

Tam kandan periferik mononükleer hücrelerin toplanması ve ayrılmasında  
kullanım için

## KULLANIM KILAVUZU

In Vitro Tanıda Kullanım İçin  
Bu kılavuz, aşağıdakilerin kullanımını kapsar:  
Leucosep™ Tüpleri (Katalog numarası: LTK.615)

## **Kullanım amacı**

Leucosep tüpleri, periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC'ler) tam kandan toplanması ve ayrılmasında kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Tüpler, bu hücreler ELISPOT testlerinde kullanılmadan önce PBMC'lerin polisükroz bazlı bir gradyan ayırma solüsyonu yardımıyla tam kandan ayrılmasını kolaylaştırır.

## **Giriş**

ELISPOT teknikleri, tam kandan ayrılmış olan PBMC'lerdeki T hücrelerini kullanır. Bu hücreleri ayırma yöntemlerinden birisi, polisükroz bazlı bir gradyan ayırma solüsyonunun kullanılmasını gerektirir. Bu prosedür, en iyi sonuçları elde etmek için dikkatle gerçekleştirilmesi gereken birkaç adımı içerir. Leucosep tüplerinin kullanılması adım sayısını azaltır, daha kontrollü ve güvenilir bir prosedür sağlar ve ayırma prosedürü için gereken süreyi kısaltır.

## **Yöntem Prensipleri**

Leucosep tüpleri, yoğunluk gradyanlı santrifüjleme yoluyla insan tam kanından PBMC'lerin optimum şekilde ayrılmasını sağlamak için geliştirilmiştir. Leucosep tüpleri, şeffaf bir polipropilen tüp içinde gözenekli bir bariyer içerir. Bu biyolojik olarak inaktif bariyer, yüksek dereceli polietilenden oluşur. Leucosep tüpü, numune materyalinin, zaman alan ve zahmetli bir süreç olan polisükroz bazlı bir gradyan ayırma solüsyonu üzerinde katmanlaşması ihtiyacını ortadan kaldırır. Antikoagüle edilmiş tam kan, kültür ortamı ile karıştırılır ve daha sonra Leucosep tüpüne dökülür. Gözenekli bariyer, kanın ayırma ortamı ile karışmasını önler. Santrifüjleme sırasında, PBMC'ler, farklı yoğunlukları nedeniyle istenmeyen eritrositlerden ayrılır ve ayırma ortamının üzerindeki ara yüzde toplanır. Ayırma tamamlandığında bariyer, PBMC katmanının çıkarılması sırasında yeniden kirlenmesini önler.

## **Uyarılar ve Önlemler**

1. Yalnızca in vitro tanıda kullanım içindir.
2. Yalnızca profesyonel kullanım içindir; kullanıcılar bu prosedür konusunda eğitilmelidir.
3. Kan numuneleri potansiyel olarak tehlikeli kabul edilmelidir, insan kaynaklı malzeme ile çalışılırken dikkatli olunmalıdır.
4. Kullanım, saklama ve imha sırasında tam kan numunelerinin ve test bileşenlerinin işlenmesi, ilgili ulusal biyolojik tehlike güvenlik yönergeleri veya yönetmeliklerinde tanımlanan prosedürlere uygun olmalıdır.
5. Santrifüjleme süreleri ve/veya sıcaklıkları, yıkama teknikleri ve pipetleme için önerilen prosedürlere herhangi bir sapma, PBMC izolasyonlarının saflığını değiştirebilir ve sonraki test sonuçlarını etkileyebilir.
6. Hücre Hazırlama Tüpleri (CPT™, Becton Dickinson) ve EDTA'lı kan toplama tüpleri Leucosep tüpleri ile uyumsuz olduklarından kanı bunlarda toplamayın.
7. Tam kan numunelerini soğutmayın veya dondurmayın. Kan numuneleri saklanırken ve laboratuvara nakledilirken 18-25 °C'de tutulmalıdır, ancak numuneler T-Cell Xtend® reaktifi ile işlenecekse 10-25 °C arasındaki bir sıcaklık sağlanmalıdır.
8. Kan 8 saatten veya daha sonra T-CELL Xtend reaktifi ile işlenecekse 32 saatten uzun sürelerle saklanmamalıdır.
9. Venöz kan numunesi alımı için yalnızca tek kullanımlık kaplar kullanın.
10. Son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
11. Bu ürünü kullanırken aseptik teknikler kullanın.
12. Leucosep tüplerini doğrudan ışık altında saklamayın.
13. Leucosep tüpleri hasar görmüşse veya polisükroz bazlı gradyan ayırma solüsyonu partikül maddeler ya da berrak solüsyonun belirgin bir sarı renk alması şeklinde kendini belli eden bir bozulma gösteriyorsa, tüpleri kullanmayın.
14. Leucosep tüplerini tekrar kullanmayın. Her tüp tek kullanımlık olarak tasarlanmıştır.
15. Tam kan alımı için kan numunesi toplama tüpü talimatlarını izleyin.

## Sađlanan Malzemeler

Her kutu Őunları içerir:

Polisükroz bazlı gradyan ayırma solüsyonu ile önceden doldurulmuş 50 Leucosep tüpü.  
Kullanma kılavuzu ve MSDS'yi içeren CD.

## Saklama ve Stabilite

Kutu üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar açılmadan 4-30°C'de saklayın.  
Açılmış ürünü oda sıcaklığında (18-25 °C) saklayın ve dıŐ poŐeti açıldıktan sonra 12 hafta içinde veya kutu üzerindeki son kullanma tarihinden (hangisi daha önceyse) önce kullanın.

## Gerekli Olan Ancak Sađlanmayan Ekipman ve Malzemeler

1. Heparinize kan alma tüpleri.
2. AIM-V® ve RPMI hücre kültürü ortamı.
3. 15 mL'lik santrifüj tüpleri.
4. PBMC'lerin fraksiyonlanması için en az 1000 RCF (g) kapasiteli ve numuneleri oda sıcaklığında (18-25 °C) muhafaza edebilen bir santrifüj.
5. Biyogüvenlik Seviyesi 2 (BL 2) kabini (önerilir).
6. Pipetler ve steril pipet uçları.
7. ELISPOT Kiti
8. 8 saatten daha eski numuneler kullanılıyorsa T-Cell *Xtend* reaktifi gerekebilir.

## Prosedür

Not: AŞağıdaki adımlar, İyi Laboratuvar Uygulamaları ilkeleri kullanılarak gerçekleştirilmelidir:

1. Kullanmadan önce, gerekli sayıda Leucosep tüpünün önceden oda sıcaklığına (18-25°C) getirildiğinden emin olun.
2. Polisükroz bazlı gradyan ayırma solüsyonu gözenekli bariyerin (frit) üzerinde toplanmışsa polisükroz bazlı gradyan ayırma solüsyonunu fritin altına taşımak için Leucosep tüplerini 350 x g'de bir dakika santrifüjleyin.
3. Tam kan numunesini ters çevirin ve ardından 15 mL'lik bir santrifüj tüpünde 5 kısım kan ile 3 kısım AIM-V veya RPMI hücre kültürü ortamı oranında seyreltin. Karıştırmak için santrifüj tüpünü birkaç kez ters çevirin.
4. Seyreltilmiş kanı doğrudan Leucosep tüpüne dökün ve 1000 x g'de 18-25°C'de aralıksız 10 dakika santrifüjleyin.
5. Bulanık PBMC katmanını aspire edin ve 15 mL'lik bir santrifüj tüpünde AIM-V veya RPMI ile ~10 mL'ye tamamlayın. Karıştırmak için santrifüj tüpünü ters çevirin.
6. 600 x g'de 7 dakika santrifüjleyin. Süpernatantı imha edin.
7. Hücre peletini AIM-V veya RPMI ile yeniden süspanse edin, AIM-V veya RPMI ile ~10 mL'ye tamamlayın ve 350 x g'de 7 dakika santrifüjleyin.
8. Süpernatantı imha edin ve ELISPOT testi için gerekli hücre peletini AIM-V hacminde (RPMI **değil**) yeniden süspanse edin.
9. Bir ELISPOT testinde antijen stimülasyonu için hücre gerekiyorsa hücreleri AIM-V'ye (RPMI **değil**) göre seyreltin.

## Sınırlamalar

1. Diđer ayırma yöntemlerinde olduğu gibi Leucosep tüpleri, bazı PBMC alt kümelerinin (örn. T ve B hücreleri) oranını, ayrılmamış tam kandakilerden farklılaştırabilir. Bu değişikliğin normal durumlarda nispeten önemsiz olduğuna inanılmaktadır.

## Kalite Kontrol

Bireysel bir laboratuvarın kalite kontrol faaliyetlerinin bir parçası olarak ilgili test sistemi için yeterli miktarda PBMC elde edilebilmesini sağlamak üzere hücre sayma yöntemleri tasarlanmalı ve valide edilmelidir. Ayrıca, kalite kontrol faaliyetleri, ilgili test sistemi içinde T hücrelerinden beklenen performansın elde edilmesini sağlamak üzere geliŐtirilmiş

pozitif ve negatif kontrollerin kullanımını içermelidir.

### **Performans Özellikleri**

#### Taze kan

15 donörden 6 ml kan alınmıştır. Her donörden alınan numuneler, venepunkturdan sonraki 8 saat içinde işlenmiştir. Numuneler, polisükröz bazlı ayırma ortamı ile doldurulmuş Leucosep tüpleri kullanılarak işlenmiştir. ELISPOT testinde izole edilmiş hücrelerin canlı ve işlevsel olduğu görülmüştür.

#### T-Cell Xtend Reaktifi kullanılarak saklanan kan

205 donörden kan numunesi alınmış ve polisükröz bazlı ayırma ortamı ile doldurulmuş Leucosep tüpleri kullanılarak hücre geri kazanımlarının test edilmesi için kullanılmıştır. Donör başına 6 mL kan toplanmış ve kan, venepunkturdan sonra 29-32 saat içinde T-Cell Xtend reaktifi kullanılarak işlenmiştir. ELISPOT testinde izole edilmiş hücreler canlı ve işlevsel bulunmuştur.

Not: Donör başına 6 ml kan kullanılması tavsiye edilir. Kan hacmindeki bir azalma, hücre geri kazanımlarını etkileyebilir.

### **Ciddi Olayların Bildirilmesi**

Bu cihazla ilgili ciddi bir olay meydana geldiyse, Müşteri Hizmetlerine bildirilmelidir. Avrupa Birliği Üye Devletlerinde, ciddi vakalar ayrıca ülkenizdeki yetkili makama (in vitro tanı amaçlı tıbbi cihazlardan sorumlu devlet dairesi) bildirilmelidir. Yetkili makamınızla nasıl iletişime geçeceğinize ilişkin ayrıntılar için lütfen devletinizin web sitesine bakın. 'Ciddi bir olay', doğrudan veya dolaylı olarak aşağıdakilere yol açan, açmış olabilecek veya açabilecek herhangi bir olay anlamına gelir:

- Bir hastanın, kullanıcının veya başka bir kişinin ölümü,
- Bir hastanın, kullanıcının veya başka bir kişinin sağlığının geçici veya kalıcı olarak ciddi şekilde bozulması;
- Ciddi bir halk sağlığı tehdidi.

### **Müşteri Hizmetleri İletişim Bilgileri**

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

Ürün desteği yüklemeleri ve daha fazla teknik bilgi için lütfen web sitemizi ziyaret edin:  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

## ELISPOT için PBMC'lerin Toplanması ve Ayrılmasında Sorun Giderme Kılavuzu

Sorun	Potansiyel sebep	Olası çözüm
Düşük hücre verimi	Lökopeni Kan alma hatası Kan alma tüpünün oda sıcaklığında (18-25 °C) olmaması Kanın gereken sıcaklıkta saklanmaması Tavsiye edilenler dışındaki hacimlerin veya dilüsyonların kullanılması	İlave bir kan toplama tüpü ekleyin. EDTA içeren CPT ve kan alma tüpleri Leucosep tüpleriyle uyumlu değildir. Kan alma tüpünün oda sıcaklığına gelmesine izin verin. Kan taşıma işlemlerinin 18-25°C'de veya T-Cell Xtend reaktifi kullanılıyorsa 10-25°C'de yapıldığından emin olun. Doğru talimatların izlendiğinden emin olun.
Kırmızı kan hücresi kontaminasyonu	Kanın gereken sıcaklıkta saklanmaması Kan alma tüpünün oda sıcaklığında (18-25 °C) olmaması Kanın seyreltilmemiş olması Leucosep tüpü içindeki kan numunesinin ters çevrilmesi Hatalı santrifüjleme Numune ayırmanın tamamlanamaması	Kan taşıma işlemlerinin 18-25°C'de veya T-Cell Xtend reaktifi kullanılıyorsa 10-25°C'de yapıldığından emin olun. Kan alma tüpünün oda sıcaklığına gelmesine izin verin. Kanın prosedüre göre seyreltilmiş olduğundan emin olun. Santrifüjlemeden önce Leucosep tüpünün dik durduğundan emin olun. Santrifüjleme talimatlarının takip edildiğinden emin olun. Santrifüjün 18-25°C'de soğutma yapabildiğini kontrol edin. Santrifüj freninin kapalı olduğunu kontrol edin. Santrifüjleme adımını 10 dakika artırın.
Tanımlanmış veya belirgin mononükleer katman yok	Numune ayırmanın tamamlanamaması Santrifüjün doğru kalibre edilmemiş olması Hatalı santrifüjleme Hiperlipemik numune	Santrifüjleme adımını 10 dakika artırın. Santrifüjü kalibre edin. Santrifüjleme talimatlarının takip edildiğinden emin olun. Açlık kan numunesi toplayın.
Geçersiz sonuçlar	Geçersiz sonuçların sebebi, bir dizi yanlış numune işleme sorunu olabilir.	Yukarıdaki bölümlere bakın.

## Semboller Sözlüğü

📅 Son Kullanma Tarihi (Yıl-Ay-Gün)

📦 Lot numarası

📋 Katalog numarası

⚠️ Dikkat, kullanım talimatlarına bakın

🏭 Üretici firma

📉 "n" sayıda test için yeterli

📄 In Vitro tanı cihazı

🌡️ Sıcaklık sınırlaması / Bu sıcaklık aralığında saklayın

📖 Kullanım talimatlarına bakın

🇪🇺🇷🇪🇵 AB Yetkili Temsilcisi

T-Cell Xtend ve Oxford Immunotec logosu, Oxford Immunotec Limited'in ticari markalarıdır.

Leucosep, Greiner Bio-One'in ticari markasıdır.

AIM- V, Life Technologies Corporation'in ticari markasıdır.

CPT, Becton, Dickinson and Company'nin ticari markasıdır.

T-Cell Xtend reaktifinin kullanımı aşağıdaki patentlerle korunmaktadır:

EP2084508, U S9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

© 2024, Oxford Immunotec Limited. Her hakkı saklıdır.

### 🏭 Üretici:

Oxford Immunotec Ltd

143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon

Oxfordshire OX14 4SE, Birleşik Krallık

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

### 🇪🇺🇷🇪🇵 AB Yetkili Temsilcisi:

Wallac Oy

Mustionkatu 6,

FI-20750 Turku,

Finlandiya

Revizyon numarası	Veriliş tarihi	Değişiklikler
1-5		Ayrıntılar, Oxford Immunotec'ten talep edilebilir.
6	Nisan 2023	j PI-TS-IVD-UK-V6'un ilk çevirisi
7	Eylül 2024	AB'deki yetkili temsilcinin değişmesi



Oxford Immunotec Ltd.  
143 Park Drive East, Milton Park,  
Abingdon, Oxfordshire, OX14 4SE,  
Birleşik Krallık.

Tel: +44 (0)1235 442780

Faks: +44 (0)1235 442781

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

