T-Cell *Xtend*®

Oxford Immunotec

Para uso en la preparación y aislamiento de linfocitos purificados directamente de sangre entera.

PROSPECTO

Para uso diagnóstico *in vitro*

Este prospecto cubre el uso de:

T-Cell *Xtend* (número de catálogo: TTK.610)

Uso previsto

El reactivo T-Cell *Xtend* está indicado para su empleo en la preparación de linfocitos T purificados a partir de sangre entera. El reactivo permite a los laboratorios aislar linfocitos de la sangre entera hasta 32 horas después de la venopunción para su análisis mediante un procedimiento ELISPOT comercial.

Introducción

En general, las técnicas ELISPOT han sido validadas para el procesamiento de muestras de sangre en el plazo de 8 horas después de la venopunción. Este plazo para el manejo de la sangre puede afectar al personal y a los procedimientos del laboratorio, al restringir el flujo de trabajo para la realización del análisis. La incorporación del reactivo T-Cell *Xtend* al proceso ELISPOT permite incrementar la flexibilidad del laboratorio. Las muestras de sangre se pueden transportar o conservar de un día para otro sin impacto alguno sobre la función de los linfocitos T ni sobre el rendimiento.

Principio del método

El uso del reactivo T-Cell *Xtend*, como ayuda para la separación de linfocitos a partir de sangre entera mejora la logística del procesamiento del análisis ELISPOT con muestras almacenadas. Los linfocitos T aislados de sangre entera conservada de un día para otro parecen mostrar una respuesta reducida a la estimulación con antígenos en los análisis ELISPOT, aunque esto se debe principalmente a las poblaciones celulares contaminantes de la capa de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC, siglas inglesas). El reactivo T-Cell *Xtend* contiene anticuerpos monoclonales biespecíficos que se dirigen contra marcadores presentes en la superficie celular de ciertos leucocitos y en los eritrocitos. El reactivo T-Cell *Xtend* enlaza esos leucocitos con los eritrocitos, lo cual aumenta la densidad de las células seleccionadas. Cuando se aplica un gradiente de densidad durante la extracción FICOLL, los linfocitos seleccionados permanecen separados dentro de la capa de eritrocitos fuera de la capa de PBMC. Las células no seleccionadas, entre ellas los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos, están dentro de la capa de PBMC. Algunos estudios han demostrado que la funcionalidad de los linfocitos T preparados con el reactivo T-Cell *Xtend* tras el almacenamiento de la sangre de un día para otro es comparable a la obtenida con sangre fresca.

Advertencias y precauciones

1. Solamente para uso diagnóstico *in vitro.*
2. Solamente para uso profesional; los técnicos han de estar formados para este procedimiento.
3. Las muestras de sangre deben considerarse potencialmente peligrosas. Hay que tener cuidado cuando se manipula material de origen humano.
4. El manejo de muestras de sangre entera y componentes de su análisis, durante su uso, conservación y desecho, debe realizarse de conformidad con procedimientos definidos en las correspondientes directrices o normas nacionales de seguridad para riesgos biológicos.
5. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados para el pipeteo, las técnicas de lavado y los tiempos o temperaturas de incubación puede afectar a los resultados de la prueba.
6. No extraer sangre en tubos de preparación celular (CPT™, Becton Dickinson) ni en tubos de extracción de sangre con EDTA, ya que son incompatibles con el reactivo T-Cell *Xtend.*
7. No refrigerar ni congelar las muestras de sangre entera. Conservar y transportar las muestras de sangre al laboratorio entre 10 y 25 °C.
8. Añadir el reactivo T-Cell *Xtend* a la sangre entera antes del procesamiento de la muestra.
9. No diluir ni añadir otros componentes directamente al reactivo T-Cell *Xtend.*
10. Utilizar solamente recipientes de un solo uso para la extracción de muestras de sangre venosa.
11. No mezclar diferentes lotes en una misma muestra del paciente.
12. No utilizar pasada la fecha de caducidad.
13. No utilizar con una muestra de sangre entera que se haya conservado durante más de 32 horas.
14. Emplear técnicas asépticas para utilizar este producto.
15. No utilizar si los viales parecen estar dañados o abiertos.
16. No utilizar si el líquido dentro de los viales aparece descolorido o tiene precipitados.

17. T-Cell *Xtend* contienen sustancias de origen animal que son potencialmente infecciosas. En condiciones normales de uso, estas sustancias no entran en contacto con el usuario

Materiales suministrados

Cada caja contiene:

Tres (3) viales de 2 mL de anticuerpos monoclonales T-Cell *Xtend* (TT.610).

Almacenamiento y estabilidad

Conservar los viales del reactivo T-Cell *Xtend* sin abrir a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en la caja. Conservar los viales abiertos y vueltos a cerrar a 2-8 °C y utilizarlos en el plazo de 12 semanas desde su apertura, a menos que dicho plazo supere la fecha de caducidad de la caja.

Equipo y materiales necesarios pero no suministrados

1. Tubos de extracción de sangre heparinizados.
2. FICOLL y otros materiales alternativos de separación de PBMC, como tubos Accuspin™ y Leucosep.
3. Una centrífuga para el aislamiento de PBMC capaz de alcanzar al menos 1.800 RCF (g) y capaz de mantener las muestras a temperatura ambiente (18-25 °C), si se emplean métodos de centrifugación por densidad para separar los PBMC.
4. Cámara de flujo laminar con medidas de seguridad biológica de nivel 2 (BL2, recomendada).
5. Pipetas y puntas de pipeta estériles.
6. Kit ELISPOT.

Procedimiento

Nota: Los pasos siguientes deben realizarse bajo los principios de las prácticas correctas de laboratorio:

1. Extraer sangre entera en tubos de extracción con heparina de litio y conservarla durante un máximo de 32 horas a 10-25 °C.
2. Inmediatamente antes de utilizarla en un análisis ELISPOT comercial, añadir 25 µL de la solución del reactivo T-Cell *Xtend* por mL de sangre entera, quitando el tapón del tubo de extracción y pipeteando el volumen recomendado.
3. Volver a tapar el tubo de extracción de sangre e invertirlo con cuidado 8 ó 10 veces.
4. Incubar la sangre entera con el reactivo T-Cell *Xtend* durante 20 ± 5 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C).
5. Aislar la fracción de PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad FICOLL o por un método alternativo de aislamiento de PBMC.
6. Preparar los PBMC para el análisis ELISPOT según las instrucciones de uso del fabricante del kit ELISPOT.

Nota: Cada laboratorio debe validar su procedimiento de extracción y separación de PBMC para obtener un número suficiente. Se recomienda lo siguiente:

- Extraer las muestras de sangre en tubos de extracción con heparina de litio, y separar después los PBMC mediante técnicas convencionales de separación como el gradiente de densidad FICOLL. Se pueden emplear métodos alternativos para purificar los PBMC si así se desea, p.ej., tubos Accuspin o Leucosep llenados previamente con FICOLL.
- Se pueden agrupar los leucocitos de un paciente, si es necesario, para obtener células suficientes de varios tubos de sangre que hayan sido extraídos y procesados al mismo tiempo.

Normalmente, se pueden obtener suficientes PBMC para realizar el análisis a partir de muestras de sangre venosa de pacientes inmunocompetentes de conformidad con las siguientes directrices:

- Adultos y niños de más de 2 años: un tubo de heparina de litio de 6 mL.
- Niños hasta los 2 años: un tubo pediátrico de 2 mL.

Preparación del Reactivo

El reactivo T-Cell *Xtend* se suministra listo para su utilización. No es necesario preparar el reactivo.

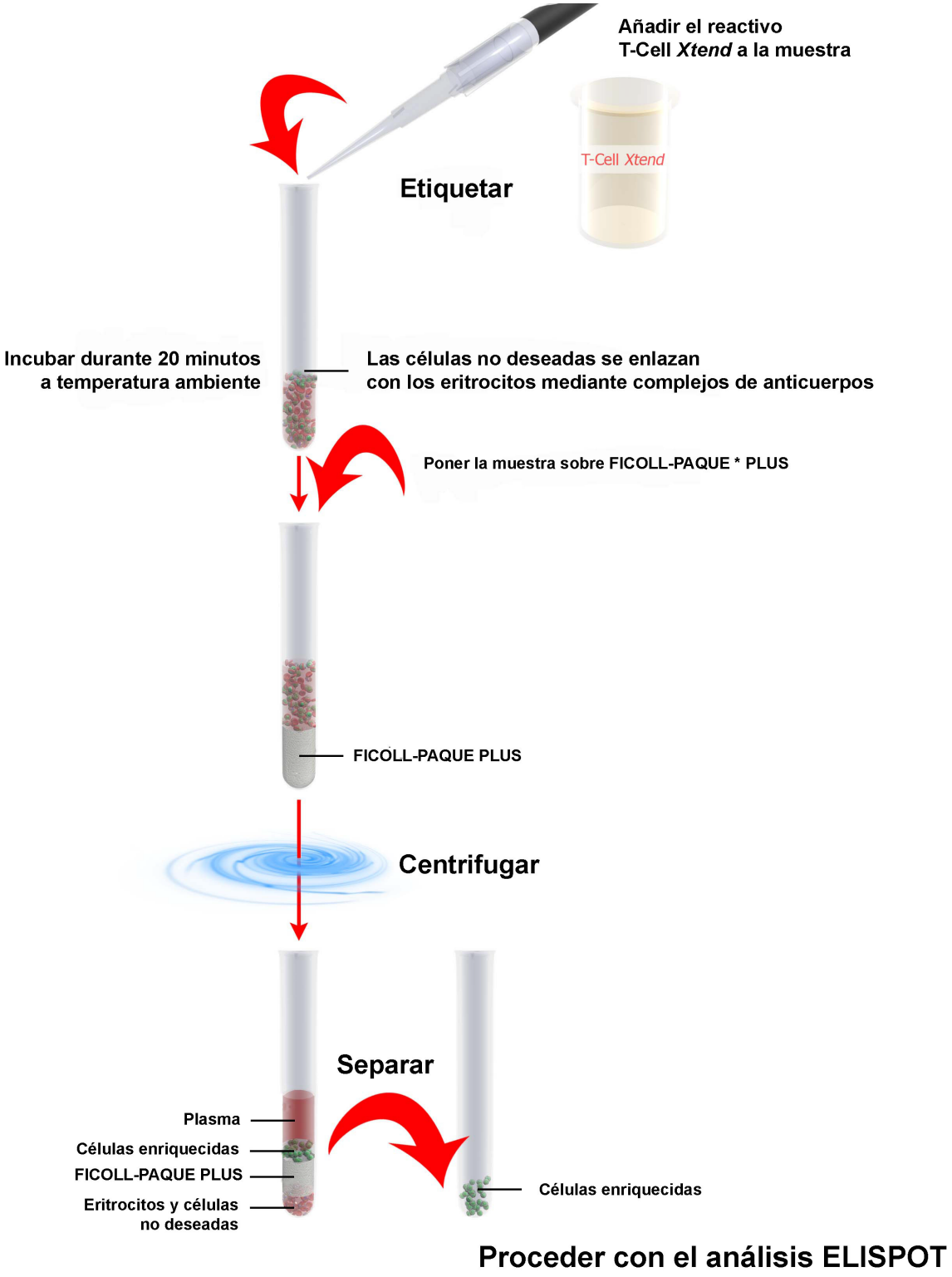

Figura 1: *Diagrama que muestra el modo de incorporar el reactivo T-Cell Xtend a un protocolo ELISPOT para su empleo con sangre entera conservada/transportada hasta 32 horas después de la venopunción.*

Limitaciones

1. El reactivo T-Cell *Xtend* es una ayuda al diagnóstico. Los resultados de la prueba deben interpretarse conjuntamente con los resultados de la prueba diagnóstica utilizada.

Control de calidad

Los análisis internos del reactivo T-Cell *Xtend* no han mostrado una reducción significativa del rendimiento de PBMC ni de las poblaciones de linfocitos T, al comparar muestras de sangre entera conservadas durante menos de 8 horas después de la venopunción con muestras de sangre entera conservadas durante un máximo de 32 horas y tratadas con el reactivo T-Cell *Xtend*. Como parte del control de calidad de cada laboratorio, se deben diseñar y validar métodos de recuento celular para garantizar que se han obtenido suficientes PBMC para el sistema de análisis correspondiente. Además, los procedimientos de control de calidad deben incluir el uso de controles positivos y negativos creados para garantizar el rendimiento previsto de linfocitos T con el sistema correspondiente.

Características de rendimiento

Se realizaron estudios clínicos con y sin la adición del reactivo T-Cell *Xtend* antes de la separación de las células para el procesamiento de muestras de sangre entera mediante un procedimiento ELISPOT (sistema de análisis T-SPOT®.*TB*) conservadas hasta 32 horas después de la venopunción.

Se obtuvo una concordancia del 96,6 % (340/352) [IC del 95%: 94,1-98,2 %] en los datos del estudio clínico (3 centros) obtenidos mediante el procedimiento T-SPOT.*TB* con y sin el reactivo T-Cell *Xtend*.

Notificación de incidentes graves

Si se ha producido un incidente grave en relación con este dispositivo, 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 la autoridad competente. Por “incidente grave” se entiende cualquier incidente que directa o indirectamente haya provocado, pueda haber provocado o pueda provocar

- la muerte 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 para el 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 descargas de documentación del producto y más información técnica, visite nuestro sitio web: www.oxfordimmunotec.com

Guía de resolución de problemas para la preparación de PBMC para ELISPOT

Problema	Posible causa	Posible solución
Bajo rendimiento celular.	Leucopenia.	Añadir un tubo de extracción de sangre adicional.
	Extracción de sangre incorrecta.	No utilizar tubos de preparación de células (CPT, Becton Dickinson) ni tubos de extracción de sangre que contengan el anticoagulante EDTA
	El tubo de extracción de sangre no está a temperatura ambiente (18-25 ºC).	Asegurarse de que el tubo de extracción de sangre se haya equilibrado a la temperatura ambiente antes de extraer la muestra.
	La sangre no se ha conservado a 10-25 ºC.	Comprobar que el transporte de la sangre se realice a 10-25 ºC.
	La conservación de la sangre supera el tiempo recomendado.	Recoger otra muestra de sangre y repetir el análisis.
Contaminación eritrocítica.	El tubo de extracción de sangre no está a temperatura ambiente (18-25 ºC).	Asegurarse de que el tubo de extracción de sangre se haya equilibrado a la temperatura ambiente antes de extraer la muestra.
	Centrifugación incorrecta.	Aumentar el tiempo de centrifugación a 30 minutos. Comprobar que la centrífuga esté refrigerada. Comprobar que la centrífuga tenga un freno funcional y verificar que estos pasos se lleven a cabo de conformidad con las instrucciones del fabricante para la separación FICOLL.
No existe capa de monocitos definida o clara.	La centrífuga no está correctamente calibrada.	Hacer calibrar la centrífuga.
	La velocidad de centrifugación es demasiado baja.	Aumentar la velocidad de centrifugación para obtener 1.500-1.800 RCF.
	El tiempo de centrifugación es demasiado corto.	Aumentar el tiempo de centrifugación a 30 minutos.
	Muestra hiperlipémica.	Extraer la muestra de sangre en ayunas.
Resultados no válidos.	Diversos problemas de incorrecta manipulación de la muestra pueden provocar resultados no válidos.	Consultar las secciones anteriores.

Referencias bibliográficas

1. Procedimiento H3 – A5 del NCCLS: Procedimiento para la extracción de muestras diagnósticas de sangre por venopunción

Glosario de símbolos

	Fecha de caducidad (año-mes-día)
LOT	Número de lote
REF	Número de catálogo
⚠	Atención, véanse las instrucciones de uso
	Fabricante
▽	Suficiente para "n" pruebas
IVD	Dispositivo diagnóstico *in vitro*
	Limitación de temperatura/consérvese entre
	Consultar las instrucciones de uso
EC REP	Representante autorizado de la UE

T-SPOT, T-Cell *Xtend* y el logotipo de Oxford Immunotec son marcas comerciales de Oxford Immunotec Limited.
CPT y Vacutainer son marcas comerciales de Becton, Dickinson and Company.
Ficoll y Ficoll-Paque son marcas comerciales registradas de Cytiva, un afiliado de Global Life Sciences
Accuspin es una marca comercial de Sigma-Aldrich.

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

© 2023, Oxford Immunotec Limited. Todos los derechos reservados.

Fabricante:
Oxford Immunotec Ltd
143 Park Drive East, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire, OX14 4SE, UK
+44(0)1235 442796
www.oxfordimmunotec.com

EC REP Representante autorizado de la Unión Europea:
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 - 6	Detalles disponibles bajo solitud a Oxford Immunotec.	
7	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
8	Octubre 2022	Eliminar detalles del Importador en la Unión Europea
9	Noviembre 2023	Eliminación de "una empresa PerkinElmer" del logotipo