

Para utilizar na recolha e separação de células mononucleares periféricas do sangue total

## FOLHETO INFORMATIVO

Para diagnóstico *in vitro*

Este folheto informativo cobre a utilização de:

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

## Utilização prevista

Os tubos Leucosep destinam-se a ser utilizados na recolha e separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) do sangue total. Os tubos facilitam a separação de CMSP do sangue total utilizando uma solução de separação por gradiente à base de polissacarose, antes da utilização destas células em ensaios ELISPOT.

## Introdução

As técnicas ELISPOT utilizam células T em CMSP que foram separadas do sangue total. Um método para separar estas células requer a utilização de uma solução de separação por gradiente à base de polissacarose. Este procedimento envolve vários passos que devem ser realizados cuidadosamente para garantir os melhores resultados. A utilização dos tubos Leucosep reduz o número de passos, torna o processo mais simples e reduz a quantidade de tempo necessária para realizar o procedimento de separação.

## Princípio do método

Os tubos Leucosep foram desenvolvidos para obter a separação ótima dos CMSP do sangue total humano por centrifugação em gradiente de densidade. Os tubos Leucosep incorporam uma barreira porosa num tubo transparente de polipropileno. Esta barreira biologicamente inerte é constituída por polietileno de alto grau. O tubo Leucosep elimina as demoradas e trabalhosas formações de camadas do material da amostra através de uma solução de separação por gradiente à base de polissacarose. O sangue total anticoagulado é misturado com meios de cultura e, em seguida, é transferido para o tubo Leucosep. A barreira porosa impede a mistura do sangue com o meio de separação. Durante a centrifugação, as CMSP são separadas de eritrócitos indesejáveis devido às suas diferentes densidades e recolhidos na interface acima do meio de separação. Quando a separação está concluída, a barreira impede a recontaminação da camada de CMSP durante a sua remoção.

## Advertências e precauções

1. Apenas para diagnóstico *in vitro*.
2. Apenas para uso profissional; os operadores devem receber formação sobre este procedimento.
3. As amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente perigosas. Deve ter-se cuidado ao manusear materiais de origem humana.
4. O manuseamento de amostras de sangue total e de componentes do ensaio, durante a utilização, armazenamento e eliminação deve ser efetuado em conformidade com os procedimentos definidos nas orientações ou regulamentos nacionais de segurança de risco biológico apropriados.
5. Qualquer desvio em relação aos procedimentos recomendados para pipetagem, técnicas de lavagem, tempos de centrifugação e/ou temperaturas podem alterar a pureza dos isolados de CMSP e influenciar os resultados dos testes subsequentes.
6. Não recolher o sangue em tubos de preparação de células (CPT™, Becton Dickinson) ou em tubos de colheita de sangue com EDTA, uma vez que são incompatíveis com os tubos Leucosep.
7. Não refrigerar nem congelar amostras de sangue total. Conservar e transportar as amostras de sangue para o laboratório a temperaturas entre 18 a 25 °C ou entre 10 a 25 °C, se as amostras forem tratadas com o reagente T-Cell *Xtend*®.
8. T-Cell *Xtend* deve ser utilizado apenas em amostras de sangue total que tenham entre 8 a 32 horas.
9. Utilizar apenas recipientes de utilização única para a colheita de amostras de sangue venoso.
10. Não utilizar para além do prazo de validade.
11. Utilizar técnicas assépticas quando utilizar este produto.
12. Não armazenar os tubos Leucosep expostos a luz direta.
13. Não utilizar se os tubos Leucosep estiverem danificados ou se a solução de separação por gradiente à base de polissacarose estiver deteriorada, conforme indicado pelo aparecimento de uma coloração amarela ou partículas em suspensão na solução transparente.
14. Não reutilizar os tubos Leucosep. Cada tubo foi concebido para ser usado apenas uma vez.
15. Siga as instruções do tubo de recolha de amostras de sangue para a recolha de sangue total.

## **Materiais fornecidos**

Cada caixa contém:

50 tubos Leucosep pré-cheios com uma solução de separação por gradiente à base de polissacarose.

CD contendo o folheto informativo e a FDS.

## **Armazenamento e estabilidade**

Conservar entre 4 a 30 °C sem abrir até ao prazo de validade indicado na caixa. Conservar o produto aberto à temperatura ambiente (18 a 25 °C) e utilizar no período de 12 semanas após abertura do saco exterior, ou antes do prazo de validade indicado na caixa, consoante o que ocorrer primeiro.

## **Equipamentos e materiais necessários, mas não fornecidos**

1. Tubos de colheita de sangue heparinizados.
2. Meios de cultura de células AIM-V® e RPMI.
3. Tubos de centrifuga de 15 mL.
4. Uma centrífugadora para o fracionamento das CMSP com capacidade para pelo menos 1000 RCF (g) e capaz de manter as amostras à temperatura ambiente (18 a 25 °C).
5. Câmaras de fluxo laminar com nível de segurança biológica 2 (BL 2) (recomendado).
6. Pipetas e pontas de pipeta estéreis.
7. Kit ELISPOT.
8. O reagente T-Cell *Xtend* pode ser necessário caso sejam utilizadas amostras com mais de 8 horas.

## **Procedimento**

Nota: Os passos seguintes devem ser realizados utilizando os princípios de Boas Práticas de Laboratório:

1. Garantir que o número necessário de tubos Leucosep estão à temperatura ambiente (18 a 25 °C) antes da sua utilização.
2. Se a solução de separação por gradiente à base de polissacarose tiver passado para cima da barreira porosa (frita), centrifugar os tubos Leucosep a 350 x g durante um minuto para mover a solução de separação por gradiente à base de polissacarose para baixo da frita.
3. Inverter a amostra de sangue total e, em seguida, diluir na proporção de 5 partes de sangue para 3 partes de meio de cultura de células AIM-V ou RPMI num tubo de centrifugação de 15 mL. Inverter o tubo de centrifugação várias vezes para misturar.
4. Verter o sangue diluído diretamente no tubo Leucosep e centrifugar a 1000 x g durante 10 minutos entre 18 a 25 °C sem paragem.
5. Aspirar a camada turva de CMSP e completar até ~10 mL com AIM-V ou RPMI num tubo de centrifuga de 15 mL. Inverter o tubo de centrifugação para misturar.
6. Centrifugar a 600 xg durante 7 minutos. Descartar o sobrenadante.
7. Ressuspender o agregado (pellet) de células com AIM-V ou RPMI, completar até ~10 mL com AIM-V ou RPMI e centrifugar a 350 x g durante mais 7 minutos.
8. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o agregado de células no volume de AIM-V (**não** RPMI) requerido pelo ensaio ELISPOT.
9. Se as células precisarem de estimulação com antigénio num ensaio ELISPOT, diluir as células em conformidade com AIM-V (**não** RPMI).

## **Limitações**

1. Tal como com outros métodos de separação, os tubos Leucosep podem alterar a proporção de alguns subconjuntos de CMSP (por exemplo, células T e B) das existentes em sangue não separado. Pensa-se que esta alteração seja relativamente insignificante em casos normais.

## **Controlo de qualidade**

Como parte da atividade de controlo de qualidade de um laboratório individual, devem ser concebidos e validados métodos de contagem de células para garantir que foram obtidas CMSP suficientes para o sistema de teste relevante. Adicionalmente, as atividades de controlo de

qualidade devem utilizar controlos positivos e negativos, desenvolvidos para garantir o desempenho esperado das células T no sistema de teste relevante.

### **Características de desempenho**

#### Sangue fresco

Obtiveram-se 6 mL de sangue de 15 dadores. As amostras de cada dador foram processadas no período de 8 horas após a punção venosa. As amostras foram processadas utilizando tubos Leucosep cheios com meio de separação à base de polissacarose. As células isoladas estavam viáveis e funcionais no ensaio ELISPOT.

#### Sangue conservado utilizando o reagente T-Cell *Xtend*

Obtiveram-se amostras de sangue de 205 dadores e foram utilizadas para analisar as recuperações de células utilizando tubos Leucosep cheios com meio de separação à base de polissacarose. Foram colhidos 6 mL de sangue por dador e o sangue foi processada no período entre 29 a 32 horas após a punção venosa utilizando reagente T-Cell *Xtend*.

As células isoladas estavam viáveis e funcionais no ensaio ELISPOT.

Nota: recomenda-se que sejam utilizados 6 mL de sangue por dador. Uma diminuição no volume de sangue pode afetar a recuperação das células.

### **Comunicação de incidentes graves**

Se tiver ocorrido um incidente grave em relação a este dispositivo, este deverá ser comunicado ao Serviço de Atendimento ao Cliente. Nos Estados-Membros da União Europeia, os incidentes graves devem também ser comunicados à autoridade competente (o departamento governamental responsável pelos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*) no seu país. Consulte o website do seu governo para obter detalhes sobre como contactar a sua autoridade competente. Um "incidente grave" significa qualquer incidente que direta ou indiretamente tenha conduzido, possa ter conduzido ou possa conduzir:

- à morte de um paciente, utilizador ou outra pessoa;
- à deterioração grave temporária ou permanente do estado de saúde de um paciente, utilizador ou outra pessoa;
- a uma grave ameaça para a saúde pública.

### **Informações de contacto do Serviço de Atendimento ao Cliente**

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











Para downloads de apoio ao produto e mais informações técnicas, visite o nosso website:  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

## Guia de resolução de problemas na colheita e separação de CMSP para ELISPOT

<b>Problema</b>	<b>Causa possível</b>	<b>Solução possível</b>
Baixo rendimento de células	<p>Leucopenia</p> <p>Colheita incorreta de sangue</p> <p>O tubo de colheita de sangue não está à temperatura ambiente (18 a 25 °C)</p> <p>O sangue conservado não está à temperatura necessária</p> <p>Utilização de volumes ou diluições que não as recomendadas</p>	<p>Adicionar um tubo de colheita de sangue adicional</p> <p>Tubos CPT e de colheita e sangue contendo EDTA não são compatíveis com os tubos Leucosep</p> <p>Deixar o tubo de colheita de sangue equilibrar à temperatura ambiente</p> <p>Certificar-se de que a remessa de sangue é efetuada entre 18 a 25 °C ou entre 10 a 25 °C, se for utilizado o reagente TCell <i>Xtend</i></p> <p>Certificar-se de que as instruções corretas são seguidas</p>
Contaminação de glóbulos vermelhos	<p>O sangue conservado não está à temperatura necessária</p> <p>O tubo de colheita de sangue não está à temperatura ambiente (18 a 25 °C)</p> <p>O sangue não está diluído</p> <p>Inversão da amostra de sangue dentro do tubo Leucosep</p> <p>Centrifugação incorreta</p> <p>Separação da amostra incompleta</p>	<p>Certificar-se de que o sangue é transportado entre 18 a 25 °C ou entre 10 a 25 °C, se for utilizado o reagente TCell <i>Xtend</i></p> <p>Deixar o tubo de colheita de sangue equilibrar à temperatura ambiente</p> <p>Certificar-se de que o sangue é diluído de acordo com o procedimento</p> <p>Certificar-se de que o tubo Leucosep permanece na posição vertical antes da centrifugação</p> <p>Certificar-se de que as instruções de centrifugação são seguidas</p> <p>Verificar que a centrífuga possui refrigeração entre 18 a 25 °C</p> <p>Verificar se o travão da centrífuga está desligado</p> <p>Aumentar a centrifugação 10 min.</p>

<b>Problema</b>	<b>Causa possível</b>	<b>Solução possível</b>
Nenhuma camada mononuclear definida ou distinta	Separação da amostra incompleta  A centrifugadora não está calibrada corretamente  Centrifugação incorreta  Amostra hiperlipémica	Aumentar a centrifugação 10 min.  calibrar a centrífuga  Certificar-se de que as instruções de centrifugação são seguidas  Colheita de amostra de sangue em jejum
Resultados inválidos	Os resultados inválidos podem ser causados por vários aspetos de manipulação incorreta da amostra	Consultar as secções acima

### Glossário de símbolos

	Utilizar até/Prazo de validade (Ano-Mês-Dia)
	Número de lote
	Número de catálogo
	Atenção, consultar as instruções de utilização
	Fabricante
	Suficiente para “n” testes
	Dispositivo para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Limitação de temperatura/Conservar entre
	Consultar as instruções de utilização
	Representante Autorizado da UE

T-Cell *Xtend* e o logótipo Oxford Immunotec são marcas comerciais da Oxford Immunotec Limited.  
 Leucosep é uma marca comercial da Greiner Bio-One  
 AIM-V é uma marca comercial da Life Technologies Corporation.  
 CPT é uma marca comercial da Becton, Dickinson and Company.

A utilização do reagente T-Cell *Xtend* está protegida pelas seguintes patentes: EP2084508, US9090871, CN101529221, AU2007-303994, JP5992393, IN289117, CA2665205

© 2022, Oxford Immunotec Limited. Todos os direitos reservados.

■ Fabricante:  
Oxford Immunotec Ltd  
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon  
Oxfordshire, OX14 4SE, Reino Unido  
[www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com)

**EC REP** Representante Autorizado da UE:  
Oxford Immunotec (Irlanda)  
Unit 3d North Point House,  
North Point Business Park,  
New Mallow Road,  
Cork, T23 AT2P  
República da Irlanda

Número da revisão	Data de emissão	Alterações
1 - 4		Detalhes disponíveis mediante pedido sobre a Oxford Immunotec.
5	Junho de 2022	Mudança de endereço do fabricante. Adição do histórico de revisões. Adição de instruções para comunicar incidentes graves, dos dados do Representante Autorizado da União Europeia e do Importador da União Europeia
6	Outubro de 2022	Exclusão dos dados do Importador da UE



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

