

Para uso en la recogida y separación de células mononucleares periféricas de sangre completa

PROSPECTO

Para uso diagnóstico *in vitro*

Este prospecto cubre el uso de:

Tubos Leucosep™ (número de catálogo: LTK.615)

Uso indicado

El uso indicado de los tubos Leucosep es la recogida y la separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre completa. Los tubos facilitan la separación de las PBMC de la sangre completa utilizando una solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa antes de utilizar estas células en análisis ELISPOT.

Introducción

Las técnicas ELISPOT utilizan células T en PBMC que se han separado de sangre completa. Un método para separar estas células requiere el uso de una solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa. Este procedimiento consta de una serie de pasos que se deben llevar a cabo con cuidado para garantizar resultados óptimos. El uso de los tubos Leucosep reduce el número de pasos, aumenta la estabilidad del procedimiento y disminuye el tiempo necesario para realizar el procedimiento de separación.

Principio del método

Los tubos Leucosep se han creado para conseguir una separación óptima de las PBMC de la sangre completa humana mediante centrifugación por gradiente de densidad. Estos tubos Leucosep incorporan una barrera porosa en un tubo de polipropileno transparente. Esta barrera biológicamente inerte consiste en polietileno de alto grado. El tubo Leucosep elimina la larga y laboriosa estratificación del material de la muestra sobre una solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa. Se mezcla la sangre completa anticoagulada con unos medios de cultivo y luego se vierte en el tubo Leucosep. La barrera porosa impide que la sangre se mezcle con el medio de separación. Durante la centrifugación, las PBMC se separan de los eritrocitos no deseados debido a sus diferentes densidades y se recogen en la interfaz por encima del medio de separación. Cuando la separación se completa, la barrera impide una nueva contaminación de la capa de PBMC en el momento de retirarla.

Advertencias y precauciones

1. Exclusivamente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Sólo para uso profesional; los técnicos deberán haberse formado para este procedimiento.
3. Las muestras de sangre se deben considerar potencialmente peligrosas. Hay que tener cuidado al manipular material de origen humano.
4. La manipulación de las muestras de sangre completa y de los componentes del análisis, durante su uso, conservación y eliminación, debe respetar los procedimientos definidos en las directrices o normas nacionales pertinentes de seguridad ante riesgos biológicos
5. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados de pipeteo, técnicas de lavado, tiempos de centrifugación y temperaturas puede alterar la pureza de los aislamientos de PBMC e influir en los posteriores resultados de la prueba.
6. No recoja sangre en Tubos para Preparación de Células (CPT™, Becton Dickinson) o tubos de extracción de sangre con EDTA porque son incompatibles con los tubos Leucosep
7. No refrigere ni congele las muestras de sangre completa. Conserve y transporte las muestras de sangre al laboratorio a una temperatura de 18 a 25 °C o de 10 a 25 °C si van a tratarse con el reactivo T-Cell *Xtend*®.
8. La sangre no deberá almacenarse durante más de 8 horas, o de 32 horas si más tarde va a tratarse con el reactivo T-Cell *Xtend*.
9. Utilice únicamente recipientes de un solo uso para la recogida de muestras de sangre venosa.
10. No use el producto después de la fecha de caducidad.
11. Utilice técnicas asépticas al usar este producto.
12. No almacene los tubos Leucosep bajo la luz directa.
13. No use el producto si los tubos Leucosep están dañados o si la solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa se ha deteriorado, como indicaría la aparición de un evidente color amarillo o de partículas en la solución.
14. No reutilice los tubos Leucosep. Cada tubo está diseñado para un solo uso.
15. Siga las instrucciones del tubo de recogida de muestras de sangre para recoger sangre completa.

Materiales suministrados

Cada caja contiene:

50 tubos Leucosep precargados con una solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa.

CD con el prospecto y la MSDS (hoja de datos de seguridad de materiales).

Conservación y estabilidad

Almacene el producto sin abrir a temperatura entre 4 y 30 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la caja. Conserve el producto abierto a temperatura ambiente (18-25 °C) y utilícelo en un plazo de 12 semanas después de abrir la bolsa externa, o antes de la fecha de caducidad que figura en la caja, lo que ocurra primero.

Equipo y materiales necesarios pero no suministrados

1. Tubos de extracción de sangre heparinizados.
2. Medios de cultivo celular AIM-V® y RPMI.
3. Tubos de centrifugación de 15 mL.
4. Una centrífuga para el fraccionamiento de las PBMC capaz de al menos 1 000 RCF (g) y capaz de mantener las muestras a temperatura ambiente (18-25 °C).
5. Cámara de flujo laminar con un nivel de seguridad biológica 2 (BL 2) (recomendado).
6. Pipetas y puntas de pipeta estériles.
7. Kit de ELISPOT.
8. Puede que se necesite un reactivo T-Cell *Xtend* que podrá adquirirse si se utilizan muestras de más de 8 horas.

Procedimiento

Nota: Hay que realizar los siguientes pasos aplicando los principios de buena práctica de laboratorio:

1. Asegúrese de que cuenta con el número necesario de tubos Leucosep a temperatura ambiente (18-25 °C) antes del procedimiento.
2. Si ha quedado la solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa encima de la barrera porosa (frit), centrifugue los tubos Leucosep a 350 x g durante un minuto para desplazar la solución de separación por gradiente de densidad de polisacarosa por debajo de la barrera.
3. Invierta la muestra de sangre completa y luego diluya en una proporción de 5 partes de sangre por 3 partes de medios de cultivo celular AIM-V o RPMI en un tubo de centrifuga de 15mL. Invierta varias veces el tubo de centrifuga para mezclar.
4. Vierta directamente la sangre diluida en el tubo Leucosep y centrifugue a 1000 x g durante 10 minutos a 18-25 °C sin frenar.
5. Aspire la capa turbia de PBMC y diluya hasta ~10 mL con AIM-V o RPMI en un tubo de centrifuga de 15 mL. Invierta el tubo para mezclar.
6. Centrifugue a 600 x g durante 7 minutos. Deseche el sobrenadante.
7. Vuelva a suspender el sedimento celular con AIM-V o RPMI, diluya hasta ~10 mL con AIM-V o RPMI y centrifugue a 350 x g durante 7 minutos más.
8. Deseche el sobrenadante y vuelva a suspender el sedimento celular en el volumen de AIM-V (**no** RPMI) necesario para el análisis ELISPOT.
9. Si se precisan células para estimulación antigénica en un análisis ELISPOT, dilúyalas con AIM-V (**no** RPMI).

Limitaciones

1. Como ocurre con otros métodos de separación, los tubos Leucosep pueden alterar la proporción de algunas subpoblaciones de PBMC (p. ej., células T y B) con respecto a la presente en sangre completa no separada. Se considera que tal alteración es relativamente insignificante en los casos normales.

Control de calidad

Como parte del control de calidad de los laboratorios, se deben diseñar y validar métodos de recuento para garantizar la obtención de suficientes PBMC para el sistema analítico pertinente. Además, en las actividades de control de calidad se deben emplear controles positivos y negativos creados para garantizar el rendimiento previsto de las células T en el sistema analítico pertinente.

Características de rendimiento

Sangre fresca

Se obtuvieron 6 mL de sangre de 15 donantes. Las dos muestras de cada donante se procesaron en las 8 horas siguientes a su extracción. Las muestras se procesaron utilizando tubos Leucosep rellenos de un medio de separación de polisacarosa. Las células aisladas fueron viables y funcionales en el análisis ELISPOT.

Sangre conservada con el reactivo T-Cell *Xtend*

Se obtuvieron muestras de sangre de 205 donantes que se utilizaron para analizar la recuperación celular utilizando tubos Leucosep rellenos de un medio de separación de polisacarosa. Se procesaron 6 mL de sangre de cada donante durante las 29-32 horas siguientes a su extracción utilizando el reactivo T-Cell *Xtend*.

Las células aisladas fueron viables y funcionales en el análisis ELISPOT.

Nota: se recomienda utilizar 6 mL de sangre de cada donante. Una disminución en el volumen de sangre podría repercutir en la recuperación celular.

Notificación de incidentes graves

Si se produce un incidente grave en relación con este producto, debe notificarse al Servicio al cliente. En los Estados Miembros de la Unión Europea, los incidentes graves también deben notificarse a la autoridad competente (el departamento gubernamental responsable de los productos sanitarios de diagnóstico *in vitro*) de su país. Consulte el sitio web de su gobierno para saber cómo contactar con su autoridad competente. Por "incidente grave" se entiende cualquier incidente que directa o indirectamente haya conducido, pueda haber conducido o pueda conducir a:

- el fallecimiento de un paciente, usuario u otra persona;
- el deterioro grave, temporal o permanente, del estado de salud de un paciente, usuario u otra persona;
- una amenaza grave para la salud pública.

Información de contacto del Servicio al cliente

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











Para descargar documentos del producto y más información técnica, visite nuestro sitio web:
www.oxfordimmunotec.com

Guía de detección de problemas en la recogida y separación de PBMC para ELISPOT

Problema	Posible causa	Posible solución
Baja producción de células	<p>Leucopenia</p> <p>Extracción incorrecta de sangre</p> <p>El tubo de extracción de sangre no está a temperatura ambiente (18-25 °C)</p> <p>La sangre no está conservada a la temperatura requerida</p> <p>Uso de volúmenes o diluciones distintos de los recomendados</p>	<p>Añada otro tubo de extracción de sangre</p> <p>Los CPT y los tubos de extracción de sangre con EDTA no son compatibles con los tubos Leucosep</p> <p>Deje que el tubo de extracción de sangre se equilibre a temperatura ambiente</p> <p>Asegúrese de que el envío de sangre sea a 18-25 °C o a 10-25 °C si se usa el reactivo T-Cell Xtend</p> <p>Asegúrese de seguir las instrucciones correctas</p>
Contaminación por eritrocitos	<p>La sangre no está conservada a la temperatura requerida</p> <p>El tubo de extracción de sangre no está a temperatura ambiente (18-25 °C) La sangre no está diluida</p> <p>Inversión de la muestra de sangre en el tubo Leucosep</p> <p>Centrifugación incorrecta</p> <p>Separación incompleta de las muestras</p>	<p>Asegúrese de que la sangre se transporta a 18-25 °C o a 10-25 °C si se usa el reactivo T-Cell Xtend</p> <p>Deje que el tubo de extracción de sangre se equilibre a temperatura ambiente</p> <p>Asegúrese de que se diluye la sangre según el procedimiento</p> <p>Asegúrese de que el tubo Leucosep está en posición vertical antes de la centrifugación</p> <p>Asegúrese de que se siguen las instrucciones de la centrifugación</p> <p>Compruebe que la centrifugadora es capaz de refrigerar a 18-25 °C</p> <p>Compruebe que el freno de la centrifugadora está desconectado</p> <p>Aumente 10 minutos el tiempo de centrifugación</p>

Problema	Posible causa	Posible solución
No hay una capa de células mononucleares definida o clara	Separación incompleta de las muestras La centrífuga no está calibrada correctamente Centrifugación incorrecta Muestra hiperlipémica	Aumente 10 minutos el tiempo de centrifugación Calibre la centrífuga Asegúrese de que se siguen las instrucciones de la centrifugación Obtenga la muestra de sangre en ayunas
Resultados no válidos	Los resultados no válidos pueden deberse a una serie de incorrecciones en la manipulación de la muestra	Consulte los apartados anteriores

Glosario de símbolos

	Uso por/fecha de caducidad (año-mes-día)
	Número de lote
	Número de catálogo
	Atención, ver las instrucciones de uso
	Fabricante
	Suficiente para “n” análisis
	Dispositivo de diagnóstico in vitro
	Limitación de temperatura/Conservar a
	Consultar las instrucciones de uso
	Representante autorizado de la UE

T-Cell *Xtend* y *Oxford* Immunotec logo son marcas registradas de Oxford Immunotec Limited.

Leucosep es una marca registrada de Greiner Bio-One

AIM-V es una marca registrada de Life Technologies Corporation.

CPT es una marca registrada de Becton Dickinson and Company.

El uso del reactivo T-Cell *Xtend* está protegido por las siguientes patentes: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205.

© 2022, Oxford Immunotec Limited. Reservados todos los derechos.

■ Fabricante:

Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, UK
www.oxfordimmunotec.com

EC REP Representante autorizado de la UE:

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

Número de revisión	Fecha de emisión	Modificaciones
1 - 4	Detalles disponibles bajo solicitud de Oxford Immunotec.	
5	Junio 2022	Cambio de la dirección del fabricante. Adición del historial de revisiones. Adición de instrucciones para notificar incidentes graves, y detalles para EC REP e Importador en la Unión Europea.
6	octubre 2022	Eliminar detalles del Importador en la Unión Europea



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

www.oxfordimmunotec.com

