



SIGMA-ALDRICH®
HISTOPAQUE®-1077
 (Procedimiento número 1077)

APLICACIÓN

HISTOPAQUE®-1077 de Sigma-Aldrich se utiliza para el aislamiento de células mononucleares. HISTOPAQUE®-1077 está diseñado para uso diagnóstico *in vitro*.

En 1968, Boyum¹ describió métodos para el aislamiento de células mononucleares de la sangre circulante y médula ósea.

En términos generales, estos métodos se servían de mezclas de polisacáridos y medio de contraste radioopaco. HISTOPAQUE®-1077 es una solución de polisucrosa y diatrizoato sódico, ajustada a una densidad de 1,077 ± 0,001 g/ml. Este medio facilita la rápida recogida de células mononucleares viables, de pequeños volúmenes de sangre. El procedimiento HISTOPAQUE®-1077 es adecuado para el estudio de linfólisis mediada por células² y para la tipificación de antígeno de linfocitos humanos (HLA)³. También puede utilizarse como el paso de aislamiento inicial antes de la enumeración de linfocitos T, B y "nulos"⁴.

La sangre venosa anticoagulada se extiende sobre HISTOPAQUE®-1077. Durante el centrifugado, los eritrocitos y granulocitos son agregados por la polisucrosa, sedimentándose rápidamente, mientras que los linfocitos y otras células mononucleares permanecen en la zona entre el plasma e HISTOPAQUE®-1077. La contaminación por eritrocitos es ínfima. La mayor parte de plaquetas extrañas se extraen mediante centrifugado a baja velocidad durante los pasos de lavado.

REACTIVO

HISTOPAQUE®-1077, número de catálogo 1077-1 Polisucrosa, 5,7 g/dl, y diatrizoato sódico, 9,0 g/dl. Filtrado asépticamente.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacenar HISTOPAQUE®-1077 en el frigorífico (2–8 °C). Proteger de la luz. La etiqueta del reactivo indica la fecha de caducidad.

DETERIORO:

Un aspecto turbio es indicativo del deterioro del producto.

PREPARACIÓN:

HISTOPAQUE®-1077 se presenta listo para su uso. Calentar a 18–26 °C antes de su uso.

PRECAUCIONES:

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. En caso de contacto con sustancias de origen humano, tratar todos los reactivos y el equipo como material biológicamente peligroso. Deshacerse de los desechos observando todas las normativas locales, regionales y nacionales. Consultar la Hoja de datos de seguridad del material para obtener cualquier información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

Declaración de riesgos y seguridad (EE.UU.)

Las soluciones HISTOPAQUE®-1077-1 son PERJUDICIALES. Pueden causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. Llevar ropa protectora adecuada. Órgano al que afectan: la sangre.

Declaración de riesgos y seguridad (U.E.)

Las soluciones HISTOPAQUE®-1077-1 son PERJUDICIALES. Pueden causar sensibilización por inhalación y contacto con la piel. No inhalar los vapores. Usar ropa y guantes protectores adecuados. En caso de accidente o de malestar, buscar atención médica inmediatamente (mostrar la etiqueta si es posible).

PROCEDIMIENTO

RECOGIDA DE LA MUESTRA:

Se recomienda que la recogida de la muestra se lleve a cabo de acuerdo con las directrices del documento M29-A2 de la NCCLS. Ningún método de prueba puede garantizar la completa seguridad de que las muestras de sangre o tejido no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Recoger la sangre venosa en heparina o EDTA sin conservantes. Para obtener óptimos resultados, la sangre debe procesarse dentro de las 2 horas. Ver las Notas 2 y 3 de la sección "Limitaciones del procedimiento" para obtener información adicional sobre estabilidad.

MATERIAL ESPECIAL NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO:

Centrífuga (rotor con cubeta oscilante) capaz de generar 400 x g

Solución salina isotónica tamponada con fosfato o medio de cultivo de tejidos apropiado

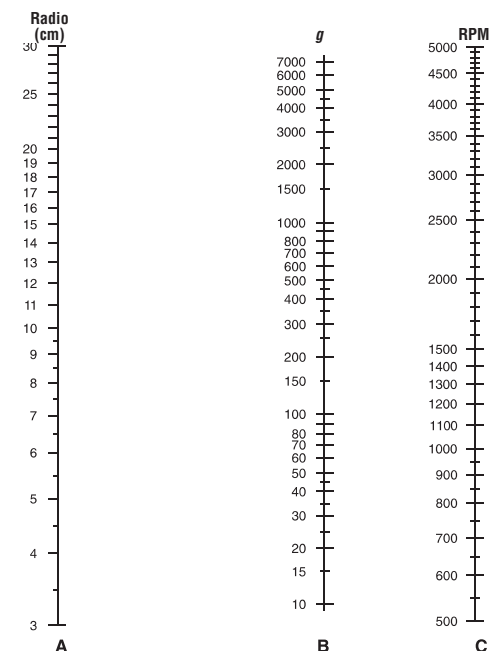
Tubos de centrífuga cónicos de 15 ml, de plástico

NOTAS:

1. Pueden usarse tubos de centrífuga de 50 ml. Modificar el procedimiento indicado utilizando 15 ml de HISTOPAQUE®-1077-1 y 15 ml de sangre total o diluida.
2. En algunas ocasiones puede ser necesario diluir la sangre a 1:2 o a 1:4, según el número absoluto de células. Existe la posibilidad de sobrecargar el gradiente.
3. Evitar el uso de guantes empolvados. El polvo de los guantes activará los monocitos y provocará resultados más bajos.
4. Evitar el uso de plásticos con alto poder de fijación, tales como el poliestireno. El poliestireno puede fijar las células a las paredes de los tubos de la centrífuga.
5. Pueden utilizarse otros anticoagulantes, pero teniendo en cuenta que algunos pueden afectar a la recogida de las células. A medida que la sangre envejece, desciende la recogida de las células.
6. El procedimiento describe la separación de células mononucleares utilizando solución salina isotónica tamponada con fosfato como diluyente y líquido de lavado. En muchas circunstancias, se prefieren las soluciones de sales equilibradas, tales como las de Hank, o el medio de cultivo de células, tal como RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino.
7. Puede determinarse la pureza de la población de células obtenida con este procedimiento realizando una tinción de Romanowsky (p.ej., tinción de Wright) en un frotis o en un portaobjetos de citospin con material del paso 10. Puede determinarse la viabilidad mediante tratamiento con azul tripán.
8. Si la viabilidad de las células es <80 %, puede ser útil sustituir la solución salina tamponada con fosfato por un medio de cultivo de tejidos, tal como RPMI 1640 fortificado con suero fetal bovino al 5 % del volumen total de RPMI 1640.
9. Si va a realizarse la enumeración de las células T y B, la sangre sólo puede guardarse unas cuantas horas⁵. La adición de sangre a determinados medios de cultivo de tejidos puede permitir un almacenamiento de hasta 72 horas sin alteración de los valores de las células T o B⁶.
10. Puede utilizarse sangre pre-diluida en este procedimiento. La sangre puede diluirse con solución salina tamponada con fosfato u otro medio apropiado, siendo la proporción recomendada de 1 parte de sangre por 1 parte de medio. Para optimizar la recogida de células mononucleares deberán utilizarse volúmenes iguales de HISTOPAQUE®-1077 y sangre. La dilución es adecuada para muestras con hematocritos por encima de lo normal.
11. La retirada de los excedentes de HISTOPAQUE®-1077 con la banda mononuclear aumenta la contaminación granulocítica procedente de granulocitos residuales que pueden permanecer debajo de la zona de las células mononucleares.

12. La retirada de los excedentes de sobrenadante con la banda mononuclear puede producir la contaminación por proteínas de plasma y plaquetas.
13. El uso de volúmenes de sangre pre-diluida o total que no sean los recomendados puede disminuir la recogida.
14. Para retirar todas las plaquetas contaminantes, puede realizarse un segundo centrifugado con un gradiente de sucrosa del 4 al 20 % extendido sobre HISTOPAQUE®-1077. El gradiente de sucrosa aislará satisfactoriamente las plaquetas, mientras que las células mononucleares penetrarán en la capa de HISTOPAQUE®-1077.
15. Si el sistema ACCUSPIN-HISTOPAQUE®-1077 no se lleva a temperatura ambiente, la recogida de las células mononucleares puede verse limitada.
16. Se recomienda el uso de un paciente "normal" como control para cada proceso.

NOMOGRAMA PARA DETERMINAR LAS FUERZAS CENTRÍFUGAS RELATIVAS:



Puede utilizarse un nomograma para derivar la configuración de RPM de la centrífuga.

Cómo establecer las RPM necesarias para obtener 400 x g en el procedimiento número 1077.

1. Medir el radio (cm) desde el centro del eje de la centrífuga hasta el final del portatubos. Marcar este valor en la escala A.
2. Marcar la fuerza centrífuga relativa (p.ej., 400) en la escala B.
3. Con una regla, trazar una línea recta entre los puntos de las columnas A y B, extendiéndola hasta intersectar la columna C. La lectura de la columna C es la configuración de RPM de la centrífuga.

PROCEDIMIENTO:

1. Poner 3,0 ml de HISTOPAQUE®-1077 en un tubo de centrífuga cónico de 15 ml, y llevarlo a temperatura ambiente.
2. Extender con cuidado 3,0 ml de sangre total en HISTOPAQUE®-1077. Centrifugar a 400 x g durante exactamente 30 minutos, a temperatura ambiente. El centrifugado a temperaturas más bajas, como a 4 °C, puede producir la coagulación de las células y una recogida escasa.
3. Después del centrifugado, aspirar con cuidado, con una pipeta de Pasteur, la capa superior hasta 0,5 cm de la zona opaca que contiene las células mononucleares. Desechar la capa superior.
4. Transferir con cuidado la zona opaca, con una pipeta de Pasteur, a un tubo de centrífuga cónico limpio.

REFERENCIAS

1. Boyum A: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest 21 (Suppl 97):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

HISTOPAQUE es marca registrada de Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO EE.UU.

Sigma-Aldrich, Inc. garantiza que sus productos concuerdan con la información contenida en ésta y otras publicaciones de Sigma-Aldrich. El comprador debe determinar la idoneidad de los productos para su uso particular. Es posible que deban aplicarse términos y condiciones adicionales. En el reverso de la factura o del albarán se incluyen los términos adicionales y las condiciones de venta.

Procedimiento número 1077

Revisión anterior: 2003-02

Revisión: 2003-09

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los eritrocitos y granulocitos deberán acumularse en el fondo del tubo de la centrifuga. Las células mononucleares deberán formar una banda en la zona entre HISTOPAQUE®-1077 y el plasma.

En un estudio comparativo, 42 muestras de sangre heparinizada apareadas se aislaron simultáneamente en HISTOPAQUE®-1077 de Sigma-Aldrich y en un producto de la competencia, siguiendo los procedimientos respectivos. La recogida de linfocitos se calculó con el número inicial extendido en los gradientes, comparándolo con el número que aparecía en la zona entre el gradiente y el plasma. Se utilizó la exclusión con azul tripán para evaluar la viabilidad de las células. Los dos productos dieron resultados parecidos, tal como se muestra en los datos siguientes:

	Linfocitos en zona plasma-gradiente	Recogida de linfocitos	Viabilidad (azul tripán)
HISTOPAQUE®-1077	84 ± 14 %	68 ± 13 %	98 ± 4 %
Producto de la competencia	83 ± 14 %	60 ± 13 %	98 ± 4 %

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio Técnico de Sigma-Aldrich.

SIGMA-ALDRICH, INC.

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

Servicio Técnico: a cobro revertido al +1 314 771 3122

o por correo electrónico a clintech@sial.com

Para pedidos: a cobro revertido al +1 314 771 5750

www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH

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