



**SIGMA-ALDRICH®**

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

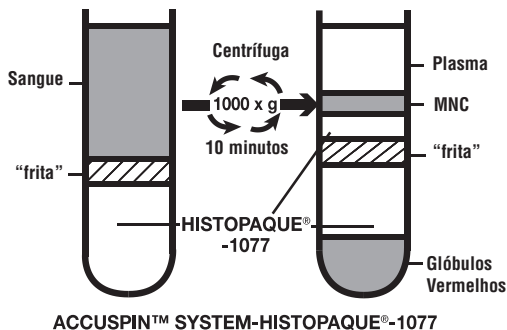
(Procedimento N.º A 6929 / A 7054 / A 0561)

## UTILIZAÇÃO PREVISTA

O Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077 da Sigma-Aldrich destina-se a ser utilizado no isolamento de linfócitos e de outras células mononucleares. Os reagentes do Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077 foram concebidos para “utilização em diagnóstico in vitro”.

A separação dos linfócitos e de outras células mononucleares (MNC) do sangue total e da medula óssea com o HISTOPAQUE®-1077 baseia-se num método primeiramente descrito por Boyum<sup>1</sup>, em 1968. O meio de separação, o HISTOPAQUE®-1077, é uma solução aquosa composta por polissacarídeos de elevado peso molecular e por diatrizoato de sódio, um composto de iodo não-iónico, ajustada a uma densidade de 1,077 ± 0,001.

O Tubo ACCUSPIN™ foi especialmente concebido e contém duas câmaras separadas por uma barreira porosa de polietileno de alta densidade (“frita”). Pode adicionar-se sangue total anticoagulado à câmara superior do tubo sem que haja o risco de este se misturar com o HISTOPAQUE®-1077, que se encontra na câmara inferior, por baixo da “frita”. Mediante centrifugação, o sangue total passa através da “frita” para entrar em contacto com o HISTOPAQUE®-1077. Os elementos de maior densidade afastam um volume de HISTOPAQUE®-1077 acima da “frita” fornecendo uma separação distinta dos componentes do sangue. O agregado de eritrócitos e os granulócitos tornam-se ligeiramente hipertónicos, aumentando a sua velocidade de sedimentação, o que resulta na sua concentração no fundo do tubo ACCUSPIN™. Os linfócitos e outras células mononucleares, por exemplo os monócitos, permanecem na interface plasma-HISTOPAQUE®-1077. Esta banda densa de células mononucleares pode ser recolhida decantando-se o conteúdo da câmara superior ou utilizando-se uma pipeta. A contaminação por eritrócitos é evitada devido à barreira existente entre as câmaras.



## REAGENTE

**SISTEMA ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077**, N.º de Catálogo A 6929, A 7054 e A 0561

Um tubo de polipropileno esterilizado por radiação que tem instalada uma barreira de polietileno de alta densidade (“frita”), cheio assepticamente com HISTOPAQUE®-1077.

O HISTOPAQUE®-1077 contém polissacarose, 5,7 g/dL, e diatrizoato de sódio, 9,0 g/dL. Filtrado assepticamente. Densidade 1,077 a 25°C.

### ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Armazenar no frigorífico (2–8°C). Proteger da luz. O prazo de validade está indicado na caixa dos produtos.

### DETERIORAÇÃO:

Um aspecto turvo indica a deterioração do produto.

### PREPARAÇÃO:

Os reagentes do Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077 estão prontos a ser utilizados. Aquecer a 18–26°C antes de utilizar.

## PRECAUÇÕES:

Deverão ser aplicadas as precauções normais relativamente ao manuseamento de reagentes laboratoriais. Depois de entrar em contacto com substâncias de origem humana, tratar todos os reagentes e equipamento como sendo material biológico potencialmente perigoso. Eliminar os resíduos de acordo com todos os regulamentos locais, estaduais, regionais ou nacionais. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações mais actualizadas sobre os riscos, perigos ou segurança.

### Declarações de riscos e segurança dos EUA

As soluções HISTOPAQUE®-1077-1 são NOCIVAS. Podem provocar sensibilização por inalação e em contacto com a pele. Usar vestuário de protecção adequado. Órgão alvo: Sangue.

### Declarações de riscos e segurança da UE

As soluções HISTOPAQUE®-1077-1 são NOCIVAS. Podem provocar sensibilização por inalação e em contacto com a pele. Não respirar os vapores. Usar vestuário de protecção e luvas adequadas. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível).

## PROCEDIMENTO

### COLHEITA DE AMOSTRAS:

Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento M29–A2 da NCCLS. Nenhum método de teste conhecido poderá garantir totalmente que as amostras sanguíneas ou de tecido não irão transmitir infecções. Por essa razão, todos os derivados sanguíneos ou amostras de tecido deverão ser considerados potencialmente infecciosos.

Pode ser utilizado sangue total desfibrinado ou anticoagulado (EDTA ou heparina sem conservantes). Para obtenção de melhores resultados, o sangue deve ser processado no máximo ao fim de 2 horas.

### MATERIAIS ESPECIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS:

Tubos de centrifuga para lavar células mononucleares  
Solução Salina de Tampão Fosfato (PBS) ou solução salina equilibrada

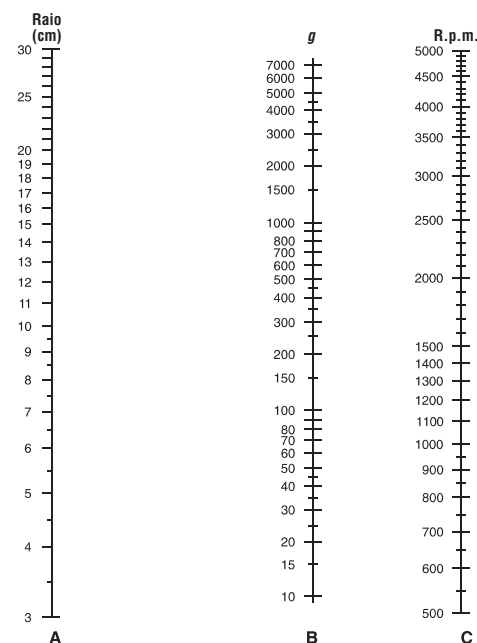
Centrifuga (rotor de cesto oscilante) com capacidade para gerar de 100 x g a 1000 x g, mantendo uma temperatura de 18–26°C

### NOTAS:

1. Pode utilizar-se entre 3 e 6 mL de sangue pré-diluído com o N.º de Catálogo A 6929 ou entre 15 e 30 mL de sangue pré-diluído com os Nos de Catálogo A 7054 e A 0561. O sangue pode ser diluído directamente na câmara superior do tubo do Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077. Este é apropriado para amostras com níveis de hematócritos acima do normal.
2. A remoção das quantidades de HISTOPAQUE®-1077 em excesso com a banda mononuclear aumenta a contaminação por granulócitos através dos granulócitos residuais que possam ficar na interface mononuclear (Tabela I).
3. A remoção das quantidades de sobrenadante em excesso com a banda mononuclear pode promover a contaminação por meio das proteínas do plasma.
4. A utilização de volumes de sangue total ou pré-diluído diferentes dos recomendados podem resultar numa diminuição da recuperação.
5. Para remover todas as plaquetas contaminadas, pode realizar-se uma segunda centrifugação num gradiente de 4 a 20% de sacarose colocado em camadas sobre o HISTOPAQUE®-1077. O gradiente de sacarose irá isolar eficazmente as plaquetas enquanto as células mononucleares irão penetrar na camada de HISTOPAQUE®-1077.
6. Se o sistema HISTOPAQUE®-1077 ACCUSPIN não atingir a temperatura ambiente, a recuperação das células mononucleares pode ser limitada.
7. Ocasionalmente, uma “frita” pode ser desalojada durante a centrifugação. Se isto ocorrer, não tentar decantar o conteúdo do tubo para recolher as células mononucleares. Em vez disso, retirar suavemente a “frita” com uma pinça esterilizada ou inclinar a “frita” com uma pipeta e colher as células mononucleares.

8. A secção do procedimento deste folheto informativo descreve a separação de células mononucleares utilizando solução salina de tampão fosfato como diluente e fluido de lavagem. Em diversas situações são preferíveis as soluções salinas equilibradas ou o meio de cultura celular, como o RPMI -1640, suplementados com soro bovino fetal.
9. Para cada execução, como controlo, recomendamos a utilização de um doente “normal”.

## NOMOGRAMA PARA DETERMINAÇÃO DAS FORÇAS CENTRÍFUGAS RELATIVAS:



Pode utilizar-se um nomograma para derivar a definição de r.p.m. para a centrifuga.

Como estabelecer as r.p.m. necessárias a fim de se obterem 1000 ou 800 x g para o Procedimento N.º A 6929 / A 7054 / A 0561.

1. Medir o raio (cm) desde o centro do eixo da centrifuga até à extremidade do suporte dos tubos de ensaio. Marcar este valor na escala A.
2. Marcar a força centrífuga relativa (por exemplo, 1000 ou 800) na escala B.
3. Com uma régua, desenhar uma linha recta entre os pontos nas colunas A e B, aumentando-a até se cruzar com a coluna C. A leitura na coluna C é a definição das r.p.m. para a centrifuga.

### PROCEDIMENTO:

1. Deixar o número desejado de tubos atingir a temperatura ambiente. Proteger da luz. Se o HISTOPAQUE®-1077 estiver acima da “frita” antes de utilizar, centrifugar a 1000 x g durante 30 segundos à temperatura ambiente.
2. Rotular o(s) tubo(s).
3. Decantar livremente 3,0 a 6,0 mL de sangue total fresco desfibrinado ou anticoagulado que se encontra na câmara superior de cada tubo pré-cheio do Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077, N.º de Catálogo A 6929.  
OU  
Decantar livremente 15,0 a 30,0 mL de sangue total fresco desfibrinado ou anticoagulado que se encontra na câmara superior de cada tubo pré-cheio do Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077, N.º de Catálogo A 7054 ou A 561.
4. Centrifugar a 1000 x g mantendo uma temperatura de 18–26°C durante 10 minutos.  
OU  
Centrifugar a 800 x g mantendo uma temperatura de 18–26°C durante 15 minutos.
5. Após a centrifugação, aspirar cuidadosamente a camada de plasma com uma pipeta de Pasteur até 0,5 cm da interface opaca contendo as células mononucleares. Eliminar adequadamente a camada de plasma.

6. Transferir cuidadosamente a banda mononuclear com uma pipeta de Pasteur, para dentro de um tubo de centrifuga limpo.
  7. Lavar a banda mononuclear adicionando 10 mL de PBS isotónico ou uma solução salina equilibrada e ressuspender as células através de aspiração suave com uma pipeta de Pasteur. Centrifugar a 250 x g mantendo uma temperatura de 18–26°C durante 10 minutos.
  8. Repetir duas vezes o Passo 7, ressuspender o concentrado em 5 mL de PBS isotónico.
  9. Ressuspender o concentrado mononuclear em meio apropriado com base na aplicação para estas células.
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

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os eritrócitos e os granulócitos devem concentrar-se no fundo do tubo ACCUSPIN™. As células mononucleares devem ficar em banda na interface entre o HISTOPAQUE®-1077 e o plasma.

A tabela abaixo representa os resultados da análise da banda de células mononucleares a partir de amostras de sangue humano saudável separado em paralelo pelo Sistema ACCUSPIN™ – HISTOPAQUE®-1077 e HISTOPAQUE®-1077.

### TABELA I

#### SISTEMA

#### ACCUSPIN™ -

	HISTOPAQUE®-1077		HISTOPAQUE®-1077	
	Média	±SD	Média	±SD
% de recuperação <sup>1</sup>	70,0	13,3	53,6	8,9
% de viabilidade <sup>2</sup>	98,0	1,1	95,0	2,7
% de linfócitos <sup>3</sup>	87,6	4,3	89,8	3,5
% de monócitos <sup>3</sup>	9,1	3,8	8,3	3,0
% de granulócitos <sup>3</sup>	3,0	2,7	2,3	1,8
% de eritrócitos <sup>3</sup>	5,0	2,0	5,0	2,0
% de plaquetas <sup>3</sup>	<5,0	2,0	<5,0	2,0

1. Determinado através da contagem diferencial por hematimetria e da coloração de Wright.
2. Determinado através do teste de exclusão de corante azul trypan.
3. Determinado através da contagem diferencial com coloração de Wright da fracção mononuclear.

Se os resultados observados forem diferentes dos esperados, contactar a Assistência Técnica da Sigma-Aldrich para mais informações.

## BIBLIOGRAFIA

1. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21 (Suppl97):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

HISTOPAQUE é uma marca registada da Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO EUA

A Sigma-Aldrich, Inc. garante que os seus produtos estão em conformidade com as informações contidas nesta e em outras publicações da Sigma-Aldrich. O comprador deverá determinar a adequação do(s) produto(s) ao fim particular a que se destinam. Poderão aplicar-se termos e condições adicionais. Consultar o verso da factura ou carta de porte para mais informações sobre os termos e condições de venda adicionais.

Procedimento N.º A 6929 / A 7054 / A 0561

Revisão Anterior: 2003-04

Revisto: 2003-09



EC REP

AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Reino Unido

SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA +1 314 771 5765

Assistência Técnica: chamada paga no destino +1 314 771 3122

ou endereço de correio electrónico: clintech@sial.com

Para encomendar: chamada paga no destino +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemanha 49-7329-970