

Na použitie pri odbere a oddeľovaní periférnych mononukleárných buniek z plnej krvi

PRÍBALOVÝ LETÁK

Na diagnostické použitie *in vitro*

Táto písomná informácia pre používateľa sa týka použitia:

Skúmavky Leucosep™ (katalógové číslo: LTK.615)

Plánované použitie

Skúmavky Leucosep sú určené na odber a separáciu mononukleárných buniek periférnej krvi z celej krvi (PBMC). Skúmavky umožňujú oddelenie PBMC z celej krvi pomocou roztoku na separáciu gradientov na báze polysacharózy pred použitím pre tieto bunky v skúšaní ELISPOT.

Úvod

Techniky ELISPOT využívajú T-bunky v PBMC, ktoré boli separované z celej krvi. Jedna z metód na oddelenie týchto buniek vyžaduje použitie roztoku na separáciu gradientov na báze polysacharózy. Tento proces pozostáva z viacerých krokov, ktoré je potrebné vykonať opatrne s cieľom zabezpečiť optimálne výsledky. Použitie skúmavky Leucosep znižuje počet krokov, vďaka nej je postup komplexnejší a znižuje čas potrebný na vykonanie postupu oddeľovania.

Princíp metódy

Skúmavky Leucosep boli vyvinuté na dosiahnutie optimálneho oddelenia PBMC z plnej ľudskej krvi pomocou odstreďovania na základe gradientov hustoty. Skúmavky Leucosep majú pórovitú bariéru v transparentnej polypropylénovej skúmavke. Táto biologicky inertná bariéra pozostáva z vysoko kvalitného polyetylénu. Skúmavka Leucosep eliminuje spotrebu času a náročné vrstvenie materiálu vzorky na roztok na separáciu gradientov na báze polysacharózy. Antikoagulovaná plná krv sa zmieša s kultivačným médiom a potom sa naleje do skúmavky Leucosep. Pórovitá bariéra zabráňuje zmiešaniu krvi so separačným médiom. Počas odstreďovania sa PBMC oddelia od nepotrebných erytrocytov vzhľadom na ich odlišnú hustotu a odoberú sa v rozhraní nad separačným médiom. Po dokončení separácie bariéra zabráni opätovnej kontaminácii vrstvy PBMC počas jeho odstránenia.

Výstrahy a bezpečnostné opatrenia

1. Len na diagnostické použitie *in vitro*.
2. Len na profesionálne použitie. Operátori musia byť zaškolení o tomto postupe.
3. Vzorky krvi sa majú považovať za potenciálne nebezpečné. Pri manipulácii s materiálom ľudského pôvodu je potrebné dávať pozor.
4. Manipulácia so vzorkami celej krvi a komponentmi testu počas používania, skladovania a likvidácie sa má vykonávať v súlade s postupmi uvedenými v príslušných smerniciach alebo nariadeniach o bezpečnosti pri biologickom riziku.
5. Akákoľvek odchýlka od odporúčaných postupov pre pipetovanie, techniky premývania, časy a teploty odstreďovania môže ovplyvniť čistotu izolácií PBMC a následne aj výsledky testu.
6. Neodoberajte krv do skúmaviek Cell Preparation Tubes (CPT™, Becton Dickinson) ani skúmaviek EDTA na odber krvi, pretože nie sú kompatibilné so skúmavkami Leucosep.
7. Vzorky plnej krvi neuchovávajte v chladničke ani v mrazničke. Vzorky plnej krvi uchovávajte a prepravujte do laboratória pri teplotách 18 – 25 °C alebo 10 – 25 °C, ak majú byť ošetrené činidlom TCell Xtend®.
8. Krv sa nemá uchovávať dlhšie ako 8 hodín alebo 32 hodín v prípade, že bude ošetrená činidlom T-Cell Xtend.
9. Používajte len jednorazové nádoby na odber vzoriek venóznej krvi.
10. Nepoužívajte po uplynutí času použiteľnosti.
11. Pri používaní tohto produktu používajte aseptický postup.
12. Skúmavky Leucosep neuchovávajte na priamom slnečnom svetle.
13. Skúmavky Leucosep neuchovávajte, ak sú poškodené alebo ak bol roztok na separáciu gradientov na báze polysacharózy znehodnotený, čo zistíte podľa zreteľného žltého sfarbenia alebo častíc v čírom roztoku.
14. Nepoužívajte skúmavky Leucosep opakovane. Každá skúmavka je určená na jednorazové použitie.
15. Pri odbere plnej krvi dodržiavajte pokyny na odber vzoriek krvi do skúmavky.

Poskytnuté materiály

Každá škatuľka obsahuje:

50 naplnených skúmaviek Leucosep s roztokom na separáciu gradientov na báze polysacharózy, CD s písomnými informáciami pre používateľa a kartou bezpečnostných údajov materiálu.

Skladovanie a stabilita

Skladujte neotvorené pri teplote 4 – 30 °C až do dátumu expirácie zobrazenom na škatuľke. Skladujte neotvorené pri izbovej teplote (18 – 25 °C) a použite do 12 týždňov od otvorenia vonkajšieho obalu alebo do dátumu expirácie uvedeného na škatuli podľa toho, čo nastane skôr.

Vybavenie a materiály, ktoré sú potrebné, ale nedodávajú sa

1. Skúmavky na odber heparinizovanej krvi.
2. Kultivačné médiá AIM-V® a RPMI na kultiváciu buniek.
3. 15 mL odstreďovacie skúmavky.
4. Centrifúga na frakcionáciu PBMC schopná dosiahnuť rýchlosť minimálne 1 000 RCF (g) a dokáže udržať vzorky pri okolitej izbovej teplote (18 – 25 °C).
5. Skrinka s úrovňou biologickej bezpečnosti 2 (BL 2) (odporúčaná).
6. Pipety a sterilné hroty pipiet.
7. Súprava ELISPOT.
8. Činidlo T-Cell *Xtend* môže byť potrebné pri použití vzoriek starších ako 8 hodín.

Postup

Poznámka: Nasledujúce kroky sa majú vykonať podľa zásad správnej laboratórnej praxe:

1. Zaistíte, aby bol pred použitím k dispozícii požadovaný počet skúmaviek Leucosep s izbovou teplotou (18 – 25 °C).
2. Ak sa roztok na separáciu gradientov na báze polysacharózy zhromaždil nad pórovitou bariérou (fritou), odstreďujte skúmavky Leucosep rýchlosťou 350 x g jednu minútu, aby sa roztok na separáciu gradientov na báze polysacharózy presunul pod fritu.
3. Prevráťte skúmavku s plnou krvou, potom ju zriedte v pomere 5 dielov krvi k 3 dielom kultivačného média AIM-V alebo RPMI média na kultiváciu buniek v 15 mL odstreďovacej skúmavke. Odstreďovaciu skúmavku premiešajte niekoľkými otočeniami.
4. Nalejte zriedenú krv priamo do skúmavky Leucosep a odstreďujte ju rýchlosťou 1 000 x g 10 minút pri teplote 18-25 °C bez zastavenia.
5. Do 15 mL odstreďovacej skúmavky aspirujte kalnú vrstvu PBMC a doplňte ju na ~10 mL médiom AIM-V alebo RPMI. Odstreďovaciu skúmavku premiešajte otočeniami.
6. Odstreďujte rýchlosťou 600 x g po dobu 7 minút. Zlikvidujte supernatant.
7. Znovu rozpustíte krvný pelet pomocou média AIM-V alebo RPMI, doplňte ho na ~10 mL médiom AIM-V alebo RPMI a odstreďujte rýchlosťou 350 x g ďalších 7 minút.
8. Supernatant zlikvidujte a znovu rozpustíte krvný pelet v objeme média AIM-V (**nie** RPMI), ktorý vyžaduje test ELISPOT.
9. Ak sú bunky potrebné pre stimuláciu antigénu v teste ELISPOT, rozpustíte bunky podľa potreby s pomocou média AIM-V (**nie** RPMI).

Obmedzenia

1. Tak ako v prípade iných metód separácie, môžu zmeniť podiel niektorých podsúborov PBMC (napr. T a B buniek) oproti tým, ktoré sa nachádzajú v neseparovanej plnej krvi. Táto zmena sa považuje za relatívne nevýznamnú v obvyklých prípadoch.

Kontrola kvality

V rámci činností kontroly kvality jednotlivých laboratórií je potrebné navrhnuť a overiť metódy na počítanie buniek na zaistenie toho, že sa získal dostatočný počet PBMC pre príslušný testovací systém. Okrem toho majú kontroly kvality používať pozitívne a negatívne kontroly vyvinuté na zaistenie očakávaných výsledkov T-buniek v rámci príslušného testovacieho systému.

Charakteristiky účinnosti

Čerstvá krv

6 mL krvi bolo odobratých od 15 darcov. Vzorky od každého darca boli spracované do 8 hodín od napichnutia žily. Vzorky sa spracovali pomocou skúmaviek Leucosep naplnených médiom na separáciu gradientov na báze polysacharózy. Izolované bunky boli životaschopné a použiteľné v teste ELISPOT.

Uložená krv s použitím činidla T-Cell Xtend

Získali sa vzorky krvi od 205 darcov a boli použité na testovanie bunkových výťažkov s použitím skúmaviek Leucosep naplnených médiom na separáciu gradientov na báze polysacharózy. Od každého darca bolo odobratých 6 mL krvi a krv bola spracovaná do 29 – 32 hodín po napichnutí žily s použitím činidla T-Cell Xtend.

Izolované bunky boli životaschopné a použiteľné v teste ELISPOT.

Poznámka: odporúča sa použiť 6 mL krvi od každého darcu. Menší objem krvi môže mať vplyv na bunkové výťažky.

Hlásenie závažných incidentov

Ak sa vyskytne závažný incident súvisiaci s touto pomôckou, musí sa oznámiť oddeleniu služieb zákazníkom. V členských štátoch Európskej únie sa závažné incidenty musia oznámiť aj príslušnému orgánu (štátny úrad zodpovedný za zdravotnícke pomôcky na diagnostiku *in vitro*) v danej krajine. Podrobnosti o kontaktovaní príslušného orgánu nájdete na webovej lokalite svojej vlády. „Závažný incident“ znamená akýkoľvek incident, ktorý priamo alebo nepriamo viedol, mohol viesť alebo by mohol viesť k:

- smrti pacienta, používateľa alebo inej osoby,
- dočasnému alebo trvalému závažnému zhoršeniu zdravotného stavu pacienta, používateľa alebo inej osoby,
- závažnému ohrozeniu verejného zdravia.

Kontaktné údaje oddelenia služieb zákazníkom

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











Podporné súbory na stiahnutie a ďalšie technické informácie pre tento produkt nájdete na našej webovej lokalite: www.oxfordimmunotec.com

Pokyny na riešenie problémov v oblasti odberu a separácie PBMC pre test ELISPOT.

Problém	Možná príčina	Možné riešenie
Nízka výťažnosť buniek	<p>Leukopénia</p> <p>Nesprávny odber krvi</p> <p>Skúmavka na odber krvi nedosiahla okolitú izbovú teplotu (18 – 25 °C)</p> <p>Krv sa neskladuje pri požadovanej teplote</p> <p>Boli použité objemy alebo riedenia, ako boli odporúčané</p>	<p>Pridajte ďalšiu skúmavku na odber krvi</p> <p>Skúmavky CPT a skúmavky na odber krvi, ktoré obsahujú EDTA, nie sú kompatibilné so skúmavkami Leucosep.</p> <p>Nechajte skúmavky na odber krvi ustáliť sa na izbovú teplotu.</p> <p>Uistite sa, že vaša zásielka krvi má teplotu 18 – 25 °C alebo 10 – 25 °C, ak sa používa činidlo TCell Xtend.</p> <p>Dbajte na dodržiavanie správnych pokynov.</p>
Kontaminácia červených krviniek	<p>Krv sa neskladuje pri požadovanej teplote</p> <p>Skúmavka na odber krvi nedosiahla okolitú izbovú teplotu (18 – 25 °C) Krv nie je zriedená</p> <p>Inverzia vzorky krvi v skúmavke Leucosep</p> <p>Nesprávne odstreďovanie</p> <p>Neúplná separácia vzorky</p>	<p>Uistite sa, že vaša krv sa prepravuje pri teplote 18 – 25 °C alebo 10 – 25 °C, ak sa používa činidlo TCell Xtend.</p> <p>Nechajte skúmavky na odber krvi ustáliť sa na izbovú teplotu.</p> <p>Zabezpečte, aby sa krv rozriedila podľa postupu.</p> <p>Zabezpečte, aby bola skúmavka Leucosep pred odstreďovaním vo zvislej polohe</p> <p>Dbajte na dodržiavanie pokynov na odstreďovanie.</p> <p>Skontrolujte, či centrifúga dokáže zmrazovať na 18-25 °C.</p> <p>Skontrolujte, či je brzda centrifúgy vypnutá.</p> <p>Predĺžte krok odstreďovania na 10 minút.</p>
Nie je definovaná alebo odlišená mononukleárna vrstva	<p>Neúplná separácia vzorky</p> <p>Centrifúga nie je správne kalibrovaná.</p> <p>Nesprávne odstreďovanie</p> <p>Hyperlipemické vzorky</p>	<p>Predĺžte krok odstreďovania na 10 minút.</p> <p>Nechajte si centrifúgu nakalibrovať</p> <p>Dbajte na dodržiavanie pokynov na odstreďovanie.</p> <p>Odoberte vzorku krvi nalačno</p>

Problém	Možná příčina	Možné riešenie
Neplatné výsledky	Neplatné výsledky môžu byť spôsobené mnohými problémami súvisiacimi s nesprávnou manipuláciou so vzorkami.	Pozrite si časti vyššie.

Zoznam symbolov

	Použite do/dátum expirácie (rok-mesiac-deň)
	Číslo šarže
	Katalógové číslo
	Pozor, prečítajte si návod na použitie
	Výrobca
	Dostatočné množstvo na n testov
	<i>In vitro</i> diagnostická pomôcka
	Teplotné obmedzenie/Skladovanie medzi
	Prečítajte si návod na použitie
	Oprávnený zástupca v EÚ

T-Cell *Xtend* a logo Oxford Immunotec sú ochranné známky spoločnosti Oxford Immunotec Limited.

Leucosep je ochranná známka spoločnosti Greiner Bio-One.

AIM-V je ochranná známka spoločnosti Life Technologies Corporation.

CPT je ochranná známka spoločnosti Becton, Dickinson and Company.

Použitie reagensie T-Cell *Xtend* je chránené týmito patentmi: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

© 2022, Oxford Immunotec Limited. Všetky práva vyhradené.

🏢 Výrobca:
Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Spojené kráľovstvo
www.oxfordimmunotec.com

EC REP Oprávnený zástupca v EÚ
Oxford Immunotec (Ireland)
Unit 3d North Point House,
North Point Business Park,
New Mallow Road,
Cork, T23 AT2P
Írska republika

Číslo revízie	Dátum vydania	Úpravy
1 – 4	Podrobnosti dostupné na požiadanie od spoločnosti Oxford Immunotec.	
5	júna 2022	Zmena adresy výrobcu. Pridanie histórie revízií. Pridanie pokynov na oznamovanie závažných incidentov, EC REP a dovozca do Európskej únie podrobnosti.
6	október 2022	Vymazať dovozca do Európskej únie