



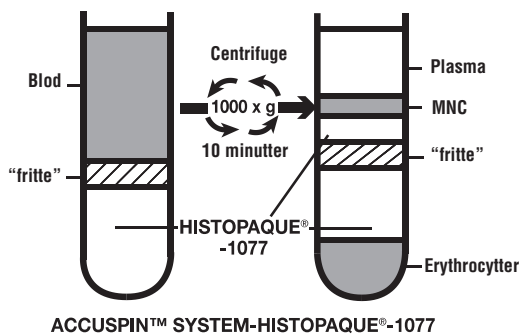
**SIGMA-ALDRICH®**  
**ACCUSPIN™**  
**SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077**  
 (Procedure nr. A 6929 / A 7054 / A 0561)

**TILSIGTET ANVENDELSE**

Sigma-Aldrich ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 er beregnet til anvendelse ved isolering af lymfocytter og andre mononukleare celler. ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 reagenser er til in vitro diagnostisk brug.

Separation af lymfocytter og andre mononukleare celler (MNC) fra fuldblod og knoglemarv vha. HISTOPAQUE®-1077 er baseret på en metode, der første gang blev beskrevet af Boyum<sup>1</sup> i 1968. Separationsmediet, HISTOPAQUE®-1077, er en vandig opløsning af polysaccharid og natriumdiatrizoat med høj molekylvægt, en ioderet ikke-ionisk forbindelse, justeret til en densitet på 1,077 ± 0,001.

ACCUSPIN™ røret er specielt konstrueret med to kamre, der er adskilt af en porøs polyethylenbarriere med høj densitet ("fritte"). Der kan tilsættes antikoaguleret fuldblod til det øverste kammer i røret, uden at der er risiko for, at det blandes med HISTOPAQUE®-1077-reagenset i det nederste kammer under fritten. Ved centrifugering går fuldblodet ned gennem "fritten", så det kommer i kontakt med HISTOPAQUE®-1077-reagenset. Elementerne med højere densitet fortrænger en mængde HISTOPAQUE®-1077-reagens oven over "fritten", hvilket giver en klar separation af blodkomponenterne. Erythrocytterne samles, og granulocytterne bliver lettere hypertonisk, hvorved deres sedimenteringsrate øges, hvilket resulterer i pelletering i bunden af ACCUSPIN™ røret. Lymfocytter og andre mononukleare celler, dvs. monocytter, forbliver ved plasma-HISTOPAQUE®-1077-grænsefladen. Dette tætte bånd af mononukleare celler kan indsamles ved at hæle indholdet ud af det øverste kammer eller vha. en pipette. Erythrocytkontaminering undgås pga. barrieren mellem kamrene.



**REAGENS**

**ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077**, katalognr. A 6929, A 7054 og A 0561

Et polypropylenrør, steriliseret ved bestråling, med en polyethylenbarriere ("fritte") med høj densitet, aseptisk fyldt med HISTOPAQUE®-1077-reagens.

HISTOPAQUE®-1077-reagenset indeholder polysucrose, 5,7 g/dl, og natriumdiatrizoat, 9,0 g/dl. Aseptisk filtreret. Densitet på 1,077 ved 25 °C.

**OPBEVARING OG STABILITET:**

Opbevares i køleskab (2–8 °C). Skal beskyttes mod lys. Udløbsdatoen fremgår af etiketten på æsken.

**FORRINGELSE:**

Et uklart udseende er tegn på forringelse af produktet.

**KLARGØRING:**

ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 reagenser er klar til brug. Skal opvarmes til 18–26 °C inden brug.

**FORHOLDSREGLER:**

De normale forholdsregler ved håndtering af laboratoriereagenser skal følges. Ved kontakt med

substanser fra humane kilder skal alle reagenser og udstyr behandles som potentielt smittefarligt. Ved kassering af affald skal alle lokale og nationale bestemmelser overholdes. Der henvises til materialesikkerhedsdatabladet for opdaterede oplysninger om risici, fare eller sikkerhed.

**Amerikanske risiko- og sikkerhedsdeklæringer**

HISTOPAQUE®-1077-1-opløsninger er SUNDHEDS-SKADELIGE. Kan give allergi ved indånding og hudkontakt. Bær passende beskyttelsesbeklædning. Målorgan: blod.

**Risiko- og sikkerhedsdeklæringer for EU**

HISTOPAQUE®-1077-1-opløsninger er SUNDHEDS-SKADELIGE. Kan give allergi ved indånding og hudkontakt. Undgå indånding af dampe. Bær passende beskyttelsesdragt og -handsker. Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig (vis etiketten hvis det er muligt).

**PROCEDURE**

**PRØVEINDSAMLING:**

Det anbefales, at prøveindsamling sker i henhold til NCCLS-dokumentet M29-A2. Der er ingen kendt testmetode, som kan give fuldstændig sikring af, at blodprøver eller væv ikke overfører infektion. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver behandles som potentielt infektiøse.

Der kan anvendes defibrineret eller antikoaguleret (EDTA eller heparin uden konserveringsmidler) friskt fuldblod. Det bedste resultat opnås ved at behandle blodet i løbet af 2 timer.

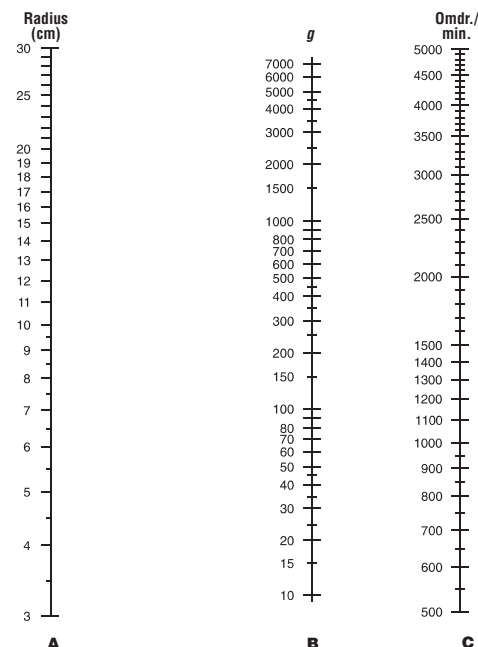
**SÆRLIGE NØDVENDIGE MATERIALER, DER IKKE MEDFØLGER:**

Centrifugerør til vask af mononukleare celler  
 Isotonisk fosfatbufferet saltvand (PBS) eller afbalanceret saltopløsning  
 Centrifuge (kurvecentrifuge) med kapacitet til at generere 100-1000 x g og opretholde 18–26 °C

**BEMÆRKNINGER:**

- Der kan anvendes 3–6 ml for-fortyndet blod til katalognr. A 6929, og 15–30 ml for-fortyndet blod til katalognr. A 7054 og A 0561. Blod kan fortyndes direkte i det øverste kammer på ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-røret. Dette er hensigtsmæssigt ved prøver med hæmatokritværdier over det normale.
- Hvis der fjernes for store mængder HISTOPAQUE®-1077-reagens sammen med det mononukleare bånd, øges granulocytkontaminering fra residuale granulocytter, der evt. forbliver ved den mononukleare grænseflade (tabel I).
- Hvis der fjernes for store mængder supernatant sammen med det mononukleare bånd, kan det fremme kontaminering med plasmaproteiner.
- Anvendelse af andre mængder for-fortyndet fuldblod end de foreskrevne kan føre til reduceret genfinding.
- Der kan udføres en sekundær centrifugering i et 4–20 % sucrosegradientlag over HISTOPAQUE®-1077 for at fjerne alle kontaminerende trombocytter. Sucrosegradienten isolerer trombocytterne fuldstændigt, mens de mononukleare celler penetrerer til HISTOPAQUE®-1077-laget.
- Hvis ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 ikke bringes på stuetemperatur, kan det medføre begrænset genfinding af mononukleare celler.
- Fra tid til anden kan en fritte gå løs under centrifugering. Hvis det sker, må der ikke gøres forsøg på at hæle indholdet af røret for at indsamle mononukleare celler. Fritten skal i stedet forsigtigt fjernes med en steriliseret pincet eller tipper med en pipette, hvorefter de mononukleare celler indsamles.
- Separation af mononukleare celler vha. fosfatbufferet saltvand som fortynder og vaskereagens beskrives i afsnittet Procedure i denne indlægsseedel. I mange tilfælde foretrækkes afbalanceret saltopløsninger eller cellekulturmedier, såsom RPMI-1640, suppleret med føtalt bovint serum.
- Det anbefales at anvende en "normal" patient som kontrol for hver kørsel.

**NOMOGRAM TIL BESTEMMELSE AF RELATIVE CENTRIFUGALKRÆFTER:**



Der kan benyttes et nomogram til indstilling af centrifugens omdr./min.

Anvisning i etablering af omdr./min. til at opnå 1000 hhv. 800 x g til procedure nr. A 6929 / A 7054 / A 0561:

- Mål radius (cm) fra midten af centrifugespindlen til enden af prøverørsholderen. Marker denne værdi på skala A.
- Marker den relative centrifugalkraft (dvs. 1000 hhv. 800) på skala B.
- Træk en lige linje med en lineal mellem punkterne på kolonne A og B og videre, så den skærer kolonne C. Værdien på kolonne C er korrekt indstilling af centrifugens omdr./min.

**PROCEDURE:**

- Bring det ønskede antal rør til stuetemperatur. Skal beskyttes mod lys. Hvis HISTOPAQUE®-1077-reagenset er over "fritten" forud for anvendelse, skal det centrifugeres ved 1000 x g i 30 sekunder ved stuetemperatur.
- Sæt etiket på røret/rørene.
- Hæld 3,0-6,0 ml friskt defibrineret eller antikoaguleret fuldblod i det øverste kammer på hvert forfyldt ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-rør, katalognr. A 6929.  
**ELLER**  
 Hæld 15,0-30,0 ml friskt defibrineret eller antikoaguleret fuldblod i det øverste kammer på hvert forfyldt ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077-rør, katalognr. A 7054 eller A 0561.
- Centrifuger ved 1000 x g og 18–26 °C i 10 minutter.  
**ELLER**  
 Centrifuger ved 800 x g og 18–26 °C i 15 minutter.
- Efter centrifugering aspireres plasmalaget forsigtigt med en Pasteur-pipette, så der er højst 0,5 cm til den uigennemsigtige grænseflade med mononukleare celler. Plasmalaget skal bortskaffes på forsvarlig vis.
- Overfør omhyggeligt det mononukleare bånd til et rent centrifugerør med en Pasteur-pipette.
- Vask det mononukleare bånd ved at tilsætte 10 ml isotonisk fosfatbufferet saltvand (PBS) eller afbalanceret saltopløsning, og resuspender cellerne ved forsigtig aspirering med en Pasteur-pipette. Centrifuger ved 250 x g og 18–26 °C i 10 minutter.
- Gentag anvisningen i punkt 7 to gange, idet pelleteringen resuspenderes i 5 ml isotonisk fosfatbufferet saltvand (PBS).
- Resuspender den mononukleare pelletering i passende medie alt efter anvendelsen af disse celler.

## RESULTATKARAKTERISTIKA

Erythrocytter og granulocytter skal pelleteres til bunden af ACCUSPIN™-røret. Mononukleare celler skal danne bånd ved grænsefladen mellem HISTOPAQUE®-1077-reagenset og plasmaet.

I nedenstående tabel opføres resultaterne af analyse af mononukleare cellebånd fra sunde humane blodprøver, separeret parallelt vha. ACCUSPIN™ System-HISTOPAQUE®-1077 og HISTOPAQUE®-1077.

TABEL I

ACCUSPIN™  
SYSTEM-

	HISTOPAQUE®-1077		HISTOPAQUE®-1077	
	Gennemsnit ±SD		Gennemsnit ±SD	

% genfindings <sup>1</sup>	70,0	13,3	53,6	8,9
% levedygtighed <sup>2</sup>	98,0	1,1	95,0	2,7
% lymfocytter <sup>3</sup>	87,6	4,3	89,8	3,5
% monocytter <sup>3</sup>	9,1	3,8	8,3	3,0
% granulocytter <sup>3</sup>	3,0	2,7	2,3	1,8
% erythrocytter <sup>3</sup>	5,0	2,0	5,0	2,0
% trombocytter <sup>3</sup>	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Bestemt vha. hæmocytometer og Wrights farvedifferentialtælling.
2. Bestemt vha. trypan eksklusionstest med blå farve.
3. Bestemt vha. Wrights farvedifferentialtælling af mononuklear fraktion.

Hvis de observerede resultater afviger fra de forventede, skal Sigma-Aldrich Technical Service kontaktes for yderligere hjælp.

## HENVISNINGER

1. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21 (Suppl97):77, 1968
2. Lightbody J: Use of the Cell-mediated Lympholysis Test in Transplantation Immunity. IN Manual of Clinical Immunology. NR Rose, H Friedman, Editors, American Society for Microbiology, Washington (DC), 1976, pp 851-857
3. Amos DB, Pool P: HLA Typing. Ibid, pp 797-804
4. Winchester RJ, Ross G: Methods For Enumerating Lymphocyte Populations. Ibid, pp 64-76
5. Hofman FM, Kanesberg B, Smith D, et al: Stability of T- and B-cell numbers in human peripheral blood. Am J Clin Pathol 77:710, 1982

6. Brown L: Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, 1973, pp 33-39
7. Eisen SA, Weaner HJ, Parker CW: Isolation of pure human peripheral blood lymphocytes using nylon wool columns. Immunol Commun 1:571, 1972
8. Wysocki LJ, Sato VL: Panning for lymphocytes. A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA 75:6, pp 2844-2848, 1978
9. Hunt SV: Separation of Lymphocyte Subpopulations. IN Handbook of Experimental Immunology, Vol 2, Cellular Immunology, DS Weir, Editor. 24:13, 3rd ed., Blackwell Scientific Publications, 1978
10. Madsen M, Johnson HE, Wendelboe I, Hansen P, Christiansen SE: Isolation of human T and B lymphocytes by E-rosette gradient centrifugation. Characterization of the isolated subpopulations. J Immunol Methods 33:323, 1980
11. Loken MR, Stall AM: Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. J Immunol Methods 50:249, 1982
12. Ting A, Morris PJ: A technique of lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang 20:561, 1971
13. Fotino M, Merson EJ, Allen FH: Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann Clin Lab Sci 1:131, 1971

HISTOPAQUE er et registreret varemærke, der tilhører Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

Sigma-Aldrich, Inc. garanterer, at dets produkter stemmer overens med de oplysninger, som er indeholdt i denne og andre publikationer fra Sigma-Aldrich. Det påhviler køber at fastlægge produktets/produkternes egnethed til deres specifikke anvendelse. Yderligere vilkår og betingelser kan være gældende. Se bagsiden af faktura eller pakkeseddel for yderligere vilkår og salgsbetingelser.

Procedure nr. A 6929 / A 7054 / A 0561

Tidligere revision: 2003-04

Revideret: 2003-09



EC REP

AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD United Kingdom

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765

Teknisk service: +1 314 771 3122

eller e-mail [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

Bestilling: +1 314 771 5750

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Tyskland 49-7329-970