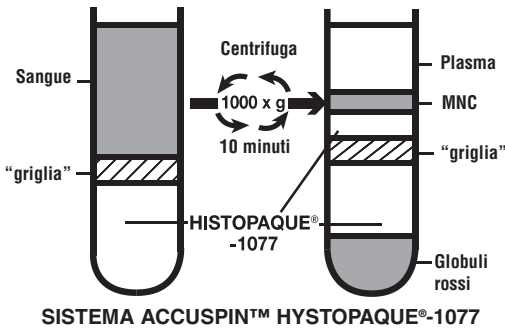


USO PREVISTO

Il sistema ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 di Sigma-Aldrich è idoneo all'uso per l'isolamento dei linfociti e di altre cellule mononucleari. I reagenti del sistema ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 sono riservati al solo "uso diagnostico in vitro".

La separazione dei linfociti e di altre cellule mononucleari dal sangue intero e dal midollo osseo per mezzo del reagente HISTOPAQUE®-1077 si basa su un metodo descritto per la prima volta da Boyum¹ nel 1968. Il terreno di separazione, HISTOPAQUE®-1077, è una soluzione acquosa di sodio diatrizoato e polisaccaride ad alto peso molecolare, un composto iodinato non ionico corretto ad una densità di $1,077 \pm 0,001$ g/ml.

La provetta ACCUSPIN™ è stata progettata in modo speciale, in quanto è provvista di due camere separate da una barriera porosa di polietilene ad alta densità, denominata "griglia". Il sangue intero anticoagulato può confluire nella camera superiore della provetta senza rischiare di mescolarsi al reagente HISTOPAQUE®-1077 che si trova nella camera inferiore, sotto la griglia. Durante la centrifugazione il sangue intero scende attraverso questa griglia ed entra in contatto con il reagente HISTOPAQUE®-1077. Gli elementi di maggiore densità spostano una certa quantità di HISTOPAQUE®-1077 al di sopra della "griglia", producendo una separazione netta dei componenti ematici. Gli eritrociti si aggregano e i granulociti diventano leggermente ipertonici, in quanto aumenta la loro velocità di sedimentazione e si assiste alla formazione di granuli in fondo alla provetta ACCUSPIN™. I linfociti e le altre cellule mononucleari, ad esempio i monociti, sono trattenuti nell'interfaccia tra il plasma e il reagente HISTOPAQUE®-1077. Per raccogliere questa densa fascia di cellule mononucleari, è possibile far fuoriuscire il contenuto della camera superiore servendosi di una pipetta. La contaminazione degli eritrociti può essere evitata grazie alla barriera presente tra le due camere.



SISTEMA ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077

REAGENTE

SISTEMA ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077, n. di catalogo A 6929, A 7054 e A 0561

Una provetta di polipropilene sterilizzata con radiazioni e provvista di una barriera di polietilene ad alta densità ("griglia"), riempita asepticamente con HISTOPAQUE®-1077.

Il reagente HISTOPAQUE®-1077 contiene polisaccarosio (5,7 g/dl) e sodio diatrizoato (9,0 g/dl). Filtrato asepticamente. Densità $1,077 \pm 0,001$ a 25°C.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare in frigorifero (2–8°C) al riparo dalla luce. La data di scadenza è indicata sull'etichetta della scatola.

DETERIORAMENTO

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

PREPARAZIONE

I reagenti del sistema ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 sono prodotti pronti per l'uso. Riscaldare a 18–26°C 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 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 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 trasmettano infezioni. Di conseguenza tutti i derivati del sangue e i campioni di tessuto devono essere considerati potenziali veicoli di infezioni.

È possibile utilizzare sangue intero fresco, defibrinato o anticoagulato (EDTA o eparina senza aggiunta di conservanti). Per ottenere risultati ottimali, analizzare il sangue entro 2 ore dal prelievo.

MATERIALI SPECIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Provette per centrifuga per il lavaggio delle cellule mononucleari

Soluzione salina tamponata al fosfato (PBS) isotonica oppure soluzione di sali bilanciata

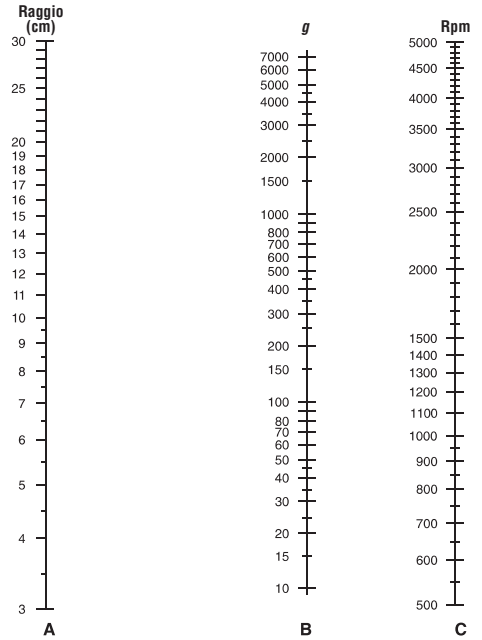
Centrifuga (rotore con cestello girevole) in grado di operare a 100–1000 x g, mantenendo una temperatura di 18–26°C

NOTE

- Con il prodotto A 6929 si possono utilizzare 6 ml di sangue prediluito; con i prodotti A 7054 e A 0561 si possono utilizzare da 15 a 30 ml di sangue prediluito. È possibile diluire il sangue direttamente nella camera superiore della provetta del sistema ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077. La diluizione è particolarmente indicata per i campioni con ematocriti sopra la norma.
- La rimozione della soluzione HISTOPAQUE®-1077 in eccesso con la fascia mononucleare aumenta la contaminazione granulocitica ad opera dei granulociti residui, i quali rimangono nell'interfaccia mononucleare (Tabella I).
- La rimozione del soprannatante in eccesso con la fascia mononucleare potrebbe contribuire alla contaminazione con proteine di plasma.
- L'uso di volumi di sangue intero o sangue prediluito diversi da quelli consigliati potrebbe comportare un recupero inferiore al previsto.
- Per rimuovere tutte le piastrine contaminanti, è possibile eseguire una seconda centrifugazione in un gradiente di saccarosio al 4–20% stratificato sulla soluzione HISTOPAQUE®-1077. Il gradiente di saccarosio isolerà le piastrine in maniera efficace, mentre le cellule mononucleari penetreranno nello strato di soluzione HISTOPAQUE®-1077.
- Se il sistema ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 non raggiunge la temperatura ambiente opportuna, il recupero delle cellule mononucleari potrebbe essere limitato.

- Esiste la possibilità che occasionalmente una griglia si sposti durante la centrifugazione. In tal caso, non tentare di far fuoriuscire il contenuto dalla provetta per prelevare le cellule mononucleari. Piuttosto utilizzare delle pinze sterilizzate per estrarre la griglia con cautela oppure utilizzare una pipetta per inclinare la griglia e prelevare le cellule mononucleari.
- La procedura descrive la separazione delle cellule mononucleari utilizzando la soluzione salina tamponata al fosfato come diluente e liquido di lavaggio. In molte circostanze sono da preferire soluzioni di sali bilanciati oppure un terreno di coltura cellulare tipo RPMI -1640, con aggiunta di siero bovino fetale.
- 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 1000 o 800 x g (Procedura n. A 6929 / A 7054 / A 0561).

- 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, 1000 o 800) 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

- Portare il numero di provette desiderato a temperatura ambiente, al riparo dalla luce. Se la soluzione HISTOPAQUE®-1077 è al di sopra della "griglia" prima dell'uso, centrifugare a 1000 x g per 30 secondi a temperatura ambiente.
- Etichettare tutte le provette.
- Versare liberamente da 3,0 a 6,0 ml di sangue intero fresco, defibrinato o anticoagulato, nella camera superiore delle provette ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 riempite in precedenza (n. di catalogo A 6929).
OPPURE
Versare liberamente da 15,0 a 30,0 ml di sangue intero fresco, defibrinato o anticoagulato, nella camera superiore delle provette ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 (n. di catalogo A 7054 o A 0561).
- Centrifugare a 1000 x g, mantenendo una temperatura di 18–26°C per 10 minuti.
OPPURE
Centrifugare a 800 x g, mantenendo una temperatura di 18–26°C per 15 minuti.

- Al termine della centrifugazione utilizzare una pipetta Pasteur per aspirare con cautela lo strato superiore, fino a 0,5 cm dall'interfaccia opaca contenente le cellule mononucleari. Eliminare in modo opportuno lo strato di plasma.
- Utilizzare una pipetta Pasteur per trasferire con cautela la fascia mononucleare in una provetta per centrifuga pulita.
- Lavare la fascia mononucleare aggiungendo 10 ml di soluzione PBS isotonica oppure una soluzione di sali bilanciata, quindi risospendere le cellule aspirando delicatamente con una pipetta Pasteur. Centrifugare a 250 x g, mantenendo una temperatura di 18–26°C per 10 minuti.
- Ripetere due volte il punto 7, risospendendo il granulo in 5 ml di soluzione PBS isotonica.
- Risospendere il granulo mononucleare in un terreno idoneo, scelto a seconda dell'impiego previsto per queste cellule.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Gli eritrociti e i granulociti dovrebbero formare un granulo sul fondo della provetta ACCUSPIN™. Le cellule mononucleari dovrebbero formare una fascia in corrispondenza dell'interfaccia tra la soluzione HISTOPAQUE®-1077 e il plasma.

La tabella che segue illustra i risultati ottenuti con l'analisi della fascia di cellule mononucleari provenienti da campioni di sangue umano di donatori sani, separati in parallelo con il sistema ACCUSPIN™ HISTOPAQUE®-1077 e con HISTOPAQUE®-1077.

TABELLA I

| | SISTEMA ACCUSPIN™ | | | |
|----------------------------|----------------------|------|------------------|-----|
| | HISTOPAQUE®-1077 | | HISTOPAQUE®-1077 | |
| | Media | ±DS | Media | ±DS |
| % recupero ¹ | 70,0 | 13,3 | 53,6 | 8,9 |
| % vitalità ² | 98,0 | 1,1 | 95,0 | 2,7 |
| % linfociti ³ | 87,6 | 4,3 | 89,8 | 3,5 |
| % monociti ³ | 9,1 | 3,8 | 8,3 | 3,0 |
| % granulociti ³ | 3,0 | 2,7 | 2,3 | 1,8 |
| % eritrociti ³ | 5,0 | 2,0 | 5,0 | 2,0 |
| % piastrine ³ | <5,0 | 2,0 | <5,0 | 2,0 |

- Determinazione tramite emocitometro e conteggio differenziale con colorazione di Wright.
- Determinazione tramite test di esclusione con colorazione Blu tripan.
- Determinazione tramite conteggio differenziale con colorazione di Wright della frazione mononucleare.

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

BIBLIOGRAFIA

- 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, Kanenberg 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 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. A 6929 / A 7054 / A 0561

Revisione precedente: 2003-04

Revisione: 2003-09



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: a carico del destinatario +1 314 771 3122

o tramite e-mail all'indirizzo clintech@sial.com

Per ordinare: a carico del destinatario +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim (Germania) 49-7329-970