

Da utilizzare per la raccolta e la separazione di cellule mononucleate da sangue periferico intero

## FOGLIO ILLUSTRATIVO

Per Uso Diagnostico *In Vitro*

Il presente foglio illustrativo descrive l'uso delle  
provette Leucosep™ (numero di catalogo: LTK.615)

## Uso Previsto

Le provette Leucosep servono per la raccolta e la separazione delle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) dal sangue intero. Le provette agevolano la separazione delle PBMC dal sangue intero, usando una soluzione di separazione in gradiente a base di polisaccarosio, prima dell'uso di queste cellule nei saggi ELISPOT.

## Introduzione

Le tecniche ELISPOT utilizzano le cellule T presenti nelle PBMC isolate dal sangue intero. Un metodo per la separazione di queste cellule richiede l'uso di un gradiente a base di polisaccarosio. Tale procedura prevede una serie di fasi da eseguire con attenzione per ottenere un risultato ottimale. L'uso delle provette Leucosep riduce il numero di fasi necessarie, rende la procedura più robusta, e riduce il tempo necessario dell'esecuzione.

## Metodica

Le provette Leucosep sono state sviluppate per ottenere una separazione ottimale delle PBMC dal sangue intero umano, tramite la centrifugazione in gradiente di densità. Le provette Leucosep incorporano una barriera porosa in un tubo di polipropilene trasparente. Tale barriera, biologicamente inerte, è costituita da polietilene di alto grado. Le provette Leucosep eliminano la lunga e laboriosa stratificazione del campione posto al di sopra di un gradiente a base di polisaccarosio. Il sangue intero trattato con anticoagulante viene miscelato con il medium di coltura e quindi trasferito nella provetta Leucosep. La barriera porosa impedisce la miscelatura del sangue con la soluzione di separazione. Durante la centrifugazione, le PBMC vengono separate dagli eritrociti indesiderati in base alle loro densità diverse e vengono recuperate dall'interfaccia al di sopra della soluzione di separazione. Una volta completata la separazione, la barriera impedisce la ricontaminazione dello strato delle PBMC durante il recupero.

## Avvertenze e Precauzioni

1. Solo per uso diagnostico *in vitro*.
2. Solo per uso professionale; gli operatori devono essere addestrati a questa procedura.
3. Tutti i campioni ematici devono essere considerati potenzialmente pericolosi. È necessario prestare attenzione durante la manipolazione di materiali di origine umana.
4. La manipolazione dei campioni ematici e dei componenti dei test durante l'uso, la conservazione e lo smaltimento deve essere eseguita in conformità alle procedure stipulate dalle direttive o dai regolamenti nazionali appropriati per la protezione contro i rischi biologici.
5. Ogni variazione alle tecniche di pipettatura e di lavaggio indicate ed ai tempi e/o alle temperature di centrifugazione può alterare la purezza delle PBMC isolate ed influenzare i risultati del test.
6. Non raccogliere il sangue nelle Provette per la Preparazione Cellulare (CPT™, Becton Dickinson) o nelle provette per la raccolta di sangue con EDTA, in quanto queste sono incompatibili con le provette Leucosep.
7. Non refrigerare o congelare i campioni di sangue intero. Conservare e trasportare i campioni di sangue al laboratorio mantenendoli a temperatura compresa tra 18-25 °C o tra 10-25 °C se i campioni sono trattati con il reagente T-Cell *Xtend*®.
8. Il sangue non deve essere conservato per più di 8 ore, o 32 ore se sarà trattato in seguito con T-Cell *Xtend*.
9. Usare solo contenitori monouso per la raccolta di campioni di sangue venoso.
10. Non utilizzare dopo la data di scadenza.
11. Utilizzare una tecnica asettica durante l'uso del prodotto.
12. Non conservare le provette Leucosep alla luce diretta
13. Non utilizzare le provette Leucosep se risultano danneggiate o se la soluzione di separazione in gradiente a base di polisaccarosio è deteriorata. Il deterioramento è evidenziato da una netta colorazione gialla o dalla comparsa di materiale particellare in una soluzione limpida.
14. Non riutilizzare le provette Leucosep. Ogni provetta è destinata ad essere monouso.
15. Seguire le istruzioni delle provette per la raccolta di campioni ematici per la raccolta di sangue intero.

## Materiali forniti

Ciascuna confezione contiene:

50 provette Leucosep pre-riempite con una soluzione di separazione in gradiente a base di polisaccarosio.

Un CD contenente il foglio illustrativo e la Scheda di Sicurezza dei Materiali (MSDS).

## Conservazione e Stabilità

Conservare il prodotto chiuso tra i 4-30 °C, fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Conservare la confezione aperta a temperatura ambiente (18-25 °C) e utilizzare il prodotto entro 12 settimane dalla prima apertura della confezione esterna o prima della data di scadenza indicata sulla confezione.

## Attrezzatura e Materiali Necessari ma non Forniti

1. Provette con eparina per la raccolta di sangue.
2. Terreno di coltura AIM-V® e RPMI.
3. Provette per centrifuga da 15 mL.
4. Una centrifuga per il frazionamento delle PBMC con una RCF di almeno 1000 (g) e capace di mantenere i campioni a temperatura ambiente (18-25 °C).
5. Cabina di sicurezza biologica di Classe II (BL 2) (raccomandata).
6. Pipette e punte sterili.
7. Kit ELISPOT.
8. Per campioni prelevati da più di 8 ore si può usare il reagente T-Cell *Xtend*.

## Metodo

Nota: Eseguire le seguenti fasi usando I Principi di Buona Pratica di Laboratorio:

1. Prima dell'uso assicurarsi che la quantità necessaria di provette Leucosep sia a temperatura ambiente (18-25 °C).
2. Se la soluzione di separazione in gradiente a base di polisaccarosio supera la barriera porosa (frit) centrifugare le provette Leucosep a 350 x g per un minuto per raccogliere la soluzione al di sotto del frit.
3. Invertire il campione di sangue intero e poi diluirlo in un rapporto di 5 parti di sangue per 3 parti di terreno di coltura AIM-V o RPMI in una provetta per centrifuga da 15 mL. Invertire la provetta più volte per miscelare.
4. Trasferire il sangue diluito direttamente nella provetta Leucosep e centrifugare a 1000 x g per 10 minuti a 18-25 °C, senza inserimento del freno.
5. Aspirare lo strato torbido delle PBMC e portare al volume di ~10 mL con AIM-V o RPMI in una provetta da centrifuga da 15 mL. Invertire la provetta da centrifuga per miscelare.
6. Centrifugare a 600 x g per 7 minuti. Scartare il supernatante.
7. Sospendere nuovamente il pellet di cellule in AIM-V o RPMI, portare al volume di ~10 mL con AIM-V o RPMI e centrifugare a 350 x g per altri 7 minuti.
8. Scartare il supernatante e risospingere nuovamente il pellet di cellule nel volume di AIM-V (**non** RPMI) necessario per il saggio ELISPOT.
9. Se le cellule servono per la stimolazione antigenica in un saggio ELISPOT, diluire le cellule appropriatamente utilizzando AIM-V (**non** RPMI).

## Limitazioni

1. Come per altri metodi di separazione, le provette Leucosep possono alterare la quantità di alcune sotto-popolazioni di PBMC (ad esempio le cellule T e B) rispetto a quelle presenti nel sangue intero non separato. Tale alterazione è ritenuta relativamente insignificante in casi normali.

## Controllo di Qualità

Come parte di controllo di qualità di un'attività di singolo laboratorio, i metodi per la conta delle cellule devono essere disegnati e validati per assicurarsi che un numero sufficiente di PBMC sia

ottenuto dal sistema per il test specifico. Inoltre, le attività di controllo di qualità devono prevedere l'uso di controlli, sia negativi che positivi, sviluppati con lo scopo di garantire la prestazione prevista delle cellule T nel sistema per il test specifico.

### **Caratteristiche di Prestazione**

#### Sangue Fresco

Sono stati ottenuti 6 mL di sangue da 15 donatori. I campioni di ciascun donatore sono stati processati entro 8 ore dalla venipuntura usando le provette Leucosep riempite con una soluzione di separazione in gradiente a base di polisaccarosio. Le cellule isolate sono risultate vitali e funzionali nel saggio ELISPOT.

#### Sangue conservato usando il reagente T-Cell Xtend

Sono stati ottenuti campioni di sangue da 205 donatori e usati per l'analisi del cellule recuperate usando le provette Leucosep, riempite con una soluzione di separazione in gradiente a base di polisaccarosio. 6 mL di sangue sono stati ottenuti da ciascun donatore e i campioni di sangue sono stati processati tra 29-32 ore dopo la venipuntura usando il reagente T-Cell Xtend.

Le cellule isolate sono risultate vitali e funzionali al saggio ELISPOT.

Nota: si raccomanda l'uso di 6 mL di sangue per donatore. Una riduzione del volume del sangue può avere un impatto nel recupero di cellule.

### **Segnalazione di incidenti seri**

Qualora si produca un incidente serio in relazione a questo dispositivo, dovrà essere segnalato al Servizio clienti. Negli Stati membri dell'Unione europea, gli incidenti gravi devono essere segnalati anche alle autorità competenti (ufficio governativo responsabile dei dispositivi medici diagnostici in vitro) nel Paese di appartenenza. Consultare il sito web del Paese di appartenenza per maggiori informazioni su come contattare le autorità competenti. Per "incidente serio" si intende qualsiasi incidente che abbia portato, che avrebbe potuto portare o che potrebbe portare direttamente o indirettamente a:

- decesso del paziente, utente o altra persona;
- seria compromissione temporanea o permanente dello stato di salute del paziente, utente o altra persona;
- seria minaccia per la salute pubblica.

### **Informazioni di contatto del Servizio clienti**

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

Per scaricare documentazioni di supporto sui prodotti e altre informazioni tecniche, visitare il nostro sito web:










[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

## Guida ai Problemi nella Raccolta e Separazione di PBMC per ELISPOT

<b>Problema</b>	<b>Possibile Causa</b>	<b>Possible Solution</b>
Basso numero di cellule	<p>Leucopenia</p> <p>Raccolta del sangue incorretta</p> <p>La provetta per la raccolta del sangue non è a temperatura ambiente (18-25 °C)</p> <p>La conservazione del sangue non è alla temperatura richiesta</p> <p>Usi di volumi o diluizioni diversi da quelli raccomandati</p>	<p>Aggiungere un'altra provetta per la raccolta del sangue</p> <p>I CPT e le provette per la raccolta del sangue contenenti EDTA non sono compatibili con le provette Leucosep</p> <p>Lasciare che la provetta raggiunga la temperatura ambiente</p> <p>Assicurarsi che la spedizione del sangue avvenga tra 18-25 °C o 10-25 °C se si usa il reagente T-Cell <i>Xtend</i></p> <p>Assicurarsi che le istruzioni vengano seguite correttamente</p>
Contaminazione di eritrociti	<p>La conservazione del sangue non è alla temperatura richiesta</p> <p>La provetta per la raccolta del sangue non è a temperatura ambiente (18-25 °C) Il sangue non è diluito</p> <p>Inversione del campione di sangue all'interno della provetta Leucosep</p> <p>Centrifugazione incorretta</p> <p>Separazione del campione incompleta</p>	<p>Assicurarsi che il trasposto del sangue avvenga tra 18-25 °C o 10-25 °C se si usa il reagente T-Cell <i>Xtend</i></p> <p>Lasciare che la provetta raggiunga la temperatura ambiente Assicurarsi che il sangue sia diluito secondo la procedura</p> <p>Assicurarsi che la provetta Leucosep rimanga in posizione verticale prima della centrifugazione</p> <p>Assicurarsi che le istruzioni per la centrifugazione vengano seguite correttamente</p> <p>Controllare che la centrifuga sia capace di refrigerare a 18-25 °C</p> <p>Controllare che il freno della centrifuga sia disinnescato</p> <p>Incrementare di 10 minuti la fase di centrifugazione</p>

<b>Problema</b>	<b>Possibile Causa</b>	<b>Possible Solution</b>
Assenza di uno strato definito o distinto di cellule mononucleari	Separazione del campione incompleta  La centrifuga non è calibrata correttamente  Centrifugazione eseguita in maniera scorretta  Campione di soggetto iperlipemico	Incrementare di 10 minuti la fase di centrifugazione  Calibrare la centrifuga  Assicurarsi che le istruzioni per la centrifugazione vengano seguite correttamente  Raccogliere un campione di sangue a digiuno
Risultati non validi	I risultati non validi possono essere provocati da una serie di problemi legati alla manipolazione dei campioni	Fare riferimento a quanto sopra

### Glossario dei simboli

	Usare entro/Data Scadenza (Anno-Mese-Giorno)
	Numero di lotto
	Numero di Catalogo
	Attenzione, leggere le istruzioni d'uso
	Fabbricante
	Sufficiente per "n" test
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Limite di temperatura /conservare tra
	Fare riferimento alle istruzioni d'uso
	Rappresentante UE autorizzato

T-Cell *Xtend* e il logo Oxford Immunotec sono marchi depositati di Oxford Immunotec Limited.  
 Leucosep è un marchio depositato di Greiner Bio-One  
 AIM-Vè un marchio depositato di Life Technologies Corporation.  
 CPT è un marchio depositato di Becton, Dickinson & Company.

L'uso del reagente T-Cell *Xtend* è protetto dai seguenti brevetti, depositati ed in corso di registrazione:  
 EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205.

© 2022, Oxford Immunotec Limited. Tutti i diritti riservati.

■ **Fabbricante:**

Oxford Immunotec Ltd  
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon  
Oxfordshire, OX14 4SE, Regno Unito  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

**EC REP** Rappresentante autorizzato UE:

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

<b>Numero revisione</b>	<b>Data di pubblicazione</b>	<b>Modifiche</b>
1 - 4	Informazioni disponibili su richiesta da Oxford Immunotec.	
5	Giugno 2022	Modifica dell'indirizzo del fabbricante. Aggiunta della cronologia delle modifiche. Aggiunta di istruzioni per la segnalazione di incidenti seri, EC REP e dettagli dell'importatore UE.
6	ottobre 2022	Elimina i dettagli dell'importatore UE.



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](http://www.oxfordimmunotec.com)

