

## Kit per la marcatura in vitro di leucociti autologhi (con radiofarmaco non fornito)

**REF** WBC.0001

Prodotto: **WBC Marker Kit**

Metodo brevettato

Conservare a temperatura 2-25 °C, non congelare.

Marcato: **IVD** codice CND **W01030199**

CE

Il **WBC Marker Kit** è un nuovo e innovativo sistema Celltech per la marcatura in vitro di leucociti autologhi con radiofarmaci. Il **WBC Marker Kit**, impiega dispositivi medici tutti rigorosamente certificati dai singoli produttori integrati nell'uso da un innovativo processo che risulta essere, di fatto, un "**sistema chiuso**" per la sedimentazione e la marcatura dei leucociti in vitro. Il cuore del sistema è rappresentato da uno strumento di riduzione delle siringhe **Syringe Cut** che, unitamente ai vari componenti, permette di assicurare al materiale biologico un costante isolamento dall'ambiente esterno in tutte le fasi del processo. Questa procedura minimizza la possibilità di errori nella fase di separazione del pellet di leucociti e ne assicura una resa estremamente elevata con una trascurabile contaminazione da piastrine ed eritrociti. Le rese di marcatura ottenute risultano essere elevate e costanti, tipicamente nell'ordine del 75-80%.

### Materiali forniti con il kit; dispositivi medici monouso sterili, apirogeni e latex free:

- 1) N. 2 siringhe da 50 ml (colore bianco);
- 2) N. 1 siringa da 50 ml (colore viola);
- 3) N. 1 siringa da 10 ml;
- 4) N. 3 siringhe da 5 ml;
- 5) N. 1 valvole per infusione (colore bianca/blu);  
**N.B.** Questa valvola apre e chiude automaticamente il passaggio dei fluidi alla connessione e sconnessione di terminali normalizzati Luer Lock con tenuta e isolamento garantiti per più di 50 connessioni. Vedi premessa alla procedura. Caratteristiche tecniche fornibili su richiesta.
- 6) N. 4 valvole per infusione (colore verde/bianca);  
**N.B.** Questa valvola apre e chiude automaticamente il passaggio dei fluidi alla connessione e sconnessione di terminali normalizzati Luer Lock con tenuta e isolamento garantiti per più di 50 connessioni. Vedi premessa alla procedura. Caratteristiche tecniche fornibili su richiesta.
- 7) N. 1 ago Mirage 20G;
- 8) N. 5 aghi 20G;
- 9) N. 1 perforatore con valvola bianca/blu per vial;
- 10) N. 1x12 ml soluzione anticoagulante (ACD formula A);
- 11) N. 1x12 ml soluzione di sedimentazione (HES);
- 12) N. 2x8 ml soluzione salina;
- 13) N. 13 tamponi disinfettanti;
- 14) N. 4 etichette stampate con le lettere **A B C D** seguite da un codice univoco di ogni singolo kit.

### Strumenti e materiali necessari per l'esecuzione del metodo e parti integranti del kit:

WBC.0002 **Syringe Cut** strumento di riduzione delle siringhe, vedi documentazione relativa;

WBC.0003 **Syringe Turn** strumento di sbloccaggio della saldatura (fornito insieme a Syringe Cut);

### Componenti opzionali (fornibili a richiesta):

WBC.0004 **Lead Case Syringe** contenitori in piombo di radioprotezione della siringa calda da 50 ml;

WBC.0005 **Support Syringe** supporto porta siringa a 4 posti.

### Strumenti e materiali necessari di laboratorio:

Centrifuga 150 g adattata a ricevere provette per centrifugazione tipo "Falcon" da 50 ml;

Radiofarmaco per la marcatura dei leucociti;

Cappa a flusso laminare sterile;

Mezzi di radio-protezione nella manipolazione del radiofarmaco.

### Composizione delle soluzioni:

Tutte le soluzioni sono preparate secondo le Norme di Buona Preparazione Farmaceutica (cGMP), classificate sterili e apirogene. Rappresentano, in qualità e composizione, quanto citato nella bibliografia Internazionale per la preparazione sterile di cellule marcate a garantire funzionalità e reattività dei leucociti.

### WBC.ACD Soluzione anticoagulante ACD formula A:

Acido citrico monoidrato	8 g/L
Sodio citrato	22 g/L
Glucosio monoidrato	24.5 g/L
pH valore compreso	4,7-5,3

## WBC.HES **Soluzione di sedimentazione HES 10%:**

Poli (O-2 Idrossietil) amido 100 g/L  
(0,5 200 KDa)  
Sodio cloruro 9 g/L  
pH valore compreso 3,5-6,0

## WBC.SAL **Soluzione salina:**

Sodio cloruro 9 g/L  
pH valore compreso 7,2-7,6

### **Dispositivi medici monouso marcati:**

siringa da 50 ml luer lock Artsana C€0373  
siringa da 50 ml luer lock Maxter C€0459  
siringa da 10 ml luer lock Artsana C€0373  
siringa da 5 ml luer lock Artsana C€0373  
valvole per infusione luer lock (maschio e femmina) Cardinal C€0086  
ago Mirage 20G luer lock Artsana C€0197  
ago 20G luer lock Artsana C€0373  
perforatore Cardinal C€0086  
tampone disinfettante PDI C€

### **Premessa alla procedura:**

tutte le manovre di trasferimento fra le siringhe e di passaggio nelle varie fasi di preparazione avvengono sempre in sistema chiuso e in isolamento. Tutto il materiale monouso fornito (sterile, apirogeno, latex free) e la procedura diligentemente applicata, garantiscono un processo in sterilità.

**L'isolamento dall'ambiente esterno è garantito dall'uso di valvole Luer Lock che aprono e chiudono il passaggio dei fluidi automaticamente** per semplice connessione o sconnessione delle varie parti con le quali, dette valvole, vengono in giunzione. Nella seguente procedura questa condizione di **"apertura e chiusura automatica in sistema chiuso"** è valida ogni volta che avviene una connessione o una disconnessione di dette valvole ad altri terminali Luer Lock.

Pertanto questa condizione, per brevità di descrizione, è da considerarsi costantemente ripetuta in procedura quando questa azione di connessione o sconnessione è prevista dalla procedura stessa.

Il sistema mantiene il suo isolamento mediante l'impiego dello strumento di riduzione delle siringhe che consente la trasformazione delle siringhe in contenitori che risultano essere adatti alla centrifugazione. Viene così risolto il problema di passaggi in ambiente aperto per trasferimenti fra vari contenitori con potenziale rischio di contaminazione delle soluzioni. E' escluso da questo processo solamente il prelievo delle soluzioni e del farmaco radioattivo dai rispettivi flaconi, attività comunque controllate dalla presenza di valvole che prevedono la foratura dei setti una sola volta e garantiscono l'isolamento del contenuto dall'ambiente esterno così come previsto per l'impiego di kit (farmaci) sigillati sterili.

Le indicazioni "PICS (Pharmaceutical Inspection Convention)/GMP Guide for blood establishment del 25-9-2007" e le linee guida "EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products" definiscono alcuni aspetti significativi al concetto di sistema chiuso nella produzione dei farmaci in asepsi, conseguentemente a queste indicazioni il Kit **WBC Marker Kit Celltech** può essere considerato un **"sistema chiuso"**.

Ogni kit è matricolato in modo univoco. Questo codice è riportato nelle etichette presenti nel kit che servono a marcare le singole siringhe nel momento dell'impiego. Questa codifica permette di mantenere univoci tutti i materiali del singolo kit con riferimento ad un unico paziente.

## Procedura

### **1) Preparazione e prelievo del sangue:**

- prendere una siringa da 50 ml bianca ed etichettarla con l'etichetta **A**, su questa connettere una valvola (verde/bianca), sulla valvola connettere un ago 20G, prendere il flacone contenente ACD-A, rimuovere la protezione e disinfettare con tampone disinfettante il tappo in gomma, inserire l'ago e prelevare 8 ml di soluzione;
- sconnettere l'ago, senza estrarlo dal flacone, dalla valvola;
- inserire l'ago Mirage 20G in vena periferica del paziente;
- disinfettare con un tampone disinfettante la valvola (verde/bianca) connessa alla siringa **A**, connettere la valvola al raccordo dell'ago Mirage;
- prelevare circa 32 ml di sangue;
- premere il tubicino dell'ago Mirage per evitare fuoriuscite di sangue, sconnettere il raccordo dell'ago dalla valvola (verde/bianca) connessa alla siringa **A**, agitare dolcemente per inversione la siringa **A** fino a omogeneizzazione della soluzione;
- estrarre l'ago Mirage dalla vena periferica del paziente.

### **2) Separazione dei leucociti:**

- prendere il flacone contenente l'HES, rimuovere la protezione, disinfettare con un tampone disinfettante il tappo in gomma del flacone contenente l'HES e contestualmente la valvola (verde/bianca) connessa alla siringa **A**, connettere la valvola con un ago 20G, inserire l'ago nel flacone e prelevare 10 ml di soluzione;
- sconnettere l'ago, senza estrarlo dal flacone, dalla valvola;

- c) agitare dolcemente per inversione la siringa **A** fino a omogeneizzazione della soluzione;
- d) posizionare la siringa **A** in verticale nel supporto WBC.0005 con la valvola posizionata verso l'alto;
- e) attendere l'idonea sedimentazione degli eritrociti e delle piastrine all'interno della siringa **A** che generalmente avviene in un tempo mediamente compreso fra 45 e 90 minuti; l'attesa produce la formazione di due volumi distinti, la soluzione concentrata di eritrociti e piastrine (rossa opalescente) e il surnatante contenente la popolazione leucocitaria (giallo-arancio trasparente).
- f) prendere una siringa da 50 ml viola ed etichettarla con l'etichetta **B**, **Attenzione** posizionare l'etichetta nello spazio compreso fra i volumi 0 e 15 ml, connettere una valvola (bianca/blu);
- g) disinfettare con un tampone disinfettante la valvola connessa sulla siringa **A**, connettere le due valvole avendo cura di eseguire l'operazione delicatamente e con la siringa **B** (viola) rivolta verso l'alto in posizione verticale;
- h) trasferire il surnatante contenente la popolazione leucocitaria dalla siringa **A** alla siringa **B** agendo indifferentemente su uno degli stantuffi delle due siringhe, attenzione trasferire non più di 32 ml di surnatante;
- i) scollegare le due siringhe nel punto di connessione delle valvole, la bianca/blu dalla verde/bianca. La siringa **A**, che contiene gli eritrociti e le piastrine, viene eliminata come rifiuto unitamente alla valvola verde/bianca.

### 3) Prima resezione della siringa:

La siringa **B** comprensiva di valvola bianca/blu viene posizionata sullo strumento di resezione Syring Cut. Posizionare il braccio mobile in alto, sul cilindro porta siringa esiste un riferimento (foro) sul quale allineare la valvola presente sulla siringa. Inserire la siringa fino a far coincidere il volume di 41 ml al bordo destro del porta siringa. In questo modo il taglio viene eseguito in corrispondenza del volume di 44 ml. La resezione a caldo produce una saldatura della plastica fra il corpo della siringa e le alette dello stantuffo. In questo modo si ottiene un corpo unico che può essere assimilato a provette di centrifugazione tipo "Falcon" e quindi può essere posta in centrifuga per la successiva fase di arricchimento dei leucociti.

### 4) Arricchimento dei leucociti:

- a) la siringa trasformata come al punto 3) viene posta in centrifuga con la valvola orientata verso l'alto. Centrifugare per 5 minuti a 150 g. Al termine della centrifugazione la popolazione di leucociti giace sulla testa del pistone della siringa;
- b) prelevare la siringa dalla centrifuga. Tenere la siringa in posizione verticale e applicare sul fondo della siringa **B** l'apposito strumento Syring Turn, con la mano tenere fermo il corpo della siringa e con l'altra mano ruotare lo strumento per liberare la saldatura dello stantuffo dal corpo della siringa;
- c) prendere una siringa bianca da 50 ml ed etichettarla con l'etichetta **C**, disinfettare con un tampone disinfettante la valvola connessa sulla siringa **B**, in posizione verticale connettere le due siringhe con la siringa **C** rivolta verso l'alto;
- d) avendo cura di mantenere la posizione verticale delle siringhe, trasferire il surnatante dalla siringa **B** alla siringa **C** agendo sullo stantuffo della siringa **C**. Spingere lo stantuffo fino a fine corsa. Nella siringa **B** rimane il pellet della popolazione leucocitaria concentrata;
- e) sconnettere la siringa **C** dalla valvola (bianca/blu). Eliminare la siringa **C** come rifiuto ospedaliero.

### 5) Marcatura dei leucociti:

- a) porre la siringa **B** in un apposito contenitore di piombo per la radioprotezione;
- b) procedere con la marcatura del farmaco secondo le indicazioni fornite dal produttore;
- c) posizionare un perforatore comprensivo di valvola bianca/blu nel flacone del radiofarmaco;
- d) preparare una siringa da 5 ml schermata e connetterla a una valvola (verde/bianca);
- e) disinfettare con un tampone disinfettante le valvole presenti sul perforatore nel flacone del radiofarmaco e quella presente sulla siringa schermata da 5 ml;
- f) connettere le due valvole e prelevare il volume di radiofarmaco (tipicamente in volume tra 1 e 5 ml con attività di 1295-1480 MBq);
- g) sconnettere la valvola (bianca/blu) presente sul perforatore del radiofarmaco da quella (verde/bianca) presente sulla siringa schermata da 5 ml;
- h) disinfettare con un tampone disinfettante la valvola (verde/bianca) presente sulla siringa schermata da 5 ml e la valvola (bianca/blu) presente sulla siringa **B**;
- i) connettere le due siringhe per mezzo delle valvole;
- j) trasferire il volume desiderato di soluzione del radiofarmaco dalla siringa schermata da 5 ml alla siringa **B**;
- k) sconnettere la valvola della siringa schermata da 5 ml dalla valvola presente sulla siringa **B**, eliminare la siringa da 5 ml con la valvola compresa e smaltirla come rifiuto contaminato radioattivo;
- l) agitare più volte delicatamente per inversione la siringa **B** e lasciare in incubazione per circa 10 minuti;
- m) prendere una siringa da 5 ml e montare una valvola verde/bianca, sulla valvola montare un ago 20G;
- n) prendere un flacone contenente la soluzione salina, rimuovere la protezione, disinfettare con un tampone disinfettante il tappo in gomma e prelevare 5 ml di soluzione;
- o) rimuovere l'ago, senza estrarlo dal flacone, dalla valvola;
- p) disinfettare con un tampone disinfettante la valvola connessa sulla siringa **B** e quella presente sulla siringa da 5 ml, connettere le due valvole e trasferire la soluzione salina nella siringa **B**;
- q) scollegare le due siringhe nel punto di connessione delle due valvole, la bianca/blu dalla verde/bianca;
- r) agitare dolcemente la siringa **B** per inversione.

### 6) Seconda resezione della siringa:

La siringa **B** comprensiva di valvola bianca/blu viene posizionata sullo strumento di resezione Syring Cut. Posizionare il braccio mobile in alto, sul cilindro porta siringa esiste un riferimento (foro) sul quale allineare la valvola presente sulla siringa. Inserire la siringa nella porta siringa e posizionarla in modo che il taglio comprenda una parte, anche minima, della croce del pistone; (**attenzione**: non tagliare il disco di posizionamento del pistone della siringa). La resezione a caldo produce una saldatura della plastica fra il corpo della siringa e le alette dello stantuffo. In questo modo si ottiene un corpo unico che può essere assimilato a provette di centrifugazione tipo "Falcon" e quindi può essere posta in centrifuga.

## 7) Preparazione per l'infusione dei leucociti marcati:

- a) la siringa trasformata come al punto 6) viene posta in centrifuga con la valvola orientata verso l'alto. Centrifugare per 5 minuti a 150 g. Al termine della centrifugazione la popolazione di leucociti giace sulla testa del pistone della siringa;
- b) prelevare la siringa dalla centrifuga. Tenere la siringa in posizione verticale e applicare sul fondo della siringa **B** l'apposito strumento Syring turn, con la mano tenere fermo il corpo della siringa e con l'altra mano ruotare lo strumento per liberare la saldatura dello stantuffo dal corpo della siringa;
- c) prendere una siringa da 10 ml ed etichettarla con l'etichetta **D**, disinfettare con un tampone disinfettante la valvola connessa sulla siringa **B**, connettere le due siringhe;
- d) trasferire il surnatante dalla siringa **B** alla siringa **D**, spingere lo stantuffo fino a fine corsa;
- e) sconnettere la siringa **D** dalla valvola e conservare la siringa **D** per il calcolo della resa della marcatura;
- f) prendere il flacone rimanente contenente la soluzione salina, rimuovere la protezione, prendere una siringa da 5 ml e connetterla con una valvola verde/bianca, sulla valvola montare un ago 20G, disinfettare con un tampone disinfettante il tappo in gomma del flacone di soluzione salina e prelevare 1-2 ml di soluzione;
- g) rimuovere l'ago, senza estrarlo dal flacone, dalla valvola verde/bianca;
- h) disinfettare con un tampone disinfettante la valvola (bianca/blu) connessa sulla siringa **B** e quella connessa sulla siringa da 5 ml contenente la soluzione salina, quindi connettere le due valvole e trasferire la soluzione salina alla siringa **B**, agitare dolcemente per inversione per risospesione dei leucociti marcati;
- i) ritrasferire i leucociti marcati e risospesi dalla siringa **B** alla siringa da 5 ml;
- j) scollegare le due siringhe nel punto di connessione delle valvole, la bianca/blu dalla verde/bianca;
- k) disinfettare con un tampone disinfettante la valvola verde/bianca presente sulla siringa da 5 ml, connettere un ago 20G e iniettare nella vena periferica del paziente;
- l) conservare la siringa **B** per il calcolo della resa di marcatura.

### Avvertenze:

Attenersi scrupolosamente alle informazioni contenute nella presente documentazione.

Nell'impiego dei componenti del kit e nelle varie fasi di preparazione adottare tutte le misure idonee previste per la manipolazione di prodotti sterili, specificatamente prestare le seguenti attenzioni:

- verificare le date di scadenza del kit;
- non utilizzare nessun componente dopo la data di scadenza;
- impiegare protezioni monouso sterili;
- utilizzare soluzioni disinfettanti per disinfettare i setti dei flaconi prima di forarli con gli aghi;
- evitare il contatto degli aghi con superfici varie nel trasferimento delle soluzioni;
- per la manipolazione del radio-farmaco; attenersi alla documentazione del produttore.

### Bibliografia:

Erik F. J. de Vries; Manel Roca; Francois Jamar; Ora Israel; Alberto Signore Guidelines for the labelling of leucocytes with 99mTc-HMPAO 3 March 2010 Springerlink.com

EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use Annex 1 Manufacture of Sterile Medicinal Products.

Pharmaceutical Inspection Convention Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme "Isolators Used For Aseptic Processing And Sterility Testing" PI 014-3 25 September 2007.

Lo smaltimento di tutti i materiali contenuti nel kit, ivi compresi i prodotti di risulta, deve essere eseguito in conformità alle vigenti disposizioni in materia e comunque come rifiuti ospedalieri trattati potenzialmente infettivi e, ove previsto, radioattivi.

Marcatura  in conformità Europea secondo direttiva IVD 98/97 CEE.

Sistema qualità aziendale UNI EN 9001:2000

	Fabbricante
	Numero di catalogo
	Numero di test eseguibili
	Numero di lotto di produzione
	Data di scadenza
	Diagnostico in vitro
	Limiti di temperatura per la conservazione
	Prodotto monouso da non riusare dopo il primo impiego
	Avvertenze e precauzioni
	Prendere visione delle informazioni prima dell'uso
	Prodotto sterilizzato con vapore o calore secco

Kit brevettato sviluppato da Celltech srl.

 Celltech srl Via Chambery 93/107 U 10142 Torino Italy - Tel. +39 011 4115123 - Fax +39 011 5702104 - www.cell-tech.it