



SIGMA-ALDRICH®

SEPARATION DES LEUCOCYTES
(Protocole N° 1119)

INDICATIONS

HISTOPAQUE® - 1119 et HISTOPAQUE® - 1077 de Sigma-Aldrich sont des préparations non stériles destinées à l'isolement des cellules mononucléaires et des granulocytes pour l'examen histologique. Les réactifs HISTOPAQUE® - 1119 sont destinés à un « Usage diagnostique in vitro ». Cette préparation, sans filtration supplémentaire, n'est pas adaptée à la culture de cellules séparées. Spécifique à la culture cellulaire, HISTOPAQUE® - 1119 n'est pas destinée à un usage diagnostique in vitro.

Les solutions utilisées à cet effet sont à base de polysucrose et de produit radio-opaque. HISTOPAQUE®-1077 est une solution identique ajustée à une densité de 1,077. Lorsque le sang est déposé sur HISTOPAQUE®-1077 et soumis aux forces centrifuges, les cellules mononucléaires sont maintenues dans l'interphase entre le plasma et HISTOPAQUE® tandis que les érythrocytes et les granulocytes gravitent au fond. On pourrait envisager de concevoir un système grâce auquel les cellules de la série myéloïde pourraient également être récoltées en utilisant une procédure en une seule étape. HISTOPAQUE®-1119 a été développé pour atteindre cet objectif et se base sur des observations faites par English et Andersen.

Selon la procédure Sigma-Aldrich, un double gradient se forme lorsque l'on dépose un volume égal d'HISTOPAQUE®-1077 sur HISTOPAQUE®-1119. Le sang total est délicatement déposé sur le milieu HISTOPAQUE®-1077 supérieur. Les tubes sont ensuite centrifugés à 700 x g pendant 30 minutes. Les cellules de la série granulocytaire sont décelées à l'interphase 1077/1119 tandis que les lymphocytes, les autres cellules mononucléaires et les plaquettes sanguines sont décelées à l'interphase plasma/1077.

RÉACTIF

HISTOPAQUE®-1119, référence N° 1119-1
Polysucrose, 6,0 g/dl, et diatrizoate de sodium, 16,7 g/dl.

CONSERVATION ET STABILITÉ :

Conserver HISTOPAQUE®-1119 au réfrigérateur (2-8°C). Ne pas exposer à la lumière. L'étiquette du réactif porte une date de péremption.

ALTÉRATION :

Une apparence trouble indique une altération du produit.

PRÉPARATION :

HISTOPAQUE®-1119 est prêt à l'emploi. Chauffer à 18-26°C avant l'emploi.

Si l'utilisation visée des cellules séparées implique une culture ultérieure, HISTOPAQUE®-1119 doit être filtré de manière stérile avant séparation des cellules. Pour une application nécessitant des conditions stériles, filtrer stérilement HISTOPAQUE®-1119 avant utilisation.

PRÉCAUTIONS :

Suivre les précautions habituelles observées lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Au contact des substances de source humaine, traiter tous les réactifs et l'équipement comme pouvant présenter un risque biologique. Éliminer les déchets selon les règlements locaux, départementaux, régionaux ou nationaux en vigueur. Pour les dernières informations sur les risques ou la sécurité, se reporter à la fiche technique du produit.

Informations sur les risques et la sécurité (Etats-Unis)

Les solutions HISTOPAQUE®1077-1 et 1119-1 sont NOCIVES. Risque de sensibilisation suite à une inhalation ou un contact dermique. Porter des vêtements protecteurs appropriés. Organe cible : le sang.

Informations sur les risques et la sécurité (Europe)

Les solutions HISTOPAQUE®1077-1 et 1119-1 sont NOCIVES. Risque de sensibilisation suite à une inhalation ou un contact dermique. Ne pas respirer les vapeurs. Porter des vêtements protecteurs et des gants appropriés. En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du produit si possible).

PROTOCOLE

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS :

Il est recommandé de prélever et de conserver les échantillons conformément aux directives du Guide de Bonne Exécution des Analyses de biologie médicale M29-A2. Aucune méthode d'analyse actuelle ne garantit totalement que les échantillons de sang ou de tissus ne transmettent pas d'agents infectieux. Par conséquent, tous les échantillons de sang ou de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

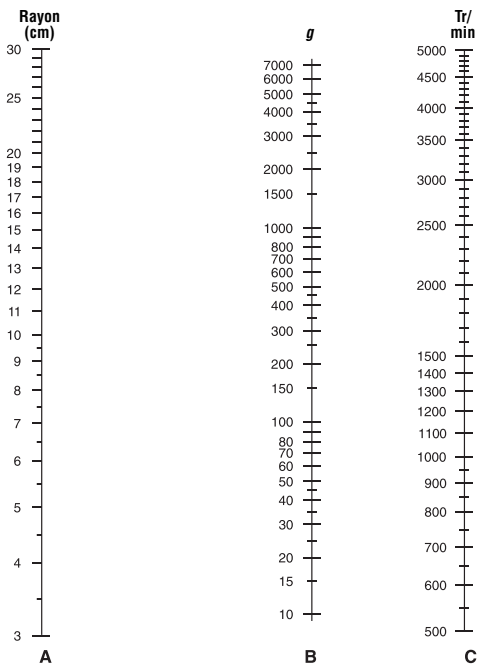
Recueillir 6 ml de sang veineux dans de l'héparine ou de l'EDTA sans agent de conservation.

MATÉRIELS SPECIFIQUES NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS:
HISTOPAQUE®-1077, référence N° 1077-1, Polysucrose, 5,7 g/dl, et diatrizoate de sodium, 9,0 g/dl.
Centrifugeuse (rotor à godets oscillants) capable de générer 700 x g
Tubes à centrifuger coniques de 15 ml en plastique

REMARQUES :

- Si l'utilisation visée des cellules séparées implique une culture ultérieure, HISTOPAQUE®-1119 doit être filtré de manière stérile avant séparation des cellules. Pour une application nécessitant des conditions stériles, filtrer stérilement HISTOPAQUE®-1119 avant utilisation. Pour usage in vitro uniquement. Les cellules isolées à l'aide de HISTOPAQUE® ne doivent pas être utilisées pour des procédures in vivo.
- Des tubes à centrifuger de 50 ml peuvent être utilisés. Modifier le protocole indiqué en utilisant 12 ml de HISTOPAQUE®-1077, 12 ml de HISTOPAQUE®-1119, et 24 ml de sang total ou dilué.
- A l'occasion, il peut être nécessaire de diluer le sang à 1/2 ou 1/4, en fonction du nombre absolu de cellules. Il existe une possibilité de saturation du gradient.
- Ne pas utiliser de gants talqués. Le talc qui se trouve sur les gants activera les monocytes et diminuera les rendements.
- Ne pas utiliser de plastiques à fort pouvoir de fixation comme le polystyrène. Le polystyrène peut fixer les cellules aux parois du tube à centrifuger.
- Préparer le gradient juste avant l'utilisation. Préparer les gradients à l'avance entraînera une diffusion et donc une faible récupération des cellules.
- Le fait d'incliner HISTOPAQUE®-1119 produira également un gradient acceptable.
- D'autres anticoagulants peuvent être utilisés ; cependant, le choix de l'anticoagulant peut avoir une incidence sur la récupération des cellules. La récupération des cellules diminue à mesure que le sang vieillit.
- La section Protocole de cette notice utilise de la saline tamponnée au phosphate isotonique comme diluant et liquide de lavage. D'autres réactifs comme le milieu de cellules RPMI 1640 complétés par du sérum bovin fœtal peuvent être utilisés.
- Le protocole décrit sert à isoler les cellules à partir de 6 ml de sang total. Les volumes peuvent être augmentés ou diminués selon les besoins.
- Il est recommandé d'utiliser un patient « normal » pour contrôler chaque série.

NOMOGRAMME PERMETTANT DE DETERMINER LES FORCES CENTRIFUGES RELATIVES :



Un nomogramme peut être utilisé pour déterminer le réglage tour par minute (tr/min) pour votre centrifugeuse.

Comment déterminer le tr/min requis pour obtenir 700 g pour la Procédure N° 1119.

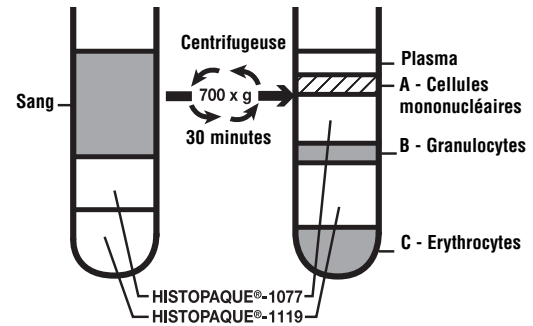
- Mesurer le rayon (cm) à partir du centre du pivot de la centrifugeuse jusqu'à l'extrémité du portoir pour tubes à essai. Marquer cette valeur sur l'échelle A.
- Marquer la force centrifuge relative (par ex : 700) sur l'échelle B.
- A l'aide d'une règle, tracer une ligne droite entre les points dans les colonnes A et B, et la prolonger pour couper la colonne C. La lecture dans la colonne C indique le réglage tr/min pour la centrifugation.

PROTOCOLE :

- Ajouter 3 ml d'HISTOPAQUE®-1119 dans un tube à centrifuger conique de 15 ml.
- Déposer 3 ml d'HISTOPAQUE®-1077 sur HISTOPAQUE®-1119.
- Déposer délicatement 6 ml de sang total sur le gradient supérieur du tube de l'étape 2.
- Centrifuger à 700 x g pendant 30 minutes à température ambiante (18-26 °C). Une centrifugation effectuée à une température inférieure, telle que 4 °C, peut entraîner une agglutination des cellules et une faible récupération.

REMARQUE : Le tr/min requis pour générer 700 x g peut être calculé à l'aide du nomogramme présenté dans cette notice.

- Retirer délicatement les tubes à centrifuger. Deux couches opaques différentes doivent être observées (couches A et B dans la figure ci-dessous).
- Aspirer et jeter le liquide à moins de 0,5 cm de la couche A. Transférer les cellules de cette couche dans un tube marqué « mononucléaire ».



- Aspirer et jeter le liquide restant à moins de 0,5 cm de la couche B. Transférer les cellules de cette couche dans un tube marqué « granulocytes ».
- Laver les cellules en ajoutant 10 ml de solution saline tamponnée au phosphate isotonique dans les tubes. Centrifuger 10 minutes à 200 x g. Retirer et jeter le surnageant.
- Suspendre à nouveau les cellules en aspirant délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Répéter les points 8 et 9 deux fois.
- Suspendre à nouveau les cellules dans le volume de solution saline tamponnée au phosphate isotonique approprié.

A ce stade, plusieurs dosages peuvent être effectués. Les procédures sont choisies subjectivement.

PERFORMANCE

Les érythrocytes doivent se précipiter au fond du tube à centrifuger. Les granulocytes doivent former un anneau à l'interface entre HISTOPAQUE®-1119 et HISTOPAQUE®-1077. Les cellules mononucléaires doivent former un anneau à l'interface entre HISTOPAQUE®-1077 et le plasma.

Si les résultats observés sont différents des résultats escomptés, contacter le Service Technique d'Assistance Sigma-Aldrich.

RÉFÉRENCES

- 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 est une marque déposée de Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO USA

Sigma-Aldrich, Inc. garantit la conformité de ses produits aux informations contenues dans cette notice et dans les autres notices Sigma-Aldrich. L'utilisateur doit s'assurer que le(s) produit(s) est/sont adapté(s) à l'utilisation qu'il souhaite en faire. D'autres conditions générales peuvent s'appliquer. Voir au verso de la facture ou du bordereau de commande les conditions de vente et autres informations.

Protocole N° 1119
Révision précédente : 2009-11
Révision : 2010-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse
Egham, TW20 9BD Royaume Uni

SIGMA-ALDRICH, INC.
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 Etats-Unis
+1 314-771-5765

Service technique : appeler en PCV au +1 314 771 3122
ou adresser un email à clintech@sial.com
Pour commander : appeler en PCV au +1 341 771 5750
www.sigma-aldrich.com

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