



SIGMA-ALDRICH®

SEPARACIÓN DE LEUCOCITOS

(Procedimiento número 1119)

APLICACIÓN

HISTOPAQUE® - 1119 e HISTOPAQUE® - 1077 de Sigma-Aldrich son unas preparaciones no estériles que se utilizan para el aislamiento de células mononucleares y granulocitos para examen histológico. Los reactivos HISTOPAQUE® - 1119 son para "uso en diagnóstico in vitro". Sin filtrados posteriores, este material no resulta adecuado para el cultivo de células separadas. Específico para cultivo celular, HISTOPAQUE® - 1119 no debe utilizarse para fines de diagnóstico in vitro.

Las soluciones utilizadas para este fin consisten en un medio de polisucrosa y radioopaco. HISTOPAQUE®-1077 es esta solución ajustada a una densidad de 1,077. Cuando la sangre se extiende sobre HISTOPAQUE®-1077 y se expone a fuerzas centrífugas, las células mononucleares permanecen entre el plasma y la solución HISTOPAQUE®, mientras que los eritrocitos y los granulocitos gravitan hacia el fondo. Sería viable crear un sistema por el que las células de las series mieloides también pudieran ser cosechadas empleando un procedimiento de un solo paso. HISTOPAQUE®-1119 ha sido desarrollado para conseguir este fin, y está basada en observaciones de English y Andersen¹.

Según el procedimiento de Sigma-Aldrich, un doble gradiente se forma al extender un volumen de HISTOPAQUE®-1077 sobre un volumen igual de HISTOPAQUE®-1119. La sangre total se extiende cuidadosamente sobre el medio superior de HISTOPAQUE®-1077. Seguidamente, los tubos se centrifugan a 700 x g durante 30 minutos. Las células de las series granulocíticas se encuentran entre 1077 y 1119, mientras que los linfocitos, otras células mononucleares y las plaquetas se encuentran en la zona entre el plasma y 1077.

REACTIVO

HISTOPAQUE®-1119, número de catálogo 1119-1
Polisucrosa, 6,0 g/dl, y diatrizoato sódico, 16,7 g/dl.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar HISTOPAQUE®-1119 en el frigorífico (2-8 °C). Proteger de la luz. La etiqueta del reactivo indica la fecha de caducidad.

DETERIORO:

Un aspecto turbio es indicativo del deterioro del producto.

PREPARACIÓN:

HISTOPAQUE®-1119 se presenta lista para su uso. Calentar a 18-26 °C antes de su uso.

Si la aplicación de las células separadas implica cultivos posteriores, HISTOPAQUE®-1119 debe filtrarse de forma estéril antes de la separación celular. En aplicaciones en las que se requiere esterilidad, filtre de forma estéril el HISTOPAQUE®-1119 antes de su uso.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. En caso de contacto con sustancias de origen humano, tratar todos los reactivos y el equipo como material biológicamente peligroso. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

Las soluciones HISTOPAQUE® 1077-1 y 1119-1 son PERJUDICIALES. Pueden causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. Llevar ropa protectora adecuada. Órgano al que afectan: la sangre.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

Las soluciones HISTOPAQUE® 1077-1 y 1119-1 son PERJUDICIALES. Pueden causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. No inhalar los vapores. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA DE LA MUESTRA:

Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Recoger 6 ml de sangre venosa en heparina o con EDTA sin conservantes.

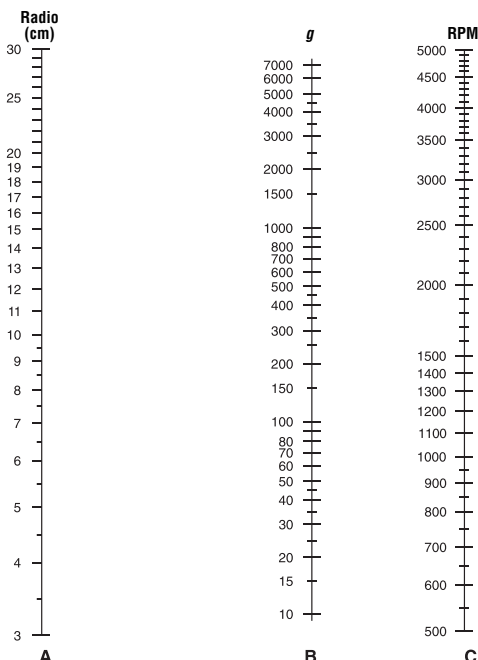
MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

HISTOPAQUE®-1077, número de catálogo 1077-1, polisucrosa, 5,7 g/dl, y diatrizoato sódico, 9,0 g/dl.
Centrífuga (rotor con cubeta oscilante) capaz de generar 700 x g
Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml, de plástico.

NOTAS:

1. Si la aplicación de las células separadas implica cultivos posteriores, HISTOPAQUE®-1119 debe filtrarse de forma estéril antes de la separación celular. En aplicaciones en las que se requiere esterilidad, filtre de forma estéril el HISTOPAQUE®-1119 antes de su uso. Este producto es sólo para "uso in vitro". Las células aisladas usando HISTOPAQUE® no deben utilizarse en procedimientos "in vivo".
2. Pueden utilizarse tubos de centrifuga de 50 ml. Modificar el procedimiento indicado utilizando 12 ml de HISTOPAQUE®-1077, 12 ml de HISTOPAQUE®-1119, y 24 ml de sangre total o diluida.
3. En algunas ocasiones puede ser necesario diluir la sangre a 1:2 o a 1:4, según el número absoluto de células. Existe la posibilidad de sobrecargar el gradiente.
4. Evitar el uso de guantes empolvados. El polvo de los guantes activará los monocitos y provocará resultados más bajos.
5. Evitar el uso de plásticos con alto poder de fijación, tales como el poliestireno. El poliestireno puede fijar las células a las paredes de los tubos de la centrifuga.
6. Preparar el gradiente inmediatamente antes de su uso. Si se preparan los gradientes anticipadamente puede producirse difusión y dar como resultado una recogida de células escasa.
7. Extender HISTOPAQUE®-1119 por debajo también puede producir un gradiente aceptable.
8. Pueden utilizarse otros anticoagulantes, pero teniendo en cuenta que algunos pueden afectar a la recogida de las células. A medida que la sangre envejece, desciende la recogida de las células.
9. La sección que describe el procedimiento en este prospecto, utiliza solución salina isotónica tamponada con fosfato como diluyente y líquido de lavado. También pueden utilizarse otros reactivos, tales como el medio celular RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino.
10. El procedimiento descrito se utiliza para el aislamiento de células en 6 ml de sangre total. Los volúmenes pueden aumentarse o disminuirse según sea necesario.
11. Se recomienda el uso de un paciente "normal" como control para cada proceso.

NOMOGRAMA PARA DETERMINAR LAS FUERZAS CENTRÍFUGAS RELATIVAS:



Se utiliza un nomograma para obtener la configuración de RPM de la centrifuga.

Cómo establecer las RPM necesarias para obtener 700 x g en el procedimiento número 1119.

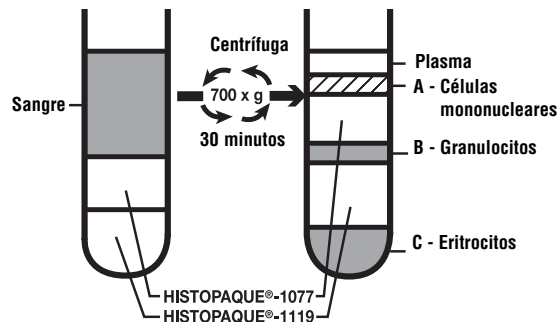
1. Medir el radio (cm) desde el centro del eje de la centrifuga hasta el final del portatubos. Marcar este valor en la escala A.
2. Marcar la fuerza centrífuga relativa (p.ej., 700) en la escala B.
3. Con una regla, trazar una línea recta entre los puntos de las columnas A y B, extendiéndola hasta intersectar la columna C. La lectura de la columna C es la configuración de RPM de la centrifuga.

PROCEDIMIENTO:

1. Poner 3 ml de HISTOPAQUE®-1119 en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.
2. Extender cuidadosamente 3 ml de HISTOPAQUE®-1077 sobre HISTOPAQUE®-1119.
3. Extender cuidadosamente 6 ml de sangre total sobre el gradiente superior del tubo indicado en el paso 2.
4. Centrifugar a 700 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente (18-26 °C). El centrifugado a temperaturas más bajas, como a 4 °C, puede producir la coagulación de las células y una recogida escasa.

NOTA: Las RPM necesarias para generar 700 x g pueden calcularse utilizando el nomograma de este prospecto.

5. Retirar con cuidado los tubos de la centrifuga. Deberán observarse claramente dos capas opacas (A y B en la siguiente figura).
6. Aspirar y desechar el líquido hasta 0,5 cm de la capa A. Transferir células de esta capa a un tubo marcado "mononuclear".



7. Aspirar y desechar el líquido restante hasta 0,5 cm de la capa B. Transferir células de esta capa a un tubo marcado "granulocitos".
8. Lavar las células añadiendo a los tubos 10 ml de solución salina isotónica tamponada con fosfato. Centrifugar durante 10 minutos a 200 x g. Retirar el sobrenadante y desecharlo.
9. Volver a suspender las células mediante aspiración suave con una pipeta de Pasteur.
10. Repetir los pasos 8 y 9 dos veces.
11. Volver a suspender las células en un volumen apropiado de solución salina isotónica tamponada con fosfato.

En este punto, pueden realizarse varios ensayos. Los procedimientos se eligen según discreción personal.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los eritrocitos deberán acumularse en el fondo del tubo de la centrifuga. Los granulocitos deberán formar una banda en la zona entre HISTOPAQUE®-1119 e HISTOPAQUE®-1077. Las células mononucleares formarán una banda en la zona entre HISTOPAQUE®-1077 y el plasma.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

REFERENCIAS

1. English D, Andersen BR: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 5:249, 1974

HISTOPAQUE es marca registrada de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO EE.UU.

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número 1119

Revisión anterior: 2009-11

Revisión: 2010-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103
EE.UU.

+1 314 771 5765

Servicio Técnico: a cobro revertido al
+1 314 771 3122

o por correo electrónico a clintech@sial.com

Para pedidos: a cobro revertido al
+1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemania
49-7329-970