

DESCRIPTION DU PRODUIT

Le Lymphoprep™ est une solution prête à l'emploi, stérile et testée en endotoxines pour l'isolement de solutions pures en lymphocytes.

La solution contient du diatrizoate de sodium et des polysaccharides dans les concentrations suivantes:

Diatrizoate de sodium	9.1% (p/v)
Polysaccharides	5.7% (p/v)
Caractéristiques physico-chimiques :	
Densité	1.077 ± 0.001 g/ml
Osmolarité	290 ± 15 mOsm

PRINCIPE DE SÉPARATION

La technique la plus commune pour séparer les leucocytes est de mélanger le sang avec un composé qui agrège les érythrocytes, augmentant ainsi leur taux de sédimentation. La sédimentation des leucocytes est très peu affectée et il est possible de les récupérer dans la partie supérieure du tube alors que les érythrocytes ont sédimenté.

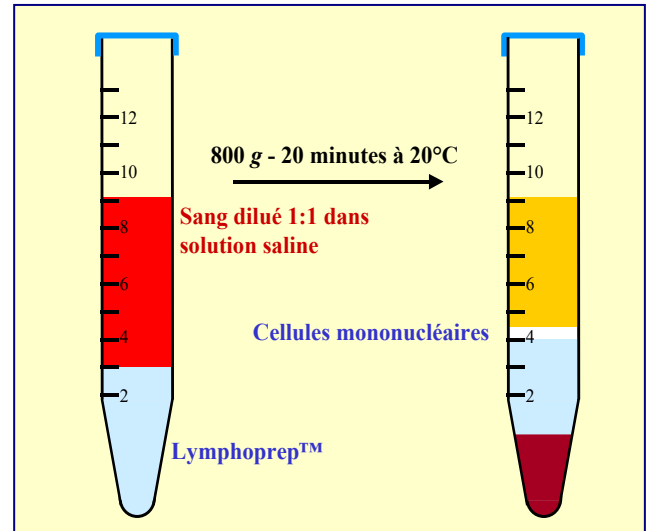
En utilisant un mélange de sodium metrizoate (Isopaque) et de Ficoll®, A. Bøyum (1968) a développé une technique en une seule étape avec centrifugation pour l'isolement de lymphocytes. Thorsby et Bratlie (1970) ont utilisé cette technique présentant de très légères modifications dans la préparation de la suspension de lymphocytes pure pour des tests de cytotoxicité et des cultures de lymphocytes. Comme souligné par d'autres auteurs, Harris et Ukayiofo (1969), Ting et Morris (1971), c'est une méthode fiable, simple et rapide appropriée pour la réalisation de préparations de lymphocytes à partir de sang de cadavre, et à partir de sang anti-coagulé conservé à température ambiante pendant une durée maximale de 6 heures.

STABILITÉ ET STOCKAGE

Le Lymphoprep™ est stable pendant 3 ans si la solution est stockée dans des conditions stériles et à l'abri des rayons du soleil. Une exposition directe et prolongée aux rayons du soleil conduit à la libération d'iode par la molécule de diatrizoate de sodium. Cet effet est négligeable lorsque l'on travaille avec cette solution dans la journée. Le Lymphoprep™ doit être conservé à température ambiante.

PROTOCOLE DE SÉPARATION (voir la figure)

1. Collecter le sang dans un tube contenant de l'anticoagulant (EDTA, héparine, ACD) ou utiliser du sang défibriné.
2. Diluer le sang par addition d'un volume équivalent de solution de NaCl 0.9%.
3. Superposer soigneusement 6 ml de sang dilué sur 3ml de Lymphoprep™ dans un tube à centrifuger de 12 à 15 mm. Le Lymphoprep™ peut également être sous-couché. Éviter de mélanger le sang et le liquide de séparation. Boucher le tube pour empêcher la formation d'aérosols.
4. Centrifuger à 800g pendant 20 minutes à température ambiante (20°C). Si le sang a été stocké plus de 2 heures, augmenter le temps de centrifugation à 30 minutes.
5. Après centrifugation, les cellules mononucléaires forment une couche distincte dans l'échantillon comme indiqué dans le schéma. Il est plus efficace de récupérer les cellules à l'aide d'une pipette Pasteur sans enlever la couche supérieure du tube.
6. Diluer la fraction récoltée avec 0,9% de NaCl ou de milieu pour réduire la densité de la solution, et sédimenter les cellules par centrifugation pendant 10 minutes à 250 g.



PURETE ET VIABILITE

La méthode décrite est rapide, simple, fiable, et donne d'excellents résultats avec des échantillons de sang provenant de la plupart des individus normaux et de patients. La technique peut également être utilisée pour la préparation de suspensions de lymphocytes pour des tests de culture de lymphocytes mixtes.

La présence d'érythrocytes dans la suspension de lymphocytes est habituellement comprise entre 1 à 5% du nombre total de cellules. Des granulocytes immatures peuvent suivre les lymphocytes lors d'un traitement intense par immunosuppresseurs.

Lorsque du sang avec héparine est utilisé, il est essentiel d'éliminer la plupart des plaquettes afin d'éviter l'inhibition dans des tests de cytotoxicité. La procédure de lavage décrite est généralement suffisante.

REFERENCES

- Bøyum, A. (1968): Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97.
- Favour, C.B. (1964): Antigen-antibody reactions in tissue culture. Immunological Methods, ed. J.R. Ackroyd, pp. 195-223. Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Harris, R. & Ukayiofo, E.V. (1969): Rapid preparation for lymphocytes for tissue typing. Lancet 327, 7615.
- Ting, A. & Morris, P.J. (1971): A technique for lymphocyte preparation from stored heparinized blood. Vox Sang. 20, 561.
- Thorsby, E. & Bratlie, A. (1970): A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. Histocompatibility Testing 1970, ed. P.I. Terasaki, p. 655 Munksgaard, Copenhagen.

PRODUITS

Lymphoprep™ Cat. no. 1114545	4 x 250 ml
Lymphoprep™ Cat. no. 1114547	6 x 500 ml
Lymphoprep™ Cat. no. 1116507	10 x 250 ml
Lymphoprep™ Cat. no. 1116508	10 x 500 ml

FABRICANT:

Alere Technologies AS
P.O. Box 6863 Rodeløkka
N-0504 Oslo, Norway
Phone: +47 24 05 60 00
Fax: +47 24 05 60 10
www.optiprep.com

ISO 13485 certified company