

Test de compétence : Consignes d'usage pour les échantillons frais de cordon

Renseignements pour commander

N° de catalogue 00606 1 Trousse (Sang de cordon frais)
00607 Trousses supplémentaires

Component Information

NOM DU COMPOSANT	N° DU COMPOSANT	FORMAT	ÉTAT À LA RÉCEPTION	CONDITIONS DE STOCKAGE
Cellules de sang de cordon humain, fraîches	00313	1 mL	Température ambiante	Stocker à la température ambiante (15 - 25°C).
MethoCult™ GF	04050	5 mL	Congelé, en carboglace	Stocker à -20°C.
Iscove's MDM avec 2% FBS	07700	100 mL	Congelé, en carboglace	Stocker à -20°C.
Consommables plastiques	00620	1 trousse	Température ambiante	Stocker à la température ambiante (15 - 25°C).

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™ (Document #28404), disponible sur le site internet www.stemcell.com.

Partie 1 – Préparation des cellules

DÉFINITIONS

Solution mère : L'échantillon cellulaire reçu dans la trousse de test de compétence.

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 aux instructions de STEMCELL Technologies envoyées par courriel le jour de la réception de la trousse pour connaître le volume de solution mère à ajouter au milieu Iscove's MDM avec 2% FBS. 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.

DILUTION OF CELL STOCK

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.

- Ajouter le volume de Solution mère au volume d'Iscove's MDM avec 2% FBS selon les instructions de STEMCELL Technologies envoyées par courriel. Conserver le restant de la solution mère pour le compte cellulaire (voir étapes 8 - 9) et l'énumération CD34+.
- À l'aide d'une pipette sérologique, mélanger doucement la suspension cellulaire à l'aide d'une pipette sérologique (3 ou 4 fois).

ENSEMENCEMENT DES CELLULES

- 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 (voir Figure 1).
- 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.

- 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.

- 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 (voir Figure 2). Mettre un couvercle sur les 2 boîtes de 100 mm. Des boîtes de culture de 35 mm supplémentaires sont fournies.
REMARQUE : Ne pas couvrir la boîte d'eau stérile.
- Incuber à 37°C, 5% CO₂, humidité ≥ 95% pendant 14 jours.



Figure 1. Images des bulles se dissipant après avoir vortexé le tube



Figure 2. Montage des boîtes de 100 mm pour une hydratation optimale

COMPTAGE CELLULAIRE

- Compter le nombre de cellules nucléées du restant de la **Solution mère**. Bien mélanger la Solution mère avant de procéder. Nous vous suggérons une procédure utilisant l'acide acétique à 3%, décrite dans la section 8.1 du Manuel technique (Document #28404). Enregistrer le résultat à la Partie 1, Ligne A.
- 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). Déterminer 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 B.

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

Partie 1 – Résultats de la préparation des cellules

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

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 les méthodes automatisées, tenez-vous compte des globules rouges nucléés?

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

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.
- **Par télécopieur**, en complétant ce formulaire et en l'envoyant au 1.604.877.0704 ou 1.800.567.2899 (Amérique du Nord) ou au +33 4 76 18 99 63 (Europe), à l'attention du Service de l'Éducation.

Nom : _____

Email : _____

Institution : _____

Numéro de Participant : _____

CD34+ Données d'énumération

Cette étape est optionnelle pour les non-membres du NMDP.

CD34+ MÉTHODE D'ÉNUMÉRATION ET RÉSULTATS		
Instrument utilisé (pour l'analyse cytométrique en flux)		
Plate-forme utilisée (encercler une réponse)	Double plate-forme	Plate-forme unique
Méthodologie utilisée (encercler une réponse)	ISHAGE Protocole	Protocole ISHAGE modifié
	Autre (décrire)	
Réactifs (énumérer les anticorps utilisés pour le phénotypage)	CD34+	
	CD45+	
	Autre (par exemple, nom des kits disponibles dans le commerce)	
% CD34+ (bloqués sur les cellules viables)		
% CD45+CD34+ (bloqués sur les cellules viables)		

Partie 2 – Résultats de comptage des colonies

Compter le nombre de colonies après 14 jours de culture et reporter le résultat ci-dessous. 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 du sang de cordon (Document #29940), fournis à chaque institut lors de sa première participation au Test 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.

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

TYPE DE COLONIE	BOÎTE			
	1	2	3	4
BFU-E				
CFU-GM				
CFU-GEMM				

(B) Si vous rapportez uniquement le nombre total de colonies, complétez le tableau ci-dessous et laissez le tableau ci-dessus vide.

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	

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.

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 © 2018 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.