



Test de compétence

Consignes d'usage Pour le programme de sang de cordon humain congelé

Réception de la trousse du Test de compétence (Catalogue #00608/00609)

NUMÉRO DE CATALOGUE #	DESCRIPTION	ÉTAT À LA RÉCEPTION	CONDITIONS DE STOCKAGE
00312	Cellules mononucléées de sang de cordon humain congelé	Congelé, en carboglace	-135°C ou plus froid (ou Azote liquide)
04050	MethoCult™ GF pour le test de compétence	Congelé, en carboglace	-20°C (-25°C à -15°C)
07700	IMDM avec 2% FBS	Congelé, en carboglace	-20°C (-25°C à -15°C)
00620	Consommables plastiques	Température ambiante	Température ambiante (15°C à 25°C)
29116F	Lettre, informations spécifiques à la session	Température ambiante	Nécessaire pour la réalisation du test

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 à notre département du Support scientifique (1-800-667-0322 or techsupport@stemcell.com). Merci de commencer le Test de compétence dès que possible après la réception de la trousse afin de pouvoir soumettre vos données dans les délais indiqués, de façon à ce qu'elles soient incluses dans l'analyse collective. Si vous ne pouvez pas réaliser le test le jour de la réception des produits, merci de conserver le matériel selon les "conditions de stockage" décrites dans le tableau ci-dessus.

Note: Vous trouverez des protocoles détaillés sur la préparation et la mise en culture des cellules hématopoïétiques humaines dans le manuel technique Human CFU Using MethoCult™ (Document #28404), sur notre site internet www.stemcell.com.

Définitions

Solution mère = échantillon de cellules mononucléées lavées et remises en suspension dans la solution d'IMDM + 2% FBS.

Concentration de cellules viables = concentration de cellules nucléées de la solution mère x pourcentage de viabilité.

Densité d'ensemencement 10X = concentration cellulaire permettant la mise en culture des cellules viables, à une concentration prédéterminée. Merci de vous référer à la lettre d'information, spécifique à la session (Document #29116F), incluse dans la trousse du Test de compétence. Concentration de cellules viables de la solution mère diluées dans la solution d'IMDM + 2% FBS égale à 10 fois la densité d'ensemencement finale.

Densité d'ensemencement finale = nombre de cellules viables ensemencées dans le milieu de culture semi-solide ou par puits.

Partie 1 – Préparation des cellules

Comptage cellulaire

Viser à compléter la procédure, y compris la préparation des cellules et l'ensemencement, en moins d'une heure. Assurez vous que le MethoCult™ GF et l'IMDM + 2% FBS aient été décongelés la nuit précédant la mise en place du test. Les procédures de comptage des cellules décrites aux étapes 8-10 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 de 15 mL.
- Ajouter lentement (goutte à goutte) 10 ml d'IMDM + 2 % FBS tout en remuant doucement le tube (environ 1 minute). Mélanger en renversant délicatement le tube. Ne pas vortexer.
- Centrifuger 10 minutes à 300 x g, à température ambiante (15-25°C). Éliminer le surnageant en prenant garde de ne pas déloger le culot.
- Resuspendre le culot en tapotant doucement le tube dans le milieu restant.
- Ajouter 2 ml d'IMDM + 2 % FBS et mesurer le volume total. Notez ce volume (*Partie 1, ligne A*).
- Mélanger doucement la solution mère.
- Procéder au calcul du nombre de cellules nucléées de la solution mère. Nous vous suggérons pour cela une procédure, décrite dans la section 8.1 « Nucleated Cell Count Using 3% Acetic Acid » du manuel technique (Document #28404).
- Reporter ce résultat en concentration de cellules nucléées, en utilisant le

format 10⁶ cellules par mL (*Partie 1, ligne B*). (Merci de ne pas multiplier cette concentration cellulaire par le volume total pour ce champ).

- Procéder au calcul du nombre de cellules viables de la solution mère. Nous vous suggérons pour cela une procédure, décrite dans la section 8.2 « Viable Cell Count Using Trypan Blue Dye Exclusion » du manuel technique (Document #28404). Noter le nombre de cellules viables (cellules non colorées) et le nombre de cellules mortes (cellules colorées) de la solution mère, et calculer le pourcentage de viabilité (%) en utilisant la formule suivante (*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 dix fois dans un milieu de culture semi-solide pour générer la densité d'ensemencement finale.

- Calculer la concentration de cellules viables en utilisant la formule suivante:

$$\text{Concentration de cellules viables (cellules/mL)} = \frac{\text{Concentration de cellules nucléées}}{(\text{Partie 1, ligne B})} \times \% \text{ de viabilité} (\text{Partie 1, ligne C})$$
- Utilisez cette formule pour calculer le volume de solution mère mélangé à l'IMDM + 2% FBS nécessaire pour faire 1 mL de densité d'ensemencement 10X

$$\text{Volume de solution mère (mL)} = \frac{\text{Densité d'ensemencement 10X (Document \#29116F)} \times 1 \text{ mL}}{\text{Concentration de cellules viables (calculée à l'étape 11 (cellules par mL))}} \\ \text{Volume d'IMDM + 2\% FBS (mL)} = (1\text{mL}) - (\text{volume de solution mère (mL)})$$

- Mélanger la solution mère avec l'IMDM + 2% FBS afin de préparer la densité d'ensemencement 10X.

Ensemencement des cellules

- Préparer la densité d'ensemencement finale en ajoutant 0,5mL de la densité d'ensemencement 10X au tube de 5 mL de MethoCult™ GF et **vortexer vigoureusement pendant au moins 4 secondes**. Laisser reposer au moins 5 minutes.
- 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 Pétri de 35 mm. Utiliser une nouvelle seringue et une nouvelle aiguille à bout francs entre chaque duplicata, afin de prévenir toute éventuelle contamination. Veuillez vous référer au manuel technique (Document #28404) pour plus d'information concernant la façon de manipuler le MethoCult™ à l'aide d'une seringue. **Veuillez noter que l'analyse statistique requiert l'entrée de données des 4 puits répliques.**
- Mettre un couvercle sur chaque boîte de Pétri de 35mm et incliner délicatement chacune dans un mouvement circulaire afin de répandre le milieu sur toute la surface de la boîte.
- Placer 2 boîtes de Pétri de 35 mm dans chacune des boîtes de Pétri de 100 mm. Ajouter troisième boîtes de Pétri de 35 mm sans couvercle et contenant de l'eau stérile dans chacune des boîtes de 100 mm pour assurer une bonne humidité.
- Incuber à 37°C, 5% CO₂, humidité >95% pendant 14 jours.



Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

DOCUMENT #29196F | VERSION 4.5.0 | OCT 2016

TOLL-FREE T. 1 800 667 0322 • T. +1 604 877 0713 • TECHSUPPORT@STEMCELL.COM • INFO@STEMCELL.COM
FOR FULL CONTACT DETAILS WORLDWIDE VISIT OUR WEBSITE

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT INTENDED FOR HUMAN OR ANIMAL DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USES.

Test de compétence

Fiche de soumission des résultats

Nom: _____

Email: _____

Institut: _____

Numéro de Participant: _____

Soumission des résultats

Vous pouvez soumettre vos résultats de 3 manières différentes:

- En ligne, en complétant le formulaire « Proficiency Testing Data Submission Forms » disponible sur notre site internet www.proficiencytesting.com. Merci de vous assurer que vous avez sélectionné la fiche de soumission des résultats correspondant à la session « Sang de cordon congelé ». La session est inscrite en haut de chaque fiche de soumission des résultats.
- Par courriel, en complétant ce formulaire et en l'envoyant à l'adresse courriel proficiency@stemcell.com
- Par télécopieur, en complétant ce formulaire et en l'envoyant au +33 4 76 18 99 63 (Europe) ou au 1.604.877.0704 ou sans frais au 1.800.567.2899 (Amérique du Nord), à l'attention du Département Education

Partie 1 – Préparation des cellules

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

*Pour la ligne B s'il vous plaît soumettre la concentration cellulaire par mL. Ne pas multiplier la concentration cellulaire par le volume total.

METHODE DE COMPTAGE CELLULAIRE					
Méthode (encercler la réponse)	Automatisée		Manuelle		
	Colorant/marqueur utilisé (encercler la réponse)	Bleu de Trypan	7AAD	AO	PI
Instrument utilisé (ne s'applique pas aux méthodes manuelles)					

METHODE PERMETTANT L'EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE					
Méthode (encercler la réponse)	Automatisée		Manuelle		
	Colorant/marqueur utilisé (encercler la réponse)	Bleu de Trypan	7AAD	AO	PI
Instrument utilisé (ne s'applique pas aux méthodes manuelles)					

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
-----	-----

Partie 2 – Comptage des colonies

Si vous avez besoin d'assistance pour l'identification des colonies, n'hésitez pas à vous référer à l'atlas des colonies hématopoïétiques humaines (Document #29940). Celui-ci est fourni à chaque participant lors de sa première participation au Test de compétence.

Instructions

Compter et reporter le nombre de colonies pour chaque boîte après 14 jours de culture. Entrer N/A pour les valeurs non reportées. Les champs laissés vides seront interprétés comme valeurs non reportées. Entrer 0 pour indiquer l'absence de colonies.

Note

Veillez noter que l'analyse statistique requiert l'entrée de données des 4 puits répliques. Des valeurs non rapportées pour un paramètre donné excluront ce paramètre de l'analyse statistique.

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

COLONIES	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 (A) vide.

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

Partie 3 - Identification des colonies

Identifier les colonies sur les photos A - H à partir du site internet www.proficiencytesting.com.

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

De plus amples informations sont disponibles sur notre site internet: www.stemcell.com/en/Technical-Resources.