

Test de compétence : Consignes d'usage pour les échantillons congelés

Renseignements pour commander

N° de catalogue #100-0926/100-0928 1 Trousse (Moelle osseuse congelée) OU N° de catalogue #100-0950/100-0952 1 Trousse (Sang de cordon congelée)
#100-0927/100-0929 Trousses supplémentaires #100-0951/100-0953 Trousses supplémentaires

Renseignements sur les composants

NOM DU COMPOSANT	N° DU COMPOSANT	FORMAT	ÉTAT À LA RÉCEPTION	CONDITIONS DE STOCKAGE
Cellules mononucléées de moelle osseuse humaine, congelées OU Cellules mononucléées de sang de cordon humain, congelées	00309 OU 00312	1 mL	Congelé, en carboglace OU azote liquide	Stocker à -135°C ou plus froid.
MethoCult™ GF	04050	5 mL	Congelé, en carboglace	Stocker à -20°C.
Iscove's MDM avec 2% FBS	100-1357	100 mL	Congelé, en carboglace	Stocker à -20°C.
Consommables plastiques	00620	1 trousse	Température ambiante	Stocker à la température ambiante (15 - 25°C).
Lettre, informations spécifiques à la session (Moelle osseuse humaine congelée) OU Lettre, informations spécifiques à la session (Sang de cordon humain congelé)	N/A	1 lettre	Température ambiante	Non applicable.

Procédure

Vérifier que tout le matériel soit arrivé selon l'État à la réception tel que décrit dans le tableau ci-dessus. Toute dérogation à ces conditions de transport doit être immédiatement signalée au Support scientifique (1.800.667.0322 ou techsupport@stemcell.com). Commencer le Test de compétence immédiatement après avoir reçu la trousse afin de pouvoir soumettre vos données dans les délais indiqués, de façon à ce qu'elles soient incluses dans l'analyse collective. Pour obtenir des instructions détaillées sur la préparation et la mise en culture des cellules hématopoïétiques humaines, référez-vous au Manuel technique : Human Colony-Forming Unit (CFU) Assays Using MethoCult™, disponible sur le site internet www.stemcell.com.

Partie 1 – Préparation des cellules

DÉFINITIONS

Solution mère : Échantillon de cellules mononucléées lavées dans l'Iscove's MDM avec 2% FBS.

Concentration de cellules viables : Concentration de cellules nucléées de la **Solution mère** multipliée par le **% de viabilité**.

Densité d'ensemencement 10X : Concentration cellulaire permettant la mise en culture des cellules viables à une concentration prédéterminée. Référez-vous à la lettre d'information spécifique à la session, incluse dans la trousse du Test de compétence. La **Solution mère** diluée dans l'Iscove's MDM avec 2% FBS égale à dix fois la **Densité d'ensemencement finale**.

Densité d'ensemencement finale : Nombre de cellules viables ensemencées par volume de milieu de culture semi-solide par puits.

COMPTAGE CELLULAIRE

REMARQUE : Décongeler les milieux MethoCult™ et Iscove's MDM avec 2% FBS à la température ambiante (15 - 25°C) ou à 2 - 8°C pendant la nuit précédant la mise en place du test. Amener les milieux à la température ambiante avant utilisation.

Viser à compléter la procédure, y compris la préparation de cellules et l'ensemencement, en moins d'une heure. Les procédures de comptage des cellules décrites aux étapes 8 - 9 ne sont que des suggestions. Utiliser les procédures qui ont été validées dans votre institution.

- Décongeler rapidement les cellules (environ 2 minutes) dans un bain-marie à 37°C. Lorsque les cellules sont presque entièrement décongelées, nettoyer le cryotube avec de l'éthanol à 70% ou de l'isopropanol à 70%.
- Transférer doucement les cellules dans un tube de polystyrène ou de polyéthylène téréphtalate de 15 mL.
- Ajouter lentement (goutte à goutte) 10 mL d'Iscove's MDM avec 2% FBS tout en remuant doucement le tube (environ 1 minute). Mélanger en renversant délicatement le tube à plusieurs reprises. Ne pas vortexer.
- Centrifuger à 300 x g pendant 10 minutes avec le frein activé, à la température ambiante (15 - 25°C). Éliminer doucement le surnageant à l'aide d'une pipette sérologique en prenant garde de ne pas déloger le culot. Ne pas verser le surnageant.

5. Resuspendre le culot en tapotant doucement le tube dans le milieu restant.
6. Ajouter 2 mL d'Iscove's MDM avec 2% FBS et mesurer le volume total en mL. Noter le **Volume de cellules** à la Partie 1, Ligne A.
7. À l'aide d'une pipette sérologique, mélanger doucement la **Solution mère**.
8. Compter le nombre de cellules nucléées de la **Solution mère**. Nous vous suggérons une procédure utilisant l'acide acétique à 3%, décrite dans la section 8.1 du Manuel technique (Document #28404). Reporter le résultat comme la **Concentration de cellules nucléées** en 10^6 cellules/mL à la Partie 1, Ligne B.

REMARQUE : Ne pas multiplier cette concentration cellulaire par le volume total pour ce champ.

9. Calculer le nombre de cellules viables de la **Solution mère**. Nous vous suggérons une procédure utilisant le bleu de trypan, décrite dans la section 8.2 du Manuel technique (Document #28404). Reporter le nombre de cellules viables (cellules non colorées) et le nombre de cellules mortes (cellules colorées) de la **Solution mère** et calculer le **% de viabilité** en utilisant la formule suivante. Enregistrer le résultat à la Partie 1, Ligne C.

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{nombre de cellules viables}}{(\text{nombre de cellules viables} + \text{nombre de cellules mortes})} \times 100\%$$

DILUTION DE LA SOLUTION MÈRE

Les étapes suivantes décrivent comment diluer la Solution mère afin de préparer la **Densité d'ensemencement 10X**, elle-même diluée 10 fois dans MethoCult™ pour générer la **Densité d'ensemencement finale**.

10. Utiliser la formule suivante pour calculer la **Concentration de cellules viables** de la **Solution mère** :

$$\text{Concentration de cellules viables} = \frac{\text{Concentration de cellules nucléées (Partie 1, Ligne B)}}{\text{Concentration de cellules viables (calculée à l'étape 10 [cellules/mL])}} \times \text{\% de viabilité (Partie 1, Ligne C)}$$

11. Utiliser les formules suivantes pour calculer le **Volume de solution mère** et le **Volume d'Iscove's MDM avec 2% FBS** nécessaires pour faire 1 mL de **Densité d'ensemencement 10X** :

$$\text{Volume de Solution mère (mL)} = \frac{\text{Densité d'ensemencement 10X (Référez-vous à la lettre d'information spécifique à la session [cellules/mL])} \times 1 \text{ mL}}{\text{Concentration de cellules viables (calculée à l'étape 10 [cellules/mL])}}$$

$$\text{Volume d'Iscove's MDM avec 2\% FBS (mL)} = (1 \text{ mL}) - (\text{Volume de Solution mère [mL]})$$

12. Mélanger doucement le volume de **Solution mère** au volume d'Iscove's MDM avec 2% FBS calculés à l'étape 11 afin de préparer la **Densité d'ensemencement 10X**.

ENSEMENCEMENT DES CELLULES

13. Préparer la **Densité d'ensemencement finale** en ajoutant 0,5 mL de la **Densité d'ensemencement 10X** au tube de 5 mL de MethoCult™ et vortexer vigoureusement pendant au moins 4 secondes. Laisser reposer au moins 5 minutes.
14. En utilisant la seringue et l'aiguille à bout franc fournies, déposer 1,1 mL de la **Densité d'ensemencement finale** dans chacune des 4 boîtes de culture de 35 mm. Référez-vous au Manuel technique (Document #28404) pour plus d'information concernant la façon de manipuler le MethoCult™ avec une seringue.

REMARQUE : L'analyse statistique requiert l'entrée de données des 4 puits répliques.

15. Mettre un couvercle sur chaque boîte de Pétri et incliner délicatement chacune dans un mouvement circulaire afin de répandre le milieu sur toute la surface de la boîte.
16. Placer 2 boîtes de culture de 35 mm contenant la **Densité d'ensemencement finale** dans chacune des boîtes de culture de 100 mm. Ajouter une troisième boîte de culture de 35 mm contenant de l'eau stérile (sans couvercle) dans chacune des boîtes de 100 mm pour assurer une bonne humidité. Mettre un couvercle sur les 2 boîtes de 100 mm. Des boîtes de culture de 35 mm supplémentaires sont fournies.
17. Incuber à 37°C, 5% CO₂, humidité ≥ 95% pendant 14 jours.

Partie 2 – Comptage des colonies

Compter le nombre de colonies après 14 jours de culture et reporter le résultat à la page 3 (Partie 2 – Résultats de comptage des colonies). Entrer N/A pour les valeurs non rapportées. Les champs laissés vides seront interprétés comme valeurs non rapportées. Entrer 0 pour indiquer l'absence de colonies.

Si vous avez besoin d'assistance pour l'identification des colonies, référez-vous à l'atlas des colonies hématopoïétiques humaines (Document #28700 [pour moelle osseuse]) ou à l'atlas des colonies hématopoïétiques du sang de cordon (Document #29940), disponible au format PDF sous "Matériel pédagogique" sur la page Web des tests de compétence.

REMARQUE : L'analyse statistique requiert l'entrée de données des 4 puits répliques. Des valeurs non rapportées pour l'un et/ou l'autre des paramètres empêcheront ce(s) paramètre(s) d'être inclus dans l'analyse statistique.

Fiche de soumission des résultats

Vous pouvez soumettre vos résultats de trois manières différentes :

- **En ligne**, en complétant le formulaire « Proficiency Testing Data Submission Forms » disponible sur le site internet www.proficiencytesting.com. Prière de bien sélectionner la fiche de soumission des résultats correspondant à la session appropriée.
- **Par courriel**, en complétant ce formulaire et en l'envoyant à l'adresse proficiency@stemcell.com.

Nom : _____

Email : _____

Institution : _____

Numéro de Participant : _____

Partie 1 – Résultats de la préparation des cellules

COMPTAGE CELLULAIRE ET VIABILITÉ		
A	Volume de cellules (mL)	
B*	Concentration de cellules nucléées (10 ⁶ cellules/mL)	
C	% de viabilité	

*Soumettre la concentration cellulaire par mL. Ne pas multiplier la concentration cellulaire par le volume total.

MÉTHODE DE COMPTAGE DES CELLULES								
Méthode (encercler une réponse)	Automatisée				Manuelle			
Colorant/marqueur utilisé	Bleu de Trypan	Acide acétique	7-AAD	AO	PI	AO/PI	Autre	Aucun
Instrument utilisé (pour le méthode automatisée)								

ÉVALUATION DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE								
Méthode (encercler une réponse)	Automatisée				Manuelle			
Colorant/marqueur utilisé	Bleu de Trypan	7-AAD	AO	PI	AO/PI	Autre	Aucun	
Instrument utilisé (pour le méthode automatisée)								

Est-ce que ces méthodes sont utilisées de routine dans votre laboratoire?

Oui	Non
-----	-----

Pour sang de cordon seulement: Pour les méthodes automatisées, tenez-vous compte des globules rouges nucléés?

Oui	Non
-----	-----

Ressources

La vidéo « CFU Assay Instructions for Global Proficiency Testing

Programs » est disponible sur le site internet

www.stemcell.com/proficiencyvideo.

De plus amples informations sont disponibles sur le site internet

www.stemcell.com/technical-resources.html.

Partie 2 – Résultats de comptage des colonies

(A) Si vous identifiez tous les types de colonies, complétez uniquement le premier tableau ci-dessous et laissez les tableaux (B) et (C) vides.

TYPE DE COLONIE	BOÎTE			
	1	2	3	4
CFU-E (Pour moelle osseuse seulement)				
BFU-E				
CFU-GM				
CFU-GEMM				

(B) Pour la moelle osseuse, si vous ne distinguez pas les CFU-E des BFCU-E et reportez uniquement le nombre total de colonies érythroïdes, laissez les champs de CFU-E et BFCU-E vides dans le tableau (A) et complétez le tableau (B) ci-dessous.

Nombre total de colonies érythroïdes				
--------------------------------------	--	--	--	--

(C) Si vous rapportez uniquement le nombre total de colonies, complétez le tableau ci-dessous et laissez les tableaux (A) et (B) vides.

Nombre total de colonies				
--------------------------	--	--	--	--

Partie 3 – Identification des colonies

Identifier les colonies sur les photos A - H de la fiche de soumission des résultats disponible sur le site internet www.proficiencytesting.com.

PHOTO	COLONIE	PHOTO	COLONIE
A		E	
B		F	
C		G	
D		H	

LE SYSTÈME DE GESTION DE LA QUALITÉ DE STEMCELL TECHNOLOGIES INC. EST CERTIFIÉ ISO 13485. LES PRODUITS SONT DESTINÉS UNIQUEMENT À DES FINS DE RECHERCHE ET NE SONT PAS CONÇUS POUR L'USAGE DIAGNOSTIQUE CHEZ L'HUMAIN OU L'ANIMAL SAUF INDICATION CONTRAIRE.

Copyright © 2022 by STEMCELL Technologies Inc. Tous droits réservés, y compris les graphiques et les images. STEMCELL Technologies & Design, STEMCELL Shield Design, Scientists Helping Scientists, et MethoCult sont des marques de commerce de STEMCELL Technologies Canada Inc. Toutes les autres marques de commerce appartiennent à leurs propriétaires respectifs. STEMCELL a déployé tous les efforts raisonnables pour s'assurer que les renseignements fournis par STEMCELL et ses fournisseurs sont corrects; toutefois, la société ne donne aucune garantie ni ne fait aucune déclaration concernant l'exactitude ou l'exhaustivité desdits renseignements.