillons ont été traités avec les tubes Leucosep remplis de milieu de séparation à base de polysucrose. Les cellules isolées étaient viables et fonctionnelles dans le dosage ELISPOT.

Sang conservé à l'aide du réactif T-Cell Xtend

Des échantillons de sang provenant de 205 donneurs ont été obtenus et utilisés pour tester la récupération des cellules à l'aide de tubes Leucosep remplis de milieu de séparation à base de polysucrose. 6 mL de sang ont été recueillis pour chaque donneur et traités entre 29 à 32 heures post ponction veineuse utilisant le réactif T-Cell Xtend.

Les cellules isolées étaient viables et fonctionnelles dans le dosage ELISPOT.

Remarque : il est recommandé d'utiliser 6 mL de sang par donneur. Une diminution du volume de sang peut influencer sur la récupération des cellules.

Signalement d'incidents graves

Si un incident grave lié au dispositif est survenu, il doit être signalé au service client. Dans les États membres de l'Union européenne, les incidents graves doivent également être signalés à l'autorité compétente (le service gouvernemental responsable des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro) de votre pays. Veuillez consulter le site Internet de votre gouvernement pour savoir comment contacter votre autorité compétente. Un « incident grave » désigne tout incident ayant entraîné directement ou indirectement, susceptible d'avoir entraîné ou susceptible d'entraîner :

- le décès d'un patient, d'un utilisateur ou d'une autre personne ;
- une grave dégradation, temporaire ou permanente, de l'état de santé d'un patient, d'un utilisateur ou d'une autre personne ;
- une menace grave pour la santé publique.

Coordonnées du service client

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Royaume-Uni
Tél. : +44 (0) 1235 442780
Courriel : info@oxfordimmunotec.com











Pour les téléchargements de support technique et d'autres informations techniques, veuillez consulter notre site Internet :
www.oxfordimmunotec.com

Conseils pour la résolution des problèmes lors du recueil et de la séparation des PBMC pour ELISPOT

Problème	Cause possible	Solution possible
Faible rendement cellulaire	Leucopénie	Ajouter un autre tube de recueil de sang
	Recueil du sang incorrect	Les tubes de recueil de sang CPT et ceux contenant de l'EDTA ne sont pas compatibles avec les tubes Leucosep
	Tube de recueil de sang non maintenu à température ambiante (18-25 °C)	Laisser le tube de recueil de sang se stabiliser à température ambiante
	Conservation du sang non à la température requise	S'assurer que l'expédition du sang est à 18-25 °C ou à 10-25 °C si le réactif TCell <i>Xtend</i> est utilisé
	Utilisation de volumes divers ou de dilutions diverses des recommandations	S'assurer que les instructions correctes sont suivies
Contamination d'érythrocytes	Conservation du sang non à la température requise	S'assurer que le sang est transporté à 18-25 °C ou à 10-25 °C si le réactif TCell <i>Xtend</i> est utilisé
	Tube de recueil de sang non maintenu à température ambiante (18-25 °C)	Laisser le tube de recueil de sang se stabiliser à température ambiante
	Le sang n'est pas dilué	S'assurer que le sang est dilué selon la procédure
	Inversion de l'échantillon de sang dans le tube Leucosep	S'assurer que le tube Leucosep reste en position verticale avant la centrifugation
	Centrifugation incorrecte	S'assurer que les instructions de centrifugation sont suivies Vérifier que la centrifugeuse est en mesure de maintenir la température à 18-25 °C Vérifier que le frein de la centrifugeuse est éteint
	Séparation de l'échantillon incomplète	Augmenter l'étape de centrifugation de 10 min.

Problème	Cause possible	Solution possible
Aucune couche mononucléaire définie ou distincte	Séparation de l'échantillon incomplète	Augmenter l'étape de centrifugation de 10 min.
	La centrifugeuse n'est pas correctement calibrée	Calibrer la centrifugeuse
	Centrifugation incorrecte	S'assurer que les instructions de centrifugation sont suivies
	Échantillon hyperlipémique	Recueillir le sang à jeun
Résultats non valides	Les résultats non valides peuvent être causés par un certain nombre de problèmes de manipulation de l'échantillon	Se reporter à la section ci-dessus

Légende des symboles

	À utiliser avant la date de péremption (année-mois-jour)
	Numéro de lot
	Numéro de catalogue
	Attention, consulter le mode d'emploi
	Fabricant
	Suffisant pour « n » tests
	Dispositif de diagnostic <i>in vitro</i>
	Limite de température/À conserver entre
	Consulter le mode d'emploi
	Représentant agréé de l'UE

T-Cell *Xtend* et le logo d'Oxford Immunotec sont des marques de commerce d'Oxford Immunotec Limited.

Leucostep est une marque de commerce de Greiner Bio-One


AIM-V est une marque de commerce de the Life Technologies Corporation.

CPT est une marque de commerce de Becton, Dickinson and Company.

L'utilisation du réactif T-Cell *Xtend* est protégée par les brevets et les brevets en instance suivants : EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

© 2022 Oxford Immunotec Limited. Tous droits réservés.

 Fabricant
Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Royaume-Uni
www.oxfordimmunotec.com

 Représentant agréé de l'UE
Oxford Immunotec (Irlande)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
République d'Irlande

Numéro de révision	Date de publication	Modifications
1 - 4	Détails disponibles sur demande auprès d'Oxford Immunotec.	
5	Juillet 2022	Changement d'adresse du fabricant. Ajout d'un historique de révision. Ajout d'instructions pour signaler les incidents graves et de détails pour EC REP et Importateur de l'Union européenne
6	Octobre 2022	Supprimer les détails de l'Importateur de l'Union européenne