



# SIGMA-ALDRICH®

## SEPARAZIONE DEI LEUCOCITI

(Procedura n. 1119)

### USO PREVISTO

Sigma-Aldrich HISTOPAQUE® - 1119 e HISTOPAQUE® - 1077 sono una soluzione non sterile destinata all'isolamento di cellule mononucleari per esame istologico. I reagenti HISTOPAQUE® - 1119 sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro". Senza un'ulteriore filtrazione, questo materiale non è idoneo alla coltura di cellule separate. In relazione alla coltura cellulare, HISTOPAQUE® - 1119 non è idoneo alle metodologie diagnostiche in vitro.

Le soluzioni utilizzate allo scopo sono costituite da polisaccarosio e da un mezzo radioopaco. La soluzione HISTOPAQUE®-1077 risponde a questi requisiti ed è regolata ad una densità di 1,077. Quando il sangue viene depositato a strati sulla soluzione HISTOPAQUE®-1077 e viene sottoposto alle forze centrifughe, le cellule mononucleari vengono trattenute in corrispondenza dell'interfaccia tra la soluzione HISTOPAQUE® e il plasma, mentre gli eritrociti e i granulociti vengono attratti sul fondo dalla forza di gravità. È dunque possibile ideare un sistema in cui anche le cellule delle serie granulocitiche possano essere raccolte utilizzando una procedura ad una sola fase. Il sistema HISTOPAQUE®-1119 è stato progettato per questo scopo specifico, sulla base delle osservazioni di English e Andersen.<sup>1</sup>

Secondo la procedura Sigma-Aldrich, si forma un doppio gradiente depositando uno strato di soluzione HISTOPAQUE®-1077 su un volume identico di soluzione HISTOPAQUE®-1119. Successivamente si versa uno strato di sangue intero sul mezzo HISTOPAQUE®-1077 superiore. Le provette vengono centrifugate a 700 x g per 30 minuti. Le cellule delle serie granulocitiche si trovano in corrispondenza dell'interfaccia 1077-1119, mentre i linfociti, le altre cellule mononucleari e le piastrine si trovano in corrispondenza dell'interfaccia plasma-1077.

### REAGENTE

**HISTOPAQUE®-1119**, n. di catalogo 1119-1  
Polisaccarosio 6,0 g/dl e sodio diatrizoato 16,7 g/dl.

#### CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare HISTOPAQUE®-1119 in frigorifero (2-8°C) al riparo dalla luce. La data di scadenza è indicata sull'etichetta del reagente.

#### DETERIORAMENTO

Se il prodotto assume un aspetto torbido, significa che si è deteriorato.

#### PREPARAZIONE

HISTOPAQUE®-1119 è un prodotto pronto per l'uso. Riscaldare a 18-26°C prima dell'uso.

Se l'uso previsto delle cellule separate comporta una successiva messa in coltura, HISTOPAQUE®-1119 deve essere filtrato sterilmente prima della separazione delle cellule. Per applicazioni in cui si richiede sterilità, filtrare sterilmente HISTOPAQUE®-1119 prima dell'uso.

#### PRECAUZIONI

Seguire le normali precauzioni adottate per i reagenti di laboratorio. In caso di contatto con sostanze di origine umana, trattare tutti i reagenti e l'attrezzatura come materiale a potenziale rischio biologico. Smaltire i rifiuti in conformità alle normative vigenti a livello locale, regionale o nazionale. Fare riferimento al foglio dati relativo alla sicurezza dei materiali per informazioni aggiornate riguardanti i rischi, i pericoli e la sicurezza associati all'uso di questi prodotti.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.S.A.)

Le soluzioni HISTOPAQUE® 1077-1 e 1119-1 sono NOCIVE. Possono causare sensibilizzazione in caso di inalazione e contatto con la cute. Indossare indumenti protettivi idonei. Organi colpiti: sangue.

Dichiarazioni sui rischi e la sicurezza (U.E.)

Le soluzioni HISTOPAQUE® 1077-1 e 1119-1 sono NOCIVE. Possono causare sensibilizzazione in caso di inalazione e contatto con la cute. Non respirare i vapori. Indossare indumenti e guanti adeguatamente protettivi. In caso di incidente o di malessere, ricorrere immediatamente a cure mediche (mostrare l'etichetta del prodotto quando è possibile).

### PROCEDURA

#### RACCOLTA DEI CAMPIONI

Per la raccolta dei campioni, attenersi alla procedura descritta nel documento NCCLS numero M29-A2. Nessun metodo di analisi noto garantisce con assoluta certezza che i campioni di sangue o il tessuto non trasmettono infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

Raccogliere 6 ml di sangue venoso in eparina o EDTA senza aggiunta di conservanti.

#### MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

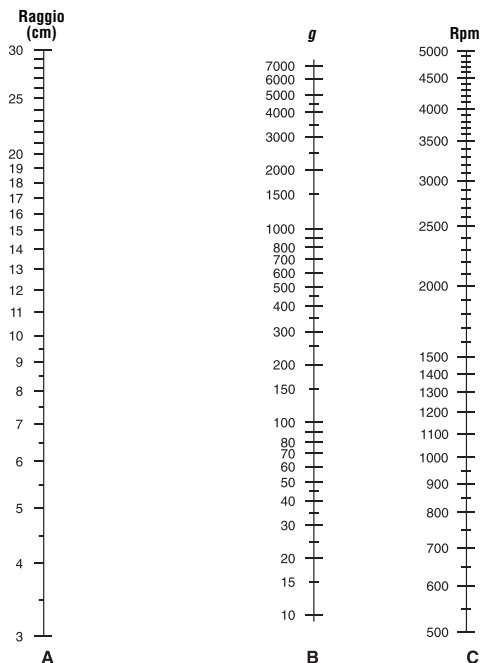
HISTOPAQUE®-1077 (n. di catalogo 1077-1), polisaccarosio 5,7 g/dl e sodio diatrizoato 9,0 g/dl.

Centrifuga (rotore con cestello girevole) in grado di operare a 700 x g. Provette coniche per centrifuga da 15 ml, in plastica

### NOTE

- Se l'uso previsto delle cellule separate comporta una successiva messa in coltura, HISTOPAQUE®-1119 deve essere filtrato sterilmente prima della separazione delle cellule. Per applicazioni in cui si richiede sterilità, filtrare sterilmente HISTOPAQUE®-1119 prima dell'uso. Questo prodotto è esclusivamente per "uso in vitro". Le cellule isolate mediante HISTOPAQUE® non devono essere usate per procedure "in vivo".
- È possibile utilizzare provette per centrifuga da 50 ml. In questo caso, variare la procedura utilizzando 12 ml di soluzione HISTOPAQUE®-1077, 12 ml di soluzione HISTOPAQUE®-1119 e 24 ml di sangue intero o diluito.
- Talvolta potrebbe essere necessario diluire il sangue con un rapporto 1:2 o 1:4, a seconda dei numeri assoluti di cellule. È possibile un sovraccarico del gradiente.
- Evitare di utilizzare guanti impolverati. La polvere dei guanti attiverebbe i monociti, generando risultati più bassi.
- Evitare di utilizzare plastica altamente legante, come il polistirene, in quanto potrebbe legare le cellule alle pareti delle provette per centrifuga.
- Preparare il gradiente un attimo prima dell'uso. Se il gradiente viene preparato con troppo anticipo, potrebbe verificarsi un fenomeno di diffusione e il recupero cellulare potrebbe essere compromesso.
- Si otterrà un gradiente accettabile anche ponendo sotto il reagente HISTOPAQUE®-1119.
- È possibile utilizzare altri anticoagulanti, tuttavia tenere presente che la scelta dell'anticoagulante influenza il recupero cellulare. Con l'invecchiamento del sangue si assiste ad un crollo del recupero cellulare.
- Nel paragrafo Procedura di questo foglietto illustrativo viene descritto l'uso del tampone fosfato isotonic come diluente e liquido di lavaggio. È possibile utilizzare altri reagenti, ad esempio il terreno per coltura cellulare RPMI 1640 arricchito con siero bovino fetale.
- La procedura illustrata si riferisce all'isolamento delle cellule a partire da 6 ml di sangue intero. È possibile aumentare o diminuire questo volume secondo necessità.
- Ad ogni seduta si consiglia di eseguire un controllo utilizzando un paziente con valori "nella norma".

### NOMOGRAMMA PER LA DETERMINAZIONE DELLE FORZE CENTRIFUGHE RELATIVE



È possibile utilizzare un nomogramma per ricavare l'impostazione del numero di giri al minuto (rpm) della centrifuga. Definizione del valore rpm per 700 x g (Procedura n. 1119):

- Misurare il raggio (cm) che va dal centro dell'asse della centrifuga all'estremità del portaprovette. Segnare questo valore sulla scala A.
- Segnare il valore della forza centrifuga relativa (ad esempio, 700) sulla scala B.
- Con un righello tracciare una linea retta tra i punti sulle colonne A e B e prolungarla fino ad intersecare la colonna C. Il valore intersecato sulla colonna C è l'impostazione rpm della centrifuga.

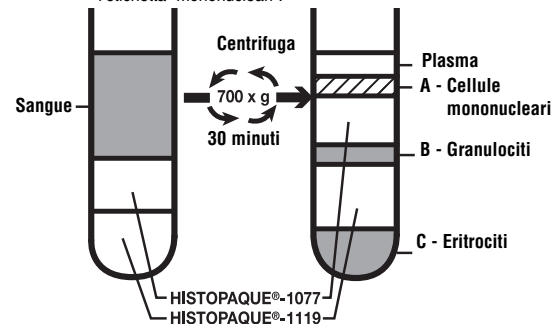
#### PROCEDURA

- Aggiungere 3 ml di soluzione HISTOPAQUE®-1119 in una provetta conica per centrifuga da 15 ml.
- Versare con cautela uno strato (3 ml) di soluzione HISTOPAQUE®-1077 sulla soluzione HISTOPAQUE®-1119.
- Versare con cautela uno strato (6 ml) di sangue intero sul gradiente superiore della provetta descritta al punto 2.
- Centrifugare a 700 x g per 30 minuti a temperatura ambiente (18-26°C). Centrifugando a temperature più basse, ad esempio a 4°C, potrebbero formarsi grumi di cellule e il recupero potrebbe essere compromesso.

### NOTA

Il valore rpm necessario per produrre 700 x g può essere calcolato sulla base del nomogramma illustrato in questo foglietto illustrativo.

- Estrarre le provette dalla centrifuga con cautela. Dovrebbero essere visibili due strati opachi ben distinti (strati A e B nella figura che segue).
- Aspirare ed eliminare il liquido fino a 0,5 cm dello strato A. Trasferire le cellule da questo strato in una provetta con l'etichetta "mononucleari".



- Aspirare ed eliminare il liquido fino a 0,5 cm dello strato B. Trasferire le cellule da questo strato in una provetta con l'etichetta "granulociti".
- Lavare le cellule aggiungendo nelle provette 10 ml di tampone fosfato isotonic. Centrifugare per 10 minuti a 200 x g. Rimuovere ed eliminare il soprannatante.
- Risospendere le cellule aspirando delicatamente con una pipetta Pasteur.
- Ripetere la procedura descritta nei punti 8 e 9 per due volte.
- Risospendere le cellule in un volume sufficiente di tampone fosfato isotonic.

A questo punto è possibile effettuare un'ampia serie di analisi. Le procedure dovranno essere scelte in base alle proprie esigenze specifiche.

### CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Gli eritrociti dovrebbero formare un granulo sul fondo della provetta per centrifuga. I granulociti dovrebbero formare una fascia nell'interfaccia tra le soluzioni HISTOPAQUE®-1119 e HISTOPAQUE®-1077. Le cellule mononucleari dovrebbero formare una fascia nell'interfaccia tra la soluzione HISTOPAQUE®-1077 e il plasma.

Se i risultati osservati si discostano dai risultati attesi, contattare l'assistenza tecnica Sigma-Aldrich per informazioni di supporto.

### BIBLIOGRAFIA

- 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 è un marchio registrato di Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO (U.S.A.).

Sigma-Aldrich, Inc. garantisce che i propri prodotti sono conformi alle informazioni contenute nel presente documento e in altre pubblicazioni Sigma-Aldrich. Spetta all'acquirente stabilire se i prodotti sono idonei all'uso particolare che ne viene fatto. È possibile che sussistano ulteriori termini e condizioni. Vedere il retro della fattura o la distinta di imballaggio per i termini e le condizioni di vendita.

Procedura n. 1119  
Revisione precedente: 2009-11  
Revisione: 2010-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham TW20 9BD (Regno Unito)

SIGMA-ALDRICH, INC.  
3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 (USA)  
+1 314 771 5765

Assistenza tecnica:  
o a carico del destinatario +1 314 771 3122  
o tramite e-mail all'indirizzo [clintech@sial.com](mailto:clintech@sial.com)

Per ordinare:  
a carico del destinatario +1 314 771 5750  
[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
P.O. 1120, 89552 Steinheim (Germania)  
49-7329-970