



SIGMA-ALDRICH

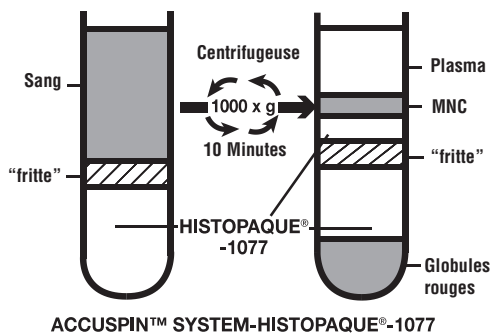
SYSTÈME ACCUSPIN™- HISTOPAQUE® -1077
(Protocole N° A 6929 / A 7054 / A 0561)

INDICATIONS

Le système ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077 de Sigma-Aldrich est destiné à l'isolement des lymphocytes et des autres cellules mononucléaires. Les réactifs du système ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077 sont destinés à « Usage diagnostique in vitro ».

La séparation des lymphocytes et des autres cellules mononucléaires (MNC) à partir de sang total et de moelle épinière à l'aide de l'HISTOPAQUE®-1077 se base sur une méthode décrite pour la première fois par Boyum¹ en 1968. Le milieu de séparation, l'HISTOPAQUE®-1077, est une solution aqueuse de polysaccharide et de diatrizoate de sodium avec une masse moléculaire élevée, un composé iodé non ionique, ajusté à une densité de 1,077 ± 0,001.

Le Tube ACCUSPIN™ a été spécialement conçu avec deux cuves séparées par une barrière poreuse de polyéthylène haute densité («fritte»). Du sang total anticoagulé peut être ajouté dans la cuve supérieure du tube sans risque d'être mélangé à l'HISTOPAQUE®-1077 qui se trouve dans la cuve inférieure sous la fritte. Lors de la centrifugation, le sang total descend à travers la « fritte » et entre en contact avec l'HISTOPAQUE®-1077. Les éléments de plus haute densité déplacent un volume d'HISTOPAQUE®-1077 au-dessus de la « fritte », formant une séparation nette des composants du sang. Les érythrocytes se regroupent et les granulocytes deviennent légèrement hypertoniques, augmentant leur vitesse de sédimentation, créant une précipitation au fond du Tube ACCUSPIN™. Les lymphocytes et les autres cellules mononucléaires, c à d les monocytes, restent à l'interface entre le plasma et l'HISTOPAQUE®-1077. Cette bande dense de cellules mononucléaires peut être recueillie en vidant le contenu de la cuve supérieure ou à l'aide d'une pipette. La contamination des érythrocytes est évitée grâce à la barrière entre les cuves.



RÉACTIF

SYSTÈME ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE® -1077,
références Nos A 6929, A 7054 et A 0561

Tube en polypropylène stérilisé par irradiation et équipé d'une barrière de polyéthylène haute densité («fritte»), rempli de façon aseptique avec de l'HISTOPAQUE®-1077.

HISTOPAQUE®-1077 contient du polysucrose, 5,7 g/dl, et du diatrizoate de sodium, 9,0 g/dl. Filtré de façon aseptique. Densité de 1,077 à 25 °C

CONSERVATION ET STABILITÉ :

Conservé au réfrigérateur (2–8 °C). Ne pas exposer à la lumière. L'étiquette de la boîte porte une date de péremption.

ALTÉRATION :

Une apparence trouble indique une altération du produit.

PRÉPARATION :

Les réactifs du système ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 sont prêts à l'emploi. Chauffer à 18–26 °C avant l'emploi.

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 d'HISTOPAQUE®-1077-1 sont NOCIVES.

Risque de sensibilisation suite à une inhalation ou un contact dermatique. Porter des vêtements protecteurs appropriés. Organe cible : le sang.

Informations sur les risques et la sécurité (Europe)

Les solutions d'HISTOPAQUE®-1077-1 sont NOCIVES.

Risque de sensibilisation suite à une inhalation ou un contact dermatique. 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.

Du sang total frais défibriné ou anticoagulé (EDTA ou héparine sans agent de conservation) peut être utilisé. Pour obtenir de meilleurs résultats, le sang doit être utilisé sous deux heures.

MATÉRIELS SPÉCIFIQUES NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

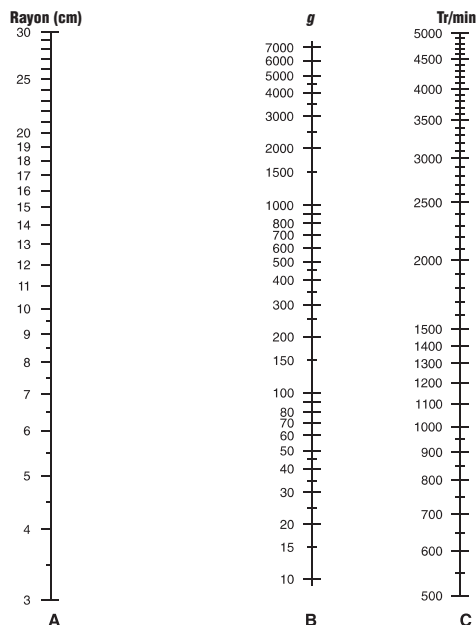
Tubes à centrifuger pour laver les cellules mononucléaires
Solution saline tamponnée au phosphate isotonique (PBS) ou solution saline tamponnée
Centrifugeuse (rotor à godets oscillants) capable de générer 100 à 1 000 x g, en maintenant 18–26 °C

REMARQUES :

- Trois à 6 ml de sang pré-dilué peuvent être utilisés avec la référence N° A 6929 ou 15 à 30 ml de sang pré-dilué avec les références Nos A 7054 et A 0561. Le sang peut être dilué directement dans la cuve supérieure du tube du Système ACCUSPIN™- HISTOPAQUE®-1077. Ceci est approprié pour les échantillons dont les hématoctrites sont supérieurs à la normale.
- Le fait de retirer l'excédent d'HISTOPAQUE®-1077 avec la bande de cellules mononucléaires augmente la contamination des granulocytes par les granulocytes résiduels qui peuvent rester à l'interface mononucléaire (Tableau I).
- Le fait de retirer l'excédent de surnageant avec la bande de cellules mononucléaires peut favoriser la contamination par les protéines plasmatiques.
- L'utilisation de volumes de sang pré-dilué ou total autres que ceux recommandés peut entraîner une récupération moindre.
- Pour retirer toutes les plaquettes sanguines contaminantes, une seconde centrifugation dans un gradient de sucrose de 4 à 20% déposé sur l'HISTOPAQUE®-1077 peut être effectuée. Le gradient de sucrose isolera réellement les plaquettes sanguines tandis que les cellules mononucléaires pénétreront dans la couche d'HISTOPAQUE®-1077.
- Si le Système ACCUSPIN™- HISTOPAQUE®-1077 ne peut pas être mis à température ambiante, la récupération des cellules mononucléaires peut être limitée.
- Une fritte occasionnelle peut se déloger durant la centrifugation. Si cela se produit, ne pas essayer de vider le contenu du tube pour recueillir les cellules mononucléaires. Retirer plutôt doucement la fritte avec des pinces stérilisées ou incliner la fritte avec une pipette puis recueillir les cellules mononucléaires.

- La section Protocole de cette notice décrit la séparation des cellules mononucléaires en utilisant la solution saline tamponnée au phosphate isotonique comme diluant et liquide de lavage. Dans de nombreux cas, on préférera des solutions tamponnées salines ou un milieu de culture des cellules comme le RPMI -1640 complété par du sérum bovin fœtal.
- Il est recommandé d'utiliser un patient "normal" pour contrôler chaque série.

NOMOGRAMME PERMETTANT DE DÉTERMINER LES FORCES CENTRIFUGES RELATIVES :



Un nomogramme peut être utilisé pour déterminer le réglage en tours par minute (tr/min) pour votre centrifugation. Comment déterminer le tr/min requis pour obtenir 1 000 ou 800 x g pour le Protocole N° A 6929 / A 7054 / A 0561

- 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 (c à d 1 000 ou 800) 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 :

- Amener le nombre de tubes désiré à température ambiante. Ne pas exposer à la lumière. Si l'HISTOPAQUE®-1077 est au-dessus de la «fritte» avant l'utilisation, centrifuger à 1 000 x g pendant 30 secondes à température ambiante.
- Étiqueter le(s) tube(s).
- Verser librement 3,0 à 6,0 ml de sang total frais défibriné ou anticoagulé dans la cuve supérieure de chaque tube du Système ACCUSPIN™- HISTOPAQUE®-1077 prérempli, référence N° A 6929. OU Verser librement 15,0 à 30,0 ml de sang total frais défibriné ou anticoagulé dans la cuve supérieure de chaque tube du Système ACCUSPIN™- HISTOPAQUE® -1077 prérempli, références N° A 7054 ou A 0561.
- Centrifuger à 1 000 x g, en maintenant à 18–26 °C pendant 10 minutes. OU Centrifuger à 800 x g, en maintenant à 18–26 °C pendant 15 minutes.
- Après la centrifugation, aspirer délicatement, à l'aide d'une pipette Pasteur, la couche du plasma à moins de 0,5 cm de l'interface opaque contenant les cellules mononucléaires. Éliminer correctement la couche de plasma.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, transférer délicatement la bande de cellules mononucléaires dans un tube à centrifuger propre.

- Laver la bande de cellules mononucléaires en ajoutant 10 ml de PBS isotonique ou une solution saline tamponnée et suspendre à nouveau les cellules en aspirant délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur. Centrifuger à 250 x g, en maintenant à 18–26 °C pendant 10 minutes.
- Répéter l'étape 7 deux fois, en suspendant à nouveau le culot dans 5 ml de PBS isotonique.
- Suspendre à nouveau le culot monocellulaire dans le milieu approprié basé sur l'application pour ces cellules.

PERFORMANCE

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

Le tableau ci-dessous représente les résultats obtenus grâce à l'analyse de la bande de cellules mononucléaires à partir d'échantillons de sang humain sain séparés en parallèle par le Système ACCUSPIN™-HISTOPAQUE®-1077 et l'HISTOPAQUE®-1077.

TABLEAU 1
SYSTÈME
ACCUSPIN™ -
HISTOPAQUE®-1077 **HISTOPAQUE®-1077**
Moyenne ±ÉT **Moyenne ±ÉT**

	ACCUSPIN™ - HISTOPAQUE®-1077		HISTOPAQUE®-1077	
	Moyenne	±ÉT	Moyenne	±ÉT
% Récupération 1	70,0	13,3	53,6	8,9
% Viabilité ²	98,0	1,1	95,0	2,7
% Lymphocytes ³	87,6	4,3	89,8	3,5
% Monocytes ³	9,1	3,8	8,3	3,0
% Granulocytes ³	3,0	2,7	2,3	1,8
% Érythrocytes ³	5,0	2,0	5,0	2,0
% Plaquettes sanguines ³	<5,0	2,0	<5,0	2,0

- Déterminé par hématimètre et par la formule leucocytaire au colorant de Wright.
- Déterminé par le test d'exclusion du colorant bleu de Trypan.
- Déterminé par la formule leucocytaire au colorant de Wright du pourcentage de mononucléaires.

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

RÉFÉRENCES

- Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97):77, 1968
- 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
- Amos DB, Pool P: HLA Typing. Ibid, pp 797–804
- Winchester RJ, Ross G: Methods For Enumerating Lymphocyte Populations. Ibid, pp 64–76
- 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
- Brown L: Hematology: Principles and Procedures. Lea and Febiger, Philadelphia, 1973, pp 33–39
- Eisen SA, Weaner HJ, Parker CW: Isolation of pure human peripheral blood lymphocytes using nylon wool columns. Immunol Commun 1:571, 1972
- Wysocki LJ, Sato VL: Panning for lymphocytes. A method for cell selection. Proc Natl Acad Sci USA 75:6, pp 2844–2848, 1978

- 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
- 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
- Loken MR, Stall AM: Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. J Immunol Methods 50:R85, 1982
- Ting A, Morris PJ: A technique of lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang 20:561, 1971
- Fotino M, Merson EJ, Allen FH: Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. Ann Clin Lab Sci 1:131, 1971

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° A 6929 / A 7054 / A 0561
Révision précédente : 2003-04
Révision : 2003-09



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

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