

## Protocolli di separazione di Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) da sangue con anticoagulante

**Dott. Roberto Nardini - IZS Lazio e Toscana, UOC Virologia**



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

I tentativi di isolamento di cellule della linea monocita / macrofago per il progetto LT0917 sono stati effettuati da:

- Milza
- **Sangue periferico**

Per quest'ultimo è stato eseguito adottando ed adattando un protocollo utilizzato con successo sui piccoli ruminanti.



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M.Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

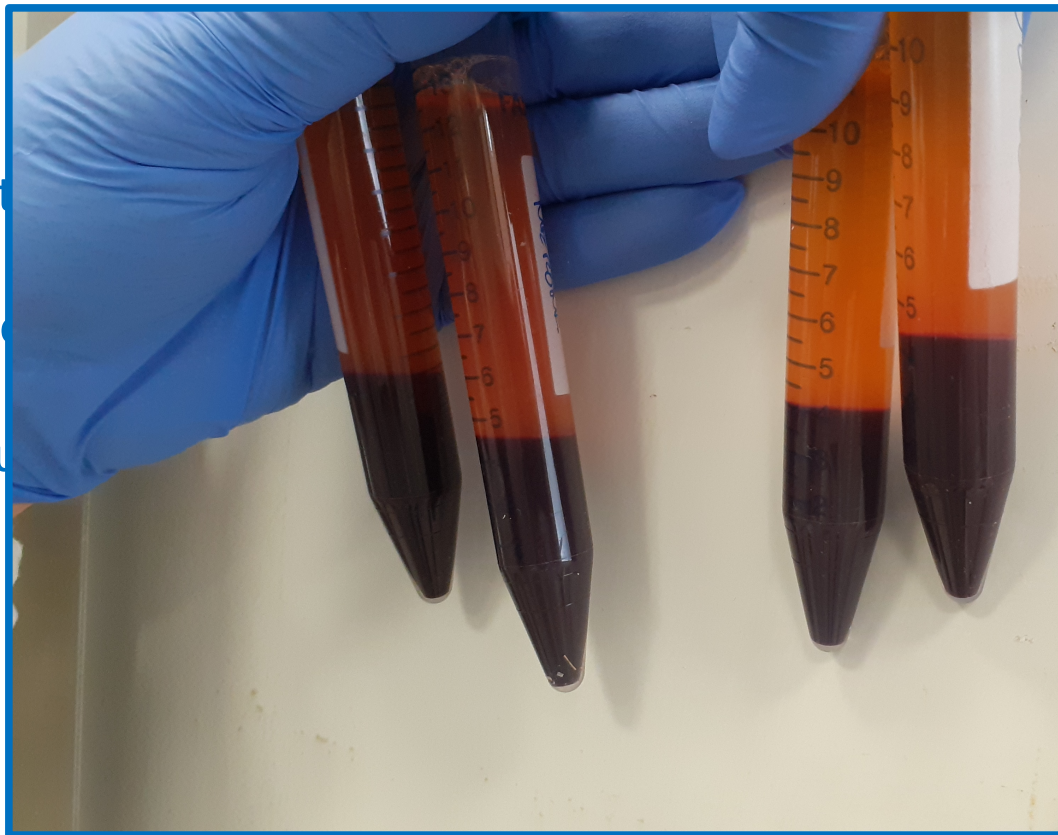
- Allestire per ogni soggetto, almeno una provetta contenente 12 ml di sangue con EDTA in condizioni di sterilità;
- Centrifugare a 115g per 3-5 minuti a temperatura ambiente senza freno;
- Verificare che non si siano depositati i leucociti, in caso contrario agitare gentilmente la provetta e centrifugare nuovamente diminuendo di un minuto il tempo di centrifugazione;



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

no una provetta contenente 12 ml di sangue con



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M.Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

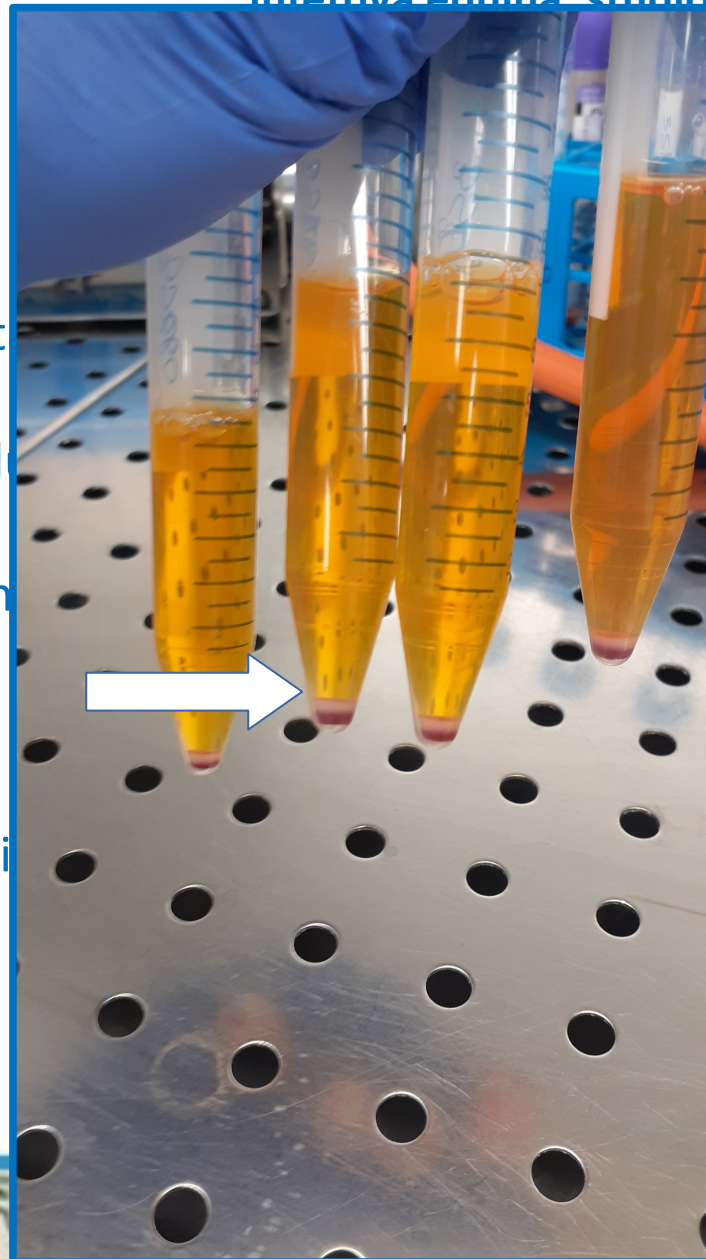
- Raccogliere in sterilità tutto il plasma (in questa fase non è critico se si raccoglie anche un minimo volume di eritrociti) in una nuova provetta
- Centrifugare per 15 minuti 1500g per sedimentare completamente i leucociti;
- Eliminare il plasma lasciandone un volume minimo di circa 0.5 ml facendo attenzione che non si risospendano i leucociti;



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
07 aprile 2022

- Raccogliere in sterilità  
anche un minimo vol
- Centrifugare per 15 m
- Eliminare il plasma  
attenzione che non si



non è critico se si raccoglie  
ovetta  
completamente i leucociti;  
di circa 0.5 ml facendo

# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri

05 e 07 aprile 2022

- Aggiungere circa 0.5 ml di PBS-EDTA e risospendere completamente i leucociti;
- Portare il tutto ad un volume di 4 ml con PBS-EDTA;
- In una nuova provetta preparare 4ml di Histopaque;
- Usando una pipette da 2 ml caricare in più riprese e molto lentamente i leucociti risospesi in PBS-EDTA sul cuscinetto di Histopaque. Fare molta attenzione che la fase del cuscinetto rimanga nettamente separata dalla fase della sospensione caricata e a non creare vortici o agitare le provette;

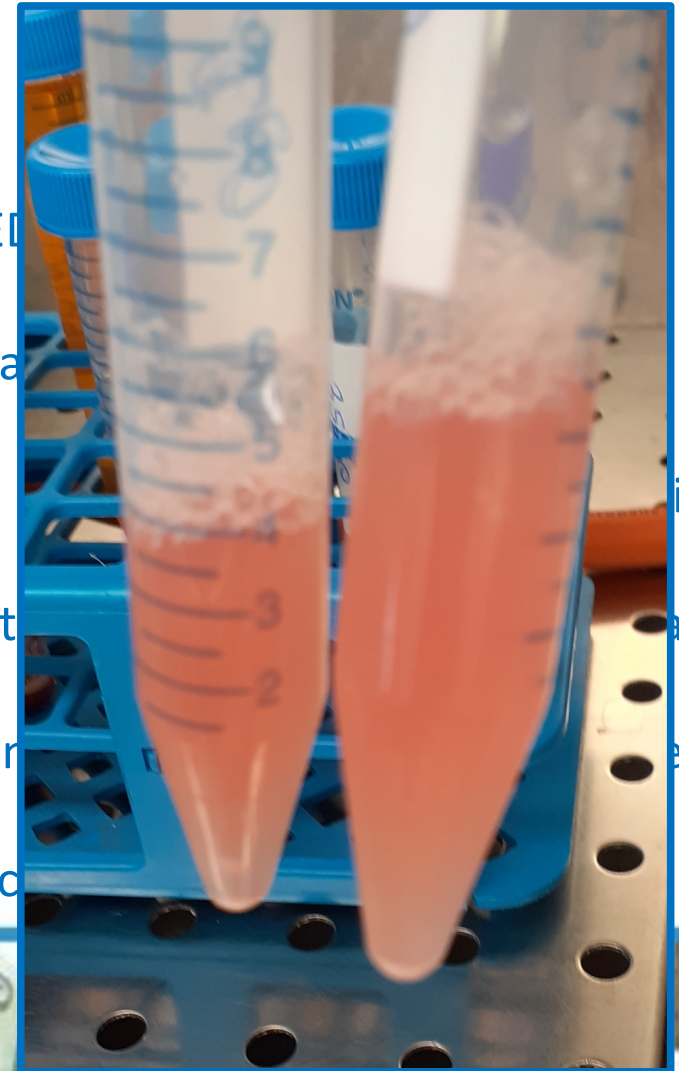
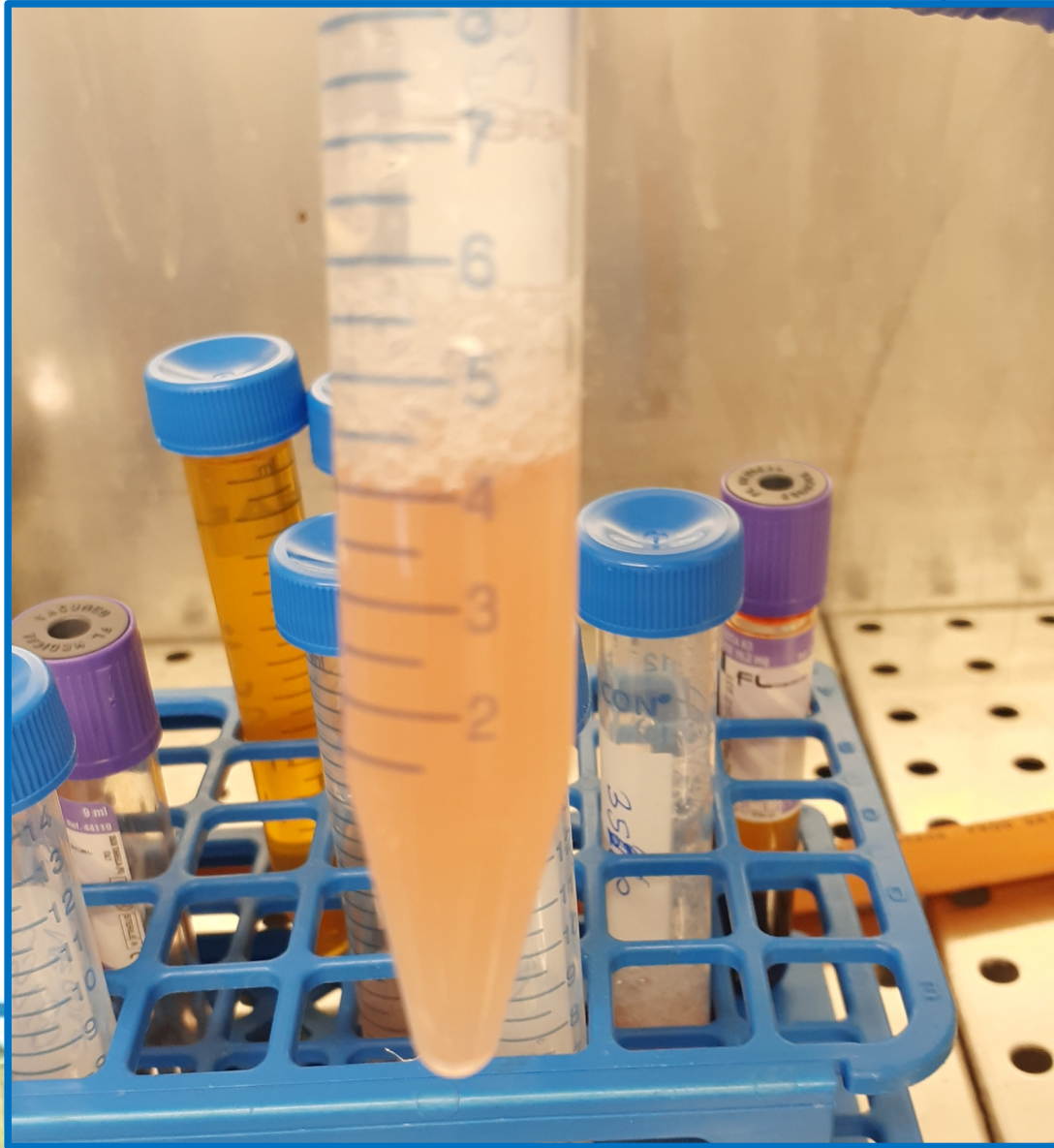


# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri

05 e 07 aprile 2022

rispondere completamente i



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

Istituto Sperimentale del Lazio e della Toscana M.Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

e risospendere completamente i

BS-EDTA;

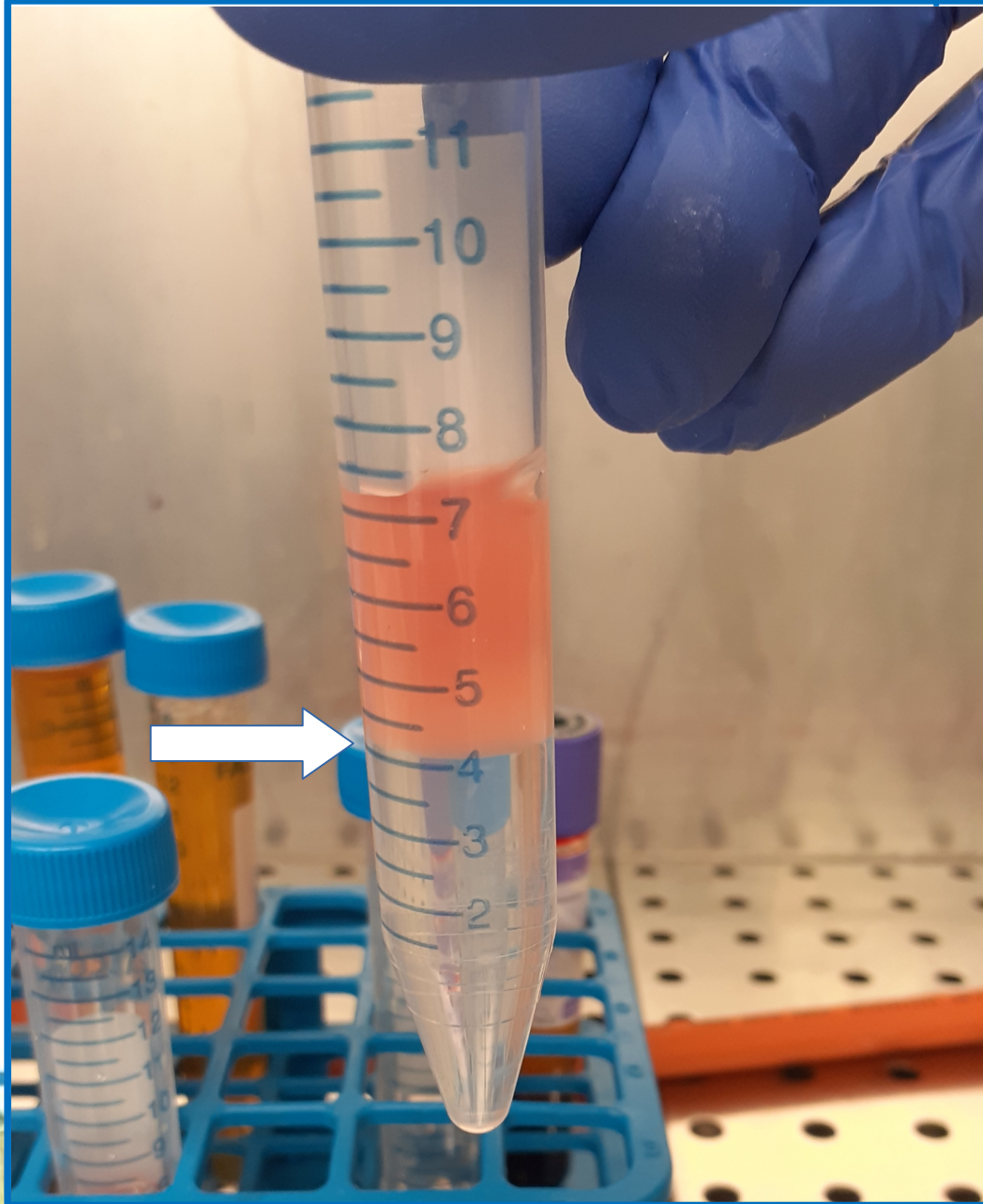
stopaque;

più riprese e molto lentamente i

inetto di Histopaque. Fare molta

nga nettamente separata dalla fase

ortici o agitare le provette;



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

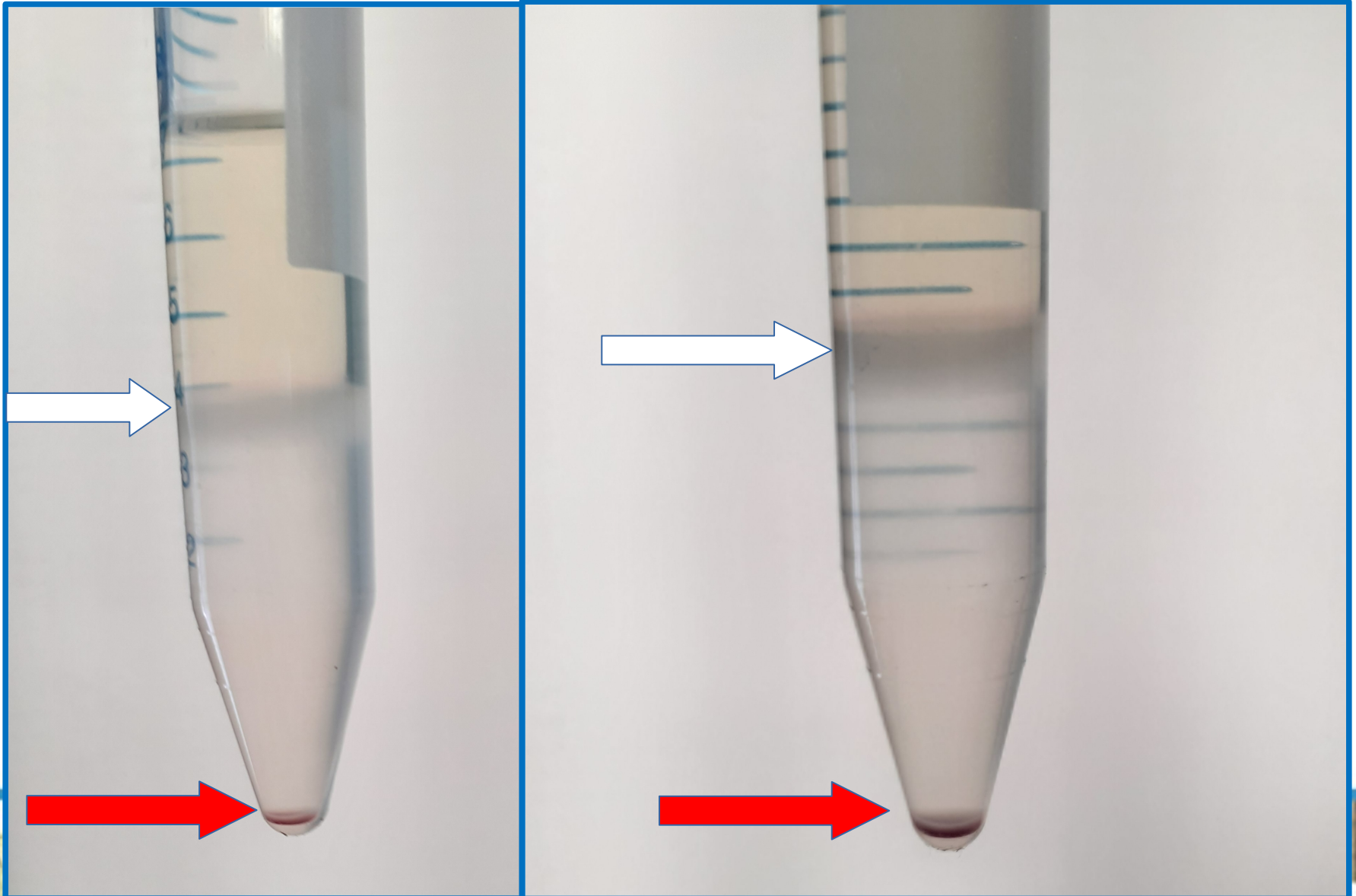
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

- Centrifugare per 30' a 400g a temperatura ambiente senza freno;
- Rimuovere il surnatante fino a 0.5 ml dall'interfaccia opaca che contiene i monociti;
- Raccogliere l'interfaccia contenente i monociti (~ 1ml) in una provetta e aggiungere circa 0.5 ml di PBS-EDTA per risospendere le cellule in maniera omogenea;
- Portare ad un volume di 10 ml con PBS-EDTA;



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri



# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo-mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

- Centrifugare per 10 minuti a 800g a temperatura ambiente;
- Rimuovere il surnatante fino a 0.5 ml e risospendere il pellet in questo volume minimo per assicurarsi la completa risospensione delle cellule.
- Ripetere i punti 13 e 14.
- Eliminare il surnatante fino a 0.5 ml e risospendere il pellet
- Portare ad un volume di 10 ml con terreno di coltura senza siero;



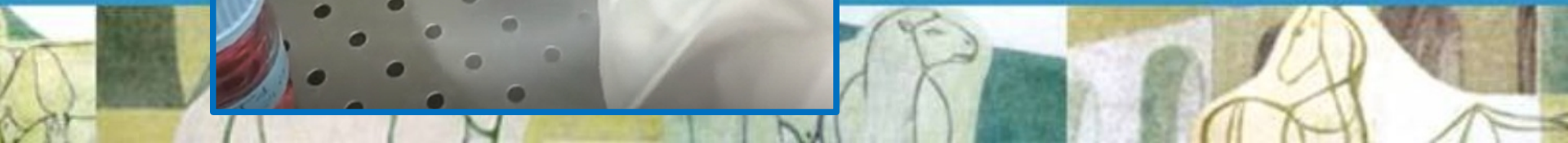
# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

rofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M.Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

- Centrifugare a 300g per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di acqua sterile.
- Questa operazione deve essere ripetuta tre volte per la completa risospensione delle cellule.
- Ripetere l'operazione per ogni campione.
- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di acqua sterile.
- Portare il campione a temperatura ambiente.



- Centrifugare a 300g per 10 minuti a temperatura ambiente;
- Rimuovere il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di acqua sterile.
- Questa operazione deve essere ripetuta tre volte per la completa risospensione delle cellule.
- Ripetere l'operazione per ogni campione.
- Eliminare il surnatante e risospendere il pellet in 1 ml di acqua sterile.
- Portare il campione a temperatura ambiente.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# Corso teorico pratico sull'infezione da virus dell'Anemia infettiva equina: studio in vitro dell'immunità cellulo- mediata"

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana M. Aleandri  
05 e 07 aprile 2022

Grazie

