



SIGMA-ALDRICH®

**SISTEMA ACCUSPIN™
-HISTOPAQUE®-1077**

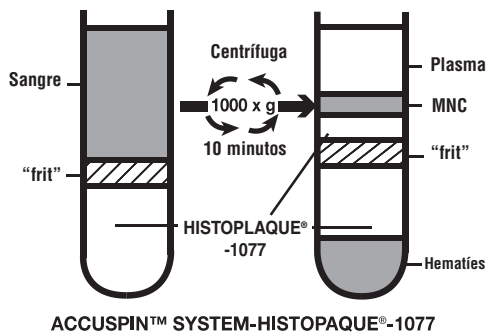
(Números de procedimiento A 6929 / A 7054 / A 0561)

APLICACIÓN

El sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 se utiliza para el aislamiento de linfocitos y otras células mononucleares. Los reactivos del sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 están diseñados para uso diagnóstico *in vitro*.

La separación de linfocitos y otras células mononucleares (MNC) de la sangre total y médula ósea utilizando HISTOPAQUE®-1077, se basa en un método descrito por primera vez por Boyum' en 1968. El medio de separación, HISTOPAQUE®-1077, es una solución acuosa de polisacárido de alto peso molecular y diatrizoato sódico, un compuesto yodado no iónico, ajustado a una densidad de 1,077 ± 0,001.

El tubo ACCUSPIN™ ha sido diseñado especialmente con dos cámaras separadas por una barrera de polietileno poroso de alta densidad ("frit"). Puede añadirse sangre total anticoagulada a la cámara superior del tubo, sin riesgo de que se mezcle con el HISTOPAQUE®-1077 en la cámara inferior, bajo el "frit". Al centrifugar, la sangre total desciende por el "frit" hasta entrar en contacto con el HISTOPAQUE®-1077. Los elementos de mayor densidad desplazan un volumen de HISTOPAQUE®-1077 por encima del "frit", proporcionando una clara separación de los componentes de la sangre. El agregado de eritrocitos y los granulocitos se vuelven ligeramente hipertónicos, aumentando su índice de sedimentación y dando como resultado la formación de pellets en el fondo del tubo ACCUSPIN™. Los linfocitos y otras células mononucleares, p.ej., los monocitos, permanecen en la interfaz plasma-HISTOPAQUE®-1077. Esta densa banda de células mononucleares puede recogerse vertiendo el contenido de la cámara superior o mediante una pipeta. La barrera entre las cámaras evita la contaminación por eritrocitos.



ACCUSPIN™ SYSTEM-HISTOPAQUE®-1077

REACTIVO

SISTEMA ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077, Números de catálogo A 6929, A 7054 y A 0561

Un tubo de polipropileno esterilizado por radiación, equipado con una barrera de polietileno de alta densidad ("frit"), llenado asépticamente con HISTOPAQUE®-1077.

HISTOPAQUE®-1077 contiene polisucrosa, 5,7 g/dl, y diatrizoato sódico, 9,0 g/dl. Filtrado asépticamente. Densidad 1,077 a 25 °C.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar en el frigorífico (2–8 °C). Proteger de la luz. La etiqueta de la caja indica la fecha de caducidad.

DETERIORO:

Un aspecto turbio es indicativo del deterioro del producto.

PREPARACIÓN:

Los reactivos del sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 se presentan listos para su uso. Calentar a 18–26 °C 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 son PERJUDICIALES. Pueden causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. Llevar ropa protectora adecuada. Órgano al que afecta: la sangre.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

Las soluciones HISTOPAQUE®-1077-1 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.

Puede utilizarse sangre total fresca desfibrinada o anticoagulada (EDTA o heparina sin conservantes). Para obtener óptimos resultados, la sangre debe procesarse dentro de las 2 horas.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Tubos de centrifuga para el lavado de las células mononucleares

Solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS) o solución salina equilibrada

Centrifuga (rotor con cubeta oscilante) capaz de generar de 100 a 1000 x g, manteniendo una temperatura de 18–26 °C

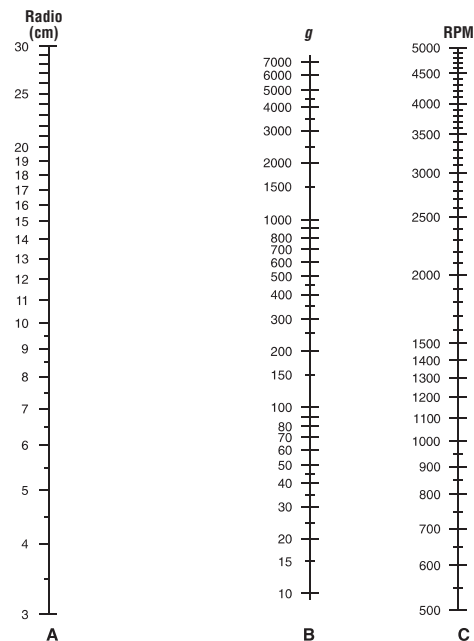
NOTAS:

- Pueden utilizarse de 3 a 6 ml de sangre prediluida con el número de catálogo A 6929, o de 15 a 30 ml de sangre prediluida con los números de catálogo A 7054 y A 0561. La sangre puede diluirse directamente en la cámara superior del tubo del sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077. Esta dilución es adecuada para muestras con hematocritos por encima de lo normal.
- La retirada de los excedentes de HISTOPAQUE®-1077 con la banda mononuclear aumenta la contaminación granulocítica procedente de granulocitos residuales que pueden permanecer en la interfaz mononuclear (Tabla I).
- La retirada de los excedentes de sobrenadante con la banda mononuclear puede producir la contaminación por proteínas de plasma.
- El uso de volúmenes de sangre prediluida o total que no sean los recomendados puede disminuir la recogida.
- Para retirar todas las plaquetas contaminantes, puede realizarse un segundo centrifugado con un gradiente de sucrosa del 4 al 20 % extendido en HISTOPAQUE®-1077. El gradiente de sucrosa aislará satisfactoriamente las plaquetas, mientras que las células mononucleares penetrarán en la capa de HISTOPAQUE®-1077.
- Si el sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 no se lleva a temperatura ambiente, la recogida de las células mononucleares puede verse limitada.
- Durante el centrifugado puede producirse el desplazamiento ocasional de un "frit". Si esto ocurre, no verter el contenido del tubo para recoger las células mononucleares. Retirar con cuidado el "frit" con forceps esterilizados, o bien hacer oscilar el "frit" con una pipeta y recoger las células mononucleares.
- En la sección que trata sobre el procedimiento en este prospecto se describe la separación de células mononucleares utilizando solución salina tamponada

con fosfato como diluyente y líquido de lavado. En muchas circunstancias, se prefieren las soluciones de sales equilibradas o el medio de cultivo de células, tal como RPMI -1640 suplementado con suero fetal bovino.

- Se recomienda el uso de un paciente "normal" como control para cada proceso.

NOMOGRAMA PARA DETERMINAR LAS FUERZAS CENTRÍFUGAS RELATIVAS:



Puede utilizarse un nomograma para derivar la configuración de RPM de la centrifuga.

Cómo establecer las RPM necesarias para obtener 1000 u 800 x g en los procedimientos números A 6929 / A 7054 / A 0561.

- Medir el radio (cm) desde el centro del eje de la Centrifuga hasta el final del portatubos. Marcar este valor en la escala A.
- Marcar la fuerza centrífuga relativa (p.ej., 1000 u 800) en la escala B.
- 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:

- Llevar el número deseado de tubos a temperatura ambiente. Proteger de la luz. Si HISTOPAQUE®-1077 está por encima del "frit" antes del uso, centrifugar a 1000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente.
- Etiquetar los tubos.
- Verter libremente de 3,0 a 6,0 ml de sangre total desfibrinada o anticoagulada en la cámara superior de cada tubo prellenado del sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077, número de catálogo A 6929. O BIEN Verter libremente de 15,0 a 30,0 ml de sangre total desfibrinada o anticoagulada en la cámara superior de cada tubo prellenado del sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077, números de catálogo A 7054 o A 0561.
- Centrifugar a 1000 x g, a 18–26 °C, durante 10 minutos. O BIEN Centrifugar a 800 x g, a 18–26 °C, durante 15 minutos.
- Después del centrifugado, aspirar con cuidado, con una pipeta de Pasteur, la capa de plasma hasta 0,5 cm de la interfaz opaca que contiene las células mononucleares. Deshacer correctamente la capa de plasma.
- Transferir con cuidado la banda mononuclear, con una pipeta de Pasteur, a un tubo de centrifuga limpio.
- Lavar la banda mononuclear añadiendo 10 ml de PBS isotónica o solución salina equilibrada, y volver a suspender las células mediante aspiración suave con una pipeta de Pasteur. Centrifugar a 250 x g, a 18–26 °C, durante 10 minutos.

8. Repetir el paso 7 dos veces, volviendo a suspender el pellet en 5 ml de PBS isotónica.
9. Volver a suspender el pellet mononuclear en un medio adecuado basado en la aplicación para estas células.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los eritrocitos y granulocitos deberán acumularse en el fondo del tubo de ACCUSPIN™. Las células mononucleares se colocarán en banda en zona entre HISTOPAQUE®-1077 y el plasma.

La siguiente tabla indica los resultados del análisis de la banda de células mononucleares procedentes de muestras de sangre humana sana, separadas en paralelo por el sistema ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 e HISTOPAQUE®-1077.

TABLA I

	SISTEMA ACCUSPIN™			
	HISTOPAQUE®-1077		HISTOPAQUE®-1077	
	Media	±DE	Media	±DE
% Recuperación ¹	70,0	13,3	53,6	8,9
% de viabilidad ²	98,0	1,1	95,0	2,7
% de linfocitos ³	87,6	4,3	89,8	3,5
% de monocitos ³	9,1	3,8	8,3	3,0
% de granulocitos ³	3,0	2,7	2,3	1,8
% de eritrocitos ³	5,0	2,0	5,0	2,0
% de plaquetas ³	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Determinado mediante un hemacitómetro y recuento diferencial de la tinción de Wright.
2. Determinado mediante la prueba de exclusión de tinción con azul de tripán.
3. Determinado mediante recuento diferencial de la tinción de Wright de la fracción mononuclear.

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

REFERENCIAS

1. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97):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:R85, 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 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.

Números de procedimiento A 6929 / A 7054 / A 0561

Revisión anterior: 2003-04

Revisión: 2003-09



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

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