

Do stosowania w pobieraniu i separowaniu jednojądrzastych
komórek krwi obwodowej z próbki krwi pełnej

ULOTKA INFORMACYJNA

Do stosowania w diagnostyce *in vitro*

Niniejsza ulotka informacyjna zawiera informacje na temat stosowania:

Probówek Leucosep™ (numer katalogowy: LTK.615)

Przeznaczenie

Probówki Leucosep są przeznaczone do pobierania i separacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) z próbki krwi pełnej. Probówki ułatwiają separację komórek PBMC od krwi pełnej za pomocą roztworu na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie przed użyciem tych komórek w oznaczeniach ELISPOT.

Wprowadzenie

Techniki ELISPOT wykorzystują limfocyty T w komórkach PBMC, które zostały oddzielone od krwi pełnej. Jedną metodą separacji tych komórek wymaga zastosowania roztworu na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie. Procedura ta obejmuje kilka kroków, które należy wykonywać z zachowaniem ostrożności, aby zapewnić optymalne wyniki. Zastosowanie probówek Leucosep zmniejsza liczbę kroków, czyniąc procedurę bardziej niezawodną i skraca czas potrzebny na przeprowadzenie procedury separacji.

Zasada metody

Probówki Leucosep zostały opracowane w celu osiągnięcia optymalnej separacji komórek PBMC od ludzkiej krwi pełnej poprzez wirowanie w gradiencie gęstości. Probówki Leucosep zawierają porowatą barierę w przezroczystej probówce polipropylenowej. Ta biologicznie obojętna bariera składa się z polietylenu wysokiej jakości. Probówka Leucosep eliminuje czasochłonne i pracochłonne nakładanie materiału na roztwór na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie. Krew pełna z antykoagulantem jest mieszana z podłożem hodowlanym, a następnie wlewana do probówki Leucosep. Porowata bariera zapobiega mieszaniu krwi z podłożem separacyjnym. Podczas wirowania komórki PBMC są oddzielane od niepożądanych erytrocytów ze względu na ich różną gęstość, a następnie zbierane w powierzchni rozdzielającej nad podłożem separującym. Po zakończeniu separacji bariera zapobiega ponownemu zanieczyszczeniu warstwy komórek PBMC podczas jej usuwania.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

1. Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.
2. Wyłącznie do użytku przez fachowy personel; użytkownicy muszą zostać przeszkoleni w zakresie tej procedury.
3. Próbkę krwi należy traktować jako potencjalnie niebezpieczną. Podczas pracy z materiałem pochodzenia ludzkiego należy zachować ostrożność.
4. Praca z próbkami krwi pełnej i komponentami oznaczeń podczas stosowania, przechowywania i utylizacji powinna odbywać się zgodnie z procedurami określonymi w odpowiednich krajowych wytycznych lub przepisach dotyczących bezpieczeństwa w zakresie zagrożenia biologicznego.
5. Wszelkie odstępstwa od zalecanych procedur pipetowania, technik mycia, czasów i/lub temperatur wirowania mogą wpłynąć na czystość izolatów komórek PBMC i wyniki kolejnych testów.
6. Nie należy pobierać krwi do probówek do separacji komórek (CPT™, Becton Dickinson) ani probówek do pobierania krwi EDTA, ponieważ są one niekompatybilne z probówkami Leucosep.
7. Nie chłodzić ani nie zamrażać próbek krwi pełnej. Próbkę krwi należy przechowywać i transportować do laboratorium w temperaturze 18–25°C lub 10–25°C, jeśli próbki mają być poddawane działaniu odczynnika Xtend®.
8. Krew nie powinna być przechowywana dłużej niż 8 godzin lub 32 godziny, jeżeli później będzie poddawana działaniu odczynnika T-Cell Xtend.
9. Do pobierania próbek krwi żyłnej należy używać wyłącznie pojemników jednorazowego użytku.
10. Nie stosować po upływie terminu ważności.
11. Podczas używania tego produktu należy stosować techniki aseptyczne.
12. Probówki Leucosep należy przechowywać z dala od bezpośredniego oddziaływania światła.
13. Nie używać, jeśli probówki Leucosep są uszkodzone lub jeśli roztwór na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie uległ degradacji, na co wskazuje pojawienie się wyraźnego żółtego koloru lub cząstek stałych w przezroczystym roztworze.
14. Probówek Leucosep nie należy używać ponownie. Każda probówka jest przeznaczona do jednorazowego użytku.
15. Należy postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi pobierania krwi pełnej do odpowiednich probówek.

Dostarczane materiały

Każde pudełko zawiera:

50 probówek Leucosep wstępnie wypełnionych roztworem na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie.

Płytę CD zawierającą ulotkę informacyjną i kartę MSDS.

Przechowywanie i stabilność

Nieotwarte probówki należy przechowywać w temperaturze 4–30°C do momentu upłynięcia terminu ważności podanego na opakowaniu. Otwarty produkt należy przechowywać w temperaturze pokojowej (18–25°C) i zużyć w ciągu 12 tygodni od otwarcia zewnętrznej torby lub przed upływem terminu ważności podanego na opakowaniu, w zależności od tego, który z tych terminów jest wcześniejszy.

Wymagane wyposażenie i materiały, które nie są dostarczone

1. Probówki z heparyną do pobierania krwi.
2. Pożywki do hodowli komórkowych AIM-V® i RPMI.
3. Probówki do wirowania o pojemności 15 mL.
4. Wirówka do frakcjonowania komórek PBMC, o względnej sile odśrodkowej co najmniej 1000 RCF (g) i zdolna do utrzymania próbek w temperaturze pokojowej (18–25°C).
5. Komora laminarna II klasy bezpieczeństwa biologicznego (BL 2) (zalecana).
6. Pipety i sterylne końcówki do pipet.
7. Zestaw ELISPOT.
8. Odczynnik T-Cell *Xtend* może być wymagany w przypadku próbek starszych niż 8 godziny.

Procedura

Uwaga: Poniższe czynności należy wykonać zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej:

1. Przed użyciem upewnić się, że wymagana liczba probówek Leucosep uzyskała temperaturę pokojową (18–25°C).
2. Jeśli roztwór na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie zebrał się nad porowatą barierą (frytą), odwirowywać probówki Leucosep z prędkością 350 x g przez jedną minutę, aby przenieść roztwór na bazie polisacharozy do separacji w gradiencie poniżej fryty.
3. Odwrócić próbkę krwi pełnej, a następnie rozcieńczyć w proporcji 5 części krwi do 3 części pożywki do hodowli komórkowych AIM-V lub RPMI w probówce do wirowania o pojemności 15 mL. Kilkakrotnie odwrócić probówkę do wirowania, aby wymieszać jej zawartość.
4. Wlać rozcieńczoną krew bezpośrednio do probówki Leucosep i wirować z prędkością 1000 x g przez 10 minut w temperaturze 18–25°C bez hamulca.
5. Zaaspirować mętną warstwę komórek PBMC i uzupełnić do około 10 mL, stosując pożywkę AIM-V lub RPMI w probówce do wirowania o pojemności 15 mL. Odwrócić probówkę do wirowania, aby wymieszać jej zawartość.
6. Wirować z prędkością 600 x g przez 7 minut. Usunąć supernatant.
7. Ponownie zawiesić osad komórek w pożywce AIM-V lub RPMI, uzupełnić do około 10 mL pożywką AIM-V lub RPMI i wirować z prędkością 350 x g przez kolejne 7 minut.
8. Usunąć supernatant i ponownie zawiesić osad komórek w objętości pożywki AIM-V (**nie** RPMI) wymaganej przez oznaczenie ELISPOT.
9. Jeśli do stymulacji antygenowej w oznaczeniu ELISPOT wymagane są komórki, należy rozcieńczyć je odpowiednio za pomocą pożywki AIM-V (**nie** RPMI).

Ograniczenia

1. Podobnie jak w przypadku innych metod separacji, probówki Leucosep mogą zmieniać proporcje niektórych podzestawów komórek PBMC (np. limfocytów T i B) w stosunku do tych w nieoddzielonej krwi pełnej. Zmiana ta jest uważana za stosunkowo nieistotną w normalnych przypadkach.

Kontrola jakości

W ramach indywidualnej laboratoryjnej kontroli jakości metody liczenia komórek powinny być opracowane i zwalidowane w celu zapewnienia, że uzyskano wystarczającą ilość komórek PBMC dla odpowiedniego systemu badań. Ponadto działania w zakresie kontroli jakości powinny wykorzystywać kontrole dodatnie i ujemne opracowane w celu zapewnienia oczekiwanej wydajności limfocytów T w odpowiednim systemie badań.

Charakterystyka działania

Świeża krew

6 mL krwi pobrano od 15 dawców. Próbki od każdego dawcy zostały przetworzone w ciągu 8 godzin od nakłucia żyły. Próbki przetworzono przy użyciu probówek Leucosep wypełnionych podłożem do separacji na bazie polisacharozy. Odizolowane komórki były żywotne i funkcjonalne w oznaczeniu ELISPOT.

Krew przechowywana przy użyciu odczynnika T-Cell Xtend

Pozyskano próbki krwi od 205 dawców i wykorzystano je do oznaczenia odzysku komórek przy użyciu probówek Leucosep wypełnionych podłożem do separacji na bazie polisacharozy. Od każdego dawcy pobrano 6 mL krwi, a krew przetworzono w okresie 29–32 godzin po nakłuciu żyły za pomocą odczynnika T-Cell Xtend.

Odizolowane komórki były żywotne i funkcjonalne w oznaczeniu ELISPOT.

Uwaga: zaleca się, aby od jednego dawcy pozyskać 6 mL krwi. Zmniejszenie objętości krwi może wpłynąć na odzysk komórek.

Zgłaszanie poważnych incydentów

W przypadku wystąpienia poważnego incydentu związanego ze stosowaniem tego wyrobu należy go zgłosić do działu obsługi klienta. W państwach członkowskich Unii Europejskiej poważne incydenty należy również zgłaszać właściwemu organowi (rządowemu wydziałowi odpowiedzialnemu za wyroby medyczne do diagnostyki *in vitro*) w danym kraju. Szczegółowe informacje na temat tego, jak skontaktować się z właściwym organem, można znaleźć na rządowej stronie internetowej. „Poważny incydent” oznacza każdy incydent, który bezpośrednio lub pośrednio doprowadził, mógł doprowadzić lub może prowadzić do:

- zgonu pacjenta, użytkownika lub innej osoby;
- tymczasowego lub trwałego poważnego pogorszenia stanu zdrowia pacjenta, użytkownika lub innej osoby;
- poważnego zagrożenia dla zdrowia publicznego.

Dane kontaktowe działu obsługi klienta

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











Aby uzyskać pomoc techniczną dotyczącą produktu, pliki do pobrania i dalsze informacje techniczne, prosimy odwiedzić naszą stronę internetową: www.oxfordimmunotec.com

**Wskazówki dotyczące rozwiązywania problemów w zakresie gromadzenia i separacji komórek
PBMC przy oznaczeniach ELISPPOT**

Problem	Potencjalna przyczyna	Możliwe rozwiązanie
Niski uzysk komórek	Leukopenia	Dodać kolejną próbkę do pobierania krwi
	Nieprawidłowe pobranie krwi	Probówki CPT i do pobierania krwi zawierające EDTA są niekompatybilne z próbkami Leucosep
	Probówka do pobierania krwi nie ma temperatury pokojowej (18–25°C)	Odczekać, aż probówka do pobierania krwi osiągnie temperaturę pokojową
	Przechowywanie krwi nie odbywa się w wymaganej temperaturze	Upewnić się, że krew do wysyłki ma temperaturę 18-25°C lub 10–25°C, jeśli został użyty odczynnik T-Cell <i>Xtend</i>
	Stosowanie objętości lub rozcieńczeń innych niż zalecane	Upewnić się, że przestrzegane są właściwe instrukcje
Zanieczyszczenie krwinek czerwonych	Przechowywanie krwi nie odbywa się w wymaganej temperaturze	Upewnić się, że krew jest transportowana w temperaturze 18–25°C lub 10–25°C, jeśli został użyty odczynnik T-Cell <i>Xtend</i>
	Probówka do pobierania krwi nie ma temperatury pokojowej (18–25°C) Krew nie jest rozcieńczona	Odczekać, aż probówka do pobierania krwi osiągnie temperaturę pokojową Upewnić się, że krew została rozcieńczona zgodnie z procedurą
	Odwrócenie próbki krwi w próbce Leucosep	Przed odwirowaniem upewnić się, że probówka Leucosep pozostaje w pozycji pionowej
	Nieprawidłowe wirowanie	Upewnić się, że przestrzegane są instrukcje wirowania Sprawdzić, czy wirówka jest zdolna do chłodzenia w temperaturze 18–25°C. Sprawdzić, czy hamulec wirówki jest wyłączony
	Niekompletna separacja próbek	Zwiększyć krok wirowania o 10 min

<p>Brak wyodrębnionej lub wyraźnej warstwy jednojądrzastej</p>	<p>Niekompletna separacja próbek</p> <p>Wirówka nie jest prawidłowo skalibrowana</p> <p>Nieprawidłowe wirowanie</p> <p>Próbka hiperlipemiczna</p>	<p>Zwiększyć krok wirowania o 10 min</p> <p>Przeprowadzić kalibrację wirówki</p> <p>Upewnić się, że przestrzegane są instrukcje wirowania</p> <p>Pobrać próbkę krwi na czczo</p>
<p>Nieprawidłowe wyniki</p>	<p>Nieprawidłowe wyniki mogą być spowodowane przez kilka problemów związanych z nieprawidłowym obchodzeniem się z próbkami</p>	<p>Zapoznać się z powyższymi punktami</p>


Słownik symboli


	Termin ważności (rok-miesiąc-dzień)
	Numer serii
	Numer katalogowy
	Uwaga, patrz instrukcja obsługi
	Wytwórca
	Wystarcza do przeprowadzenia „n” testów
	wyrób do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Ograniczenie temperatury/Przechowywać pomiędzy
	Zapoznać się z instrukcją obsługi
	Autoryzowany przedstawiciel w UE

Logotypy T-Cell *Xtend* i Oxford Immunotec są znakami towarowymi firmy Oxford Immunotec Limited. Leucosep jest znakiem towarowym firmy Greiner Bio-One AIM-V jest znakiem towarowym firmy Life Technologies Corporation. CPT jest znakiem towarowym firmy Becton, Dickinson and Company.

Stosowanie odczynnika T-Cell *Xtend* jest chronione następującymi patentami:
EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

© 2024, Oxford Immunotec Limited. Wszelkie prawa zastrzeżone.

 Wytwórca:
Oxford Immunotec Ltd.
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, Wielka Brytania
www.oxfordimmunotec.com

 Autoryzowany przedstawiciel w
Wallac Oy, Mustionkatu 6, FI-20750
Turku, Finlandia

Numer wersji	Data wydania	Modyfikacje
1–5	Szczegóły dostępne na życzenie w Oxford Immunotec.	
6	Sierpień 2023	Pierwsze tłumaczenie j LT-PI-UK-V6
7	2024 Wrzesień	Zmiana upoważnionego przedstawiciela UE



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



www.oxfordimmunotec.com